



## Metabolismo azotato nei lieviti

# L'azoto

L'azoto è un fattore chiave per la moltiplicazione e l'attività fisiologica del lievito.

Il lievito non può utilizzare qualunque fonte di azoto, quello assimilabile è costituito solo da azoto ammoniacale e da amminoacidi.

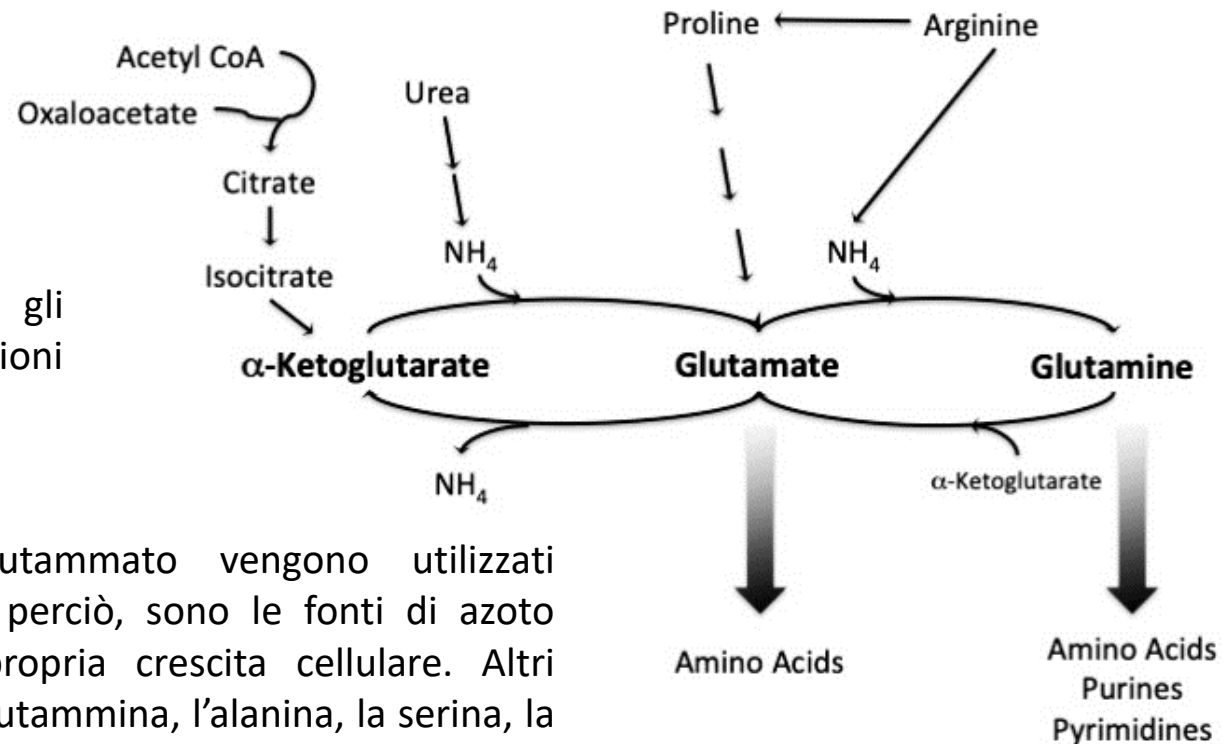
L'azoto assimilato è importante per:

- La moltiplicazione cellulare dove una parte dell'azoto viene incorporato nelle proteine strutturali che servono per le nuove cellule. Nella fermentazione alcolica, l'azoto è necessario per la sintesi delle proteine che trasportano gli zuccheri verso l'interno della cellula per essere trasformati in etanolo. Queste proteine si degradano durante la fermentazione e il lievito ha bisogno di rinnovare tali proteine per completare la fermentazione alcolica.
- La produzione di composti solforati: il lievito preleva e metabolizza lo zolfo aggiunto o presente naturalmente nel mosto (solfati) per produrre amminoacidi solforati che gli serviranno per costruire le proteine.
- La produzione di composti aromatici, la quantità di queste sostanze prodotte durante la fermentazione dipende dalla concentrazione iniziale di azoto assimilabile del mosto.

Il lievito può sintetizzare la maggior parte degli aminoacidi necessari per costruire le proteine cellulari utilizzando lo ione ammonio e gli aminoacidi del mosto.

Il glutammato svolge un ruolo vitale: può servire come donatore di gruppi amminici per produrre diversi aminoacidi.

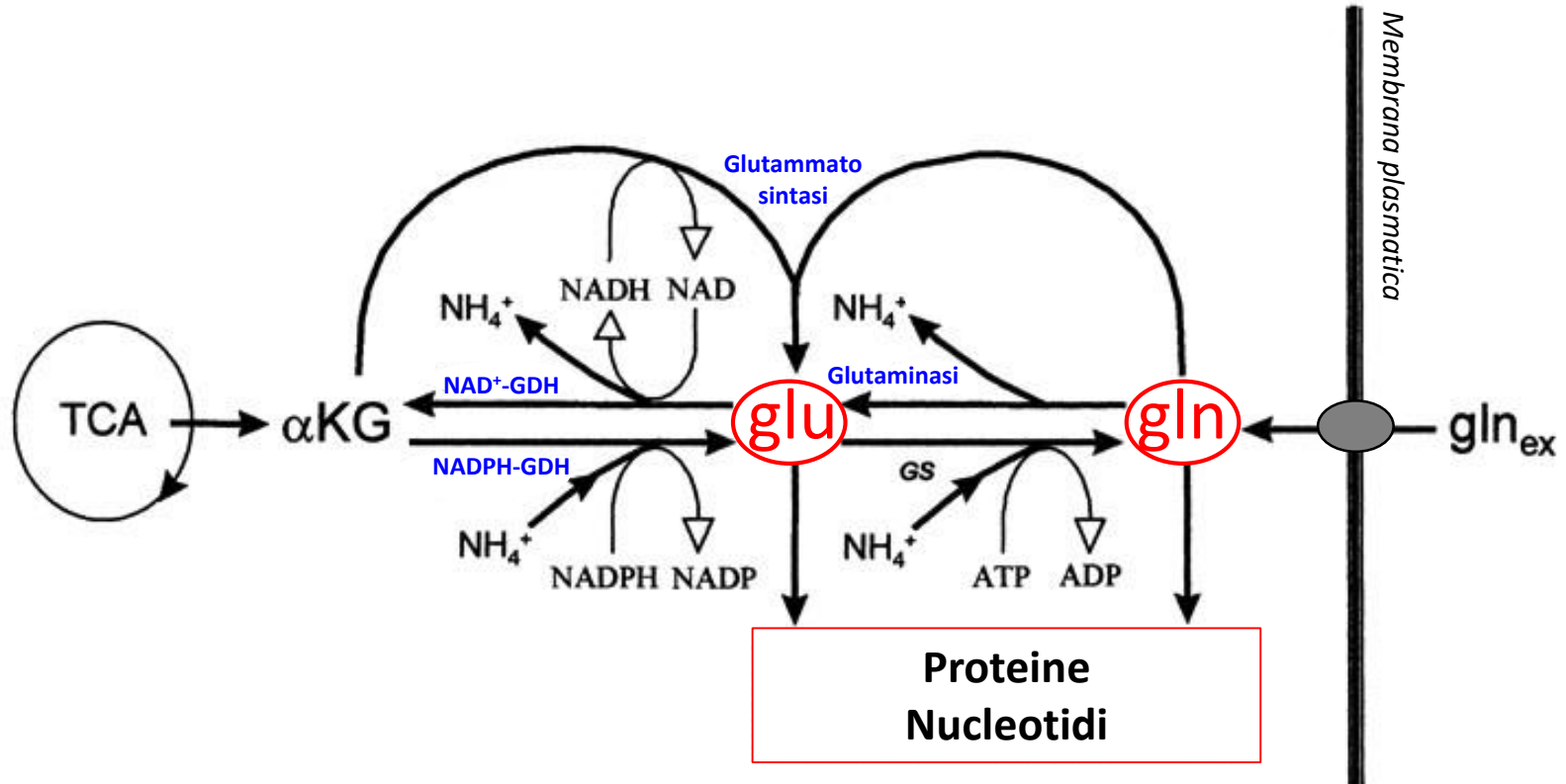
Il lievito può anche degradare gli aminoacidi per ottenere ioni ammonio.



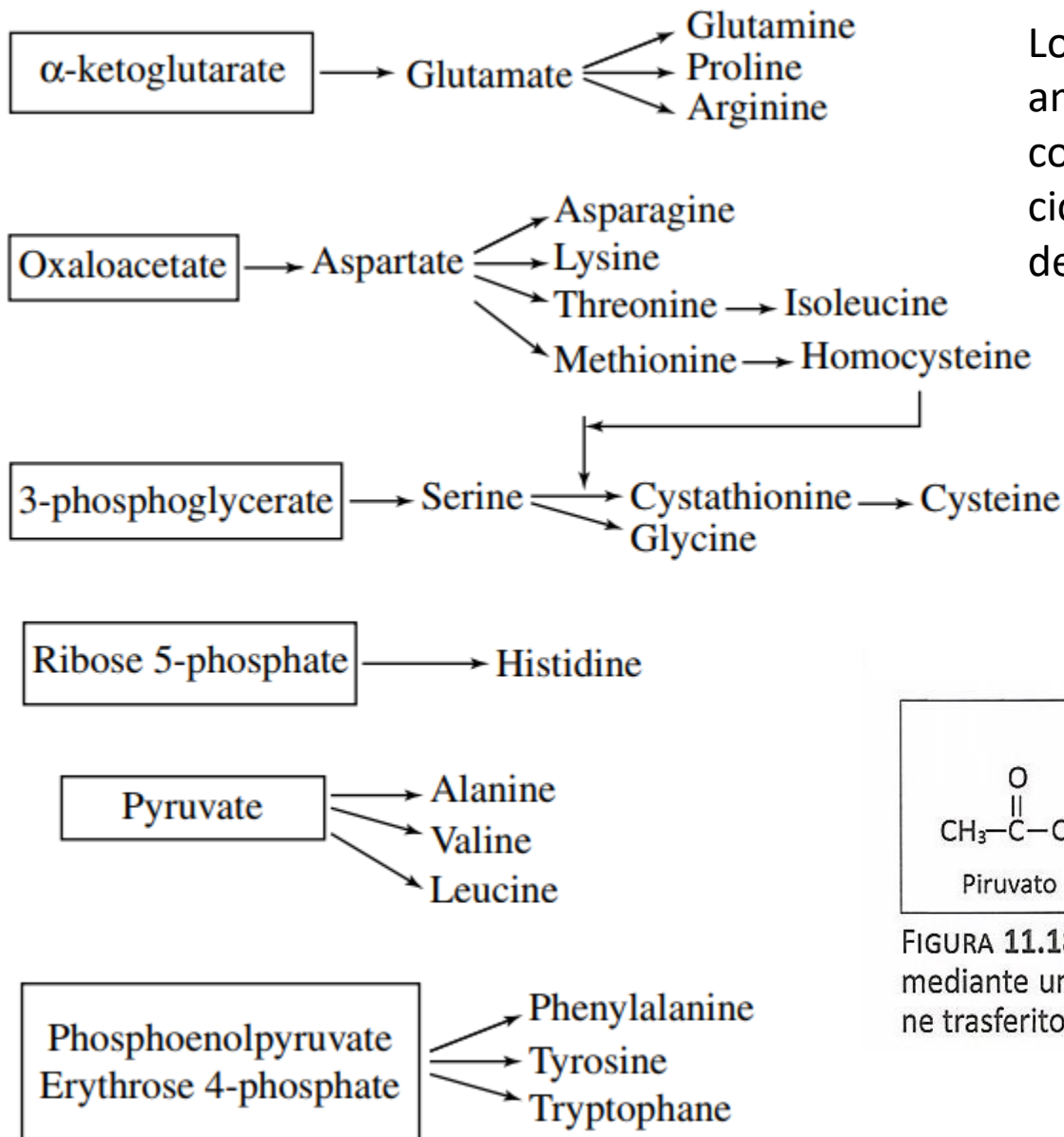
Gli ioni ammonio e il glutammato vengono utilizzati direttamente per la biosintesi perciò, sono le fonti di azoto preferite del lievito per la propria crescita cellulare. Altri composti azotati includono la glutammina, l'alanina, la serina, la treonina, l'aspartato, l'asparagina e l'urea.

Il lievito non può utilizzare la prolina come fonte azotata perché l'assorbimento richiede un enzima ossidasi mitocondriale che in condizioni anaerobiche non funziona. Una parte significativa degli scheletri di aminoacidi che formeranno le proteine nel lievito derivano dagli zuccheri del mosto. Per questo motivo, il contenuto totale di aminoacidi nel mosto è importante per determinare l'entità della crescita cellulare, piuttosto che i diversi tipi di aminoacidi.

# Vie di sintesi: il glutammato e la glutammina giocano un ruolo centrale



L'attività della glutammato deidrogenasi NADP<sup>+</sup> (NADPH-GDH) è massima quando il lievito cresce in un mezzo in cui l'unica fonte d'azoto è l'ammonio, mentre l'attività della glutammato deidrogenasi NAD<sup>+</sup> (NAD<sup>+</sup>-GDH) raggiunge livelli massimi quando la principale fonte d'azoto è il glutammato.



Lo scheletro carbonioso degli amminoacidi proviene dai composti intermedi della glicolisi, ciclo dell'acido citrico o della via dei pentosi fosfato.

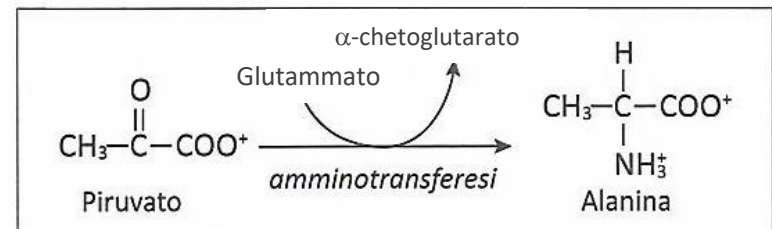


FIGURA 11.18. Sintesi dell'amminoacido alanina (ALA) mediante una reazione di transaminazione in cui viene trasferito il gruppo amminico all'acido piruvico.

**Fig. 2.23.** General biosynthesis pathways of amino acids

## Biosintesi degli amminoacidi

Gli amminoacidi utilizzati per la sintesi di macromolecole sono 20 e sulla base del loro precursore comune possono essere raggruppati in 6 famiglie.

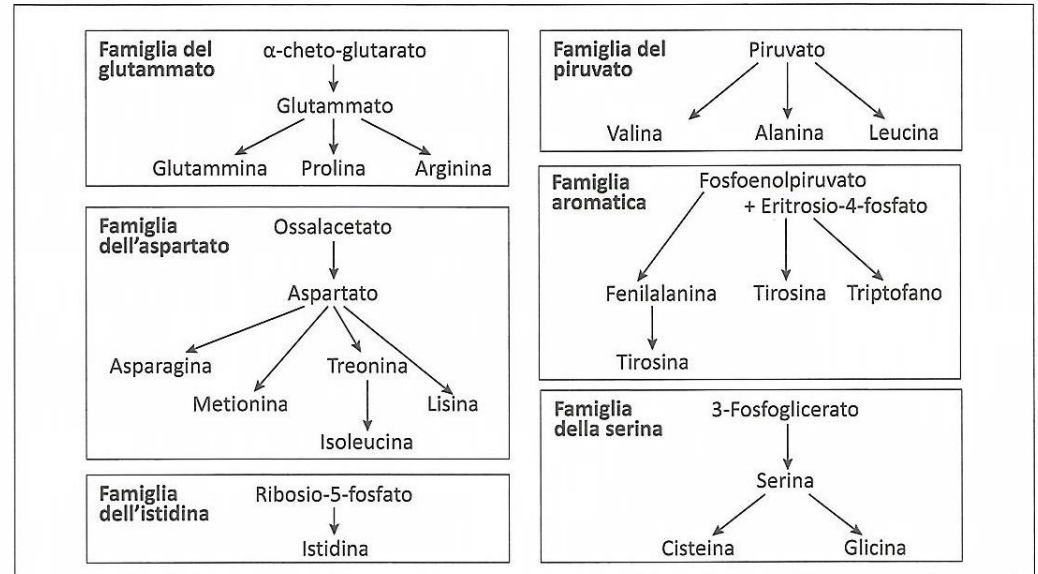


FIGURA 11.17. Le famiglie di amminoacidi.

Richiamando il ruolo anfibolico del ciclo dell'acido citrico, è importante sottolineare come esso, unitamente alle reazioni contigue che coinvolgono Acetil-Coa e l'acido piruvico, abbia una stretta relazione non solamente nella biosintesi degli amminoacidi, ma anche nel loro catabolismo.

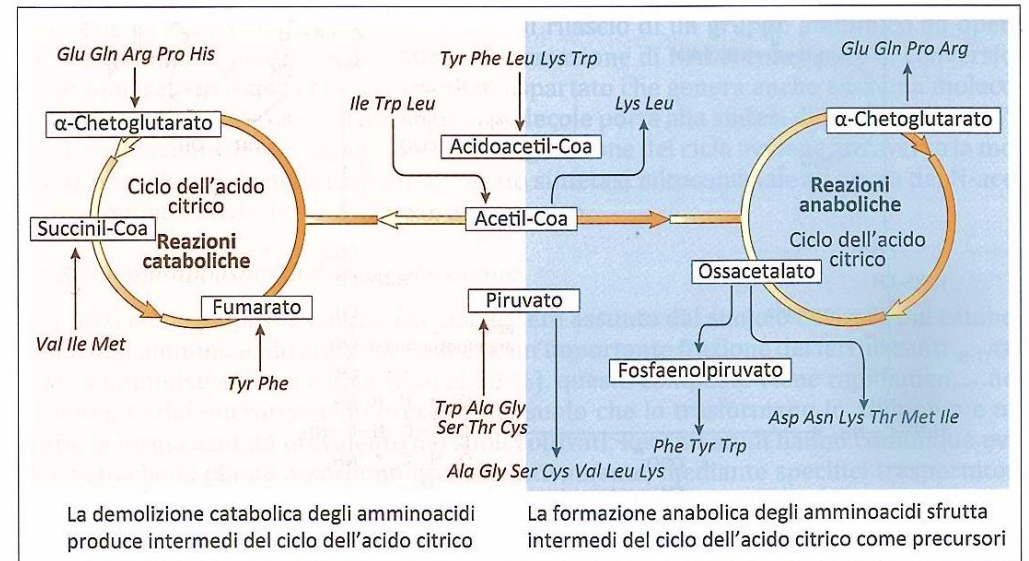
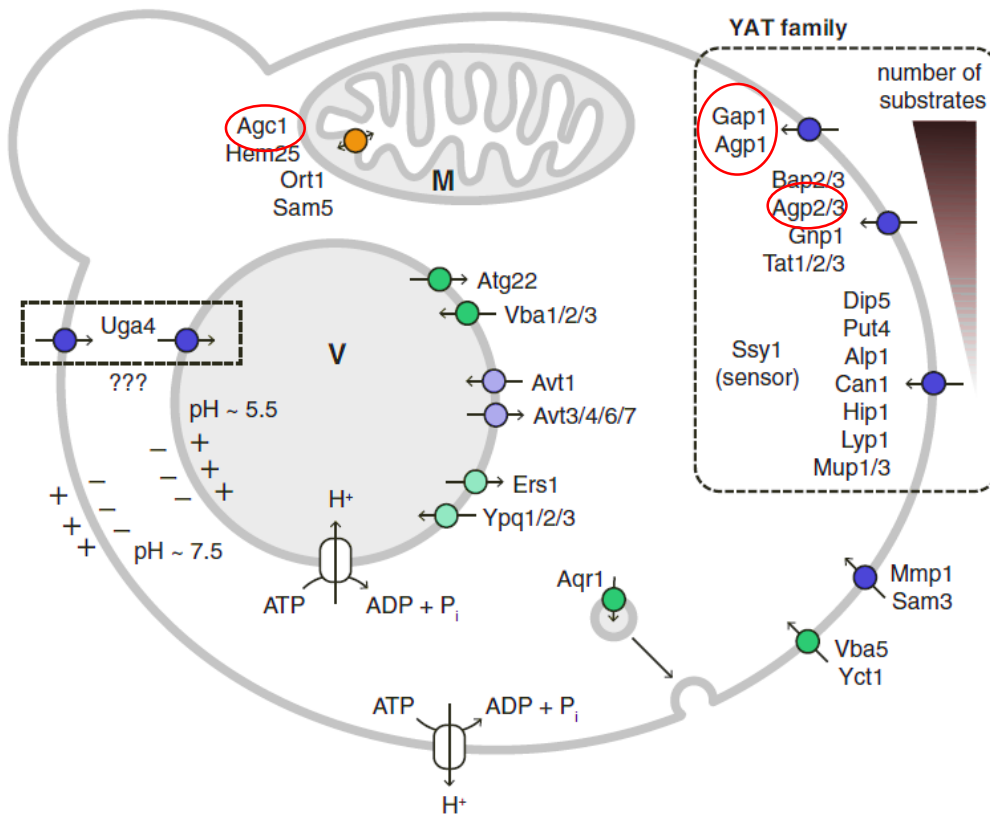


FIGURA 11.19. Relazioni fra metabolismo amminoacidico e ciclo dell'acido citrico.



**Trasportatori di membrana:** Il Gap1 è un aminoacido-permeasi, ha un'elevata affinità per tutti gli aminoacidi.

Il Agp1 importa tutti gli aminoacidi proteici ad eccezione di arginina e lisina. I Agp2/3 importano tutti gli aminoacidi neutri.

Il ruolo più importante dell'Agp2 è quello di fungere da sensore per l'ingresso della carnitina.

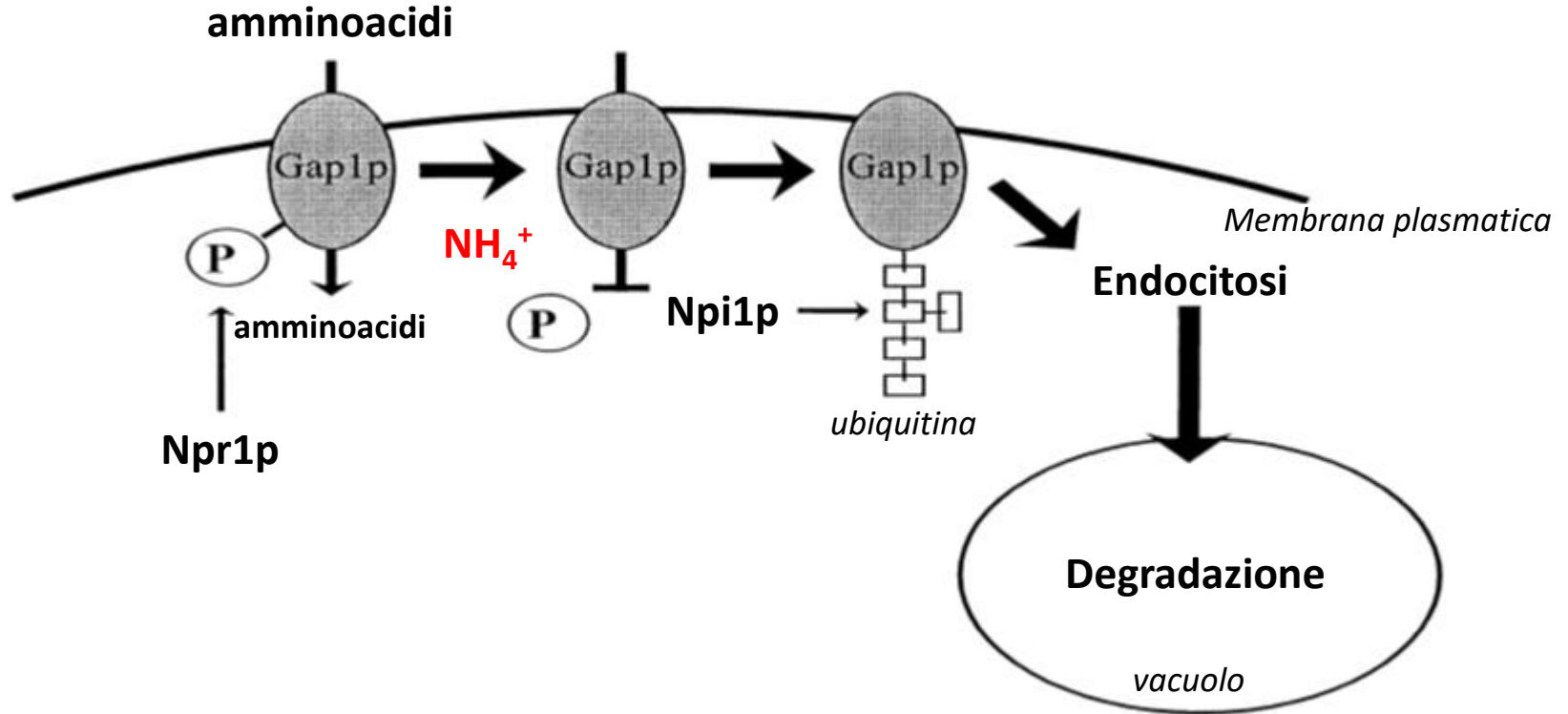
**Trasportatori vacuolari.** Il flusso di aminoacidi attraverso la membrana vacuolare è mediato da diverse famiglie di trasportatori.

**Trasportatori mitocondriali.** L'Agc1 è un trasportatore di aspartato/glutammato coinvolto nell'ingresso del glutammato nella matrice mitocondriale per le reazioni di transaminazione e biosintesi degli aminoacidi.

Nel *S. cerevisiae* il trasporto dell'ammoniaca richiede tre permeasi codificate da i geni MEP1, MEP2 e MEP3.

Nel corso della vinificazione il lievito assimila tra 1 e 2 g/L di aminoacidi. Alla fine della fermentazione alcolica, nel vino restano soltanto alcune centinaia di mg/L dei quali circa la metà sono di prolina.

## Regolazione post-traduzionale della permeasi Gap1p



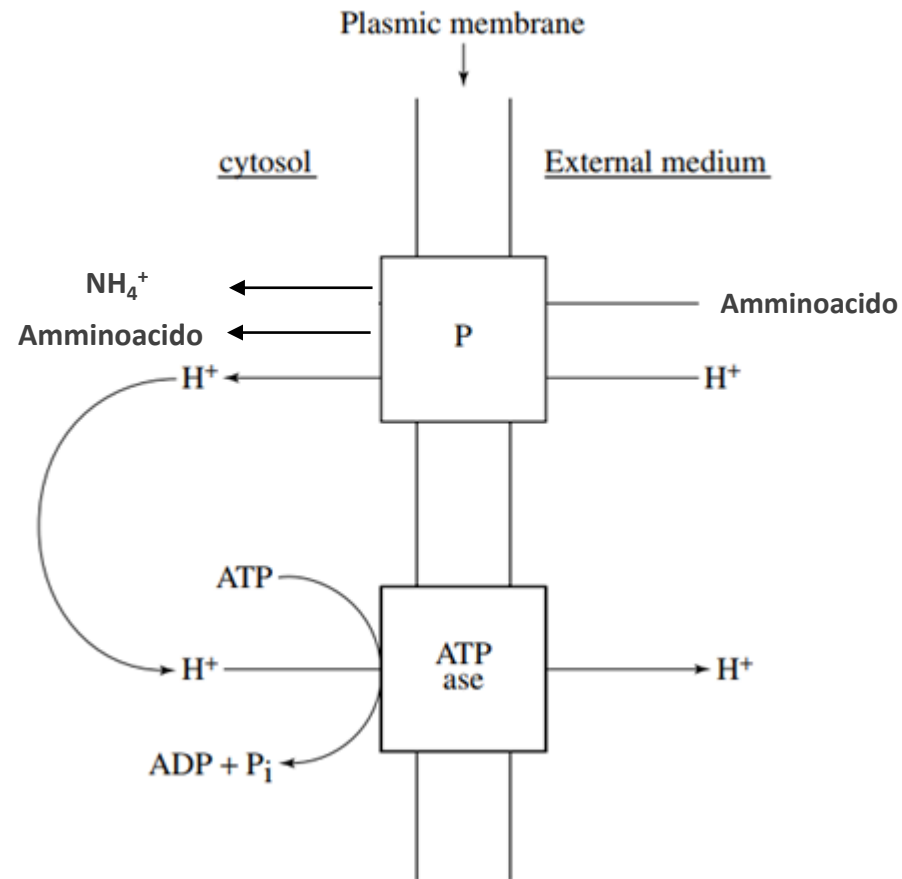
La proteina Gap1p è attivata dalla fosforilazione, dopo l'ingresso degli amminoacidi viene inattivata dalla defosforilazione e rapidamente degradata. Presente principalmente quando la concentrazione di azoto è bassa suggerendo una possibile inibizione da parte dello ione ammonio.

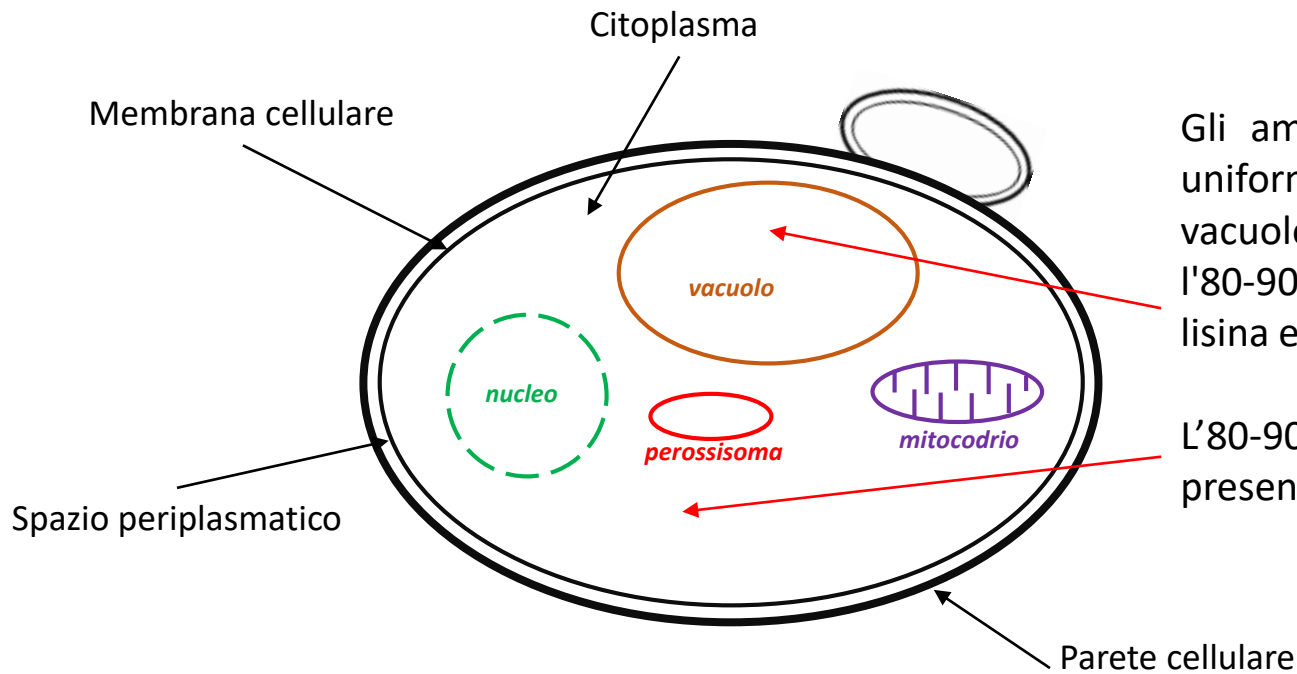


Lo ione  $\text{NH}_4^+$  e gli amminoacidi sono oggetto di un trasporto attivo, perché la loro concentrazione nella cellula è generalmente superiore a quella del mezzo esterno.

Il funzionamento delle permeasi accoppia al trasporto di una molecola di amminoacido o di ione  $\text{NH}_4^+$  uno ione  $\text{H}^+$  nel senso del gradiente di concentrazione, l'amminoacido ed il  $\text{H}^+$  si legano alla stessa proteina di trasporto ed entrano simultaneamente nella cellula.

L'eliminazione dello ione  $\text{H}^+$  attraverso la membrana è assicurata dall'ATPasi di membrana che gioca il ruolo di pompa di protoni.





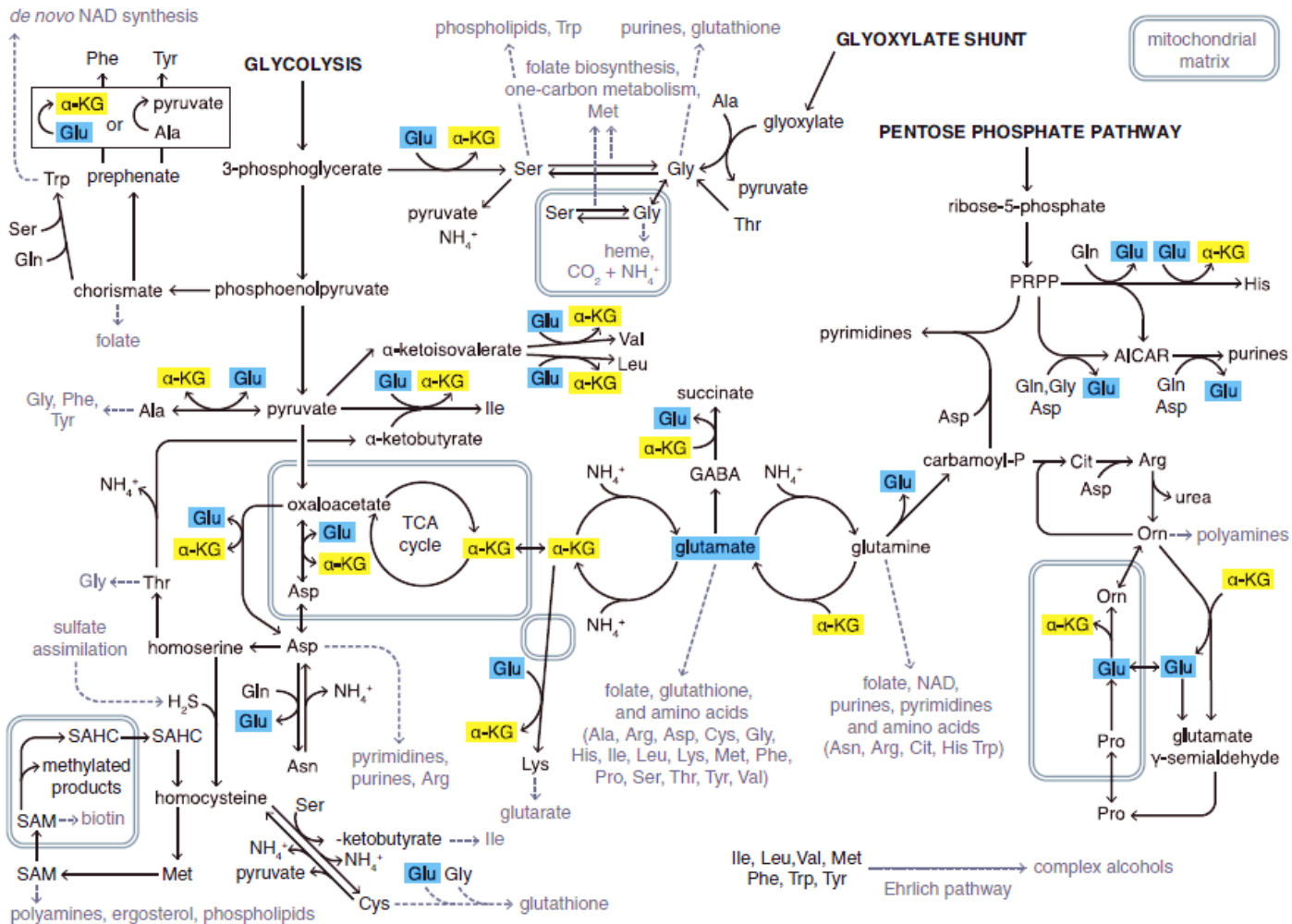
Gli amminoacidi non sono distribuiti uniformemente tra il citosol e il vacuolo:

l'80-90% del pool cellulare di istidina, lisina e arginina si trova nel vacuolo.

L'80-90% di glutammato e aspartato è presente nel citosol

All'inizio della fermentazione, quando il tenore di etanolo nel mosto è basso, il lievito è in grado di assimilare rapidamente gli amminoacidi del mezzo e li raccoglie nei vacuoli per utilizzarli, successivamente e secondo alle necessità, nelle biosintesi.

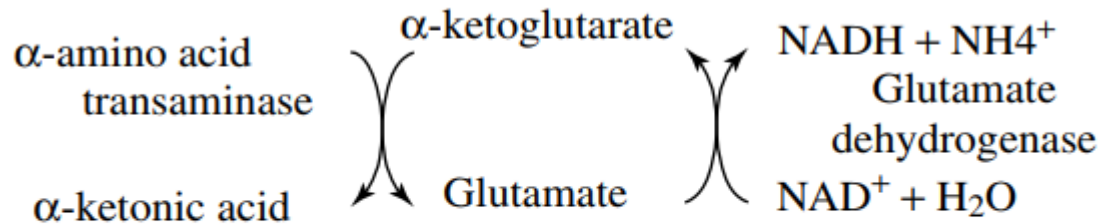
I lieviti contengono molte vie per la regolazione del metabolismo cellulare, i trasportatori di amminoacidi sono regolati da vie che rispondono sia allo stato nutrizionale generale della cellula che alla disponibilità di substrati. Questa regolazione avviene attraverso l'attivazione o la repressione della trascrizione genica.



Panoramica delle vie metaboliche di *S. cerevisiae* che coinvolgono gli aminoacidi. Le caselle con doppie linee grigie indicano reazioni che avverranno all'interno della matrice mitocondriale. Gli aminoacidi sono indicati dai loro codici a tre lettere. KG (chetoglutarato); AICAR (aminoimidazolo ribonucleotide di carbossammide); Cit (citrullina); GABA (amminobutirrato); Orn (ornitina); PRPP (fosforibosilpirofosfato).

## Il catabolismo degli amminoacidi nei lieviti

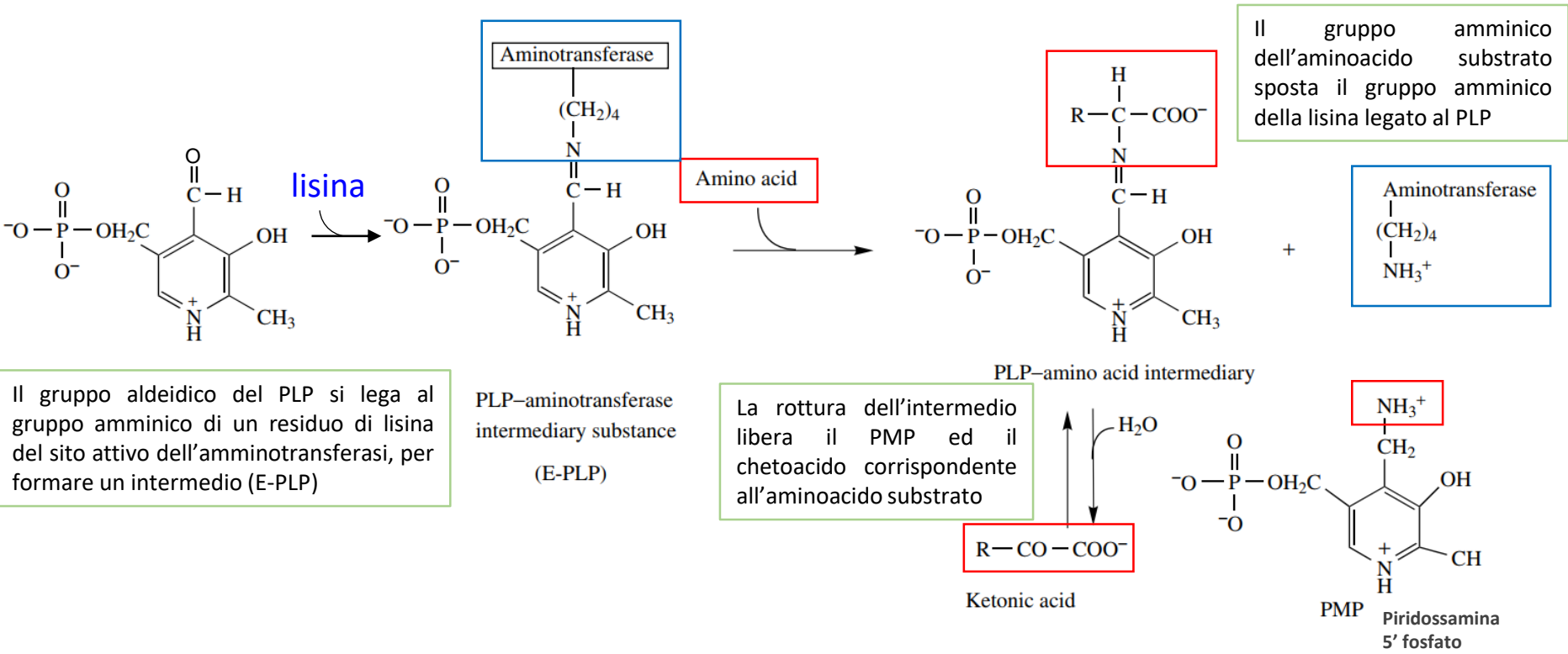
Quando il lievito non trova nel mezzo quantità sufficiente di ione ammonio necessario per sintetizzare gli amminoacidi se lo procura a partire dagli amminoacidi di riserva.



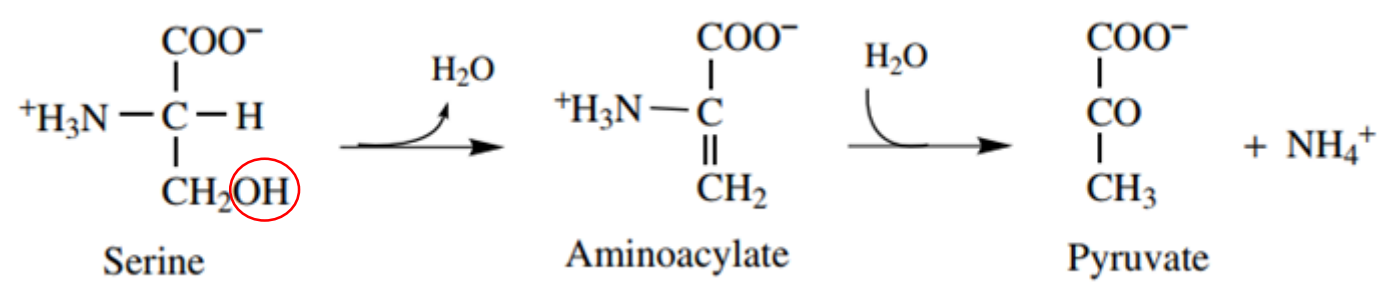
Deaminazione ossidativa di un amminoacido, catalizzata da una transaminasi e dalla glutammato deidrogenasi.

Il bilancio delle due reazioni è il seguente:

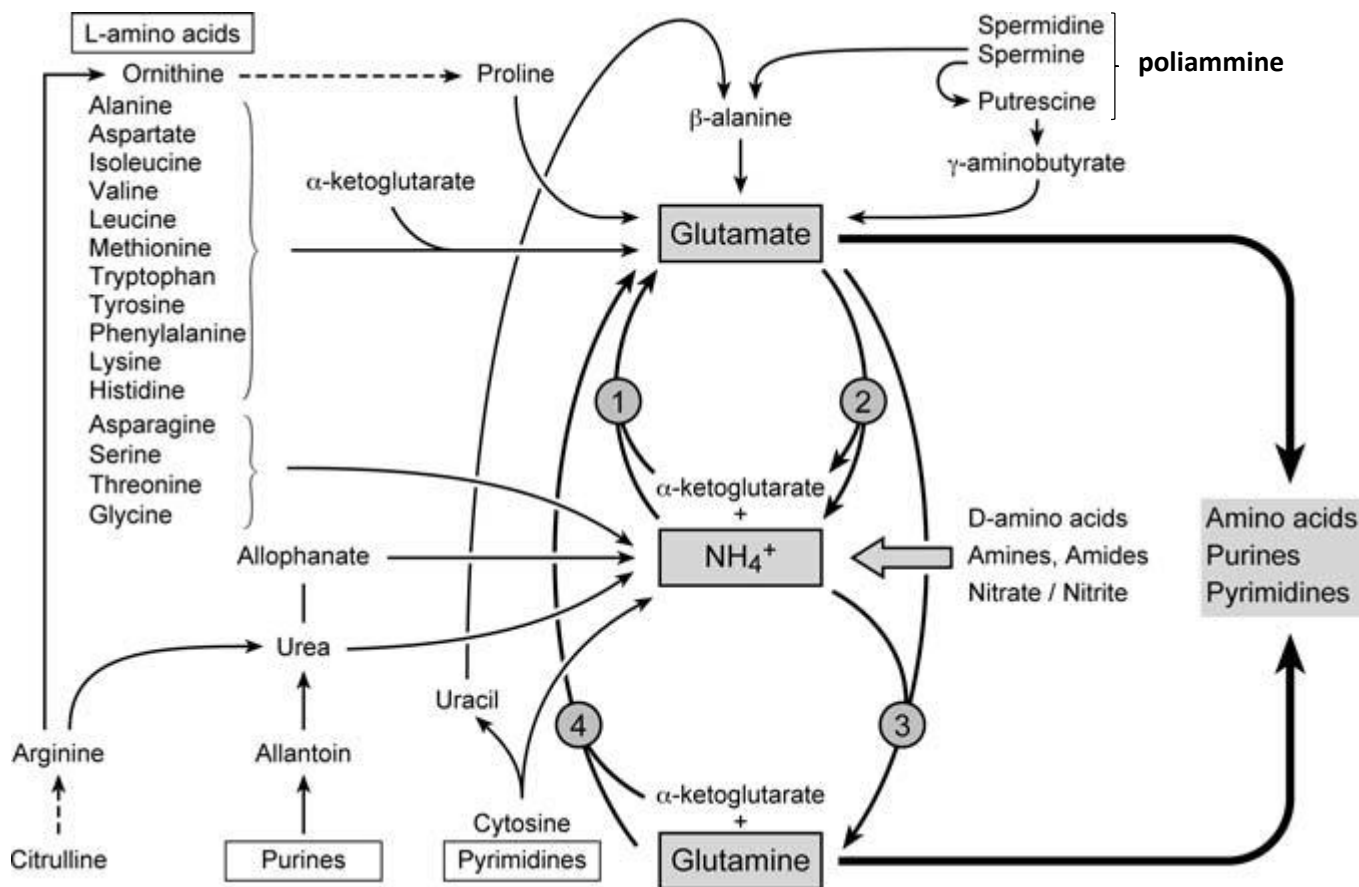




Certi aminoacidi, come la serina e la treonina, perché possiedono un gruppo idrossile sul carbonio  $\beta$  possono essere desaminati direttamente per disidratazione con una disidratasi.



## Il catabolismo degli amminoacidi nei lieviti: tutti questi percorsi degradativi portano alla formazione di ammoniaca o glutammato



La via principale per la sintesi del glutammato è attraverso la combinazione di ammoniaca con l' $\alpha$ -chetoglutarato: triptofano, tirosina, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina, alanina, metionina e aspartato forniscono il gruppo amminico per la transaminazione.

Glutammina, asparagina, treonina, citosina, adenina, citidina, guanina e urea, per deaminazione, portano alla produzione di ammoniaca ( $\text{NH}_4^+$ ) per deaminazione.

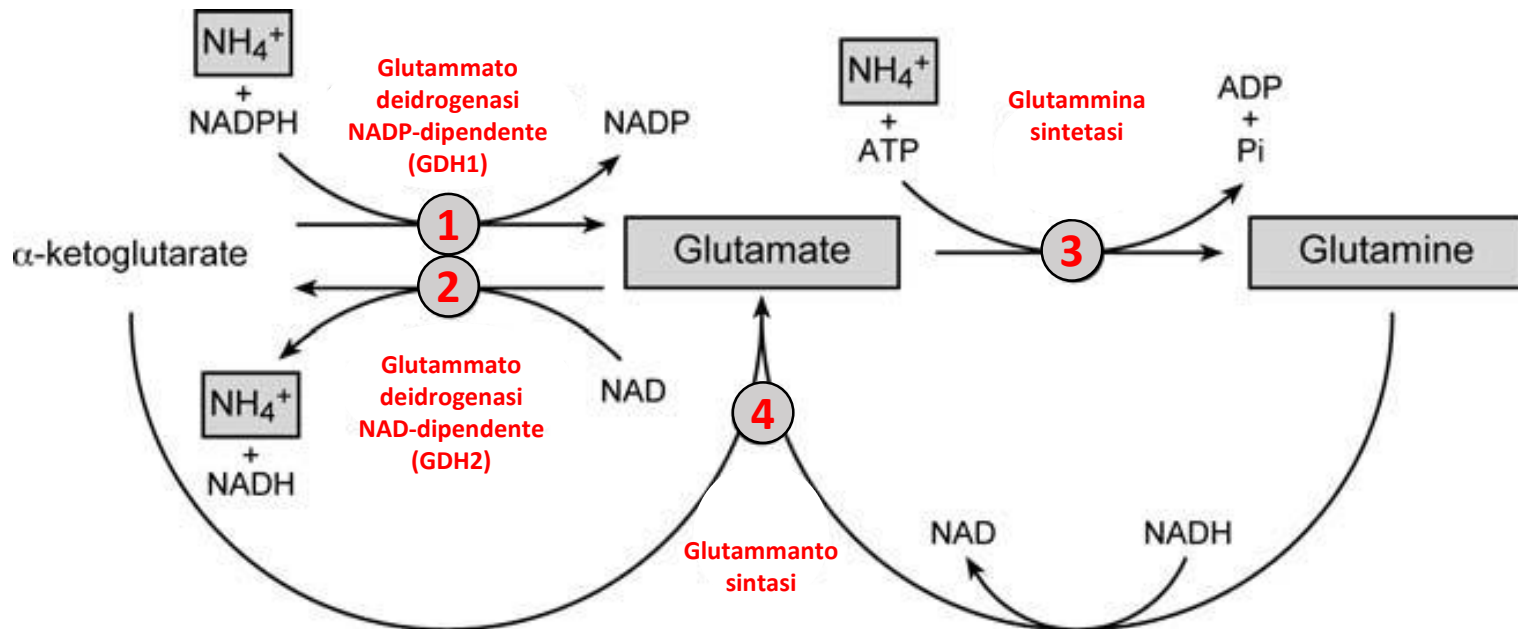
## Metabolismo dell'azoto nel lievito:

Fonti di azoto del lievito: L-amminoacidi, D-amminoacidi, pirimidine, purine, poliammine, ammine, nitrati e nitriti.

La degradazione dei composti contenenti azoto porta alla formazione di tre composti chiave nella cellula: l'ammoniaca, glutammato e glutammina.

La via principale per la sintesi del glutammato è la combinazione di ammoniaca con l' $\alpha$ -chetoglutarato.

La glutammina è sintetizzata dalla combinazione di ammoniaca con glutammato. Nel *S cerevisiae* esiste un percorso alternativo per produrre glutammato (la glutammina sintetasi accoppiata alla glutammato sintasi)

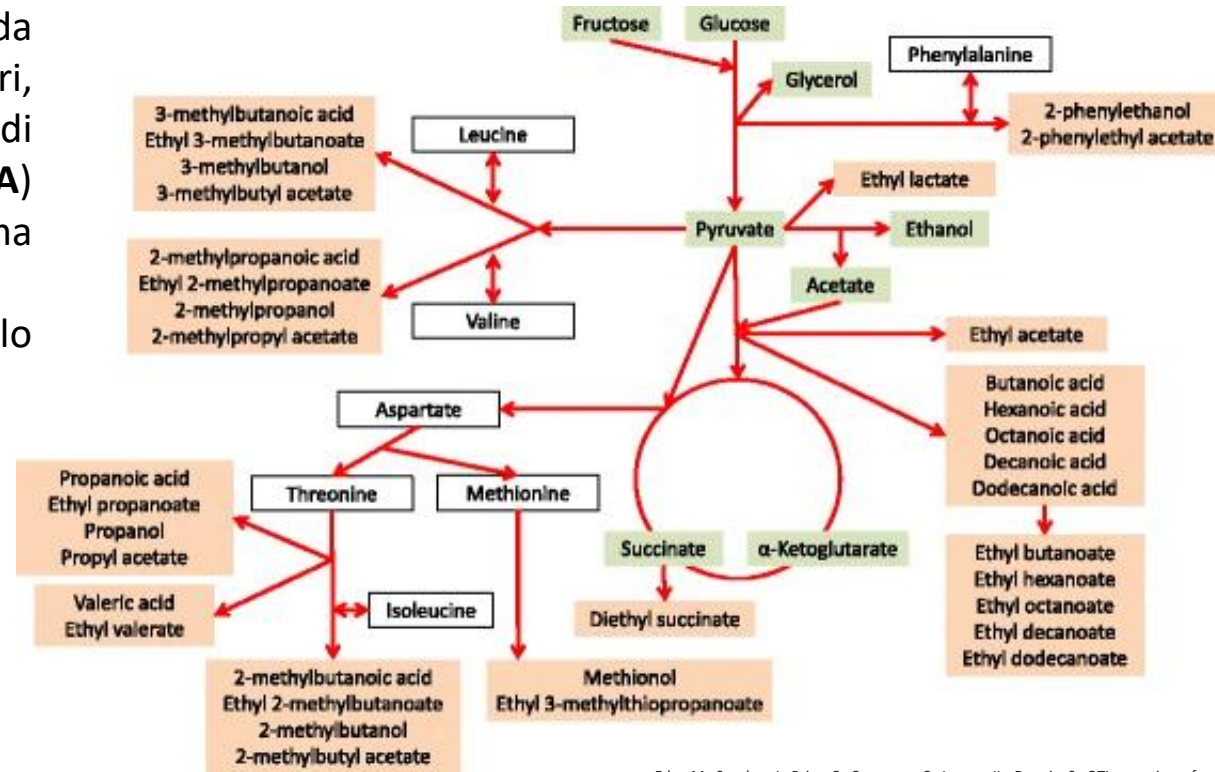


- 1) Glutammato deidrogenasi NADP-dipendente (GDH1)
- 2) Glutammato deidrogenasi NAD-dipendente (GDH2)
- 3) Glutammina sintetasi
- 4) Glutammato sintasi

# Metabolismo dei composti aromatici dei lieviti

La produzione di composti aromatici da parte del lievito, soprattutto esteri, dipende in larga parte dalla quantità di azoto prontamente assimilabile (**APA**) presente nel mosto, sotto forma amminica e ammoniacale.

I lieviti usano prima l'ammonio e, solo successivamente, gli amminoacidi.



Eder M, Sanchez I, Brice C, Camarasa C, Legras JL, Dequin S. QTL mapping of volatile compound production in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *BMC Genomics*. 2018 Mar 1;19(1):166.

In abbondanza di ammonio, nelle prime fasi della fermentazione alcolica, non utilizzano gli amminoacidi e, di conseguenza, non si formano esteri e alcoli superiori o si formano in quantità ridotte.

In presenza di amminoacidi nelle prime fasi fermentative il lievito, dopo aver consumato l'azoto ammoniacale già presente nel mosto, è costretto ad utilizzare l'azoto amminoacidico favorendo la produzione di composti odorosi. Anche gli aminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano possono essere consumati ma sono meno preferibili e sono responsabili della produzione di alcoli aromatici superiori, come triptofolo, tirosolo, di-metil-mercaptano e indolo.