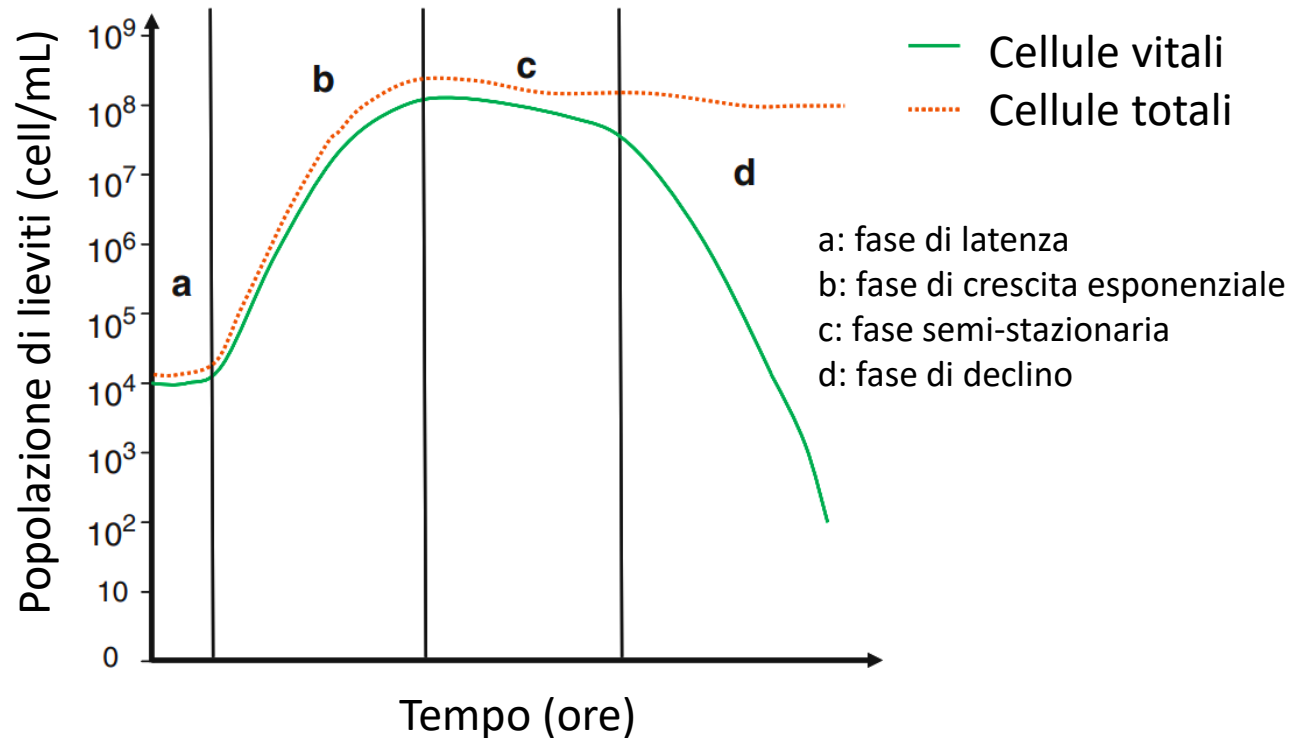
A microscopic image of yeast cells, showing several elongated, rod-shaped cells with a distinct bud at one end, set against a dark background. The cells are illuminated from the side, creating a bright, glowing effect.

Biochimica della  
fermentazione  
alcolica e vie  
metaboliche dei  
lieviti enologici

---



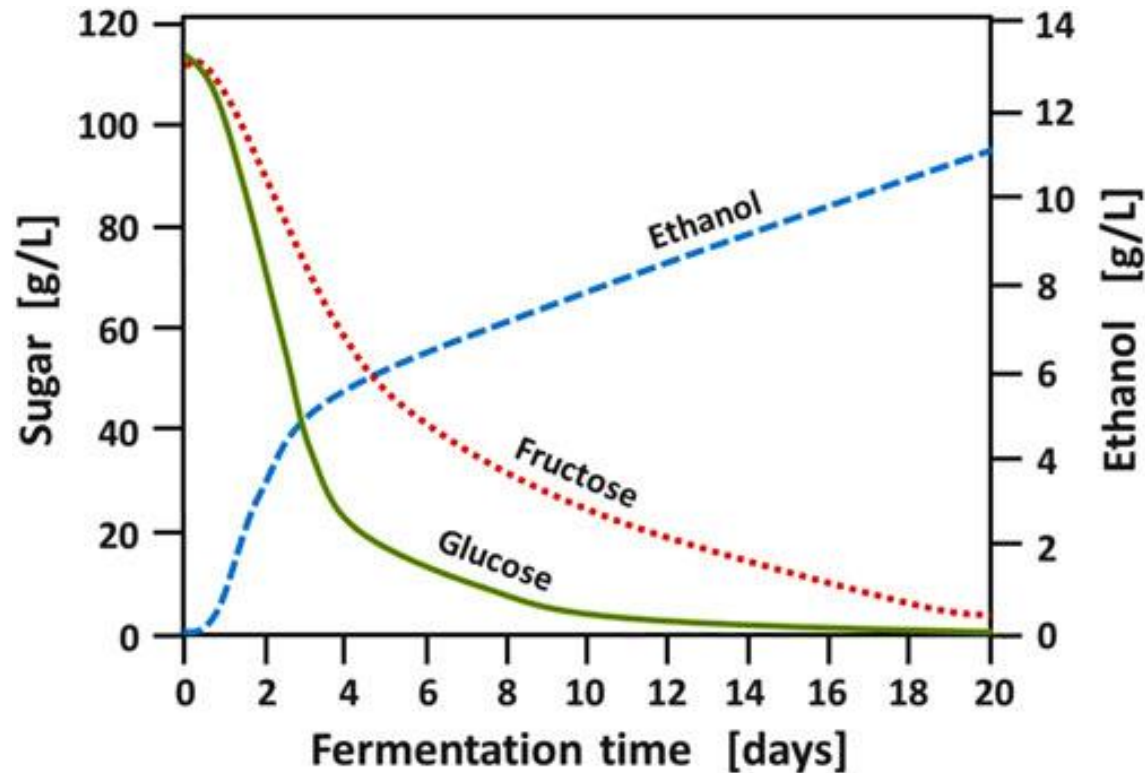
## Ciclo di crescita dei lieviti



- Se non vengono inoculati lieviti la popolazione iniziale è circa 10<sup>4</sup> cellule/mL
- Dopo inoculazione è circa 5 x 10<sup>6</sup> cellule/mL
- La fase esponenziale di crescita (10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cellule/mL per 3-6 gg)
- La fase semi-stazionaria può durare da 2 a 10 gg
- Durante la fase di declino

Il successo di una fermentazione alcolica dipende dal mantenere la popolazione di lieviti vitali a livelli sufficienti finché tutti gli zuccheri fermentabili siano stati consumati per evitare problemi di lenta fermentazione

## Evoluzione degli zuccheri durante la fermentazione

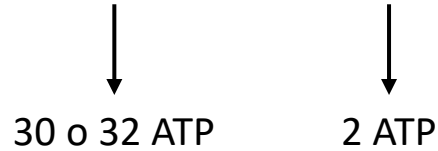


Con la pigiatura dell'uva si liberano gli zuccheri a concentrazioni di circa 110 g/L.

Nella prima fase di fermentazione del mosto, le colture starter di *S. cerevisiae* si dividono attivamente e utilizzano gli zuccheri per la crescita. Il consumo di glucosio inizia subito ed è leggermente più velocemente del fruttosio, così che la concentrazione esterna di quest'ultimo aumenta con il progredire della fermentazione. A fine fermentazione, si avrà un graduale aumento della concentrazione di etanolo e un lento consumo di zuccheri e di altri nutrienti, questo è tipico della sopravvivenza cellulare ma non della crescita e moltiplicazione.

I lieviti (microrganismi anaerobi facoltativi) possono consumare zuccheri utilizzando due differenti vie metaboliche:

### Respirazione e Fermentazione



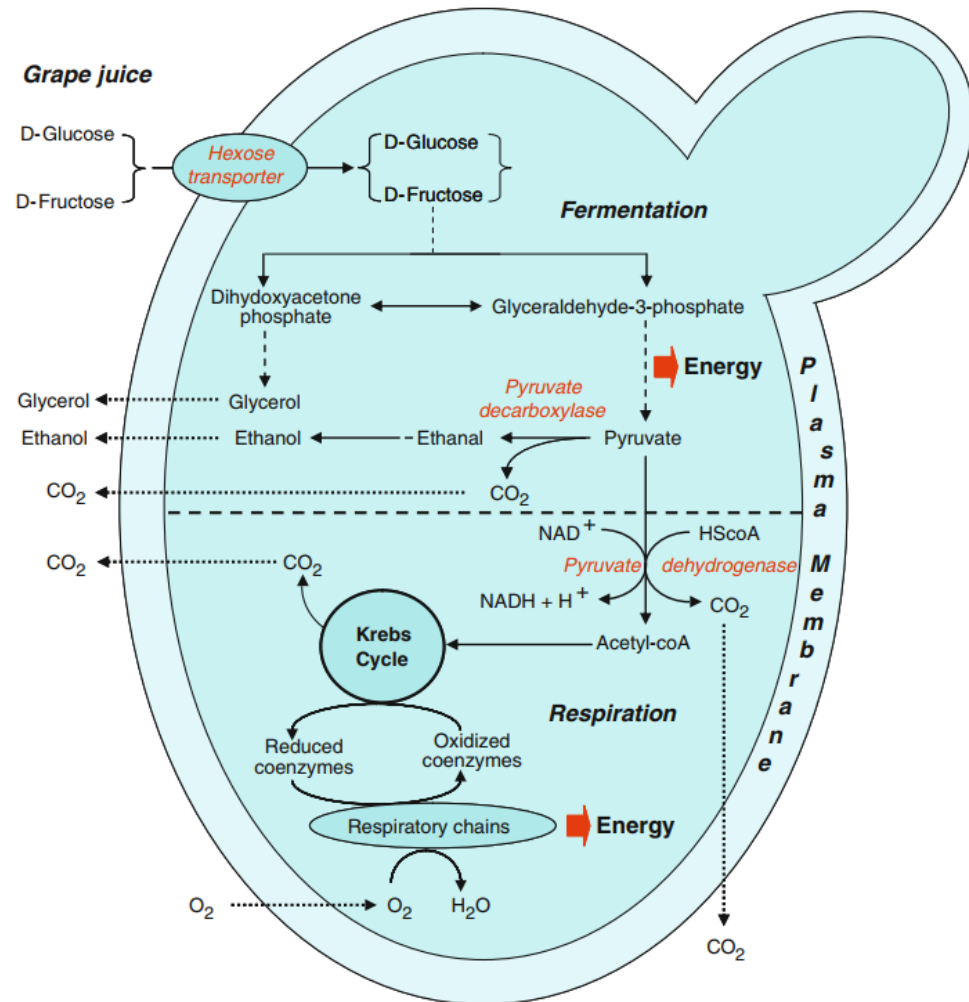
Entrambi i processi iniziano con la glicolisi per generare piruvato come prodotto finale.

Fermentazione: Il piruvato può essere trasformato in acetaldeide e anidride carbonica, l'acetaldeide è ridotta ad etanolo.

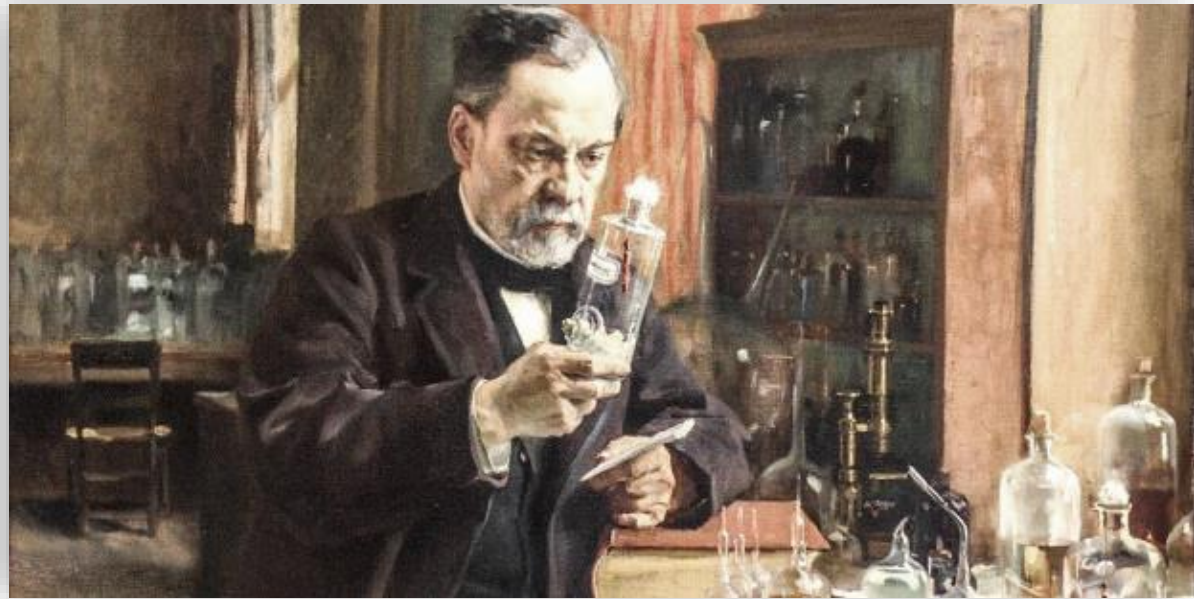
Respirazione: il piruvato può essere trasformato in acetil-CoA e anidride carbonica. L'acetil-CoA può essere incorporato nel ciclo di Krebs, trasformandosi in CO<sub>2</sub> e producendo diverse molecole di coenzimi ridotti. I coenzimi ridotti prodotti dal ciclo di Krebs, e anche dalla glicolisi, vengono successivamente riossidati nella catena respiratoria, per ridurre l'O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O.

La respirazione è un processo più vantaggioso per i lieviti in termini di energia ma necessita di ossigeno ed è inibito da alte concentrazioni di zuccheri.

## Fermentazione e respirazione



# Effetto Pasteur: l'O<sub>2</sub> inibisce la fermentazione alcolica



Quando le cellule di *Saccharomyces cerevisiae*, capaci di metabolizzare glucosio in presenza e in assenza di ossigeno, sono mantenute in condizioni aerobiche consumano meno glucosio e formano meno etanolo (derivante dalla fermentazione) a vantaggio della biomassa (maggiore divisione cellulare).

In condizioni aerobiche il piruvato viene convertito in acetil CoA che può essere utilizzato nel ciclo dell'acido citrico con aumento del numero di molecole di ATP prodotte dalla fosforilazione mitocondriale. In condizioni anaerobiche il metabolismo del glucosio è veloce ma la quantità di molecole di ATP prodotte è inferiore perché derivano solo dalla glicolisi. Se il lievito è esposto in condizioni aerobiche aumenta la produzione di ATP e di citrato, prodotti che agiscono come inibitori allosterici della PFK 1, e il flusso glicolitico diminuisce. L'effetto *Pasteur* si verifica, in presenza di O<sub>2</sub>, solo se la concentrazione di glucosio è bassa (2 g/L) e se gli altri nutrienti, come l'azoto, sono limitati.

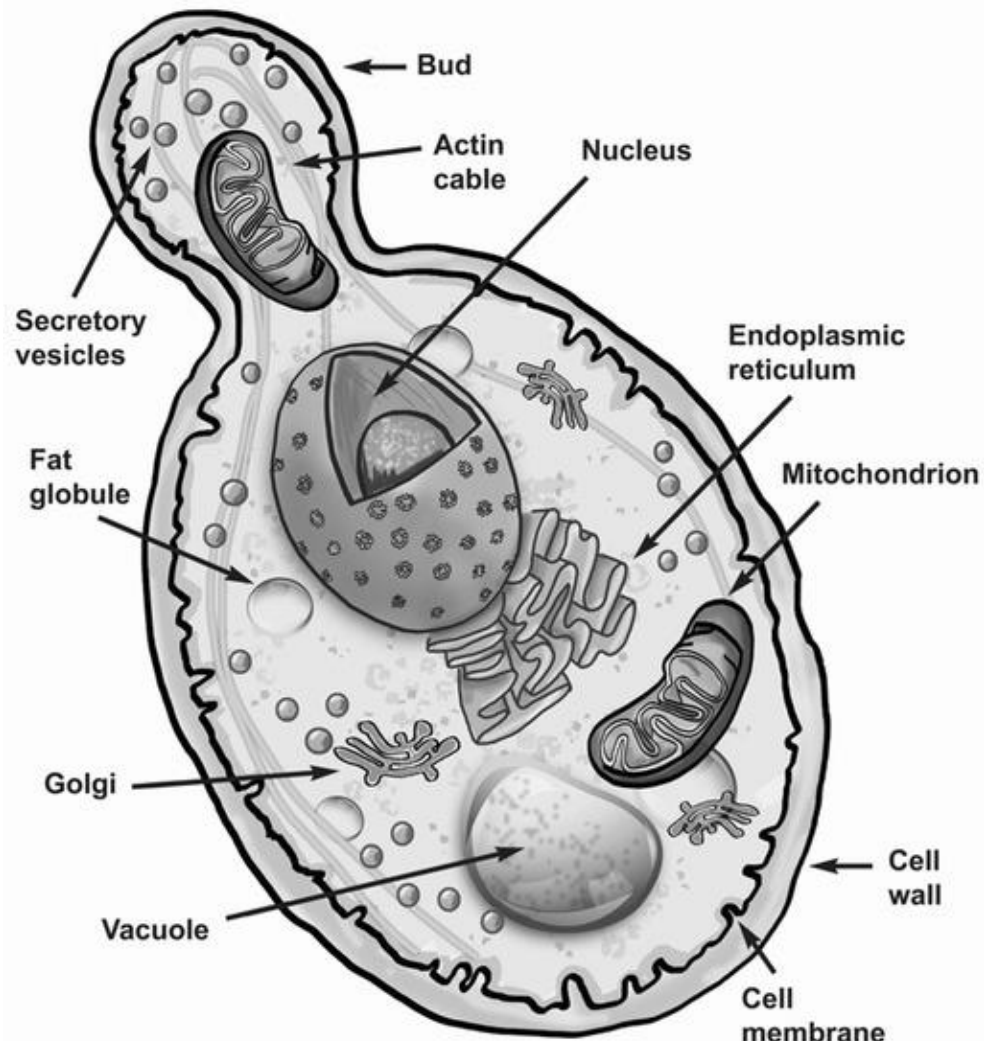
## Effetto Crabtree

Alcune specie di lievito come *Saccharomyces cerevisiae* utilizzano la fermentazione anche in presenza di ossigeno.

Quando le concentrazioni di glucosio sono sufficientemente elevate (10 g/L), rinuncia alla respirazione aerobica del glucosio.

La sua tendenza a fermentare gli zuccheri in alcol in condizioni aerobiche è noto come effetto *Crabtree* (soppressione della respirazione ad alta concentrazione di glucosio o fruttosio).

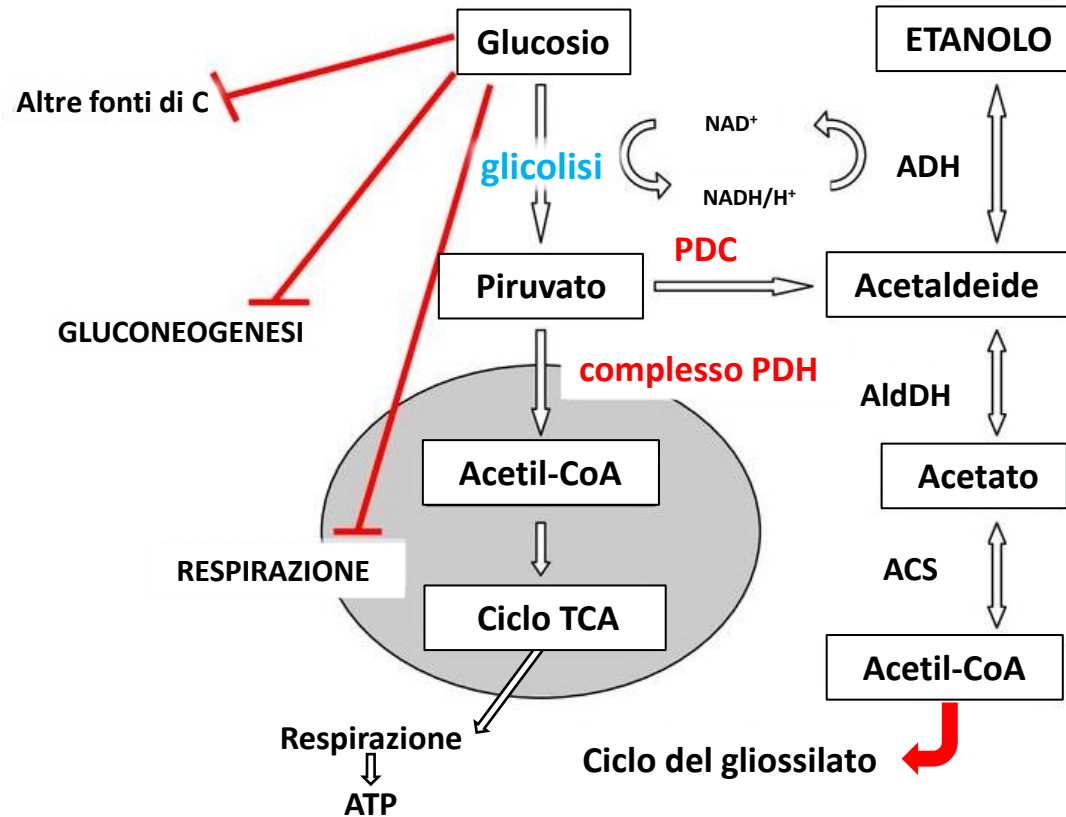
*Saccharomyces* può utilizzare la respirazione solo quando la concentrazione di zucchero è veramente bassa e quando l'ossigeno è presente nel mezzo.



Graeme M Walker, and Graham G Stewart. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2, 30

## Regolazione

La concentrazione di glucosio e ossigeno influiscono sul tipo di via catabolica utilizzata da *S. cerevisiae*. A basse concentrazioni di glucosio (<5mM) e in condizioni aerobiche diminuisce la velocità di trasporto dello zucchero rispetto a quanto accade in condizioni anaerobiche, «effetto Pasteur». La piruvato decarbossilasi (PDC) e la piruvato deidrogenasi (PDH) competono nel catalizzare la fermentazione e la respirazione, tale competizione potrebbe giustificare l'inibizione della fermentazione eseguita dalla respirazione.

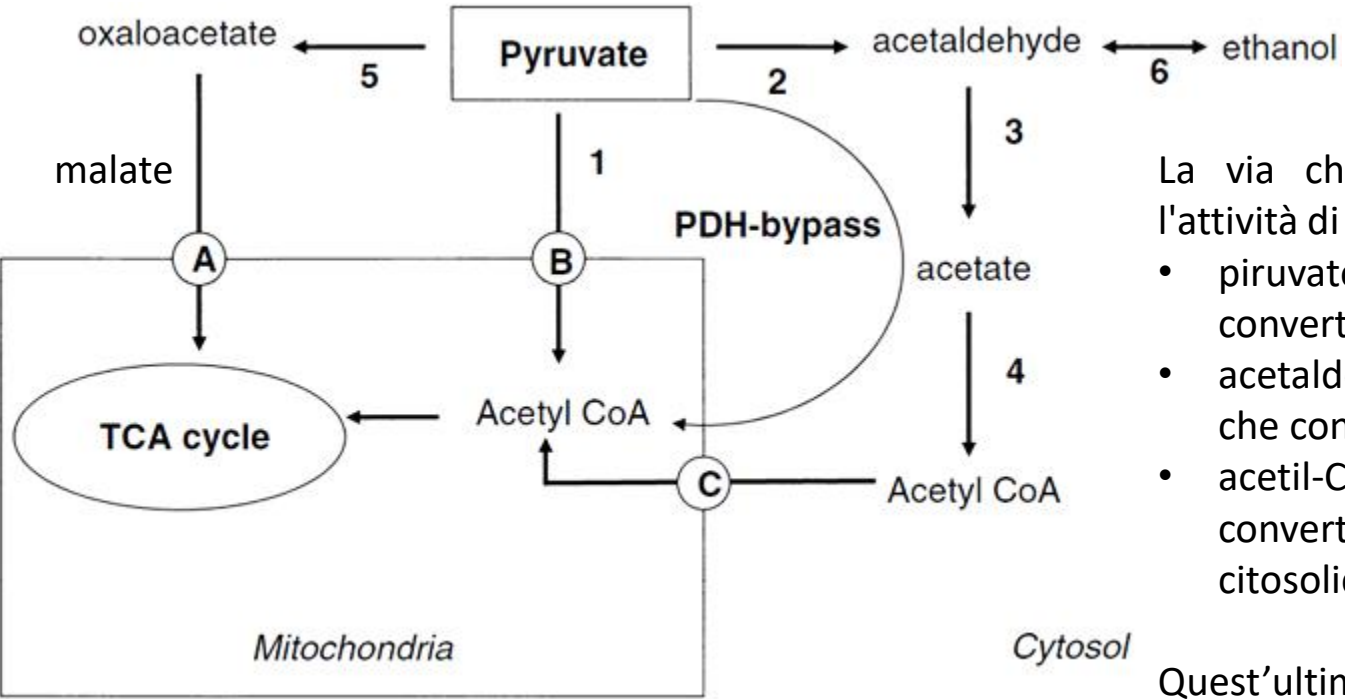


L'inibizione degli enzimi glicolitici esercitata dall'ATP causa una diminuzione del consumo di glucosio.

### L'effetto Crabtree porta le seguenti conseguenze a livello cellulare:

diminuzione di steroli ed acidi grassi, repressione degli enzimi coinvolti nel ciclo dell'acido citrico e dei costituenti della catena respiratoria. La repressione dell'enzima piruvato deidrogenasi, mentre la piruvato decarbossilasi e l'alcol deidrogenasi sono notevolmente attivati dalle alte concentrazioni di zuccheri.





La via che bypassa la PDH richiede l'attività di tre diversi enzimi:

- piruvato decarbossilasi (2), che converte il piruvato in acetaldeide;
- acetaldeide deidrogenasi (ALD) (3), che converte l'acetaldeide in acetato;
- acetil-CoA sintetasi (ACS) (4), che converte l'acetato in acetil-CoA citosolico.

Quest'ultimo può essere trasportato unidirezionale nel mitocondrio attraverso il sistema della carnitina acetiltransferasi (C).

- 1 complesso piruvato deidrogenasi
- 5 piruvato carbossilasi
- 6 alcol deidrogenasi
- A) recettore mitocondriale ossalacetato/malato
- B) recettore mitocondriale piruvato

L'acetil-CoA citoplasmatico viene regolato dalla concentrazione dell'acetato.

Il complesso della PDH (mitocondriale) ha maggiore affinità per il piruvato rispetto alla PDC (citosolica). A basse concentrazioni di glucosio (< 5mM) e in condizioni aerobiche diminuisce la velocità di trasporto dello zucchero quindi, la maggior parte del piruvato verrà metabolizzato dal complesso PDH.

Aumentando la concentrazioni di glucosio, il tasso glicolitico aumenterà e più piruvato si formerà, saturando così il bypass del PDH e spostando il flusso del carbonio verso la produzione di etanolo (fermentazione).

# Effetto *Pasteur* vs Effetto *Crabtree*

---

L'effetto Pasteur è la soppressione della fermentazione alcolica in presenza di ossigeno nel mezzo di coltura. La principale spiegazione dell'effetto Pasteur è l'inibizione da parte dell'ATP degli enzimi della glicolisi: l'ATP proveniente dalla fosforilazione ossidativa inibisce la PFK 1, il che comporta l'accumulo degli esosi fosforilati, il rallentamento del trasporto degli zuccheri attraverso la membrana e quindi, la glicolisi.

La fermentazione aerobica nel lievito è nota come effetto Crabtree. Nel *S. cerevisiae*, gli zuccheri (in particolare glucosio) determinano un'inibizione degli enzimi respiratori (effetto Crabtree) molto pronunciato già a concentrazioni intorno a 10 g/L.

A basse concentrazioni di piruvato (glicolisi lenta) è favorita la respirazione a causa della maggiore affinità della PDH verso il piruvato, mentre ad alte concentrazioni di piruvato predomina la fermentazione poiché la  $V_{max}$  della PDC è superiore a quella della PDH, saturando il bypass PDH e spostando il flusso del carbonio verso la produzione di etanolo. Inoltre, l'aumento di ATP inibisce l'enzima PFK1, rallentando la fosforilazione ossidativa del fruttosio 6P a fruttosio 1,6-bisfosfato, anche questa inibizione partecipa alla realizzazione dell'effetto Crabtree.

# Effetto *Pasteur* vs Effetto *Crabtree*

---

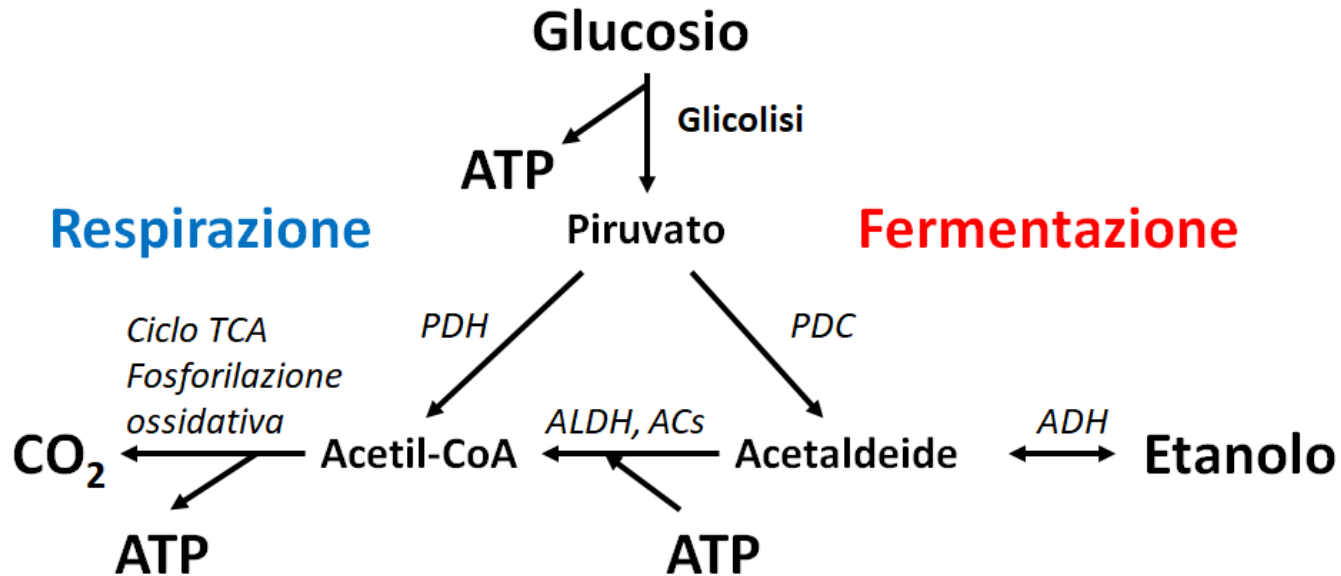
- Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* può utilizzare glucosio in condizioni di anaerobiosi, ma non è in grado di crescere significativamente.
- La mancanza di O<sub>2</sub> non permette la produzione di ergosterolo e di alcuni acidi grassi essenziali per la funzionalità delle membrane cellulari.

# Classificazione dei lieviti vinari secondo la modalità di fermentazione

**Table 8.1** Physiological categories of wine yeasts

Mode of fermentation	
Crabtree-positive	Crabtree-negative
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Hansenula neofermentans</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <sup>a</sup>
<i>Candida stellata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Metschnikowa pulcherrima</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>

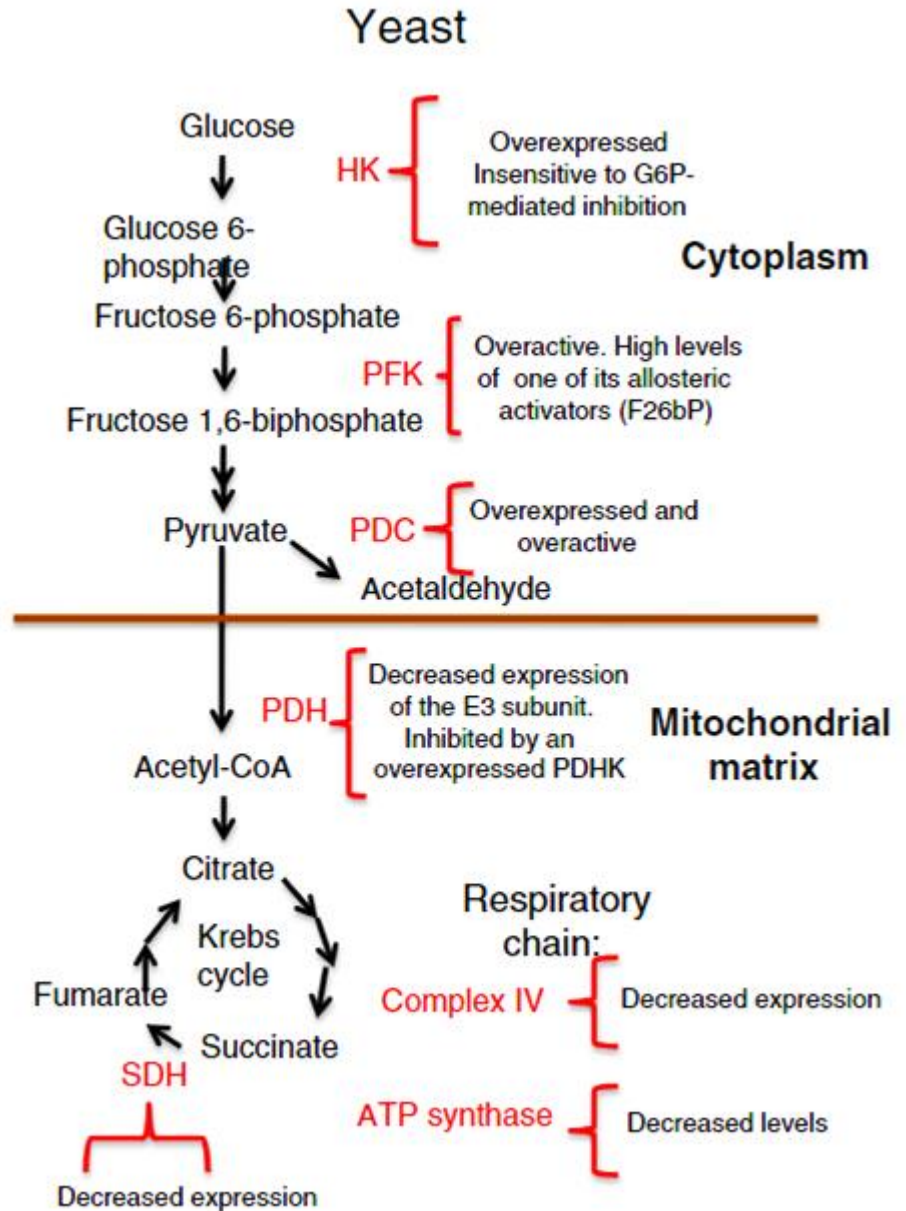
# Il metabolismo attivo nel lievito durante la fermentazione



I lieviti Crabtree positivi, in presenza di sufficiente quantità di O<sub>2</sub> e di glucosio, possono utilizzare contemporaneamente la fermentazione e la respirazione. Inoltre, una volta che il glucosio è completamente esaurito, l'etanolo che si accumula nell'ambiente esterno può essere riciclato per produrre molecole di ATP. Questo processo, tuttavia, produce meno ATP rispetto all'ossidazione diretta del piruvato perché la sintesi di Acetil-CoA dall'etanolo richiede consumo di ATP.

# Vie metaboliche attive durante la fermentazione

- Le isoforme esochinasi (HK), insensibili all'inibizione del glucosio 6-fosfato, sono sovra espresse.
- La fosfofruttochinasi (PFK) è attivata dal fruttosio 2,6-bifosfato (F26bP).
- L'enzima che metabolizza il piruvato nel citoplasma cellulare è sovraespresso: piruvato decarbossilasi (PDC).
- Il complesso della piruvato deidrogenasi (PDH) è inibito dalla fosforilazione da parte della piruvato deidrogenasi chinasi che è sovra espressa (PDHK).
- La succinato deidrogenasi (SDH) è poco espressa.
- Inoltre, si osserva una ridotta espressione del complesso mitocondriale IV e dell'ATP sintasi.



# Connessione tra il ciclo dell'acido citrico e il ciclo del glicossilato durante la fermentazione

Quando il ciclo del glicossilato è attivo bypassa alcune reazioni del ciclo TCA.

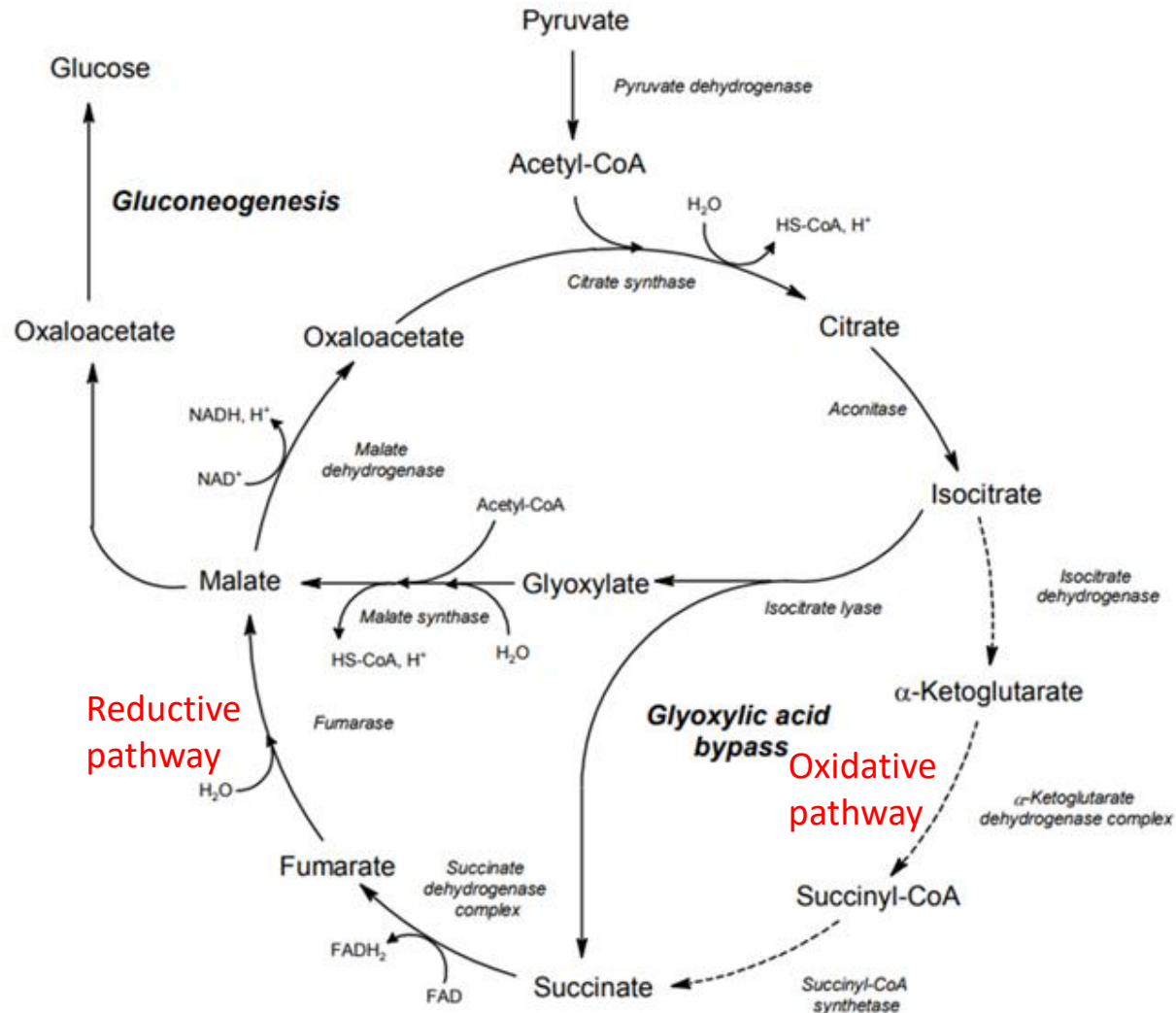
In condizioni di fermentazione il TCA funziona in modo ramificato:

la via riduttiva porta alla formazione di succinato

la via ossidativa porta alla formazione di  $\alpha$ -chetoglutarato.

Il citrato e il malato dipendono principalmente dalle reazioni del TCA, il succinato può derivare da quattro vie, tutto dipende dalla disponibilità dall'azoto, poiché l' $\alpha$ -chetoglutarato è il principale composto che apporta ammonio.

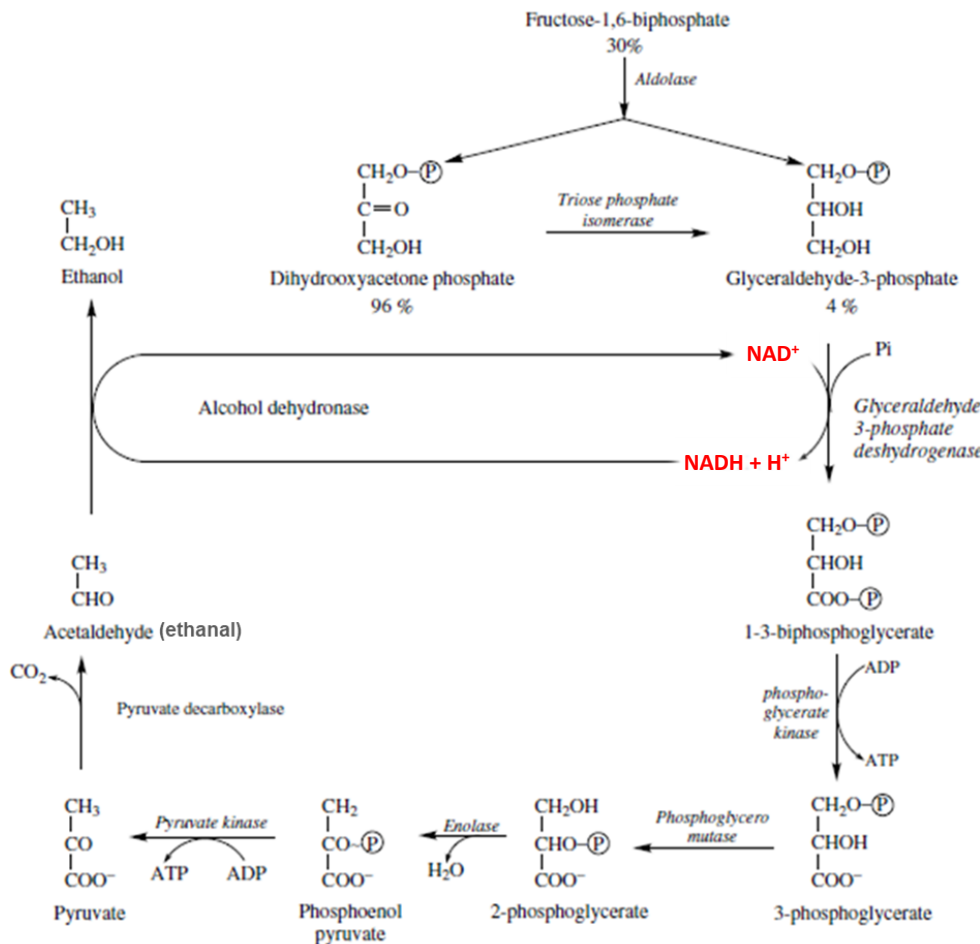
La via riduttiva del ciclo TCA è la principale via metabolica per la sintesi del succinato in condizioni anaerobiche.



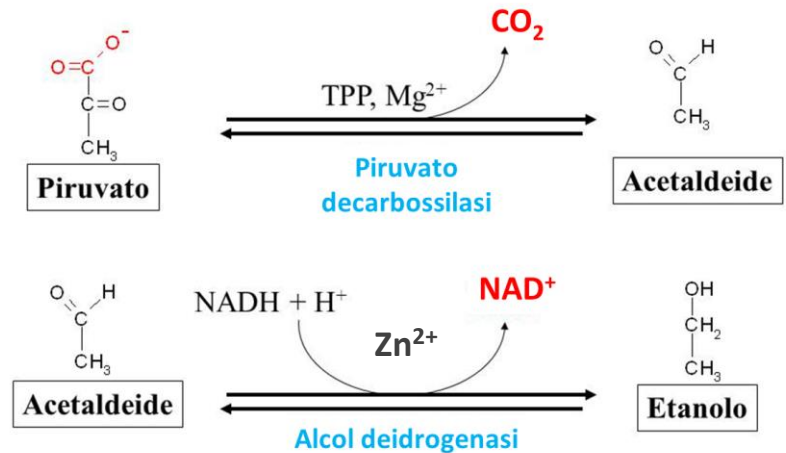
# Fermentazione alcolica

Il potere riducente del NADH, prodotto dalla glicolisi, deve essere trasferito a un accettore di elettroni per rigenerare NAD<sup>+</sup>.

Nella fermentazione alcolica, l'accettore di elettroni non è piruvato ma l'acetaldeide.



Glycolysis and alcoholic fermentation pathway





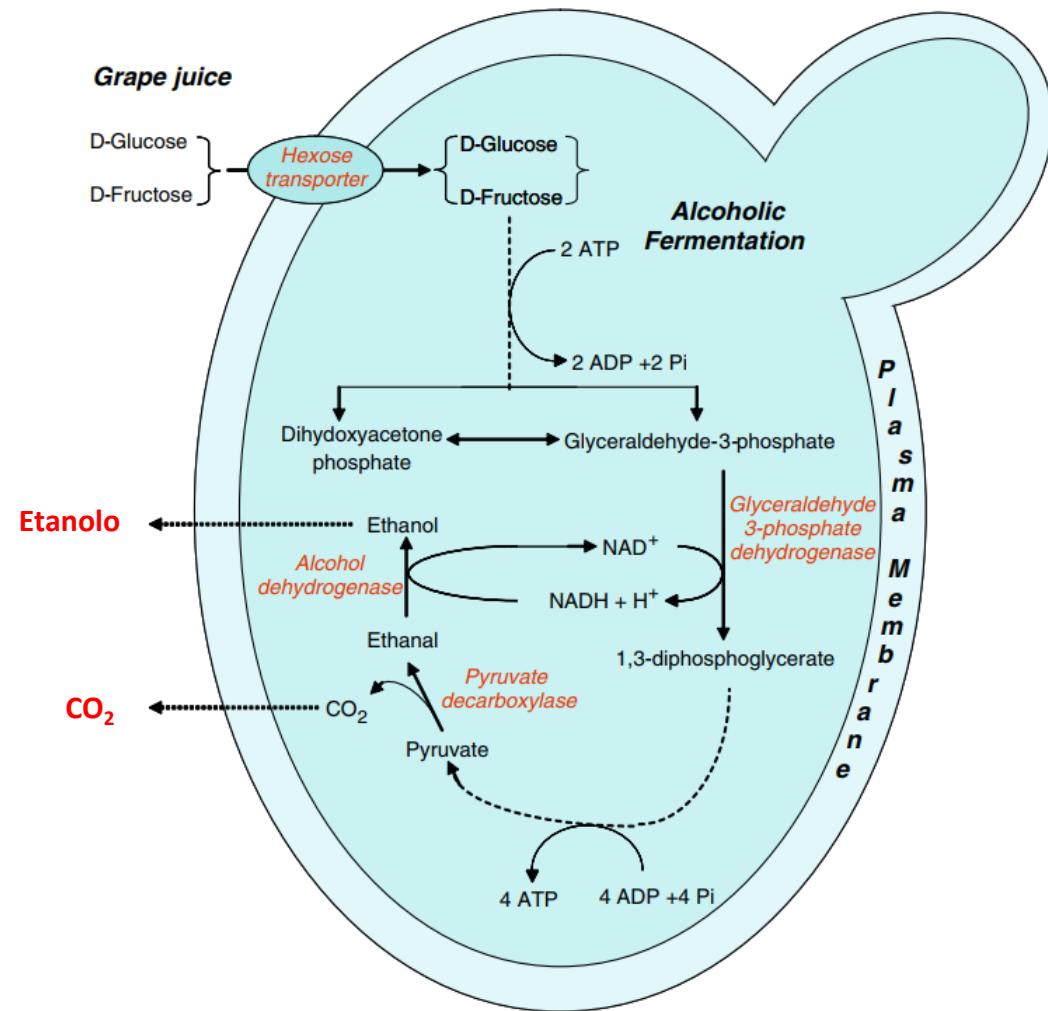
# Fermentazione alcolica

## Piruvato decarbossilasi ed Alcool deidrogenasi

la piruvato decarbossilasi (PDC) che comprende due isoenzimi: il **PDC1**, che rappresenta **l'80%** dell'attività decarbossilasi, e una forma minore, il PDC5, la cui funzione rimane incerta.

Ha tre isoenzimi dell'alcool deidrogenasi (ADH) ed è **l'isoenzima I** responsabile della conversione dell'acetaldeide in etanolo; l'alcool deidrogenasi utilizza zinco come cofattore.

Entrambi i prodotti finali della fermentazione, etanolo e  $\text{CO}_2$ , sono trasportati fuori dalla cellula per diffusione semplice.



# Il meccanismo di reazione della piruvato decarbossilasi

Fermentazione alcolica

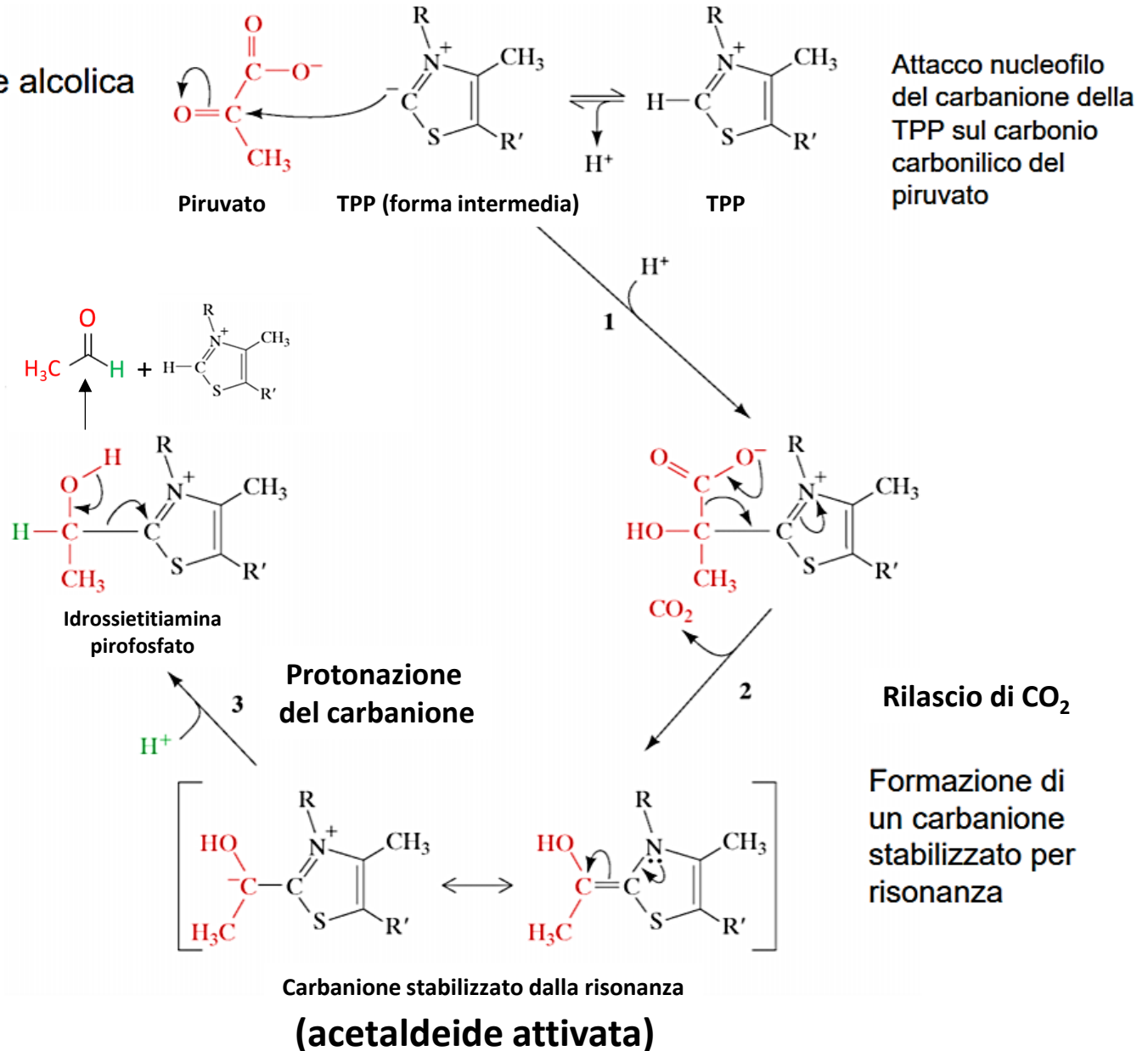
**Piruvato**

Piruvato  
decarbossilasi

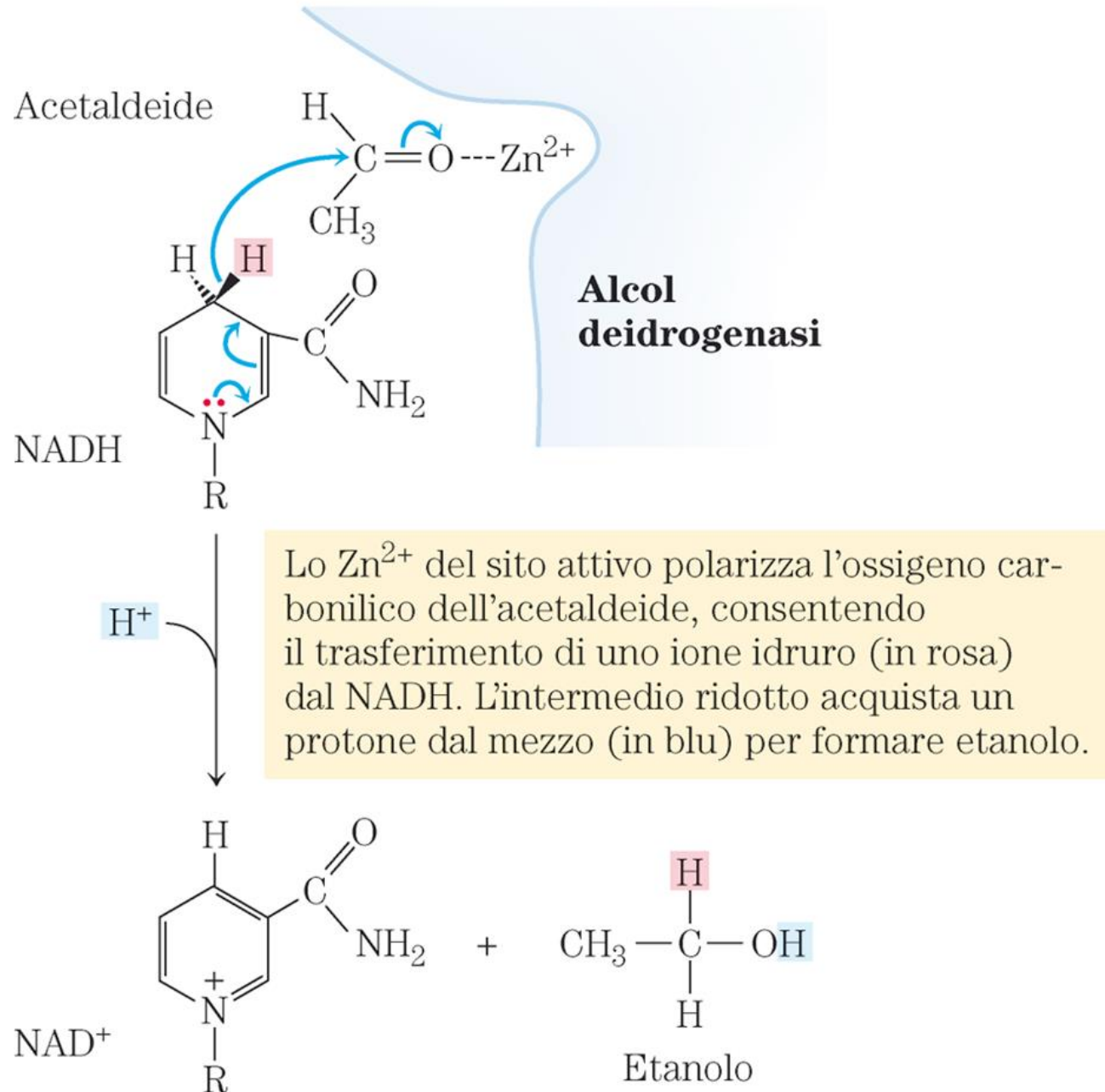
**Acetaldeide**

ADH

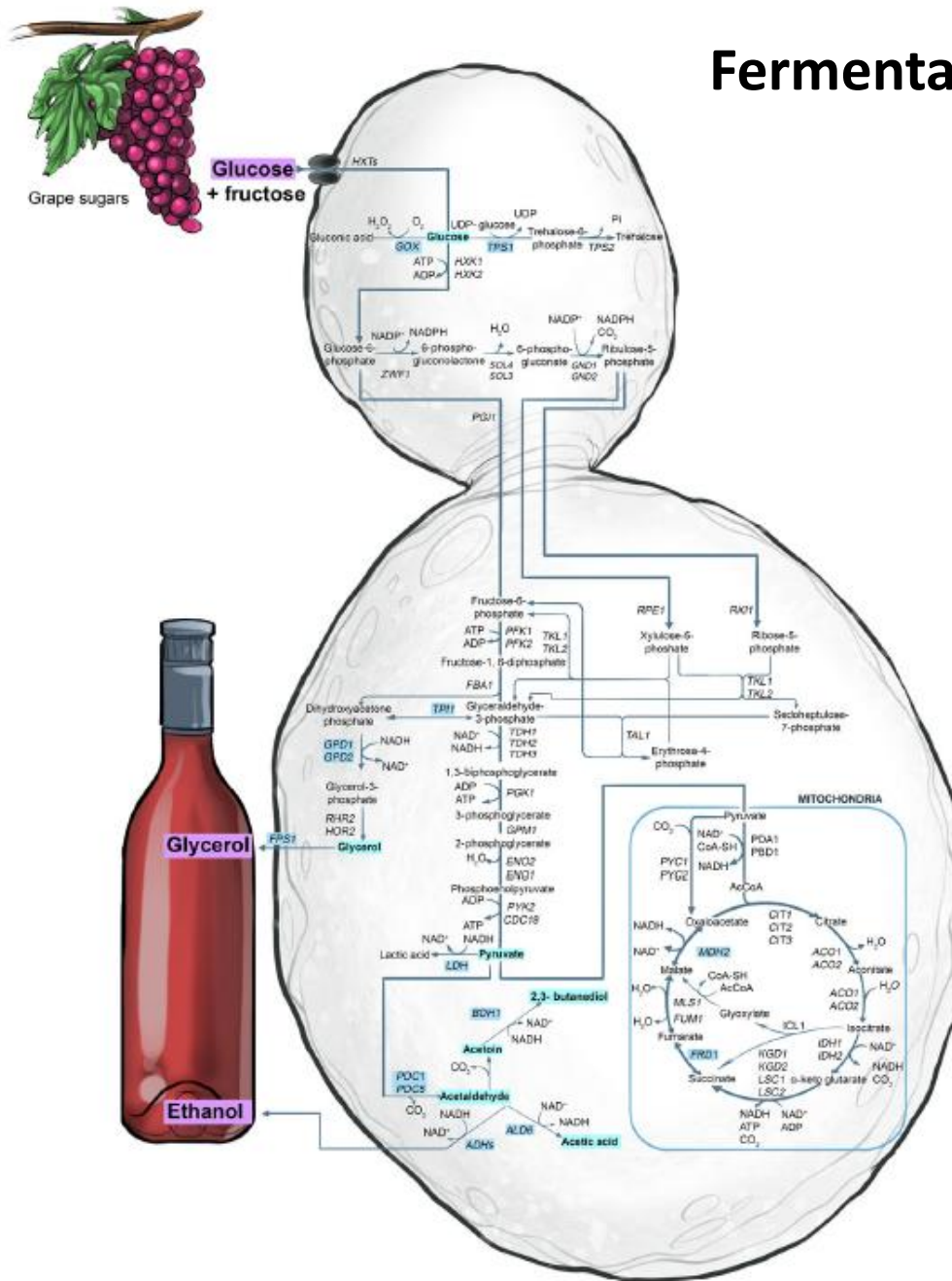
**Etanolo**



## Reazione catalizzata dall'alcol deidrogenasi



# Fermentazione gliceropiruvica



Hugh D. Gould et al., Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol Wines. *Microbial Biotechnology*, 2017. doi:10.1111/1751-7915.12488

# Fermentazione gliceropiruvica

- All'inizio della vinificazione, i lieviti hanno bisogno di molti substrati per crescere. La moltiplicazione cellulare implica una forte attività della biosintesi delle proteine, lipidi, nucleotidi, e la maggior parte di queste molecole sono sintetizzate utilizzando piruvato come substrato. Ogni volta che una molecola di piruvato è utilizzata anabolicamente si produce un deficit di  $\text{NAD}^+$  che deve essere recuperato dalla via gliceropiruvica.
- la ricostituzione del  $\text{NAD}^+$  avviene attraverso la riduzione del diidrossiacetone fosfato a glicerolo 3-fosfato con produzione finale di glicerolo. Questo meccanismo consente il riequilibrio del potenziale redox intracellulare e mantiene il rapporto tra  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a livello ottimale.
- La produzione di glicerolo consuma ATP.

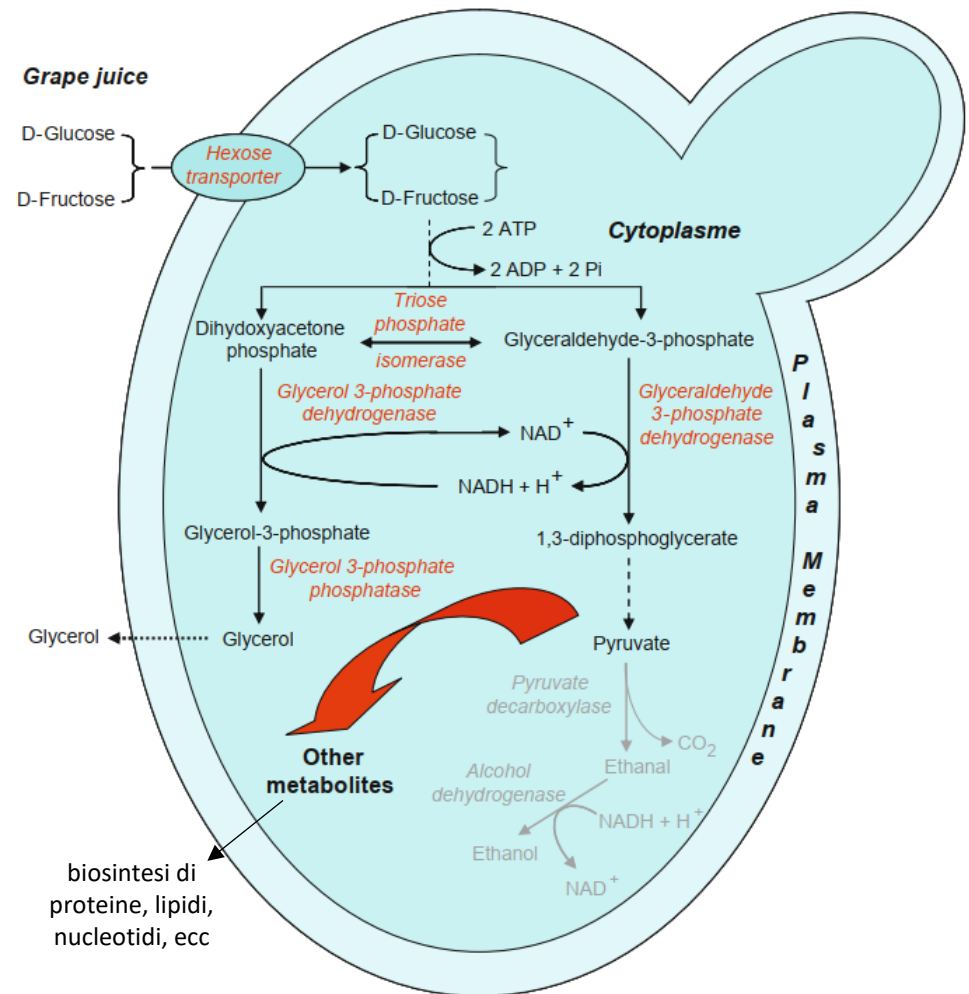
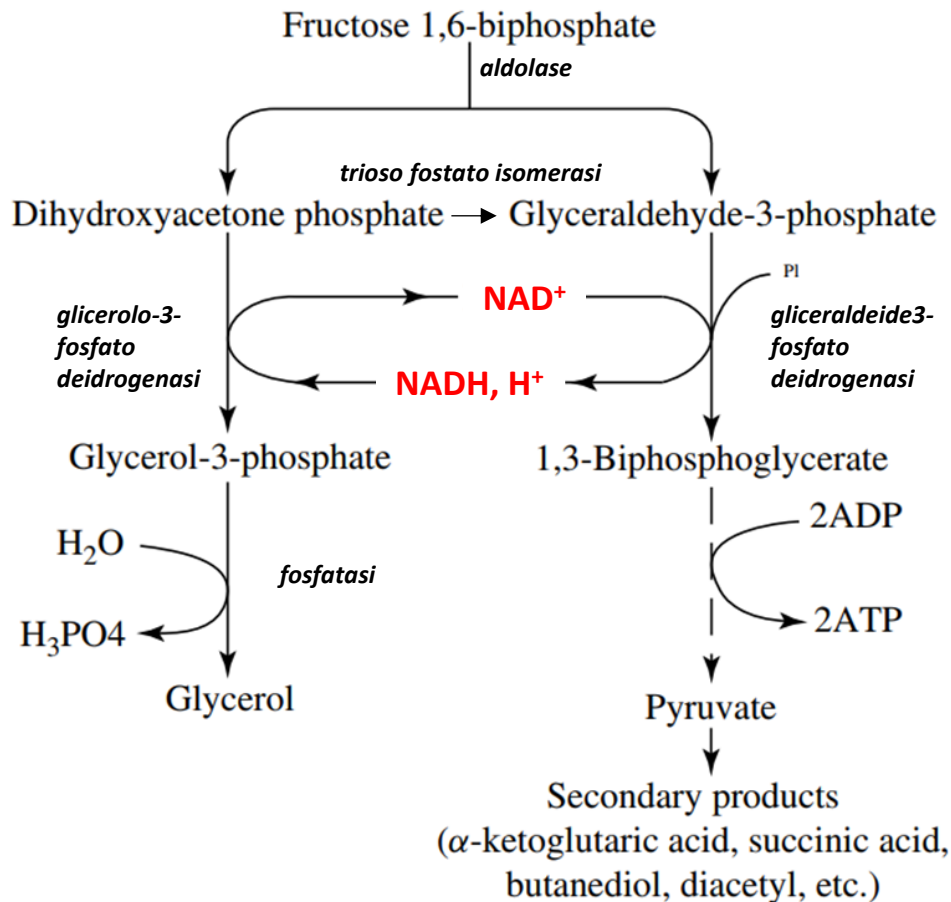


Fig. 1.5 Glyceropiruvic fermentation

## Fermentazione gliceropiruvica

Il diidrossiacetone-1-fosfato, prodotto dall'aldolase, può essere ossidato a glicerolo-3-fosfato dall'enzima glicerolo-3-fosfato deidrogenasi che diventa l'accettore finale dell'elettrone.

In questa fermentazione, vengono prodotte solo due molecole di ATP per ciascuna molecola di esoso consumata. L'ATP è necessario ad attivare il glucosio nella prima fase della glicolisi. la fermentazione gliceropiruvica è un processo in stretto contatto con la fermentazione alcolica ed è utilizzata dai lieviti per consentire il riequilibrio del potenziale redox intracellulare (ovvero mantiene il rapporto tra  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a livello ottimale).



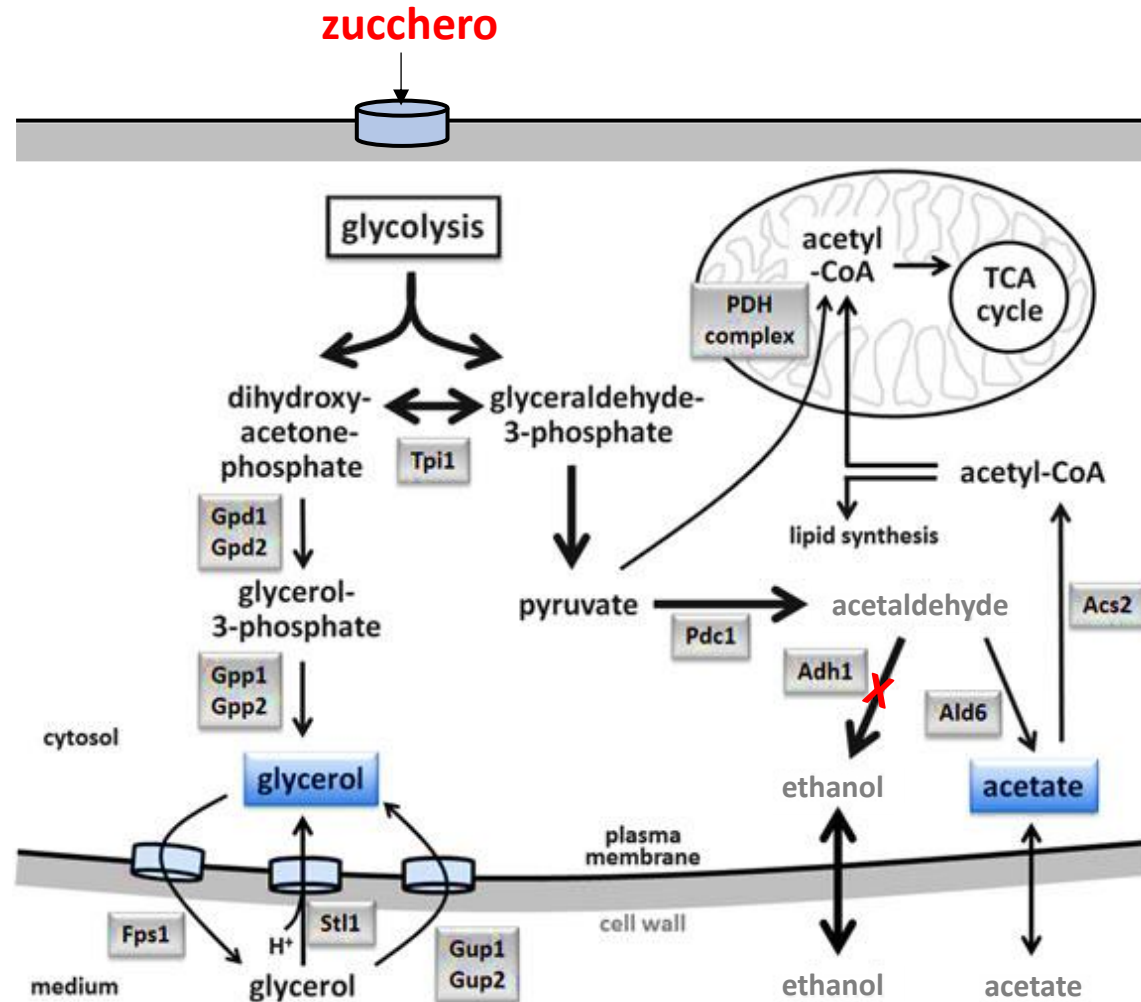
Glyceropyruvic fermentation pathway

Dalla fermentazione gliceropiruvica, il guadagno netto in ATP è nullo, non fornisce biologicamente energia assimilabile per i lieviti.

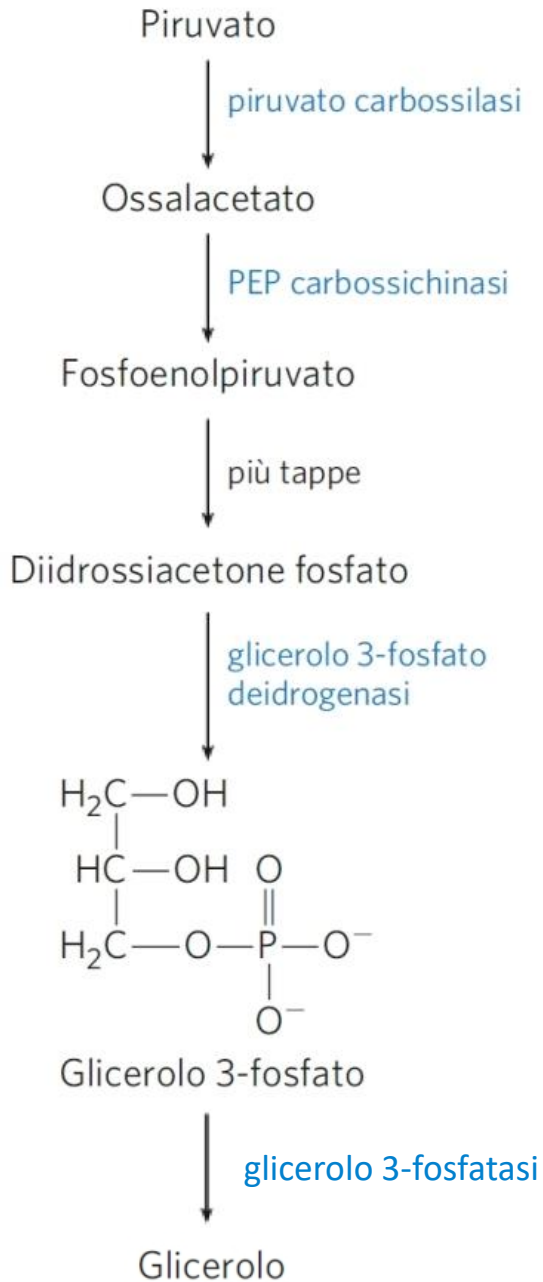
Fermentazione gliceropiruvica: Il glicerolo viene prodotto durante i primi giorni della fermentazione alcolica, quando i lieviti stanno crescendo e hanno bisogno di una grande quantità di piruvato per aumentare la loro biomassa.

La produzione di glicerolo nel lievito è probabilmente innescata da due meccanismi:

- la mancanza dell'enzima alcol deidrogenasi causa uno squilibrio redox.
- l'alto contenuto di zucchero iniziale nel mosto provoca uno stress osmotico, così i lieviti producono glicerolo per proteggersi e contrastare l'alta pressione osmotica esterna.



# Metabolismo del glicerolo



La formazione del glicerolo richiede l'azione sequenziale della glicerolo 3-fosfato deidrogenasi, NAD<sup>+</sup> dipendente e della glicerolo 3-fosfatasi.

Il glicerolo può anche essere utilizzato come fonte di carbonio in condizioni aerobiche da molti lieviti.

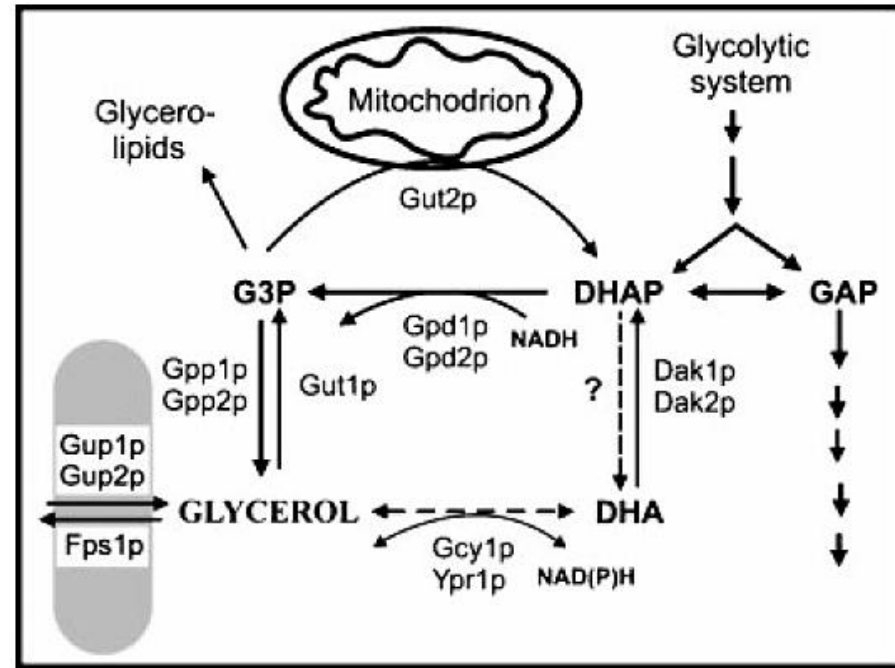
Il glicerolo è il terzo componente del vino (dopo l'etanolo e l'acqua) dove la concentrazione oscilla tra 6-10 g/L e conferisce sensazioni dolci al palato.



# Catabolismo del glicerolo

Nel *Saccharomyces* sono stati identificati due percorsi diversi per il catabolismo del glicerolo:

- Il glicerolo può essere fosforilato dalla glicerolo chinasi (Gut1p) e il glicerolo-3-fosfato formato può essere ossidato dalla glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale, FAD-dipendente (Gut2p) a diidrossiacetone fosfato. Il diidrossiacetone fosfato può essere trasformato in glicerolo 3-fosfato dalla glicerolo 3-fosfato deidrogenasi NADH-dipendente (Gpd1p/2p).
- Il glicerolo può essere trasformato in diidrossiacetone dalla glicerolo deidrogenasi NAD(P)-dipendente (Gcy1p e Ypr1p) e successivamente fosforilato a diidrossiacetone fosfato dalla diidrossiacetone chinasi (Dak1/2p).



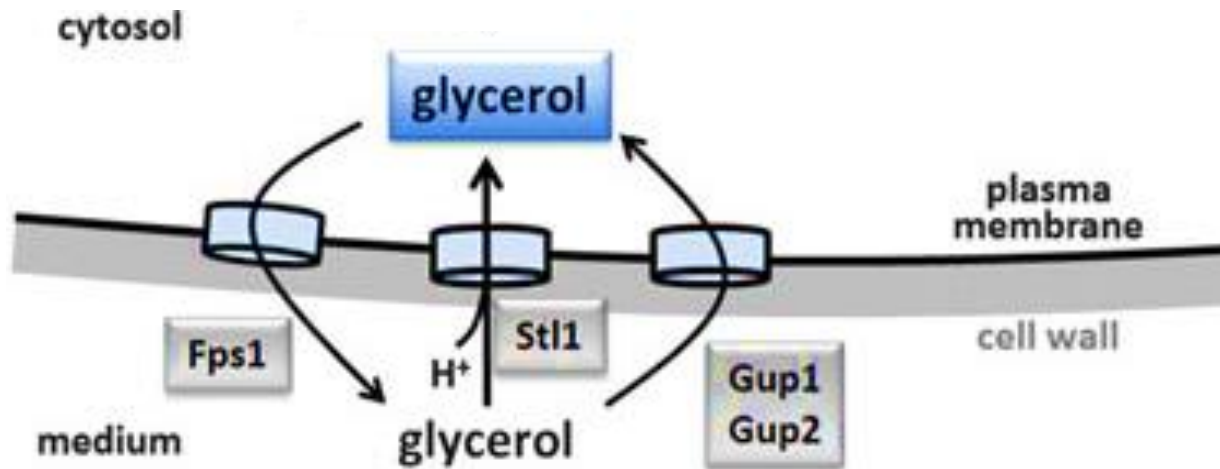
Scheme of the pathways involved in glycerol metabolism in *S. cerevisiae*

- Gut2p: glicerolo 3-fosfato deidrogenasi mitocondriale, FAD-dipendente
- Gpp1p/2p: glicerolo 3-fosfatasi
- Gut1p: glicerolo chinasi
- Gpd1p/2p: glicerolo 3-fosfato deidrogenasi, NADH-dipendente
- Dak1/2p: diidrossiacetone chinasi
- Gcy1p and Ypr1p: glicerolo deidrogenasi NAD(P)H dipendente
- Gup1p/2p: proteina canale per il glicerolo
- GAP: gliceraldeide 3-fosfato

Il trasporto del glicerolo è fondamentale per il metabolismo del *S. cerevisiae*:

Il glicerolo intracellulare prodotto lascia la cellula attraverso una proteina canale la Fps1. Se il mezzo è iperosmotico, l'attività del canale è ridotta e il glicerolo rimane prevalentemente all'interno della cellula.

L'assorbimento del glicerolo può avvenire per diffusione passiva attraverso le proteine canali Gup1 e Gup2, anche se sono stati identificati meccanismi di trasporto attivo (proteina Stl1) che agiscono, principalmente, in condizioni di stress osmotico.



Proteine canale per il glicerolo:

Gup1

Gup2

Stl1

Fps1

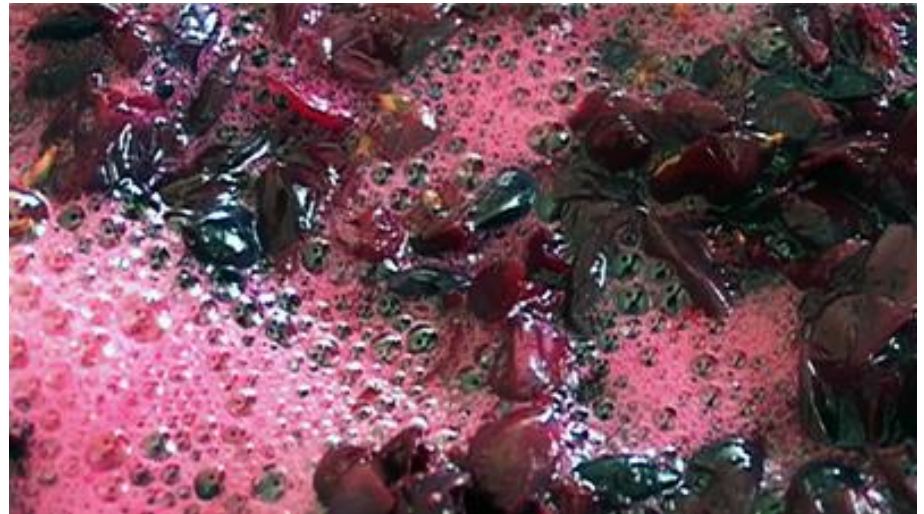
# Problemi nella fermentazione

---

Una fermentazione alcolica è considerata finita, quando nel vino si riscontra una concentrazione di zuccheri inferiore allo 0,4% (4 g/L, glucosio + fruttosio); anche se solitamente, nella pratica di cantina si nota che gli zuccheri residui a fermentazione completa sono al di sotto dei 2 g/L.

Diversi fattori hanno un impatto sulla velocità di fermentazione e possono portare a fermentazioni incomplete:

- Carenza di nutrienti
- Tossicità da etanolo
- Temperature estreme (alte e basse)
- Residui di insetticidi e antiparassitari
- Competizione microbica



# Problemi nella fermentazione

---

- La velocità di fermentazione è funzione, sia della biomassa vitale presente sia del tasso di utilizzo degli zuccheri da parte delle singole cellule. L'importanza dell'alimentazione biologica è cruciale per esempio, la nutrizione azotata senza un corretto equilibrio con i lipidi (acidi grassi insaturi, ergosterolo) potrebbe portare alla morte del lievito durante la fermentazione. È dimostrato che alcune fonti di azoto, soprattutto inorganico, possono potenzialmente avere un impatto negativo a causa dei loro effetti di “segnalazione di apoptosi”. Una corretta alimentazione con azoto organico, naturalmente associato ai lipidi come lievito inattivato o autolisato, è particolarmente importante durante la fermentazione dove le condizioni di stress sono elevate, come nel mosto ad alto contenuto zuccherino e l'incremento del etanolo.
- L'etanolo prodotto nel corso della fermentazione alcolica, rallenta l'assimilazione dei composti azotati, modificando la permeabilità delle membrane cellulari. La tossicità dell'etanolo è generalmente attribuita all'affinità di questo composto per i fosfolipidici del doppio strato; il risultato è una modificazione nella struttura della membrana, che ha effetti negativi su molti processi associati ad essa.

# Fluidità della membrana:

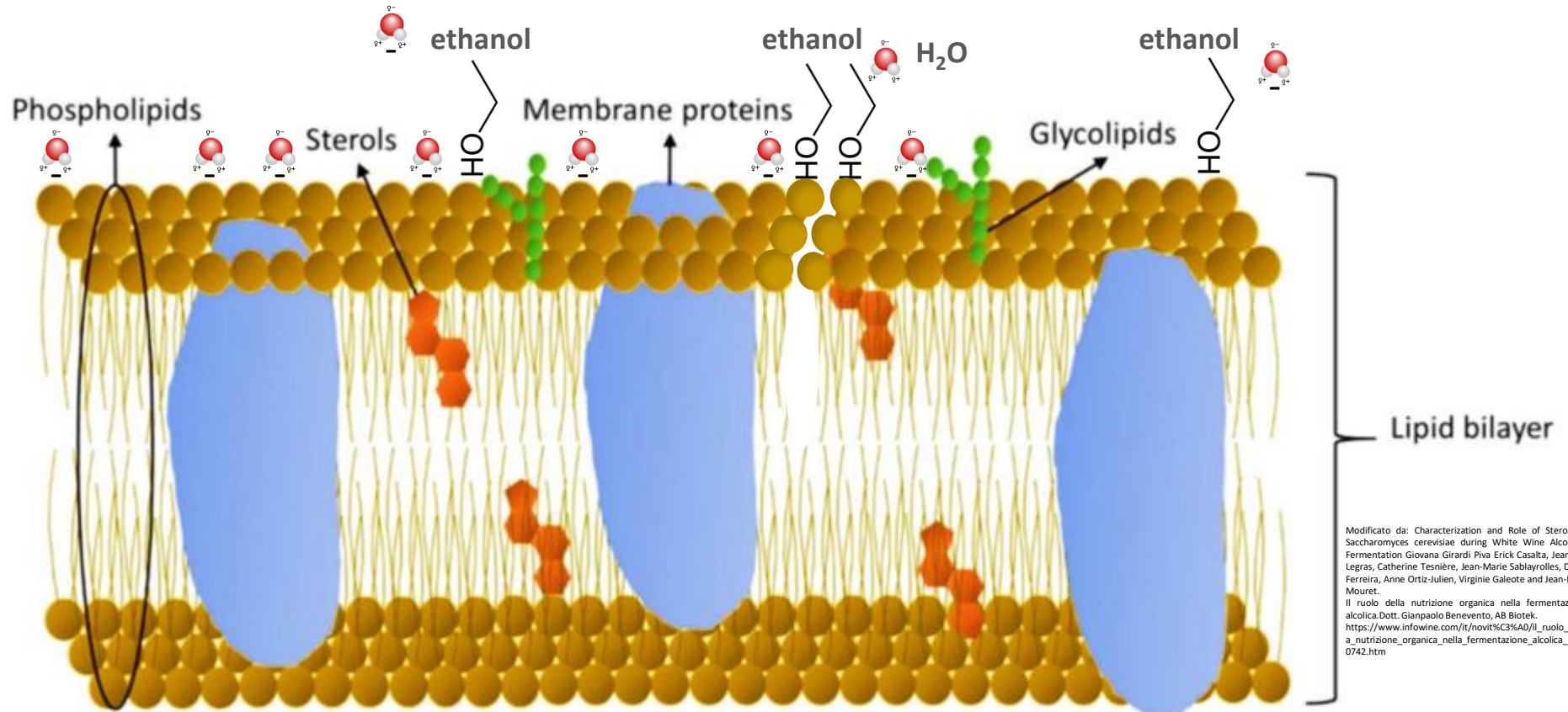
un'eccessiva fluidità o rigidità impedisce il corretto funzionamento dei sistemi di trasporto cellulare.

---

- La fluidità della membrana plasmatica è notevolmente influenzata dalla temperatura e dalla concentrazione di etanolo.
- Durante la fermentazione alcolica avvengono cambiamenti molto importanti nell'ambiente del lievito. La concentrazione di etanolo aumenta progressivamente e i lieviti devono adattare le loro membrane plasmatiche a questo nuovo ambiente aggressivo.
- L'etanolo ha un impatto sulle funzionalità delle membrane, attraverso le interazioni polari e legami idrogeno con le teste polari dei fosfolipidi e le proteine integrali di membrana.
- La cellula reagisce ad elevate concentrazioni di etanolo incrementando la quantità di ergosterolo e il rapporto fra acidi grassi insaturi (palmitoleico e oleico) e saturi (palmitico e stearico).

I cambiamenti nel grado di insaturazione degli acidi grassi, la diminuzione del contenuto di proteine e l'aumento di ergosterolo, sono gli effetti per contrastare l'azione denaturante dell'etanolo sulle teste idrofile degli acidi grassi e sulle proteine.

# Stress da etanolo nel *Saccharomyces*



Modificato da: Characterization and Role of Sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during White Wine Alcoholic Fermentation. Giovanna Girardi Piva, Erick Casalta, Jean-Luc Legras, Catherine Tesnière, Jean-Marie Sablayrolles, David Ferreira, Anne Ortiz-Julien, Virginie Galeote and Jean-Roch Mouret.  
Il ruolo della nutrizione organica nella fermentazione alcolica. Dott. Gianpaolo Benevento, AB Biotek.  
[https://www.infowine.com/it/novit%C3%A0/il\\_ruolo\\_della\\_nutrizione\\_organica\\_nella\\_fermentazione\\_alcolica\\_sc\\_20742.htm](https://www.infowine.com/it/novit%C3%A0/il_ruolo_della_nutrizione_organica_nella_fermentazione_alcolica_sc_20742.htm)

L'etanolo si inserisce fra teste lipidiche della membrana, con il suo gruppo OH associato al gruppo fosfato delle teste lipidiche e le code idrofobiche allineate al nucleo idrofobico della membrana. Le molecole di etanolo sostituiscono le molecole d'acqua interfacciali, generando spazi laterali tra le teste polari e di conseguenza lacune nel nucleo idrofobico. Questo fenomeno crea un'energia sfavorevole, quindi il sistema cerca di minimizzarla creando una fase intermedia. La modificazione della membrana provoca un assottigliamento e possono verificarsi alterazioni della struttura e della funzione proteica, portando all'inattivazione cellulare durante il processo di fermentazione. I fitosteroli e l'aggiunta di cellule di lievito inattive nel mezzo di fermentazione sono in grado di aumentare la disponibilità di steroli e di ridurre la domanda cellulare di lipidi. L'integrazione con steroli può anche aumentare la produzione di composti aromatici volatili, come alcoli superiori.

## Fluidità della membrana

- nella preparazione del **vino bianco** i lieviti *Saccharomyces* si sviluppano a basse T (14–18°C) e senza aerazione per conservare gli aromi, questo riduce la fluidità della membrana; per mantenere un'adeguata fluidità i lieviti aumentano la proporzione di UFA nei fosfolipidi.
- In normali condizioni di fermentazione del vino bianco, il succo d'uva è povero di acidi grassi e la fermentazione avviene in condizioni ipossiche per cui la fluidità di membrana viene ottenuta incorporando acidi grassi a catena media (MCFA) nei fosfolipidi di membrana (l'effetto di una corta catena è simile a quello del doppio legame di una catena lunga). Le scorze di lievito assorbono MCFA dai terreni e forniscono steroli e UFA ad altri lieviti.



## Fluidità della membrana

- nella preparazione del **vino rosso** la fermentazione avviene ad alte T (28-30 °C) e in condizioni aerate per aumentare l'estrazione del colore. Nel caso particolare di vinificazione del rosso, questi cambiamenti possono essere fatti senza problemi perché l'ossigeno è introdotto durante il processo di travaso.
- L'etanolo altera la fluidità di membrana per cui i *Saccharomyces cerevisiae* aumentano la proporzione di steroli e di UFA per compensare tale effetto.





# Problemi nella fermentazione

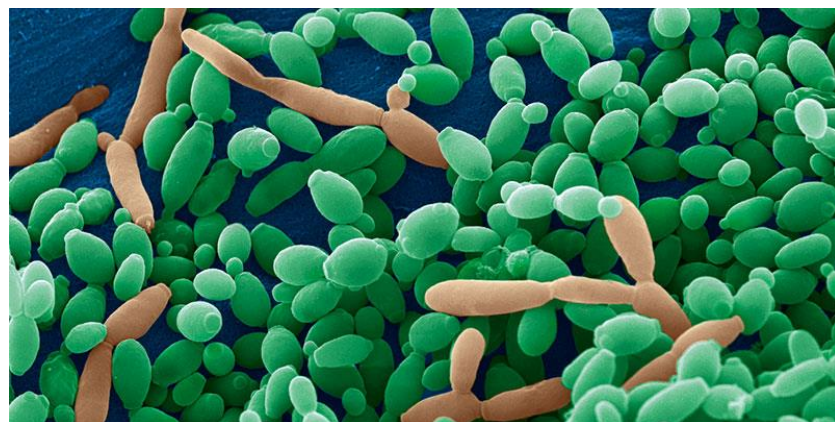
---

- Temperature estreme: troppo basse crea problemi di crescita dei lieviti. Una drastica diminuzione della temperatura può provocare un'eccessiva rigidità nelle membrane prima che i lieviti possano adattarsi. Temperature troppo alta (>30°C) rischio di blocco della fermentazione.
- Presenza di sostanze antifungine, insetticidi e antiparassitari: il succo d'uva può contenere residui di pesticidi che possono compromettere gravemente la fermentazione alcolica.
- Antagonismo tra microorganismi che competono per i nutrienti (*Saccharomyces cerevisiae*, lieviti autoctoni e batteri). Questo problema è maggiore quando il pH del succo d'uva è alto perché l'effetto antisettico dell'anidride solforosa aggiunta è meno efficace.

## Risoluzione dei problemi:

- abbondante aerazione
- azoto
- scorze di lievito.

Se la fermentazione si ferma il lievito deve essere reinoculato.



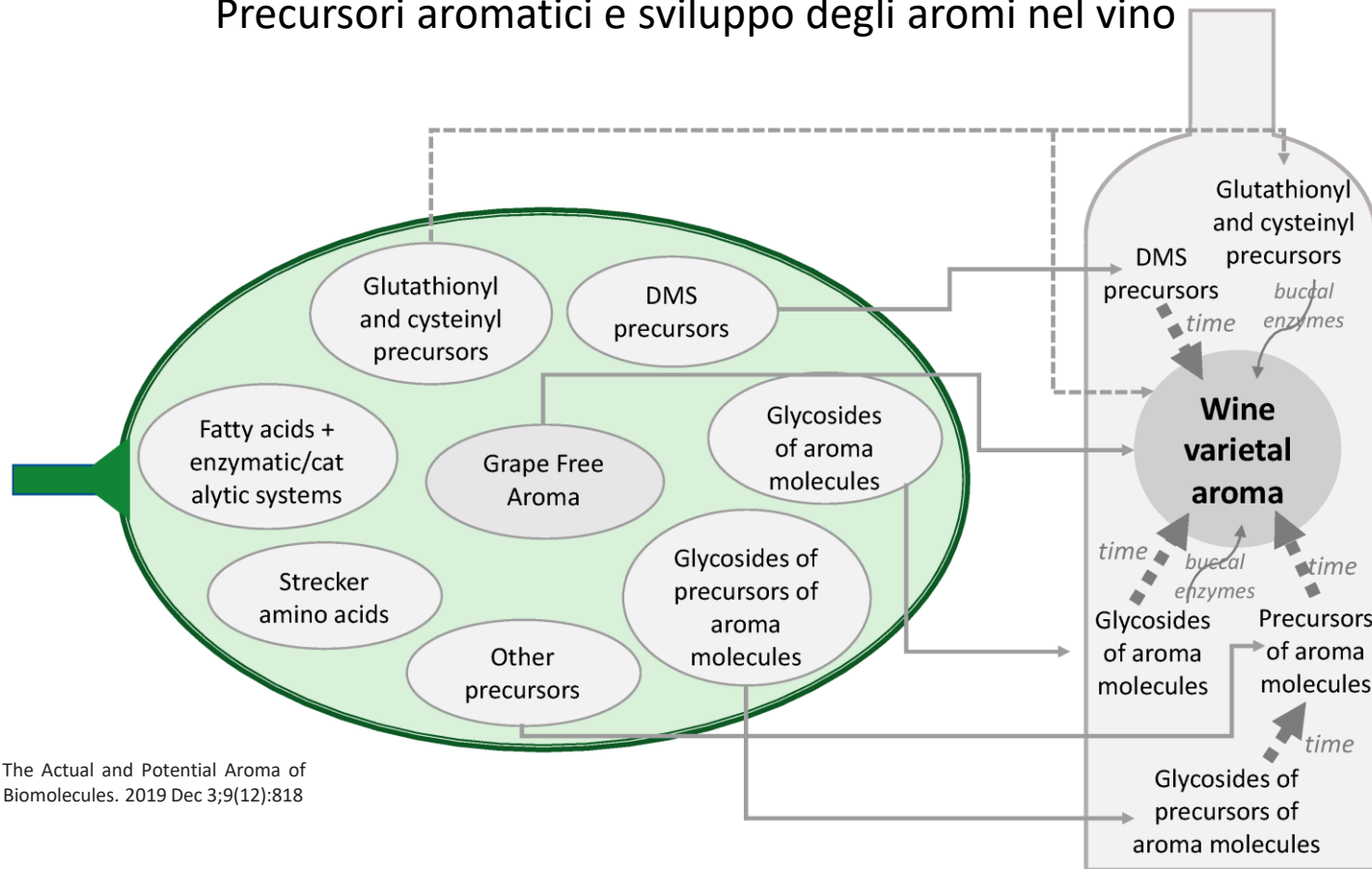
• Gli **aromi dei vini** possono essere distinti in tre categorie:

- **Primari:** provenienti dall'uva e dal suo grado di maturazione
- **Secondari:** provenienti dall'attività fermentativa prodotta dai lieviti o batteri lattici.
- **Terziari:** provenienti dall'invecchiamento del vino



<https://cartizepdc.com/it/blog/profumi-sentori-aromi-vino/>

# Precursori aromatici e sviluppo degli aromi nel vino



Ferreira V, Lopez R. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Biomolecules*. 2019 Dec 3;9(12):818

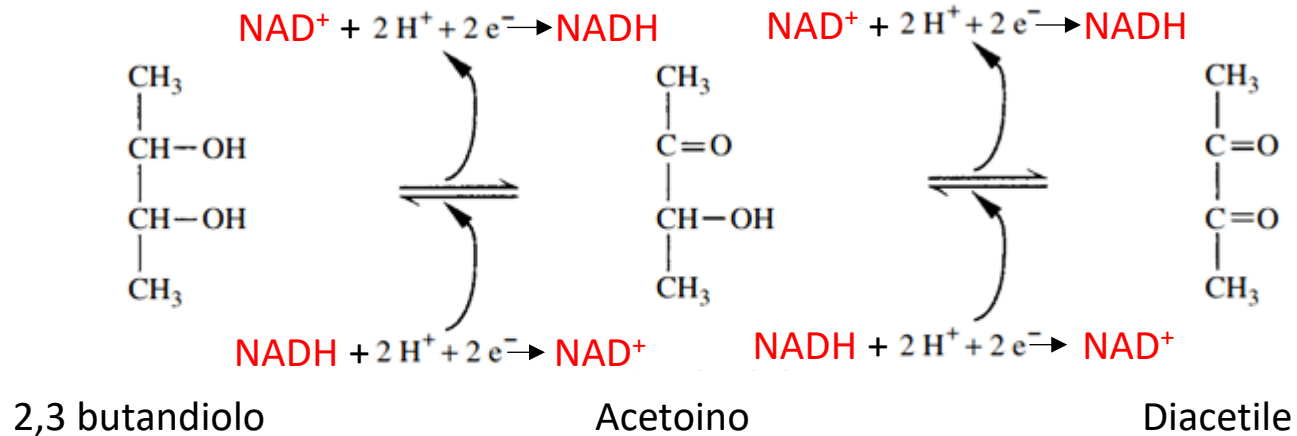
I precursori aromatici, sostanze inodore il cui aroma viene liberato nel corso della fermentazione alcolica, sono: glicosidi, glutazione-S-coniugati, cisteina-S- coniugati, dimetil solfuro (DMS) e altre molecole non volatili.

La produzione di composti aromatici da parte del lievito, soprattutto esteri, dipende dalla quantità di azoto prontamente assimilabile presente nel mosto, sotto forma amminica e ammoniacale. Il fabbisogno di azoto dipende dal ceppo considerato, ma anche dalla concentrazione iniziale degli zuccheri nel mosto.

Al lievito servono circa 180-210 mg/L di azoto assimilabile presenti nel mosto per produrre un vino con una gradazione alcolica di 13-14%.



# Sottoprodotti della fermentazione alcolica



**Fig. 2.7.** Oxidation–reduction balances of 2-3-butanediol

Il 2,3 butandiolo partecipa insieme all'acetoino (acetilmetilcarbinolo) e al diacetile agli equilibri redox della cellula.

L'acetoino possiede un leggero odore di latte ed è contenuto nei vini in quantità dell'ordine di 10 mg/L; il diacetile, il cui tenore nei vini è in genere nettamente più basso (dell'ordine di 0.3 mg/L) possiede un piacevole odore di burro e di noce che si può avvertire per tenori prossimi a 2 mg/L.

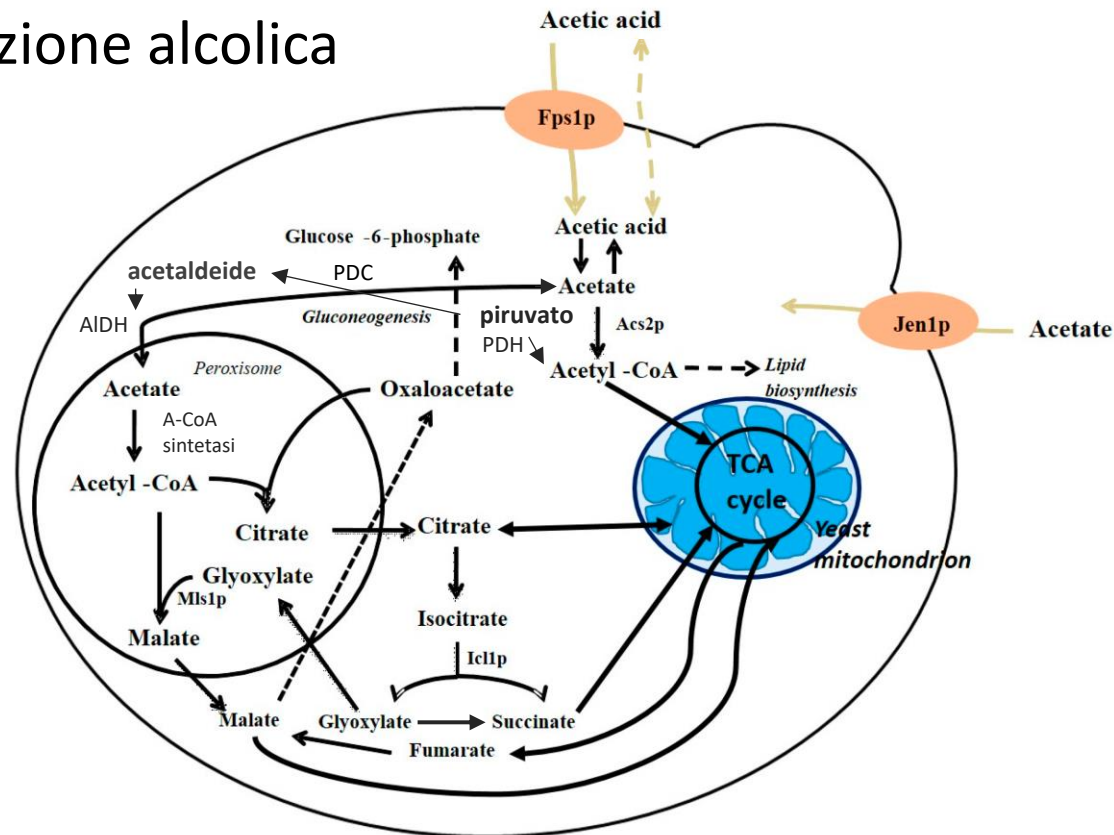


# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

**Acido acetico:** principale acido volatile del vino. Odore di aceto e sensazione sgradevole al palato.

Il limite massimo accettabile di acidità volatile nei vini da tavola rossi e bianchi è di 1,2 g/L.

Quantità normalmente prodotta dai lieviti 0,1-0,3 g/L.



In condizioni aerobiche, il lievito può utilizzare l'acetato come fonte di carbonio. Nelle cellule di lievito repressate dal glucosio, a pH basso, l'acido acetico entra principalmente per diffusione semplice. L'acetato essendo l'unica fonte di energia e di carbonio disponibile, viene metabolizzato ad acetil-CoA. L'acetil-CoA entra nei mitocondri e viene quindi ossidato nel ciclo TCA. Mentre, l'acetil-CoA, entrato nel ciclo del glicossilato, viene utilizzato per produrre succinato, riempiendo il TCA con precursori biosintetici (reazione anaplerotica).

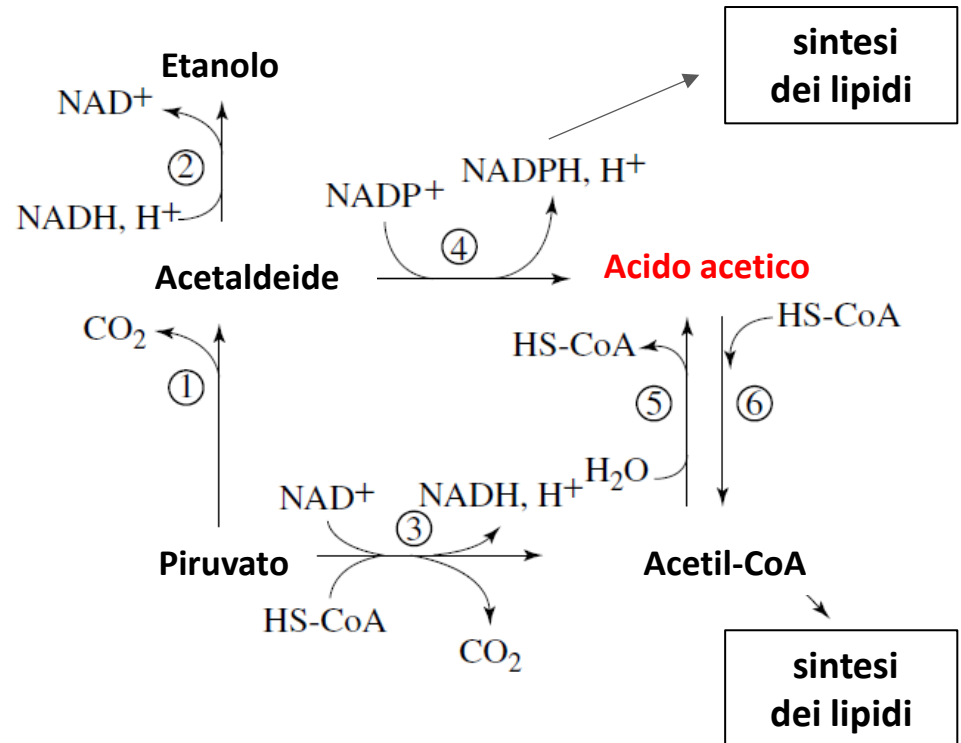
Nel vino, la produzione di acido acetico deriva principalmente all'attività dell'acetaldeide deidrogenasi che ossida l'acetaldeide in acetato.

# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

Un'elevata concentrazione di zuccheri e quindi un elevato stress osmotico o anche uno stress termico fa sì che la specie *S. cerevisiae* produca molto glicerolo e acido acetico. La spiegazione di questo fenomeno è legata ai meccanismi di adattamento del lievito a un mezzo con alta concentrazione di zucchero.

Le vie metaboliche utilizzate per produrre acido acetico sono due:

- 1) La formazione di acetil-CoA mediante decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico (**PDH**). Questa via è localizzata nei mitocondri ed è estremamente limitata alle condizioni di aerobiosi.
- 2) L'ossidazione dell'acetaldeide tramite **l'aldeide deidrogenasi**, enzima attivo durante la fermentazione che ha come cofattore  $\text{NADP}^+$ . Questa via porta alla sintesi del  $\text{NADPH}^+$ , questo coenzima può intervenire nella sintesi dei lipidi con conseguente aumento della produzione dell'acido acetico nel lievito. Infatti, l'acetil-CoA sintetasi porta alla sintesi di acetil CoA e l'acetil CoA idrolasi porta alla produzione di acido acetico.



**Fig. 2.11.** Acetic acid formation pathways in yeasts. 1 = pyruvate decarboxylase; 2 = alcohol dehydrogenase; 3 = pyruvate dehydrogenase; 4 = aldehyde dehydrogenase; 5 = acetyl-CoA hydrolase; 6 = acetyl-CoA synthetase



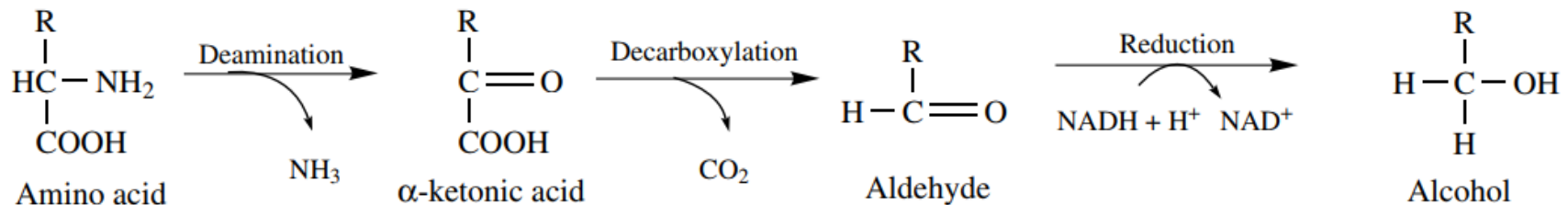
# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

**Alcool superiori:** sono alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio, essi sono per la maggior parte di origine fermentativa. Sono presenti nei vini a dosi variabili da 150 a 550 mg/L. Come i loro esteri possiedono odori intensi che possono giocare un ruolo importante nell'aroma dei vini.

I principali alcoli superiori di origine fermentativa sono l'alcol isobutilico (2-metil-propan-1-olo) e gli alcoli amilici (miscela di 2- metil-butan-1-olo e di 3- etil-butan-1-olo).

Gli alcoli superiori sono prodotti dai lieviti sia direttamente a partire dagli zuccheri (piruvato è un  $\alpha$ -chetoacido), sia a partire dagli amminoacidi dell'uva attraverso le reazioni di Ehrlich: l'amminoacido viene deaminato e trasformato in un  $\alpha$ -chetoacido (una deidrogenasi ossida l'amminoacido a imminoacido che, a sua volta, è idrolizzato a  $\alpha$ -chetoacido). La parte rimanente dell'amminoacido ( $\alpha$ -chetoacido) entra in una reazione a catena, irreversibile che porta alla formazione di un prodotto secondario della fermentazione alcolica: gli alcoli superiori

Dalla leucina si forma l'alcol isoamilico e dall'isoleucina l'alcol amilico

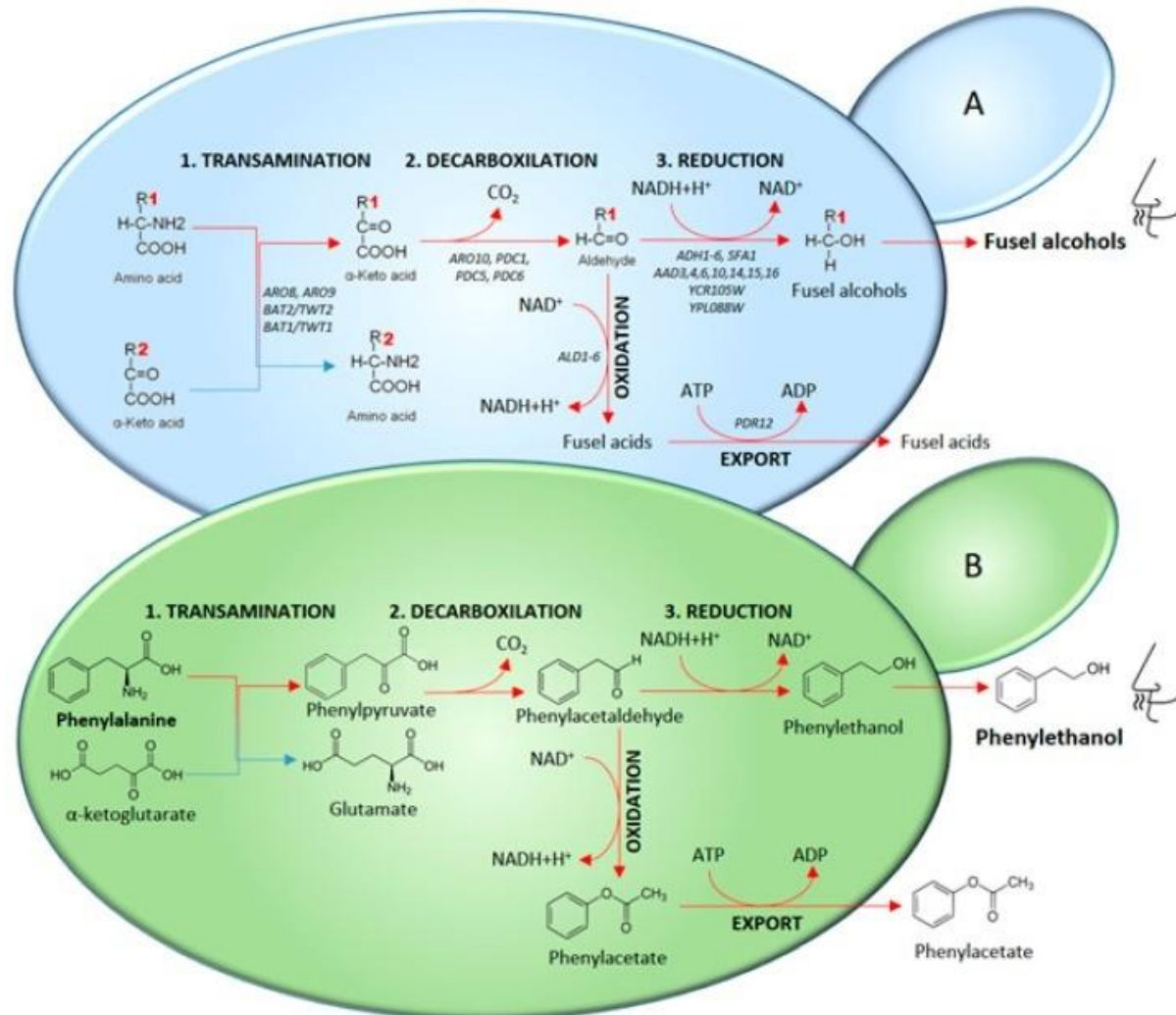


Formation of higher alcohols from amino acids (Ehrlich reactions)

Gli alcoli superiori si ottengono attraverso reazioni cataboliche partendo dagli amminoacidi mediante le reazioni di Ehrlich e contribuiscono alla complessità aromatica del vino a concentrazioni inferiori a 300 mg/L; invece, se la concentrazione supera i 400 mg/L sembrano avere un effetto negativo sull'aroma. I principali alcoli superiori sono l'1-propanolo, l'isobutanolo e l'alcol isoamilico, mentre i precursori aromatici degli alcoli sono il 2-feniletanolo (alcol aromatico con profumo simile alla rosa) e il tirosolo.

### Il percorso di Ehrlich:

Il catabolismo degli amminoacidi aromatici (Phe, Tyr e Trp), degli amminoacidi a catena ramificata (Leu, Val e Ile) e degli amminoacidi contenenti zolfo (Met) porta alla formazione di acidi e alcoli particolari (A).



Il catabolismo della fenilalanina attraverso la via di Ehrlich porta alla formazione di feniletanolo e fenilacetato (B)

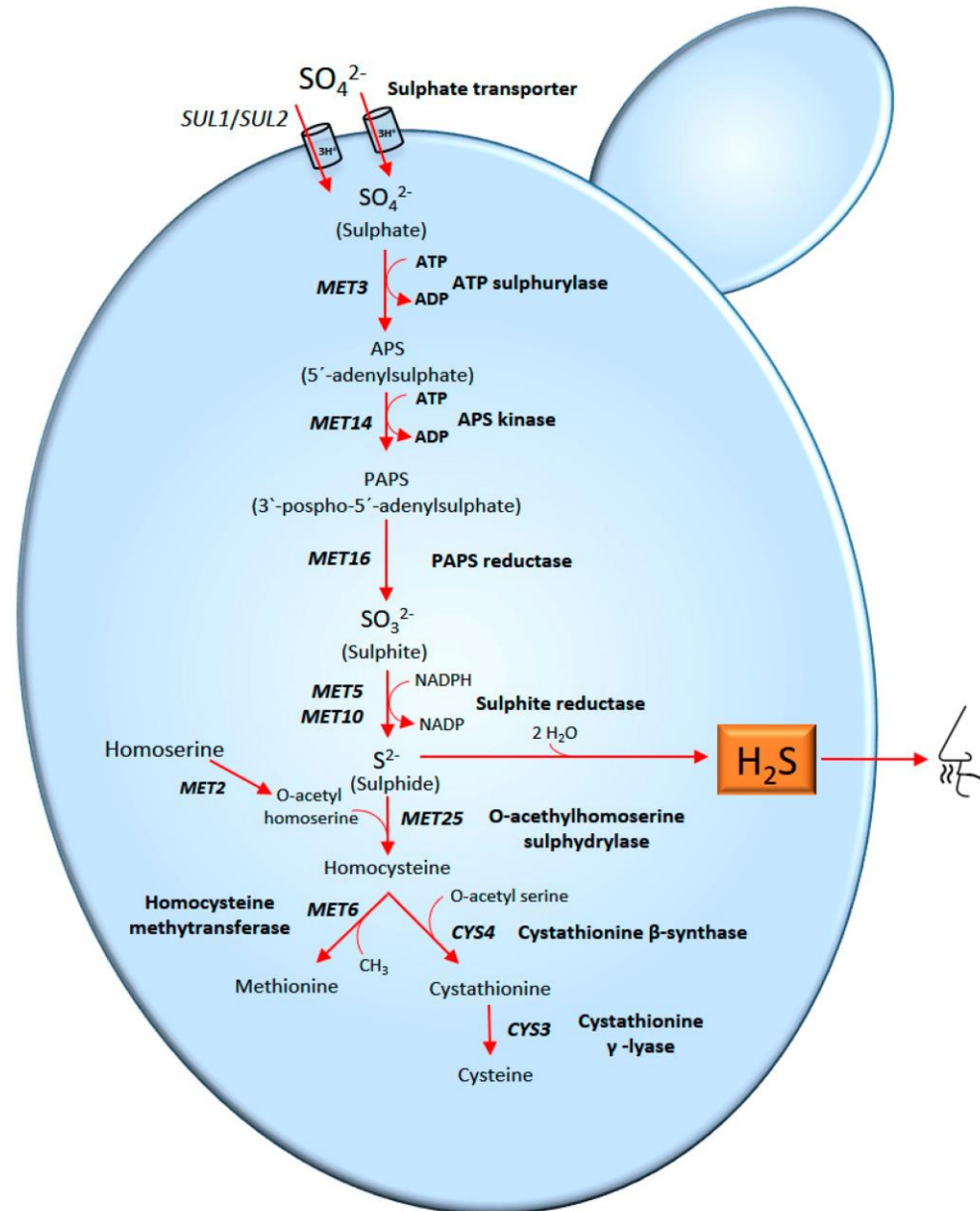
# Metabolismo dello zolfo e degli amminoacidi solforati metionina e cisteina nel *Saccharomyces*

La prima fase del percorso consiste nell'assorbimento del solfato attraverso due specifiche permeasi in co-trasporto con  $3H^+$ . Il solfato viene ridotto a solfuro in più passaggi utilizzando gli enzimi ATP solforilasi e solfito reductasi. Successivamente, il solfuro si combina con l'o-acetil omoserina per formare omocisteina che può essere trasformata in metionina. L'omocisteina insieme all'o-acetil serina forma cisteina.

Questa via è indotta quando c'è una richiesta metabolica di cisteina e metionina, che sono solitamente limitate nel mosto. Quando le fonti di azoto sono insufficienti, anche i precursori di questi aminoacidi (o-acetil serina e o-acetil omoserina) saranno limitati.

Il solfuro ( $S^{2-}$ ) non utilizzato per formare metionina o cisteina produce acido solfidrico ( $H_2S$ ).

Questo gas volatile può accumularsi e diffondersi nel vino con conseguente odore sgradevole.



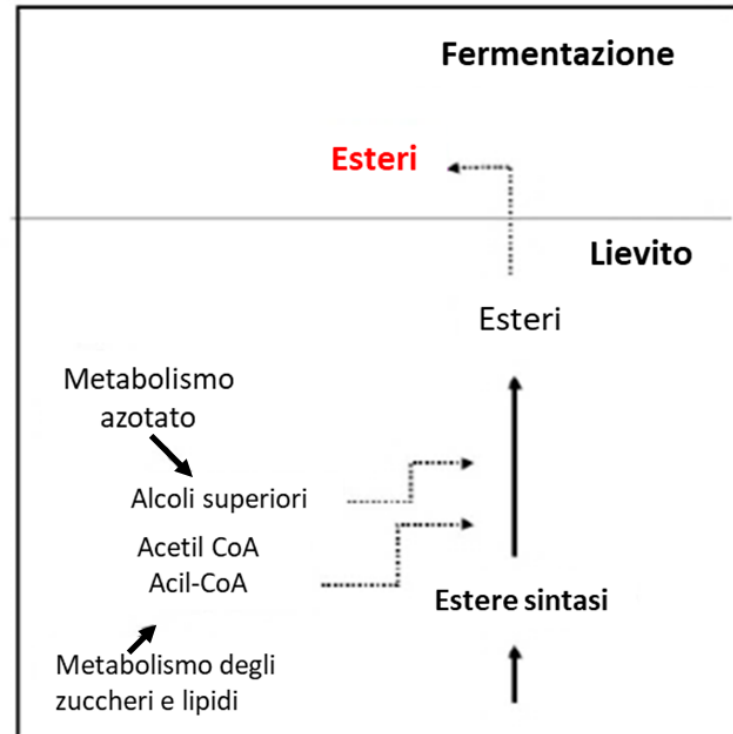
# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

**Esteri:** sono composti chimici che per idrolisi si decompongono in un acido (organico o inorganico) e in un alcol. Nel caso in cui l'acido sia un acido carbossilico la loro formula generale è:  $R_1COOR_2$

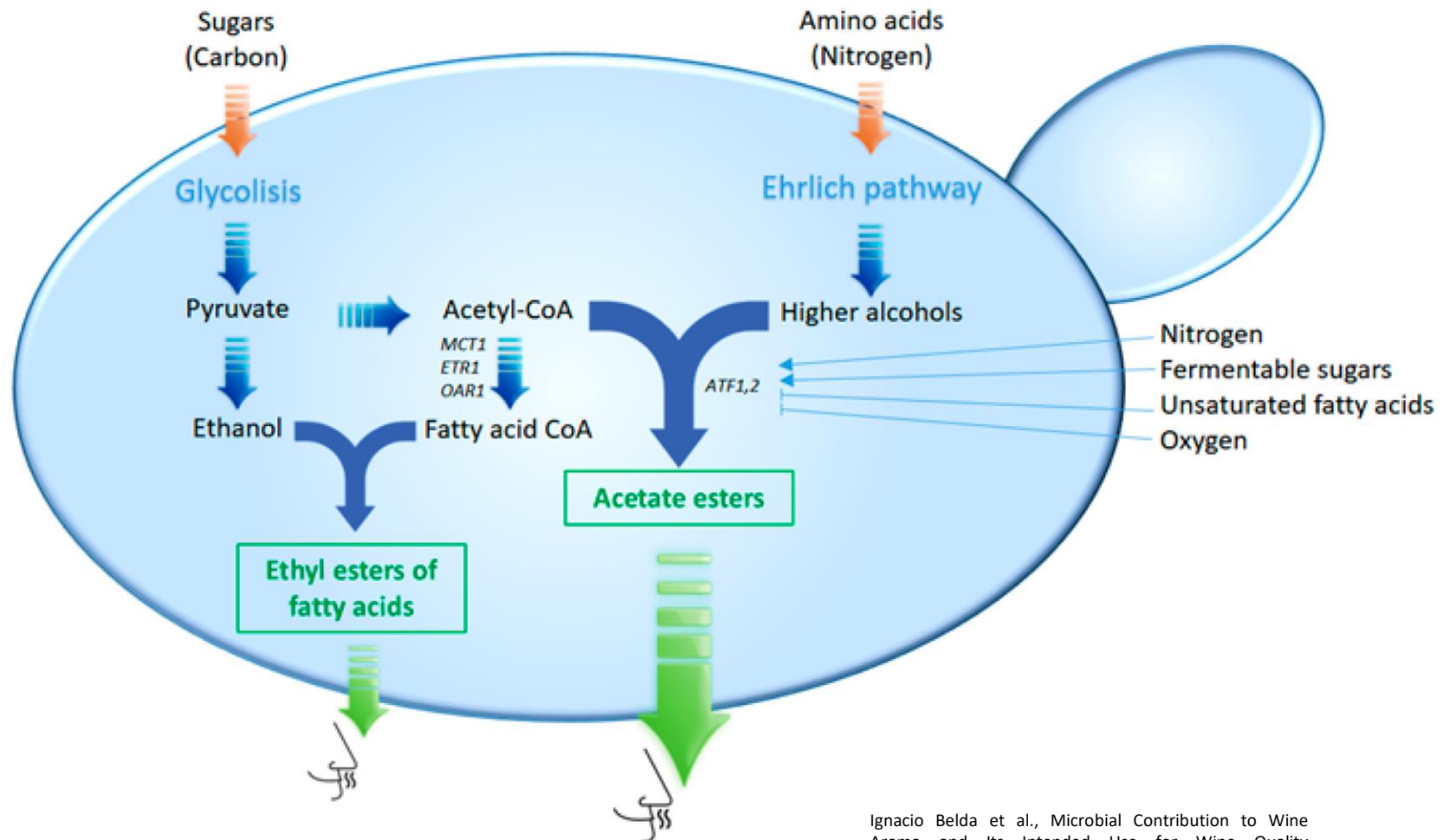


Nel vino ci sono due tipi di esteri: gli acetati degli alcoli superiori e gli esteri degli acidi grassi ed etanolo. **L'acetato di etile** è il più importante nel vino, la sua soglia di percezione si situa intorno a 160 mg/L, al di sotto di questo valore può denaturare il bouquet del vino conferendogli una nota pungente e sgradevole.

Gli esteri degli acidi grassi, come il **caproato e caprilato di etile**, sono formati dai lieviti durante la fermentazione alcolica. Gli esteri etilici degli acidi grassi hanno odore molto piacevoli di cera e di miele. Sono presenti ad una concentrazione totale di qualche mg/L. Gli esteri acetici degli alcoli superiori (acetato di isoamile, acetato di 2-feniletile) sono presenti in quantità modesta ma dotati di odore intenso (banana, caramella, mela).



I principali esteri prodotti dal lievito sono l'acetato di isobutile, l'acetato di amile, l'acetato di esile, l'acetato di etile (aroma fruttato), l'acetato di isoamile (aroma di banana) e il 2-feniletile acetato (2PA), descritto per fornire aromi di miele, fruttati e floreali al vino. L'estere principale nel vino è l'acetato di etile e può conferire un carattere di deterioramento a livelli superiori di 150-200 mg/L



L'integrazione con steroli può anche aumentare la produzione di composti aromatici volatili, come alcoli superiori ed esteri.

	<b>Esters</b>	<b>Sterol and Its Impact on Ester Biosynthesis</b>
	Isoamyl acetate	(+) Ergosterol and phytosterols
Acetate esters	Ethyl acetate, isobutyl acetate, 2-methylbutyl acetate, isoamyl acetate and phenylethyl acetate	(+) Ergosterol
	Ethyl acetate, isobutyl acetate and isoamyl acetate	(−) Phytosterols
Ethyl esters	Ethyl hexanoate and ethyl octanoate	(−) Phytosterols
	Ethyl acetate	(+) Ergosterol and phytosterols
	Ethyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate	(+) Ergosterol

Per l'ergosterolo e per i fitosteroli è stata osservata una correlazione positiva tra la loro concentrazione e una maggiore produzione di aromi.

# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

Compound	Threshold (mg L <sup>-1</sup> )	Aroma Impression
<b>Esters</b>		
Ethyl acetate	20–30 <sup>a</sup> ; 25–30 <sup>b</sup> ; 30 <sup>c,g</sup> , 33 <sup>f</sup>	Fruity, solvent-like
Isoamyl acetate	0.6–1.2 <sup>a</sup> ; 1.2–2 <sup>b</sup> ; 1.2 <sup>c,g</sup> , 1.6 <sup>f</sup>	Banana, pear
Phenylethyl acetate	3.8 <sup>a</sup> ; 0.2–3.8 <sup>b,f,g</sup>	Roses, honey, sweet
Ethyl hexanoate	0.2–0.23 <sup>b,f</sup>	Apple, fruity
Ethyl caproate	0.17–0.21 <sup>a</sup> ; 0.21 <sup>c,g</sup>	Apple, aniseed
Ethyl caprylate	0.3–0.9 <sup>a</sup> ; 0.9 <sup>c,g</sup>	Apple
Ethyl octanoate	0.9–1.0 <sup>b</sup> , 0.9 <sup>f</sup>	Apple, aniseed
<b>Higher Alcohols</b>		
Propanol	600 <sup>d</sup> , 700 <sup>h</sup> , 800 <sup>f,g</sup>	Alcohol, solvent-like
Isobutanol	100 <sup>d</sup> ; 80–100 <sup>e</sup> , 200 <sup>f,g</sup>	Alcohol, solvent-like
Isoamyl alcohol	50–65 <sup>b</sup> ; 50 <sup>d</sup> ; 50–60 <sup>e</sup> , 70 <sup>f,g</sup>	Alcohol, banana, vinous
Amyl alcohol	50–70 <sup>b</sup> ; 50 <sup>d</sup> ; 50–60 <sup>e</sup> , 65 <sup>f,g</sup>	Alcohol, solvent-like
2-Phenylethanol	40 <sup>b,d</sup> ; 45–50 <sup>e</sup> , 125 <sup>f,g</sup>	Roses, sweet
Tyrosol	200 <sup>c</sup> , 100 <sup>e</sup>	Bitter, chemical

## Sottoprodotti della fermentazione alcolica che influenzano l'aroma

---

### **Alcoli superiori**

n-propanolo, isobutanolo (2-metil-propanolo), alcol amilico attivo (2-metilbutanolo), alcol isoamilico (3-metilbutanolo). La formazione di alcoli superiori può essere incrementata dal pH, temperatura elevata e ossigeno. Contribuiscono al livello olfattivo, alla formazione **dell'aroma e del bouquet**.

---

### **Esteri**

La concentrazione di esteri prodotti durante la fermentazione alcolica è condizionata da una serie di fattori quali il ceppo di lievito, i metodi di vinificazione, la temperatura di fermentazione, i materiali insolubili e gli aminoacidi presenti nel mosto ed il suo pH, la qualità di anidride solforosa impiegata e la fermentazione malolattica.

---

### **Composti solforati**

L'idrogeno solforato, H<sub>2</sub>S il principale rappresentate della categoria con il suo caratteristico sentore di **uovo marcio**

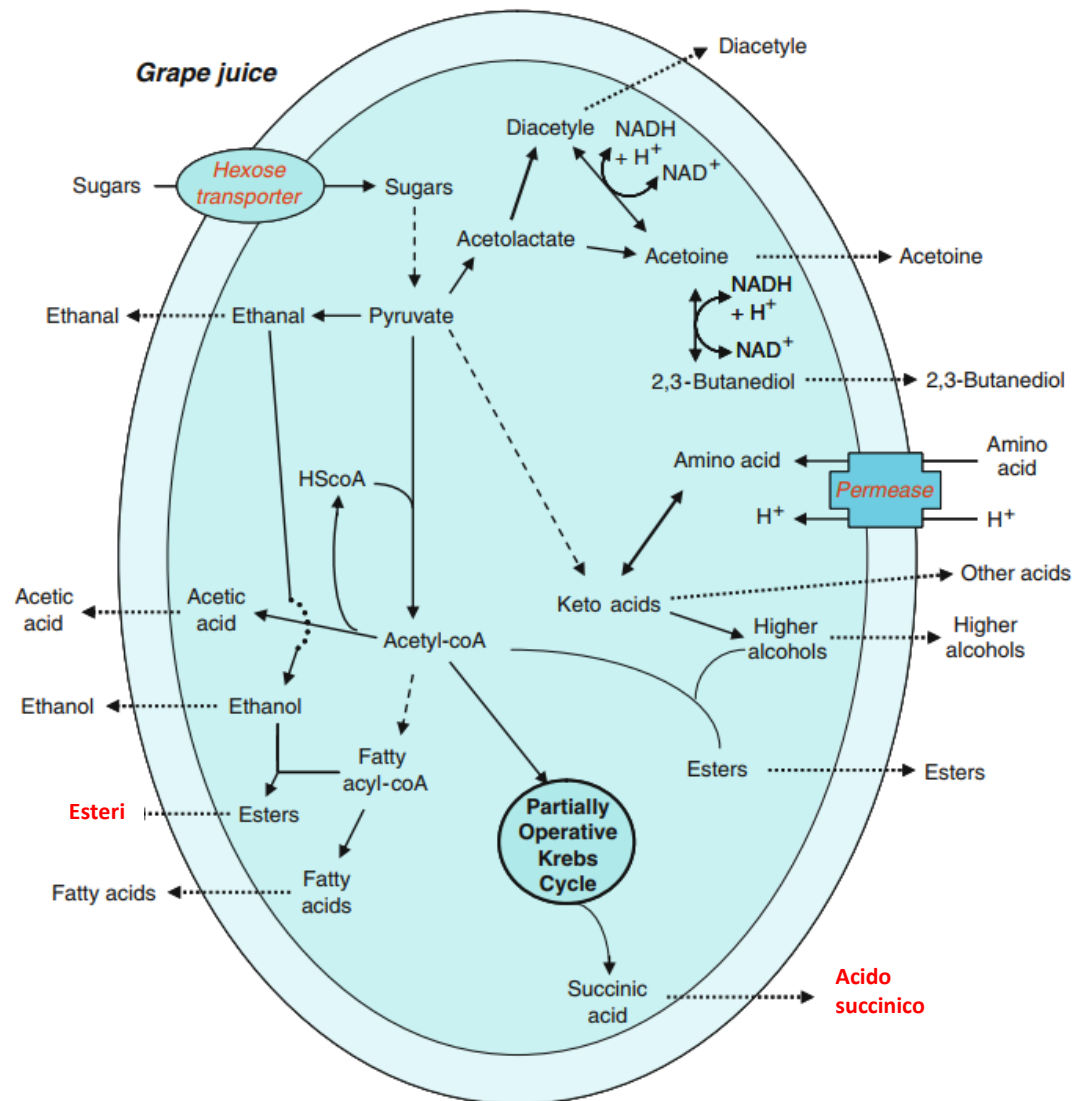
---



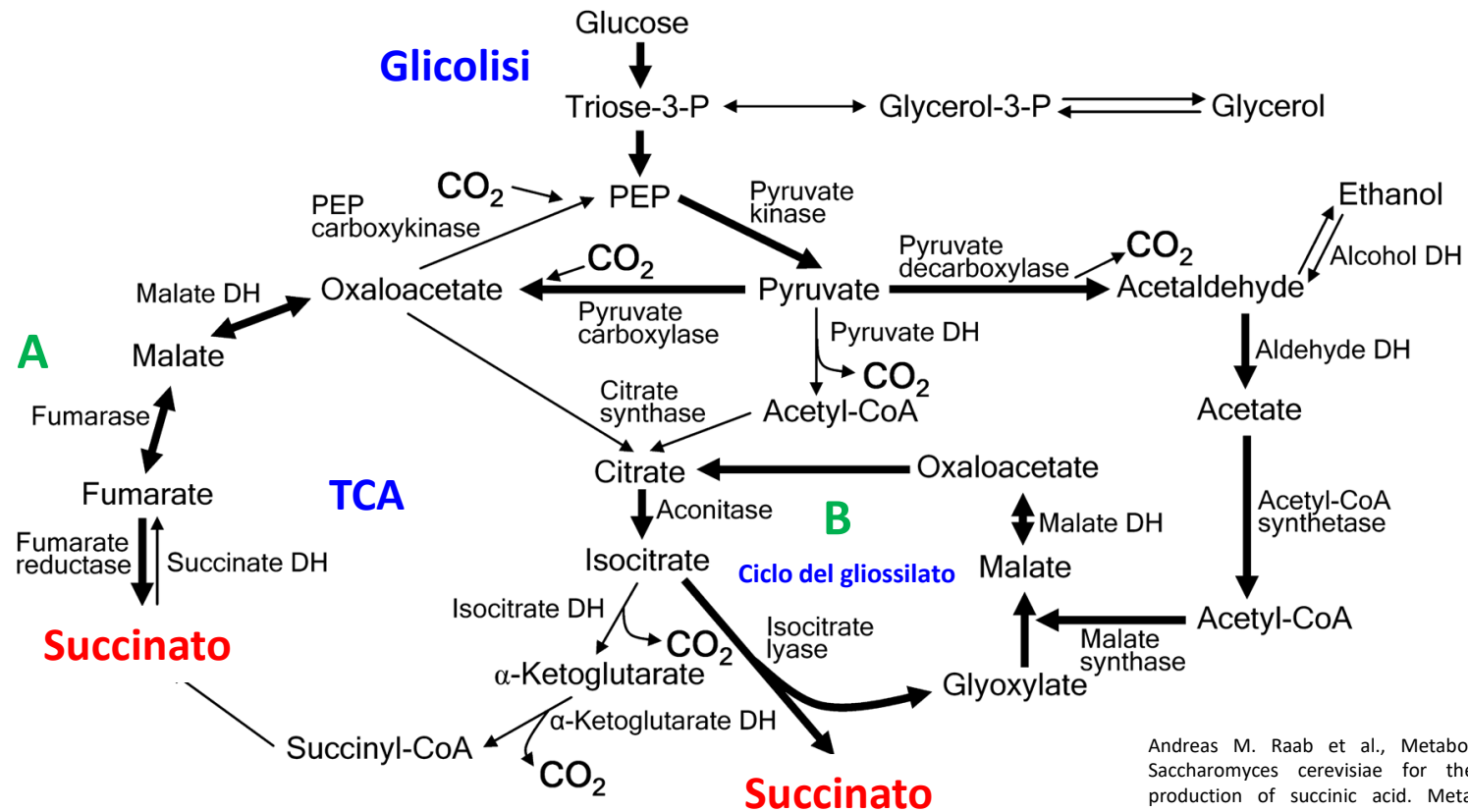
# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

**Acido succinico:** terzo prodotto della fermentazione, la concentrazione nel vino è compresa tra 0,6-1,2 g/L, derivante dal ciclo di Krebs. Contribuisce all'acidità del vino.

Il *Saccharomyces cerevisiae* rilascia nel vino anche altri acidi a basse concentrazioni come l'acido lattico, l'acido isovalerico, l'isobutirrico e acidi grassi, ecc.



# Sottoprodotti della fermentazione alcolica



Andreas M. Raab et al., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic Engineering*. Volume 12. 2010, page 518-525

l'acido succinico viene prodotto tramite diverse vie metaboliche:

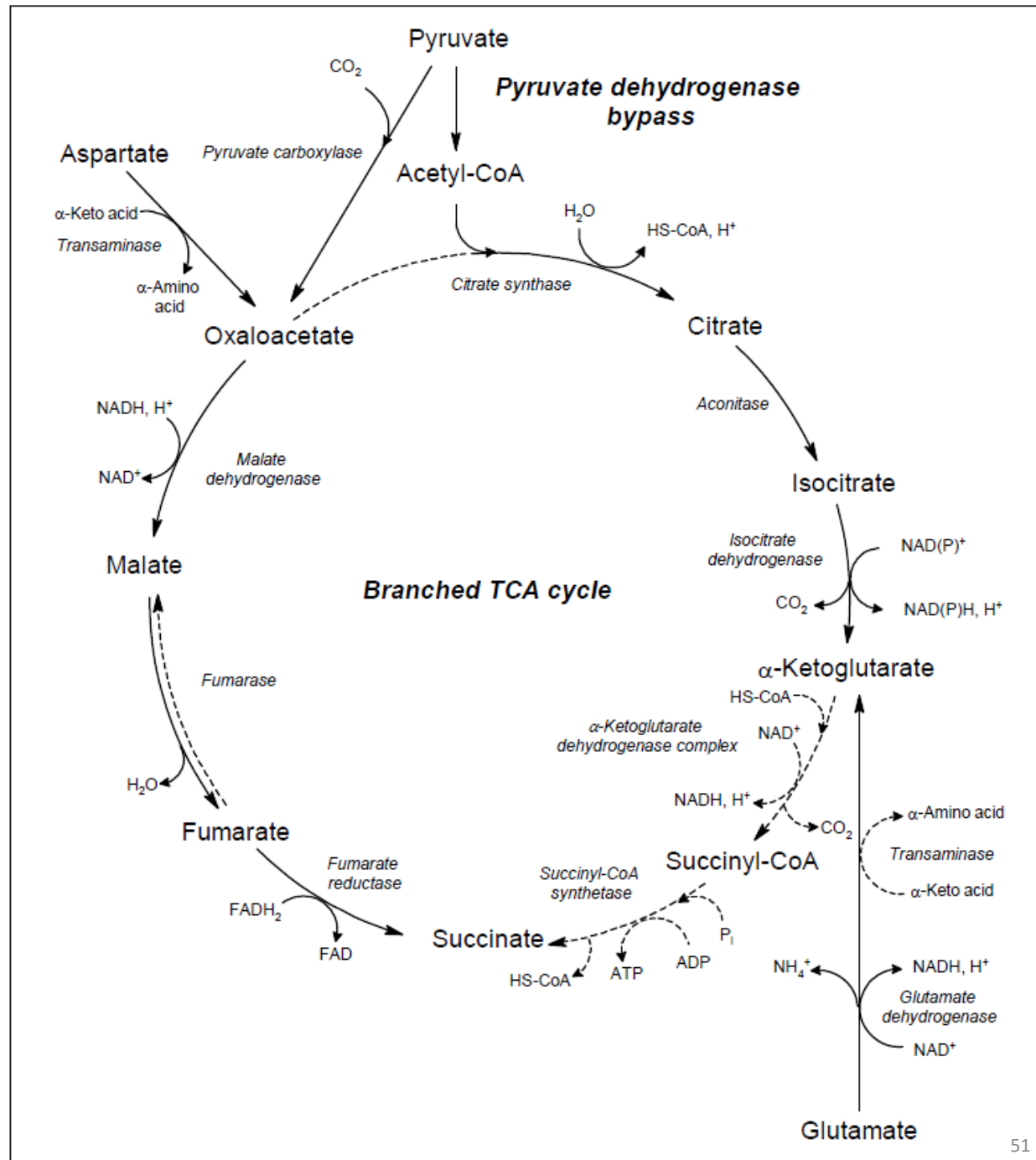
- A. una via inizia dal piruvato, questo entra nel ciclo dell'acido citrico grazie all'enzima piruvato deidrogenasi.
- B. un'altra via prevede che l'ossalacetato venga trasformato in citrato e quest'ultimo in isocitrato. Nel ciclo del gliossilato l'isocitrato può essere trasformato in succinato.

# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

Durante la fermentazione, il bypass della piruvato deidrogenasi assicura l'ingresso del piruvato nel ciclo dell'acido citrico sotto forma di ossalacetato (piruvato viene carbossilato dalla piruvato carbossilasi).

L'ossalacetato segue le reazioni inverse fino alla formazione del succinato.

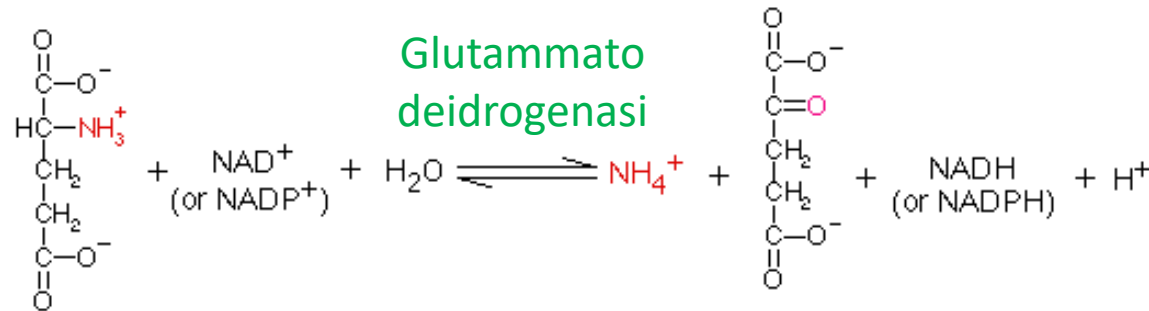
L'acido succinico può derivare anche dall'acido glutammico, dove sarà l'acido  $\alpha$ -chetoglutarato il suo intermedio.



Jean-Louis de Klerk. Succinic acid production by wine yeasts. 2010. Thesis for the degree of Master of Agricultural Sciences, at Stellenbosch University, Department of Viticulture and Oenology, Faculty of AgriSciences.

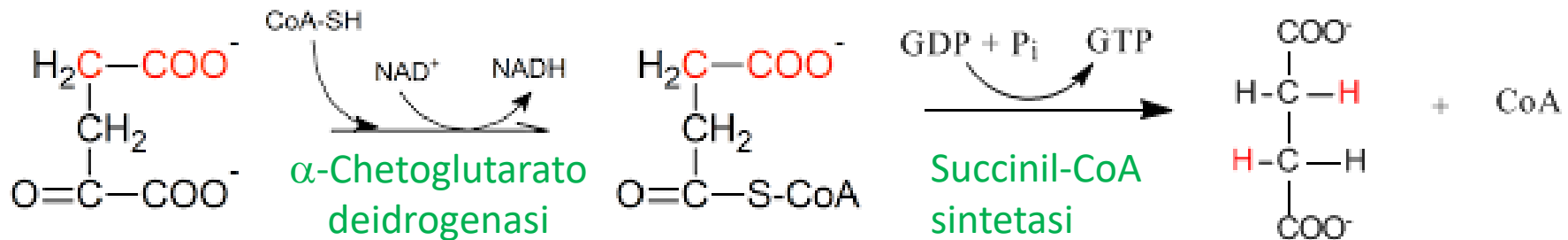
# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

Quando la concentrazione di glutammato, glutammina e/o treonina nel mosto è elevata, aumenta anche la concentrazione degli enzimi  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi e succinil-CoA sintetasi. La produzione di acido glutammico nel mosto stimola la produzione di acido succinico.



Acido glutammico

$\alpha$ -chetoglutarato



$\alpha$ -chetoglutarato

Succinil-CoA

Succinato

# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

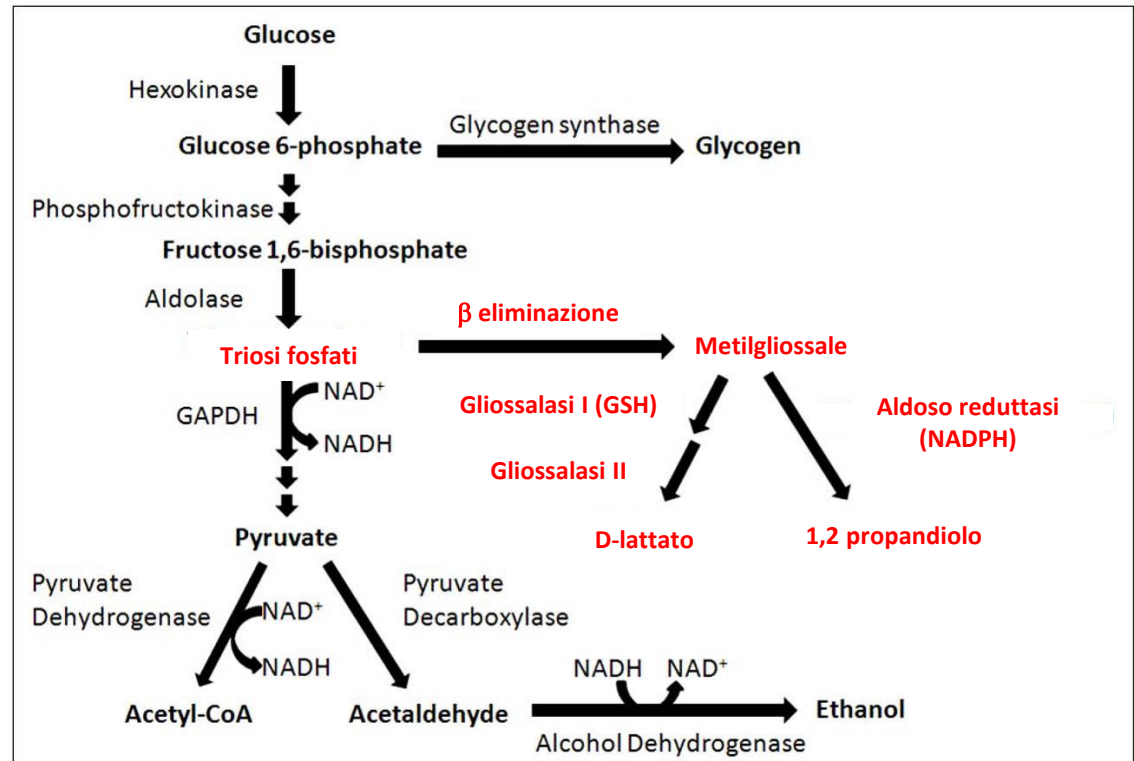
---

- l'acido lattico è un altro prodotto secondario della fermentazione; deriva dall'acido piruvico ed è direttamente ridotto dagli enzimi lattato deidrogenasi del lievito.
- In anaerobiosi si formano da 200 a 300 mg/L di acido lattico D(-) e solamente qualche decina di mg di acido lattico L(+), prodotti essenzialmente all'inizio della fermentazione.
- La determinazione del contenuto di acido lattico nel vino D(-) permette di precisare se proviene dal lievito o dai batteri lattici.
- I vini che hanno effettuato la fermentazione malolattica possono contenere parecchi grammi/L di acido L(+)

la via glicolitica può essere una fonte di tossicità per la continua generazione di composti dicarbonilici reattivi endogeni come il metilgliossale (MG) responsabile, in parte, dell'invecchiamento cellulare, ad alte concentrazioni provoca la morte del lievito. Si forma dalla degradazione non enzimatica dei triosi fosfati e si accumula quando il metabolismo del glucosio è elevato o in condizioni di stress ossidativo. Il lievito utilizza per la disintossicazione il sistema della gliossalasi che lo trasforma, principalmente, in D-lattato.

Il MG è catabolizzato da due vie enzimatiche: la prima comprendente gli enzimi gliossalasi I e II. Questa via è citosolica e converte il MG in D-lattato, utilizzando il glutatione come cofattore specifico.

Il secondo sistema utilizza l'enzima aldoso reduttasi, NADPH-dipendente, che lo riduce in 1,2-propandiolo.



Benjamin J. Stewart et al., D-Lactate Production as a Function of Glucose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2013 February; 30(2): 81–91. doi:10.1002/yea.2942.

# Trasporto del D-lattato nel mitocondrio del *Saccharomyces cerevisiae*

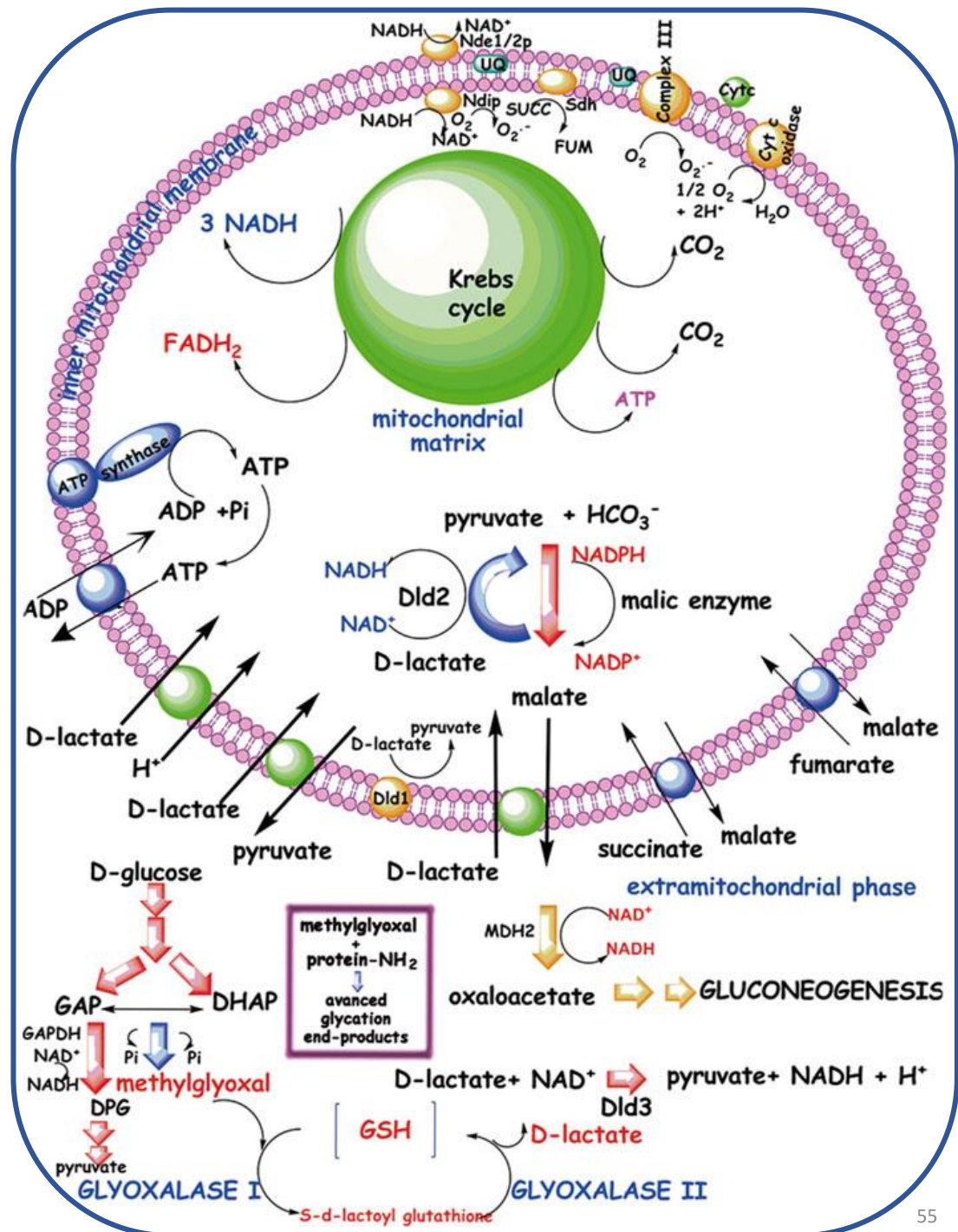
Il *S. cerevisiae* presenta diverse isoforme di D-lattato deidrogenasi citosoliche e mitocondriali.

Il D-lattato citoplasmatico può essere trasportato nel mitocondrio utilizzando un trasportatore simporto D-lattato/H<sup>+</sup> oppure trasportatori antiporto come D-lattato/piruvato; una volta nella matrice diventa piruvato, tramite l'enzima D-lattato deidrogenasi mitocondriale ed infine quest'ultimo si trasforma in malato con l'enzima malico.

Quando la concentrazione mitocondriale di malato aumenta, questo metabolita esce con un sistema di trasporto antiporto.

Lo scambio può avvenire tra i sistemi malato/lattato, malato/succinato oppure malato/fumarato.

Il D-lattato citoplasmatico si trasforma in piruvato per azione dell'enzima D-lattato deidrogenasi citoplasmatico.



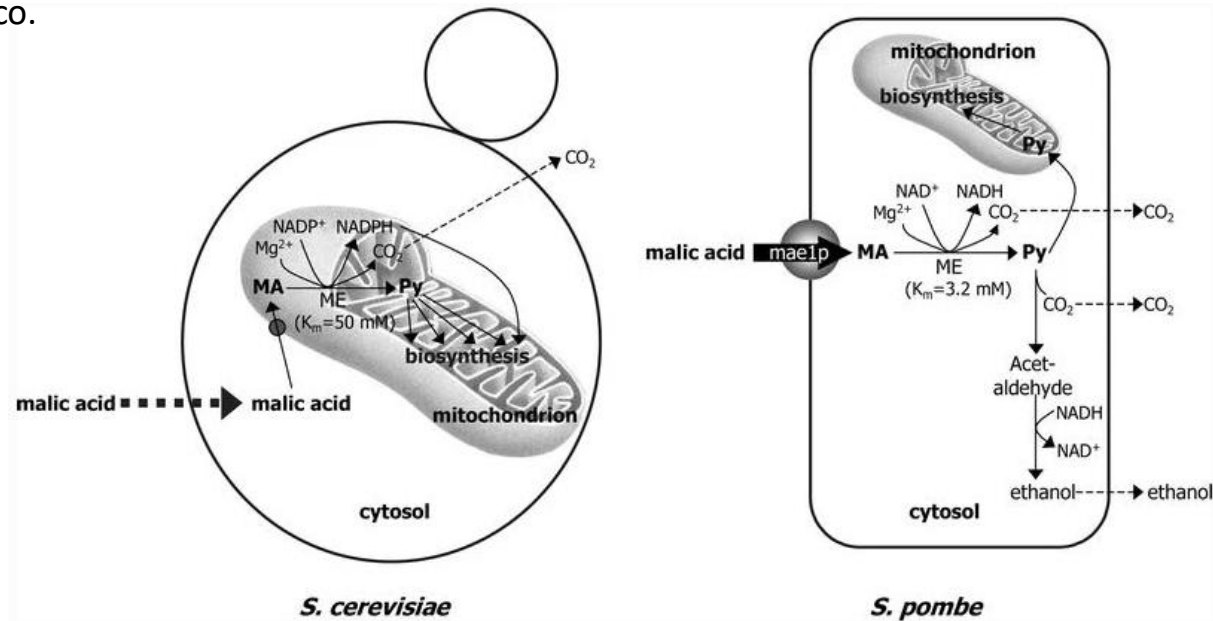
Maria Luigia Pallotta. Mitochondrial involvement to methylglyoxal detoxification: D-Lactate/Malate antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* (2012) 102:163–175. DOI 10.1007/s10482-012-9724-0

# Fermentazione malo-alcolica

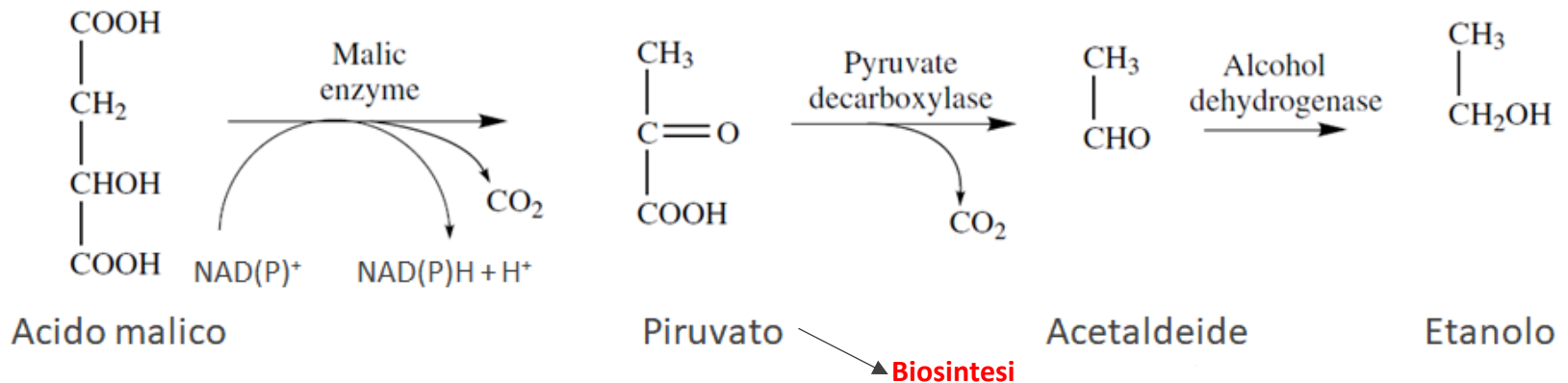
Il *Saccharomyces cerevisiae* degrada parzialmente l'acido malico del mosto (10–25%) durante la fermentazione alcolica e la degradazione è più significativa quando il pH è acido. L'acido malico è principalmente metabolizzato attraverso l'enzima malato deidrogenasi del ciclo dell'acido citrico.

Il lievito ha l'enzima malico che trasforma il malato, prima in ossalacetato e successivamente in piruvato. Quest'ultimo viene utilizzato nel metabolismo biosintetico.

Nello *Schizosaccharomyces pombe* il piruvato viene decarbossilato ad acetaldeide e infine trasformato dall'alcol deidrogenasi in etanolo. La fermentazione malo-alcolica abbassa l'acidità del vino più della fermentazione malolattica.



Volschenk *et al.* Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr Genet* (2003) 43: 379–391. DOI 10.1007/s00294-003-0411-6





# Fermentazione malo-alcolica nel lievito *Schizosaccharomyces*

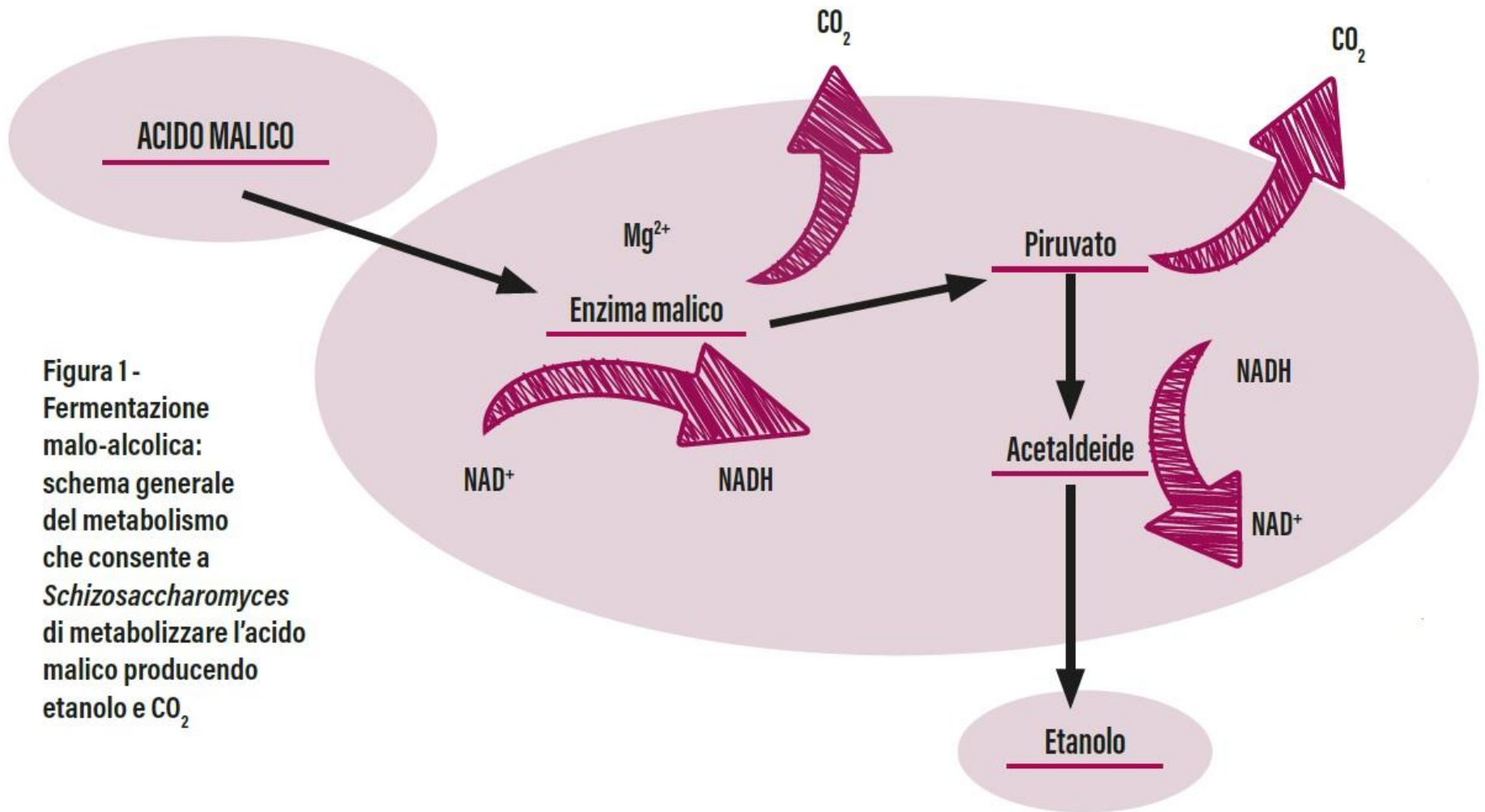


Figura 1 - Fermentazione malo-alcolica: schema generale del metabolismo che consente a *Schizosaccharomyces* di metabolizzare l'acido malico producendo etanolo e  $CO_2$