

# Biochimica della fermentazione alcolica e vie metaboliche dei lieviti enologici

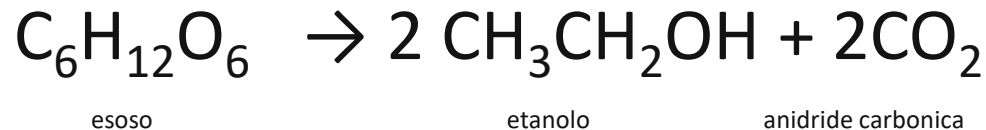
---



# Biochimica della fermentazione alcolica

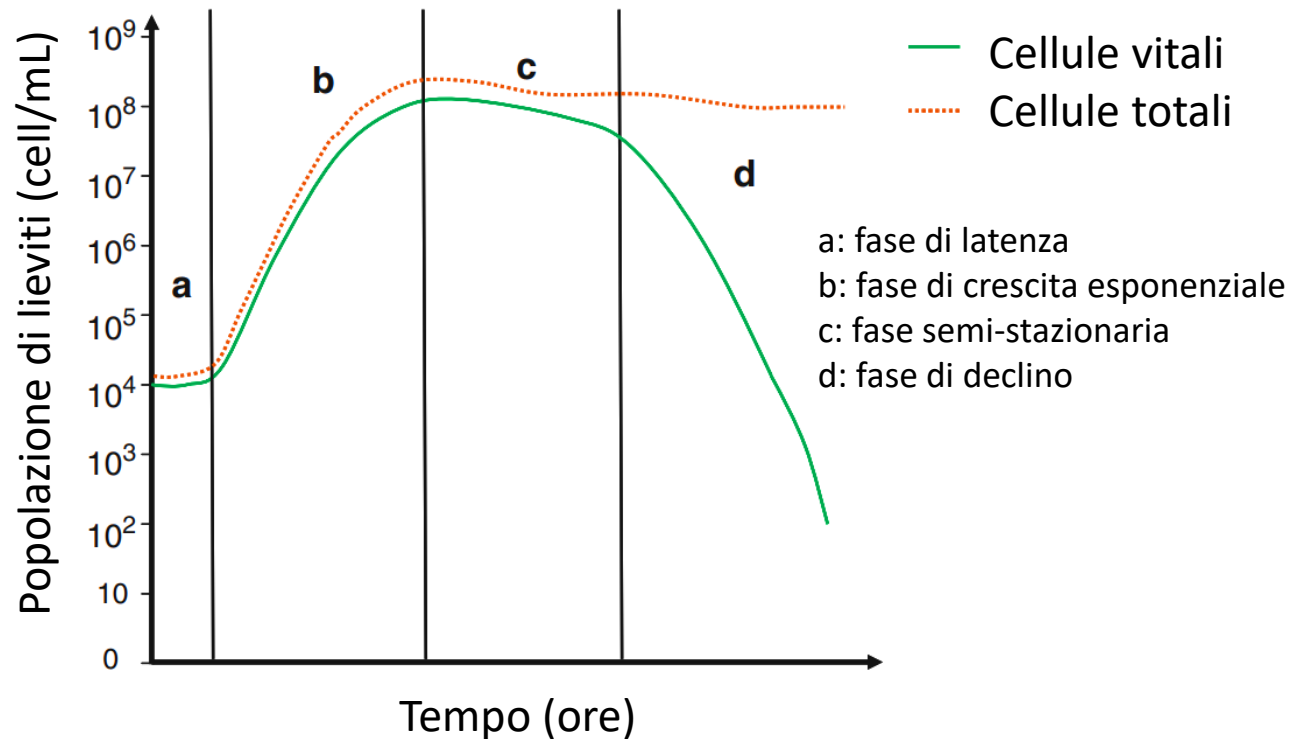
---

- La fermentazione alcolica è un processo complesso in cui oltre alla trasformazione degli zuccheri (glucosio e fruttosio) in etanolo e anidride carbonica altri processi biochimici, chimici e fisico-chimici intervengono per trasformare il succo d'uva in vino.



- Produzione di altri composti: alcoli superiori, esteri, glicerolo, acido succinico, diacetile, acetoino e 2,3-butandiolo.
- Diversi lieviti partecipano al processo di fermentazione, il ***Saccharomyces cerevisiae*** predomina per la sua elevata resistenza ad elevate concentrazioni di etanolo.

## Ciclo di crescita dei lieviti



- Se non vengono inoculati lieviti la popolazione iniziale è circa  $10^4$  cellule/mL
- Dopo inoculazione è circa  $5 \times 10^6$  cellule/mL
- La fase esponenziale di crescita ( $10^7$ - $10^8$  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

Quando il lievito passa da uno stato di quiescenza a un nuovo ambiente ricco di nutrienti: **Fase di lag**

- **Riadattamento metabolico e ripristino della cellula:** viene ripristinato il livello di ergosterolo e acidi grassi insaturi. La membrana deve tornare fluida per poter importare nutrienti e sostenere la futura crescita. Ripristino dei ribosomi e della sintesi proteica. Si riattivano trascrizione e traduzione per produrre trasportatori di membrana, enzimi per la glicolisi, proteine per l'apparato respiratorio/fermentativo.
- **Attivazione dei sistemi di trasporto e utilizzo degli zuccheri:** Il lievito inizia ad assorbire glucosio, fruttosio, maltosio o altri zuccheri attraverso trasportatori specifici. Si attiva la glicolisi, nella fase gli zuccheri servono al rifornimento energetico e biosintetico.
- **Attivazione del metabolismo energetico:** A seconda dell'ossigeno disponibile il lievito sceglie la via energetica, in presenza di ossigeno, attiva la respirazione mitocondriale e produce molta energia (ATP) necessaria per avviare la proliferazione. In assenza di ossigeno (es. nei mosti saturi di CO<sub>2</sub>) si avvia gradualmente la fermentazione alcolica. Nella fase di lag la fermentazione è ancora limitata.
- **Sintesi dei componenti cellulari per la divisione:** amminoacidi, nucleotidi, acidi grassi, polisaccaridi per la parete cellulare e riserve (glicogeno e trealosio). Questa fase è fondamentale per preparare la cellula alla prima mitosi.
- **Attivazione delle risposte di stress:** siccome il nuovo ambiente può essere "ostile", il lievito attiva le HSP (proteine dello shock termico), il trealosio e il glutathione. Queste molecole proteggono le strutture cellulari durante la fase di adattamento ai nutrimenti.

## **Durante la fase esponenziale il lievito:**

- Consuma zuccheri molto rapidamente;
- Produce ATP ad alto ritmo (fermentazione o respirazione);
- Si divide al massimo della velocità;
- Sintetizza grandi quantità di proteine, DNA, lipidi;
- Rimodella continuamente la parete cellulare;
- Rilascia CO<sub>2</sub>, etanolo e metaboliti aromatici;

Mostra la massima attività metabolica in assoluto ed è la fase più importante per la fermentazioni del vino, birra, ecc.

## **Durante la fase semi-stazionaria il lievito si prepara alla fase stazionaria:**

- Riduzione graduale della velocità di crescita;
- Rimodulazione del metabolismo da fermentazione a respirazione (se possibile)
- Calo della produzione di ATP, la glicolisi rallenta;
- Riduzione della sintesi di macromolecole;
- Attivazione delle vie di sopravvivenza e stress perché la cellula percepisce condizioni meno favorevoli e si prepara alla futura fase stazionaria, aumentando il trealosio, il glicogeno, le proteine HSP, enzimi antiossidanti e tutti i sistemi di protezioni contro lo stress ossidativo, etanolo, cambi osmotici, scarsità di nutrienti, ecc.
- Modifiche della parete cellulare, si ispessisce, aumentano i  $\beta$ -glucani e le mannoproteine;
- Utilizzo di nutrienti alternativi se i trasportatori di zucchero sono presenti consuma maltosio e zuccheri più complessi. Utilizza etanolo come fonte di carbonio (solo in aerobiosi) e inizia l'autofagia con il riciclo degli aminoacidi;
- Si accumulano prodotti di scarto come etanolo, acidi organici, aldeidi, CO<sub>2</sub>.

Questi prodotti rallentano ulteriormente la crescita.

**Durante la fase di declino il numero di cellule diminuisce perché la mortalità supera la nascita di nuove cellule.**

È il risultato dell'esaurimento dei nutrienti, dell'accumulo di sostanze tossiche e del deterioramento cellulare.

Durante la fase stazionaria il lievito aveva accumulato trealosio, glicogeno, lipidi di riserva e le riserve vengono completamente consumate per mantenere le funzioni vitali minime.

L'ATP scende drasticamente perché non ci sono più zuccheri disponibili e la respirazione e la fermentazione si arrestano.

Si esauriscono i cofattori  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , le pompe protoniche (es.  $\text{H}^+$ -ATPasi di membrana) non possono più mantenere il gradiente ionico e la membrana perde integrità e permeabilità.

## Fase di declino

Nella fase di declino aumenta lo stress ossidativo a causa dei ROS, ossidazione di lipidi (lipoperossidazione), ossidazione di proteine (carbonilazione), danni al DNA. Le difese antiossidanti (glutathione, catalasi, SOD) sono ormai insufficienti.

Perdita dell'integrità della parete e della membrana, la parete cellulare diventa meno elastica e più fragile, mentre la membrana plasmatica perde fluidità e selettività e aumenta la fuoriuscita di ioni e metaboliti fino alla lisi cellulare.

Attivazione di autofagia e catabolismo interno, per sopravvivere il più possibile, la cellula ricicla organelli danneggiati, proteine aggregate, lipidi della membrana, ecc.

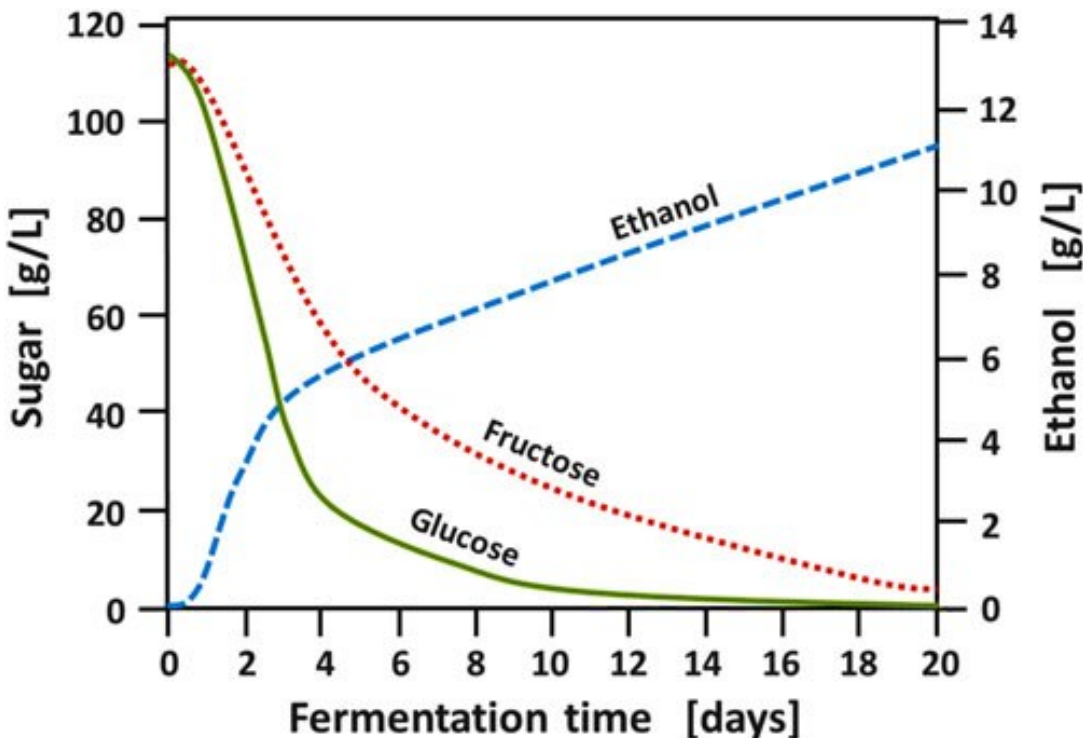
L'etanolo accumulato diventa tossico, le aldeidi (acetaldeide) danneggiano le proteine e le membrane, il pH scende aumentando lo stress acido.

Questi fattori accelerano la morte cellulare e la popolazione cellulare diminuisce drasticamente.



Evoluzione degli zuccheri durante la fermentazione.

Il lievito non assorbe glucosio e fruttosio allo stesso modo. Nella fase iniziale della fermentazione del mosto, le cellule di *Saccharomyces cerevisiae* si dividono attivamente e consumano zuccheri per sostenere la crescita e la sintesi di nuove biomolecole.

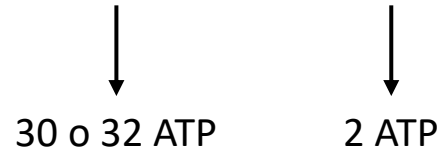


Il consumo di glucosio inizia immediatamente ed è generalmente più rapido rispetto a quello del fruttosio, poiché il lievito possiede trasportatori con maggiore affinità per il glucosio. Di conseguenza, la concentrazione esterna di fruttosio può temporaneamente aumentare durante la fermentazione.

Con l'avanzare della fermentazione, la produzione di etanolo aumenta progressivamente come prodotto principale della fermentazione alcolica, mentre il consumo di zuccheri residui e di altri nutrienti rallenta. Durante questa fase si osserva anche un lieve abbassamento del pH, dovuto principalmente all'accumulo di etanolo e di acidi organici secondari, come acido succinico e acido citrico residui, prodotti dal metabolismo secondario del lievito e dalla degradazione di componenti del mosto.

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

### Respirazione e Fermentazione



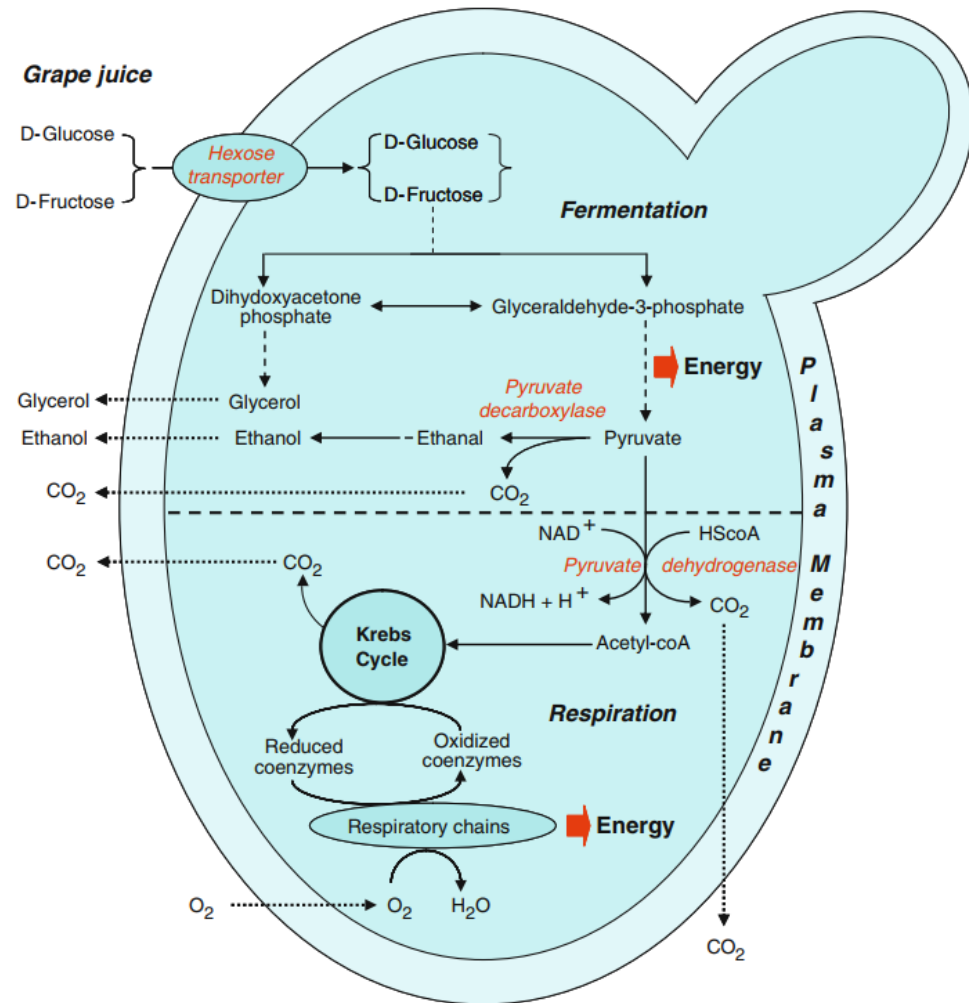
Entrambi i processi iniziano con la glicolisi per generare piruvato come prodotto finale.

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

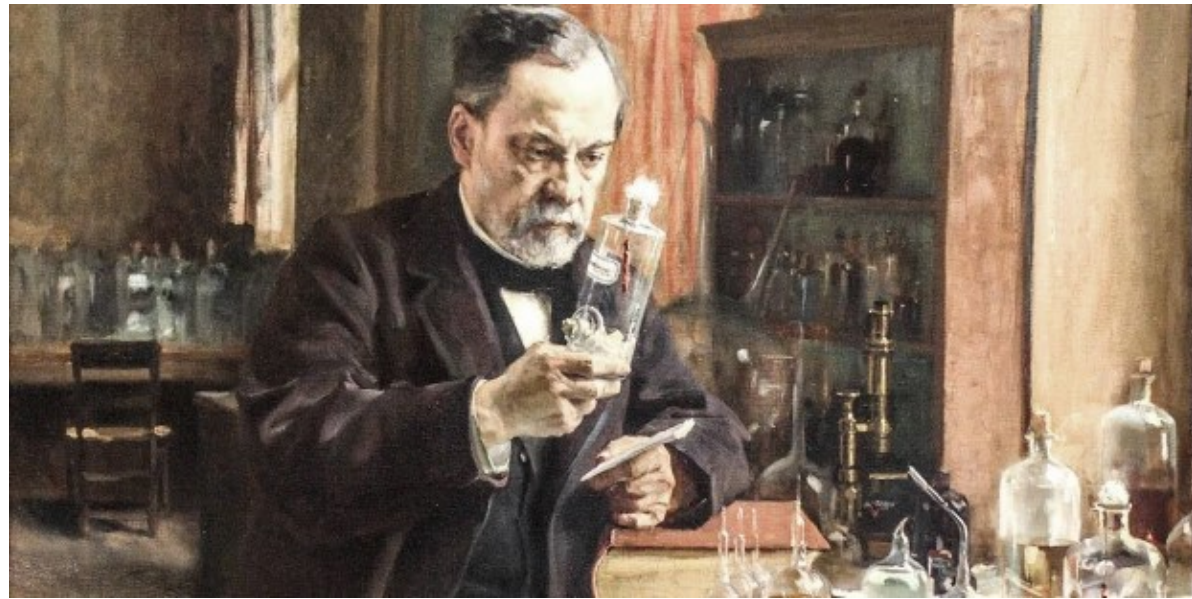
Respirazione: il piruvato può essere trasformato in acetil-CoA e anidride carbonica. L'acetil-CoA può essere incorporato nel ciclo di Krebs, trasformandosi in  $\text{CO}_2$  e producendo diverse molecole di coenzimi ridotti. I coenzimi ridotti prodotti dal ciclo di Krebs, e anche dalla glicolisi, vengono successivamente riossidati nella catena respiratoria, per ridurre l' $\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ .

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'effetto Pasteur è il fenomeno per cui la presenza di ossigeno inibisce la fermentazione nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Quando il lievito ha ossigeno a disposizione, smette di fermentare (di produrre etanolo) e passa alla respirazione aerobica.

## **La fermentazione serve per:**

- rigenerare il  $\text{NAD}^+$  (necessario alla glicolisi)
- produrre poco ATP in assenza di ossigeno

## **Quando c'è ossigeno, il lievito può:**

Può ossidare completamente il glucosio nei mitocondri ottenendo molta più energia per ogni molecola di glucosio. La respirazione è molto più energetica:

- la cellula riduce la velocità della glicolisi (meno bisogno di produrre ATP “in fretta”)
- diminuisce la produzione di piruvato e si ferma la fermentazione alcolica.

## Effetto Crabtree

Si verifica quando il lievito, trovandosi in presenza di ossigeno, fermenta il glucosio producendo etanolo e  $\text{CO}_2$ , invece di utilizzare completamente la respirazione cellulare.

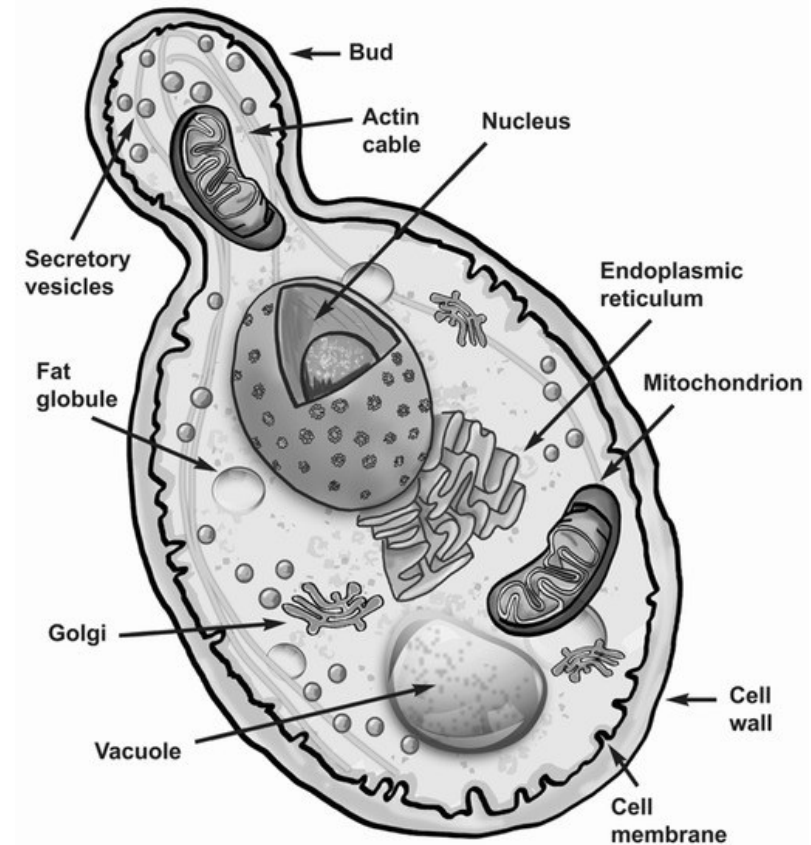
Quando la concentrazione di glucosio è molto alta (superiore a 1 o 3 g/L), il *S. cerevisiae* "sceglie" la via della fermentazione anche in presenza di  $\text{O}_2$  e converte parte del glucosio in etanolo e  $\text{CO}_2$

È un meccanismo di regolazione metabolica.

Quando c'è tanto zucchero, il lievito:

- aumenta enormemente la velocità della glicolisi,
- accumula intermedi metabolici,
- e inibisce (a livello di regolazione genica ed enzimatica) la respirazione mitocondriale.

Il lievito preferisce una via più veloce ma meno efficiente per produrre energia (fermentazione), invece di una via lenta ma più redditizia (respirazione).



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

## Concentrazioni di piruvato

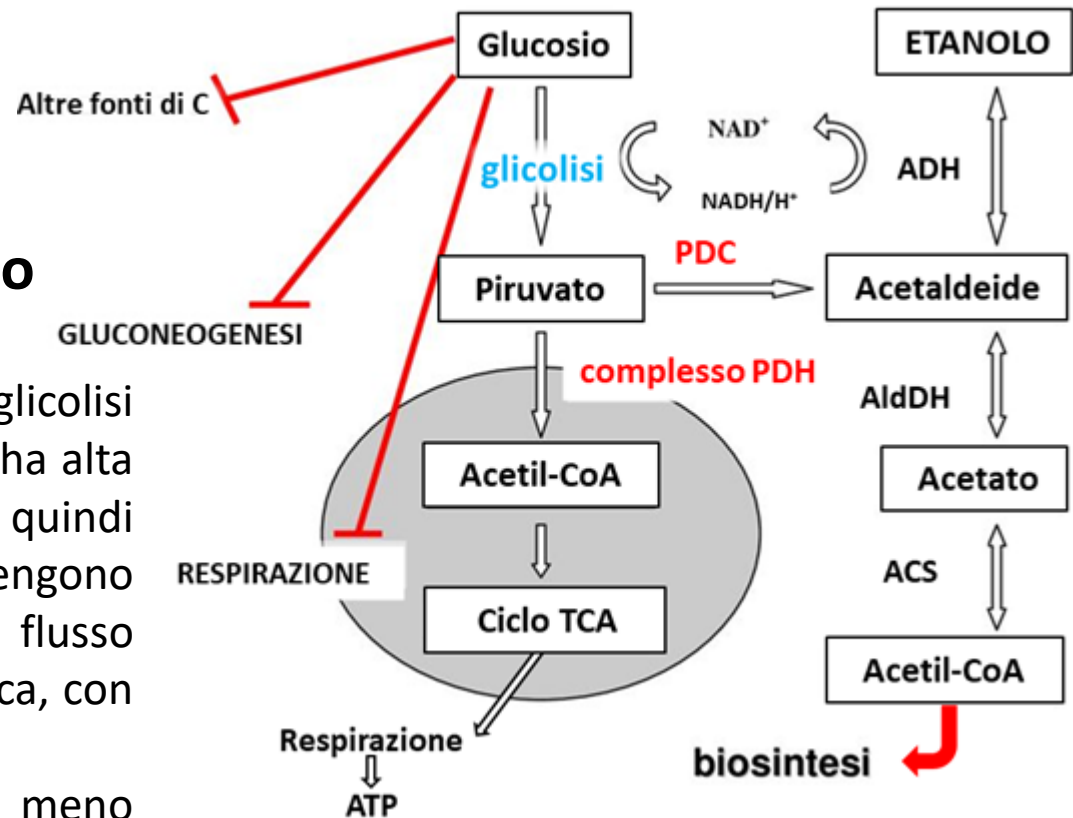
**Basse concentrazioni di piruvato:** la glicolisi è lenta e il piruvato è scarso. La PDH ha alta affinità (basso  $K_m$ ) per il piruvato, quindi anche piccole quantità di piruvato vengono convertite in acetil-CoA. Il flusso preferenziale è la respirazione aerobica, con produzione di ATP efficiente.

La piruvato decarbossilasi (PDC) è meno attiva perché non è saturata e richiede piruvato più alto per raggiungere velocità massima.

**Alte concentrazioni di piruvato:** la glicolisi è rapida e il piruvato è abbondante.

La PDC ha  $V_{max}$  maggiore e viene saturata, diventando la via preferenziale. Il flusso del carbonio va verso la formazione di etanolo.

Inoltre, l'alta concentrazione di piruvato segnala abbondanza di zuccheri con l'effetto Crabtree. Con piruvato alto la fermentazione è predominante.



# Effetto *Pasteur* vs Effetto *Crabtree*

---

L'**effetto Pasteur** consiste nella soppressione della fermentazione alcolica in presenza di ossigeno. Questo avviene perché l'ATP prodotto dalla fosforilazione ossidativa inibisce la **PFK1** (enzima centrale della glicolisi), rallentando la glicolisi e anche la fermentazione (meno piruvato formato) e l'ingresso di zuccheri nella cellula.

Con poco glucosio la glicolisi è lenta, produce poco piruvato, ma l'acetil-CoA formato dalla PDH entra nella respirazione e forma molto ATP, questo inibisce la PFK1 e la glicolisi sarà ancora più lenta e anche la fermentazione è quasi nulla. Il lievito sopravvive quando c'è poco glucosio ma molto ossigeno perché usa la respirazione con le fonti di carbonio disponibili (etanolo, glicerolo, acidi organici); la respirazione è molto efficiente, basta poco carbonio a mantenere alto il livello di l'ATP.



# Effetto *Pasteur* vs Effetto *Crabtree*

---

L'**effetto Crabtree** riguarda lieviti come *Saccharomyces cerevisiae*, in cui alte concentrazioni di glucosio promuovono la fermentazione aerobica, anche in presenza di ossigeno, reprimendo l'espressione dei geni respiratori. In queste condizioni, la glicolisi procede ad alta velocità grazie all'abbondanza di glucosio e alla forte richiesta di ATP e metaboliti per la crescita. L'ATP prodotto durante la fermentazione può esercitare una inibizione allosterica parziale sulla PFK-1 (non viene spenta, viene solo modulata), ma la velocità complessiva della glicolisi rimane elevata. La fermentazione è quindi favorita sia per smaltire rapidamente il glucosio sia per rigenerare  $\text{NAD}^+$  necessario al mantenimento del flusso glicolitico.

La scelta tra respirazione e fermentazione dipende anche dal **piruvato**: a basse concentrazioni, la PDH predomina e favorisce la respirazione; a elevate concentrazioni, la PDC ha una  $V_{\text{max}}$  maggiore e devia il flusso carbonioso verso l'etanolo.

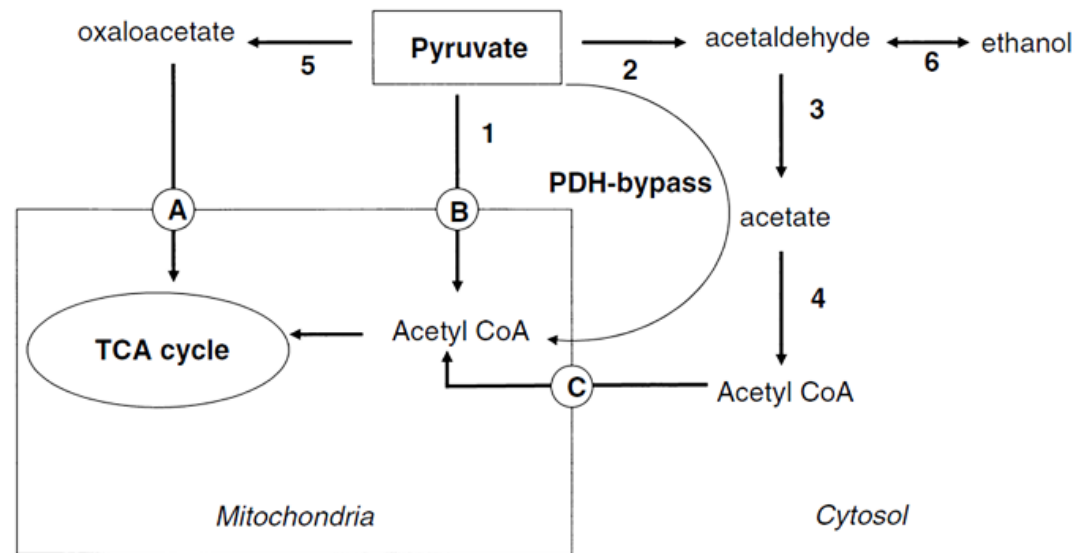
# Collegamento tra bypass della PDH e effetti Pasteur/Crabtree

- **Effetto Crabtree:**

In presenza di alte concentrazioni di glucosio, l'eccesso di piruvato favorisce l'attivazione del bypass della PDH, con conseguente produzione di acetil-CoA nel citoplasma e fermentazione anche in condizioni aerobiche (presenza di  $O_2$ ).

- **Effetto Pasteur:**

Quando le concentrazioni di zuccheri sono basse, l'ossigeno viene utilizzato principalmente nella respirazione mitocondriale e il bypass della PDH risulta meno attivo.



1 complesso piruvato deidrogenasi

2 Piruvato decarbossilasi (PDC), che converte il piruvato in acetaldeide;

3 Acetaldeide deidrogenasi (ALD), che converte l'acetaldeide in acetato;

4 Acetil-CoA sintetasi (ACS), che converte l'acetato in acetil-CoA citosolico.

5 piruvato carbossilasi

6 alcol deidrogenasi

A) recettore mitocondriale ossalacetato/malato

B) recettore mitocondriale piruvato



# Conclusioni *Pasteur* vs Effetto *Crabtree*

---

L'**effetto Pasteur** è la soppressione della fermentazione alcolica in presenza di ossigeno nel mezzo di coltura. La spiegazione principale dell'effetto Pasteur risiede nel controllo della glicolisi da parte dell'ATP: l'ATP prodotto dalla fosforilazione ossidativa inibisce la **PFK1**, causando l'accumulo di esosi fosforilati, il rallentamento del trasporto degli zuccheri attraverso la membrana e, di conseguenza, il rallentamento della glicolisi.

La fermentazione aerobica nei lieviti è invece nota come **effetto Crabtree**. Nel *Saccharomyces cerevisiae*, alte concentrazioni di zuccheri, in particolare glucosio, determinano un'inibizione degli enzimi respiratori, favorendo la fermentazione anche in presenza di ossigeno.

La regolazione tra respirazione e fermentazione dipende anche dalla disponibilità di piruvato. A basse concentrazioni di piruvato, tipiche di una glicolisi lenta, predomina la respirazione, poiché la PDH ha maggiore affinità per il piruvato. Al contrario, a elevate concentrazioni di piruvato, la PDC, caratterizzata da una  $V_{max}$  superiore, tende a saturare il bypass PDH e a deviare il flusso carbonioso verso la produzione di etanolo.

Inoltre, ad alte concentrazioni di zucchero comportano un aumento di ATP che contribuisce all'effetto Crabtree inibendo parzialmente la PFK1, rallentando la conversione del fruttosio-6-fosfato in fruttosio-1,6-bisfosfato e partecipando al controllo globale del flusso glicolitico e della fermentazione aerobica. La PFK1 riduce leggermente il flusso, ma non abbastanza da spegnere la fermentazione, la rigenerazione del  $NAD^+$  è essenziale per mantenere attiva la fermentazione.

## Classificazione dei lieviti vinari secondo la modalità di fermentazione

### 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>Torulaspora delbrueckii</i>

# Vie metaboliche attive durante la fermentazione

**Glicolisi:** tutti gli enzimi sono attivi, anche la Piruvato decarbossilasi (PDC) e l'Alcool deidrogenasi (ADH)

**I ciclo di Krebs** non funziona in maniera significativa perché il piruvato viene convertito principalmente in etanolo invece che in acetil-CoA.

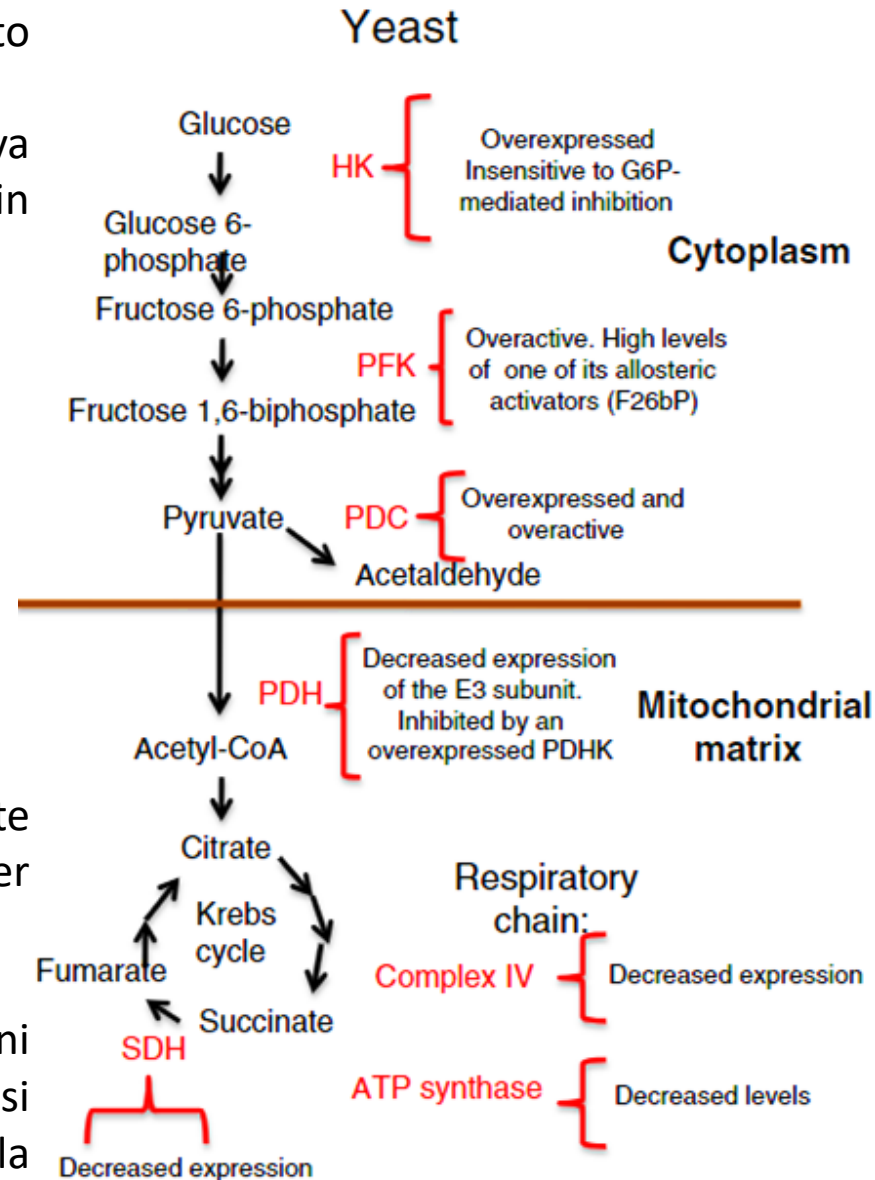
Enzimi chiave del ciclo come:

- Citrato sintasi
- Aconitasi
- Isocitrato deidrogenasi
- $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi
- Succinil-CoA sintetasi
- Succinate deidrogenasi
- Fumarasi
- Malato deidrogenasi

sono quasi inattivi, perché non arriva sufficiente piruvato/acetil-CoA e  $\text{NAD}^+$  necessario per l'ossidazione.

## Catena respiratoria e fosforilazione ossidativa

Enzimi della catena di trasporto degli elettroni (Complessi I-IV) e la ATP sintasi sono anch'essi quasi inattivi. NADH generato dalla glicolisi non entra nella catena respiratoria, ma viene ossidato tramite la fermentazione a etanolo.



# Tabella riassuntiva degli enzimi del TCA nel lievito durante la fermentazione

Enzima del TCA	Reazione	Stato durante la fermentazione	note
<b>Citrato sintasi</b>	Acetil-CoA + OAA → Citrato	Parzialmente attivo	Produce citrato per funzioni biosintetiche
<b>Aconitasi</b>	Citrato ↔ Isocitrato	Parzialmente attiva	Necessaria per arrivare alla sintesi dell'isocitrato
<b>Isocitrato deidrogenasi (NAD<sup>+</sup>-dipendente)</b>	Isocitrato → α-chetoglutarato	attiva	Punto chiave: produce α-KG per aminoacidi
<b>α-Chetoglutarato deidrogenasi</b>	α-KG → Succinil-CoA	inattiva	Fortemente inibita in assenza di O <sub>2</sub> ; richiede NAD <sup>+</sup>
<b>Succinil-CoA sintetasi</b>	Succinil-CoA → Succinato	inattiva	Non funziona perché manca substrato (succinil-CoA)
<b>Succinate deidrogenasi</b>	Succinato → Fumarato	inattiva	Parte della catena respiratoria si ferma senza O <sub>2</sub>
<b>Fumarasi</b>	Fumarato* ↔ Malato	attiva	Supporta reazioni anaplerotiche/redox
<b>Malato deidrogenasi (mitocondriale)</b>	Malato ↔ OAA	attiva	Regola NADH/NAD <sup>+</sup> e produce OAA per biosintesi

Argininosuccinato liasi

\*Il fumarato deriva dalla sintesi dell'arginina : Argininosuccinato → Arginina + Fumarato

Durante la fermentazione il ciclo di Krebs nel lievito non funziona come ciclo completo, perché molti enzimi sono inattivi e non c'è ossigeno per la catena respiratoria, il mitocondrio può comunque usare l'acetil-CoA per formare alcuni intermedi, soprattutto per la sintesi di precursori metabolici (funzioni anaplerotiche), senza ossidarlo completamente a CO<sub>2</sub>.

### **Possibili destinazioni dell'acetil-CoA mitocondriale tramite bypass della PDH:**

#### **Sintesi di citrato**

Acetil-CoA + ossalacetato → citrato (citrato sintasi)

La citrato sintasi può funzionare anche in modo limitato durante fermentazione.

#### **Produzione di α-chetoglutarato**

Il ciclo può formare α-chetoglutarato dall'isocitrato (isocitrato deidrogenasi è un enzima ancora attivo); l'α-chetoglutarato è necessario per sintetizzare glutammato e altri aminoacidi. Formazione parziale di succinato, fumarato e malato significativo.

#### **Altri intermedi**

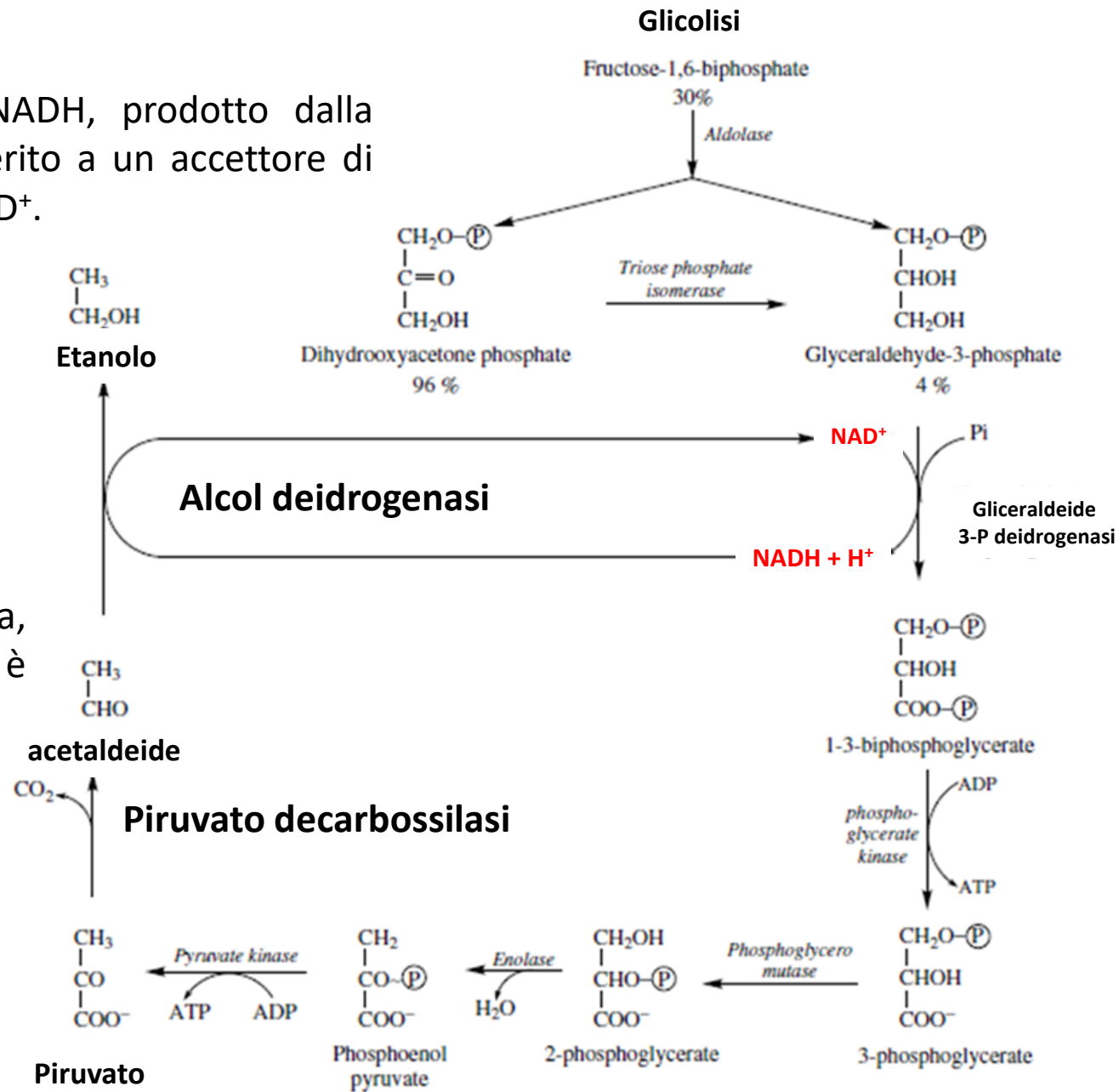
Formazione parziale di succinato, fumarato e malato possono formarsi parzialmente, soprattutto per bilanciare NADH/NAD<sup>+</sup> o come precursori biosintetici. Infatti, La malato deidrogenasi catalizza la reazione di ossido-riduzione tra malato e ossalacetato, generando o consumando NADH/NAD<sup>+</sup>. La fumarasi riconverte il fumarato in malato. Questi passaggi aiutano a mantenere il bilancio redox della cellula, ossidando NADH in NAD<sup>+</sup> o viceversa, condizione essenziale perché la glicolisi continui a produrre ATP.

#### **Conclusioni:**

L'acetil-CoA non viene ossidato completamente a CO<sub>2</sub>, non serve per produrre energia via TCA/catena di trasporto e<sup>-</sup>. Serve invece a generare metaboliti chiave come il citrato, α-chetoglutarato, malato, ecc. Alcuni intermedi possono essere trasportati nel citoplasma per biosintesi di lipidi o zuccheri.

## Fermentazione alcolica

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



Glycolysis and alcoholic fermentation pathway

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

# Enzimi coinvolti nella fermentazione

---

- La **piruvato decarbossilasi** è un enzima tetramerico formato da quattro subunità identiche (omotetramero).

Ogni subunità ha un sito attivo che lega il cofattore **tiamina pirofosfato (TPP)** e catalizza la decarbossilazione del piruvato. Nei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* ci sono più isoforme di PDC.

- **L'alcol deidrogenasi** è un enzima formato da quattro subunità identiche (omotetramero). Ogni subunità contiene siti per legare il coenzima **NAD<sup>+</sup>/NADH** e il substrato (acetaldeide o alcol).

Esistono diverse isoforme di ADH, con funzioni differenti (ADH1 è la principale in fermentazione).

## Il meccanismo di reazione della piruvato decarbossilasi

Fermentazione alcolica

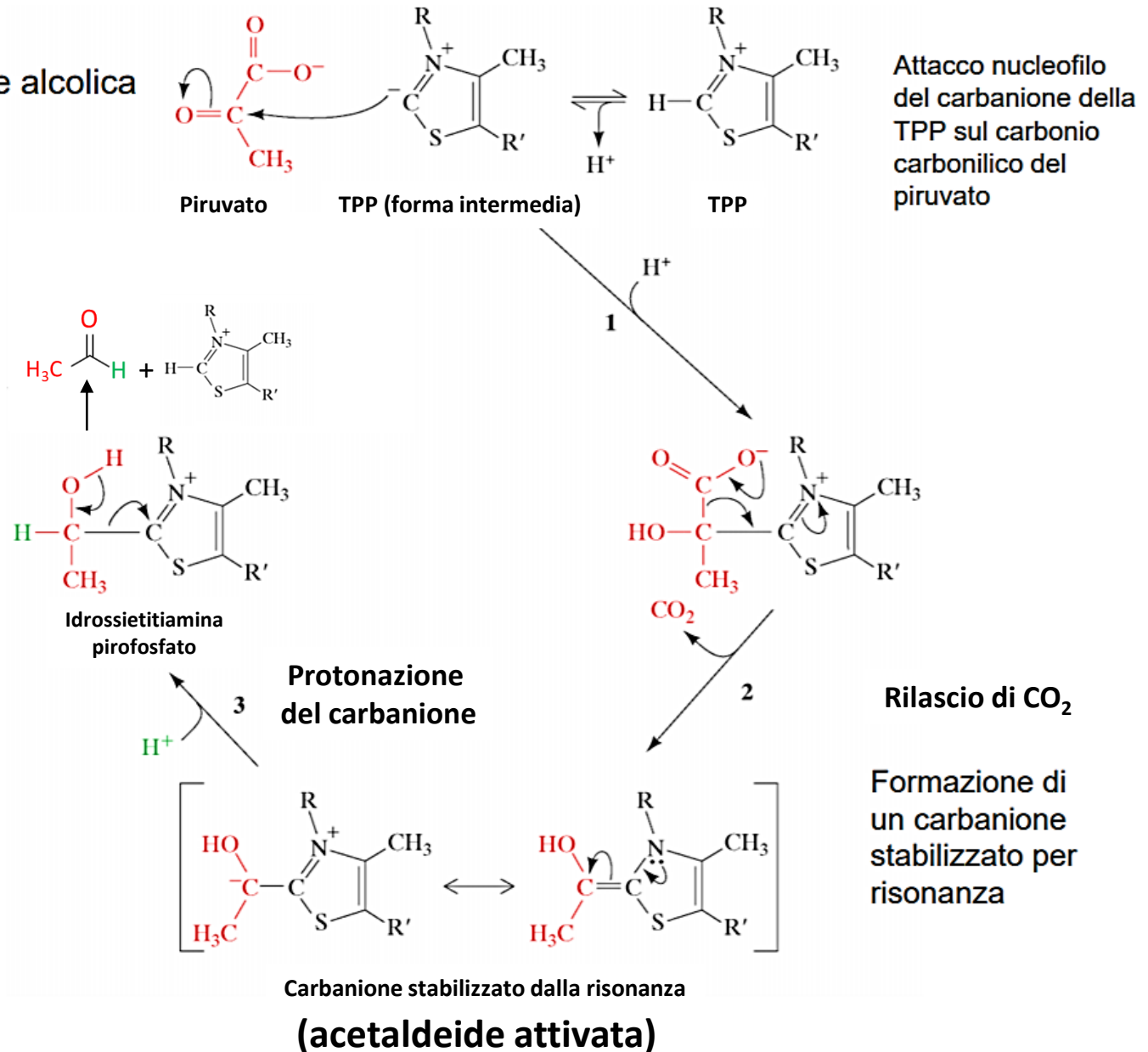
**Piruvato**

Piruvato  
decarbossilasi

**Acetaldeide**

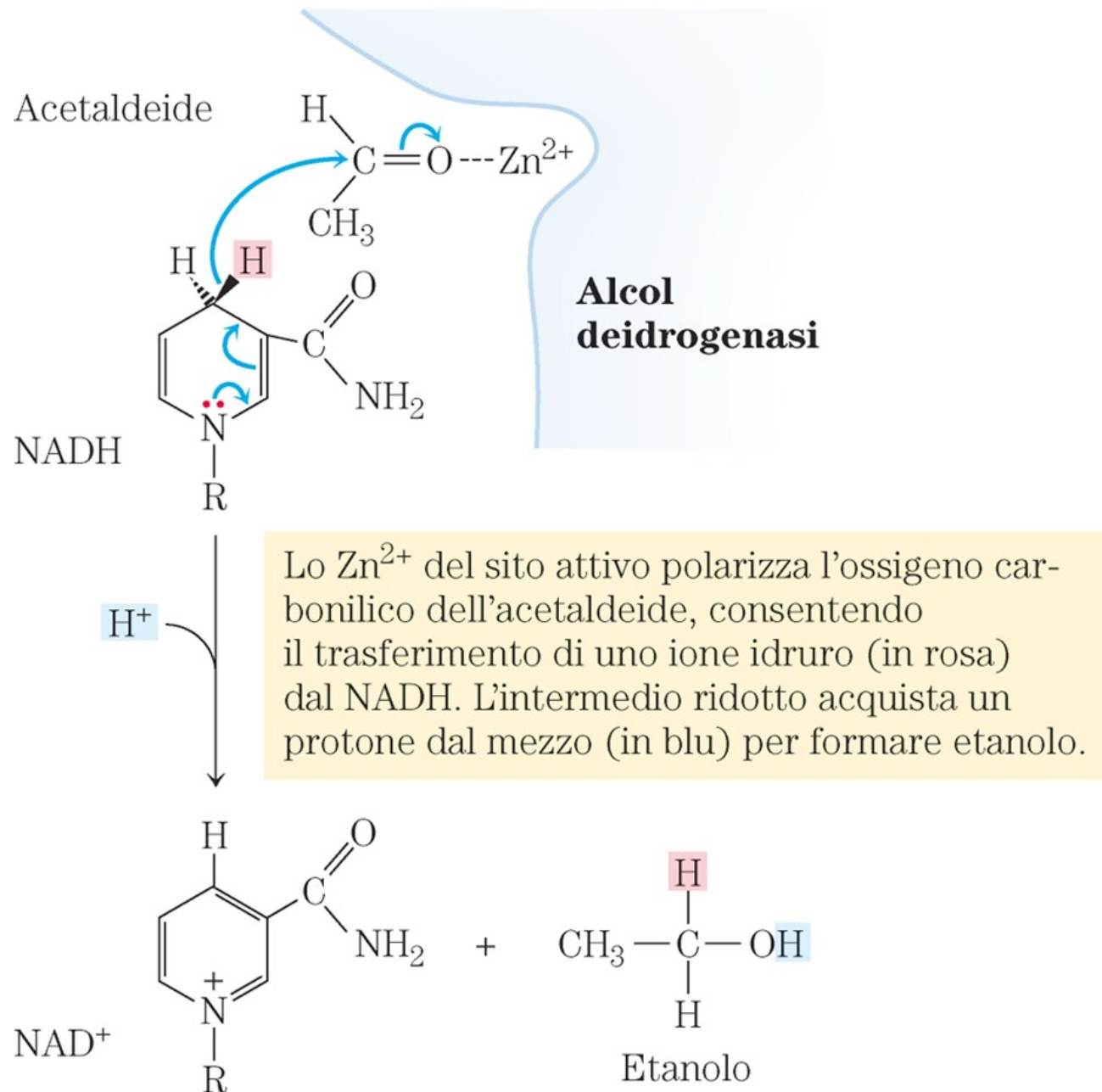
ADH

**Etanolo**

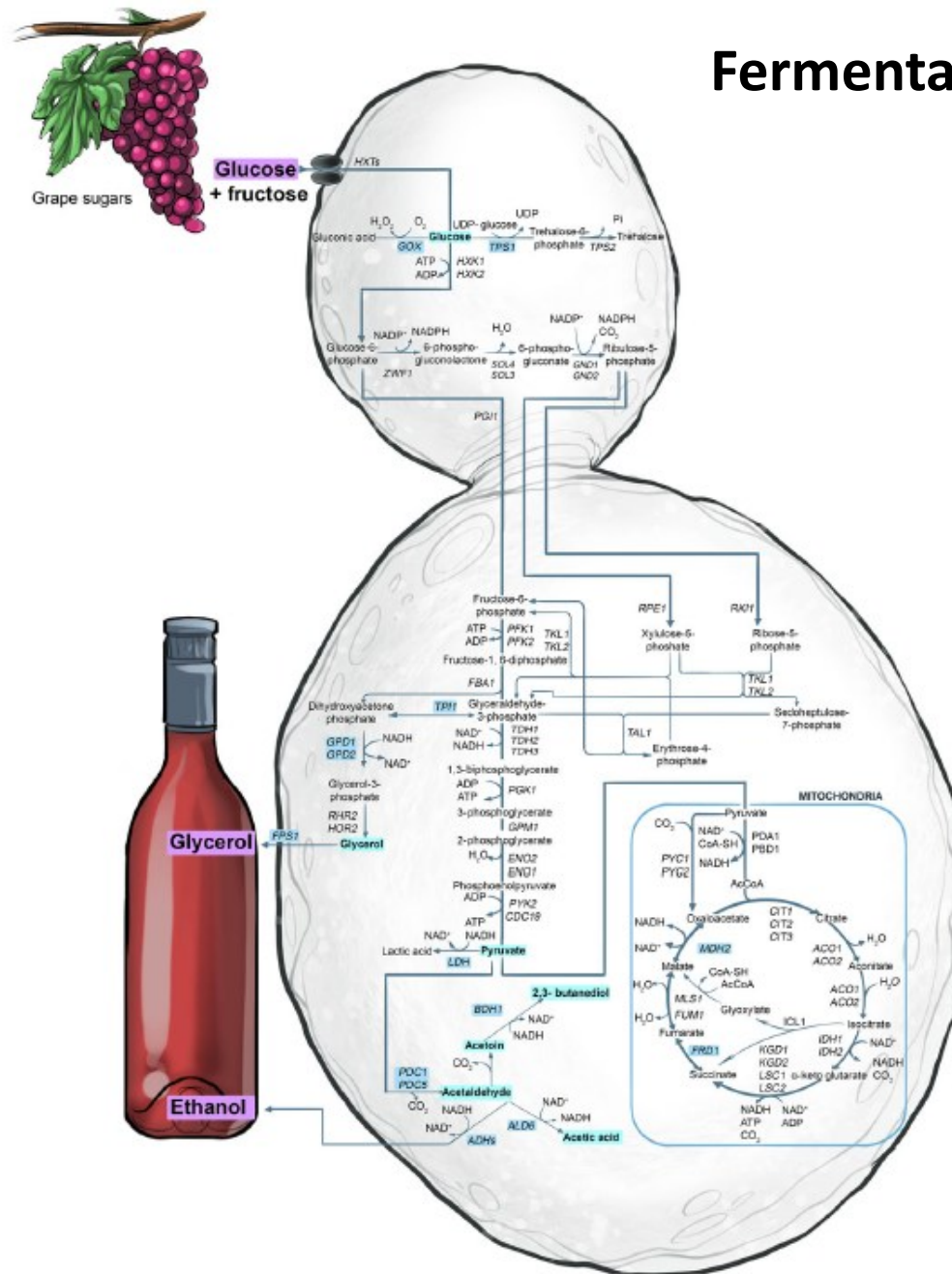




## Reazione catalizzata dall'alcol deidrogenasi



# Fermentazione gliceropiruvica



Hugh D. Goold 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.

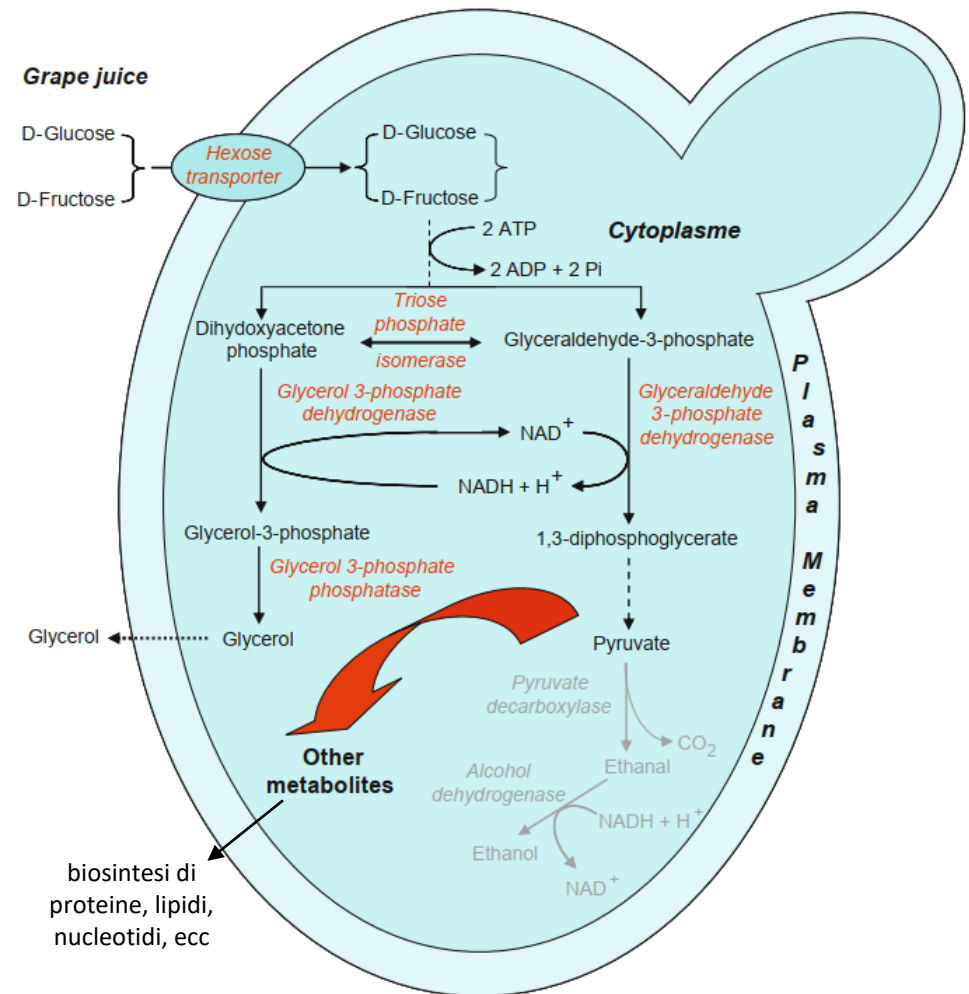
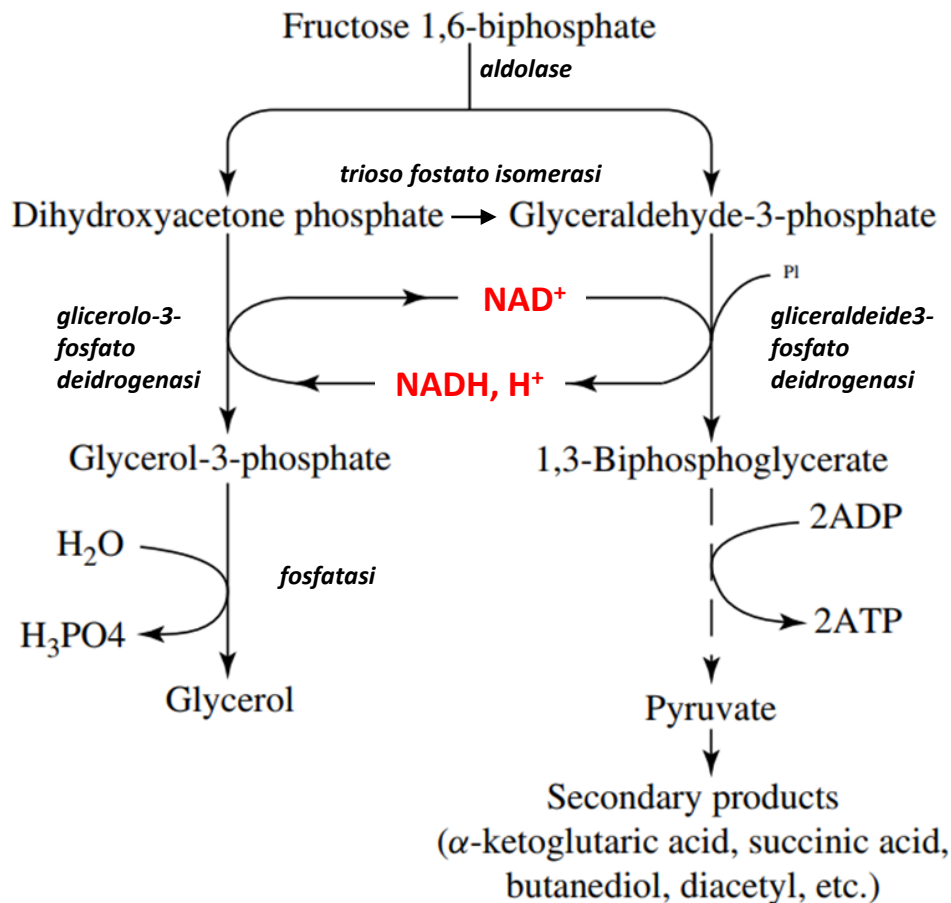


Fig. 1.5 Glyceropyruvic fermentation

## Glicolisi



## Glyceropyruvic fermentation pathway

## 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.

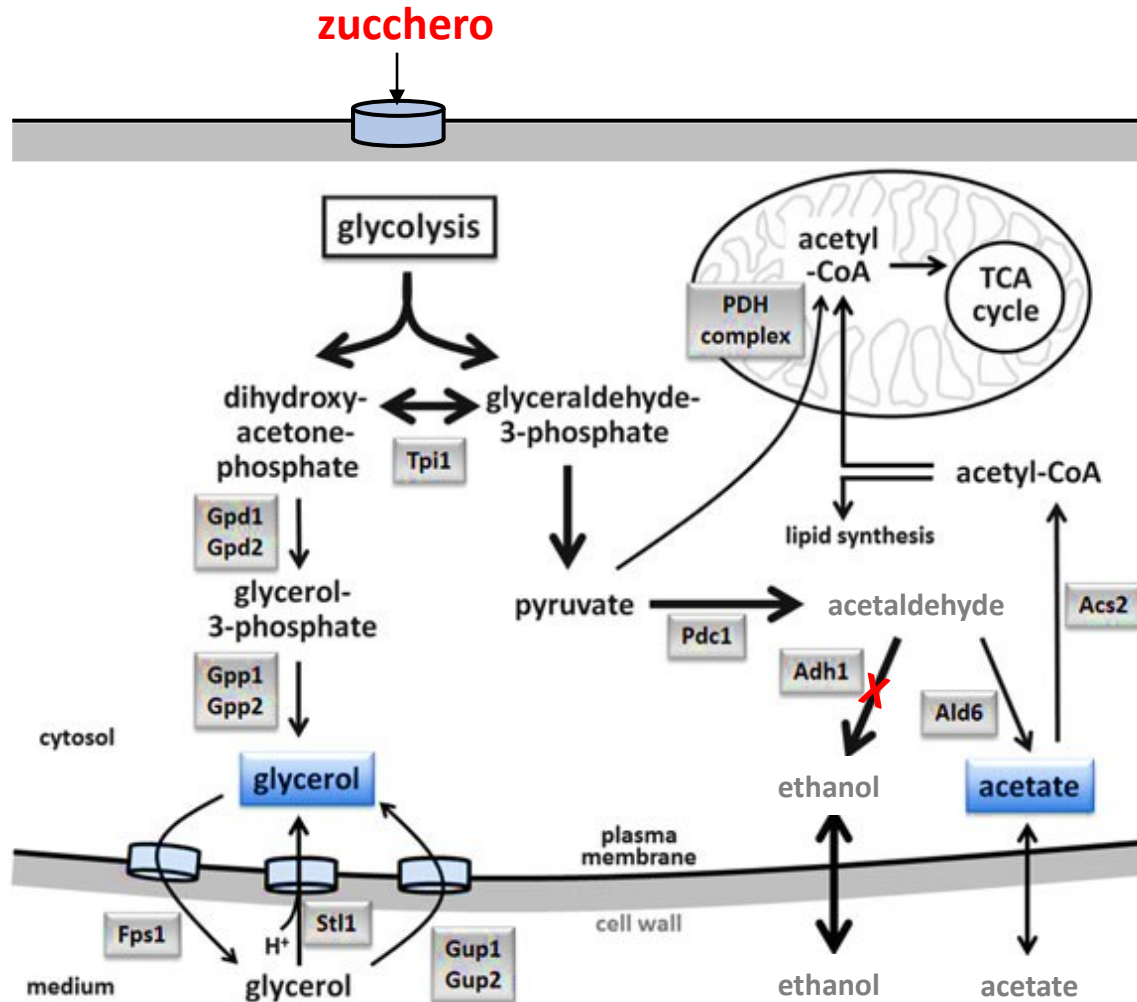
Nella fermentazione gliceropiruvica, vengono prodotte solo due molecole di ATP per ciascuna molecola di zucchero consumata. L'ATP è necessario ad attivare il glucosio nella prima fase della glicolisi. La fermentazione gliceropiruvica è utilizzata dai lieviti per consentire il riequilibrio del potenziale redox intracellulare (ovvero mantiene il rapporto tra  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a livello ottimale).

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

Il glicerolo viene prodotto quando c'è eccesso di NADH rispetto alla capacità della fermentazione alcolica di rigenerare  $\text{NAD}^+$ . Il glicerolo può entrare/uscire nella cellula tramite trasportatori specifici come FPS1 nei lieviti.

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

- **Bilancio redox:** consente di ossidare NADH a  $\text{NAD}^+$  quando la via alcolica non è sufficiente o quando la produzione di etanolo è limitata.
- **Osmoregolazione:** l'alto contenuto di zucchero iniziale nel mosto provoca uno stress osmotico, così i lieviti producono glicerolo come osmoprotettore per bilanciare la pressione interna ed esterna, evitando la disidratazione cellulare.



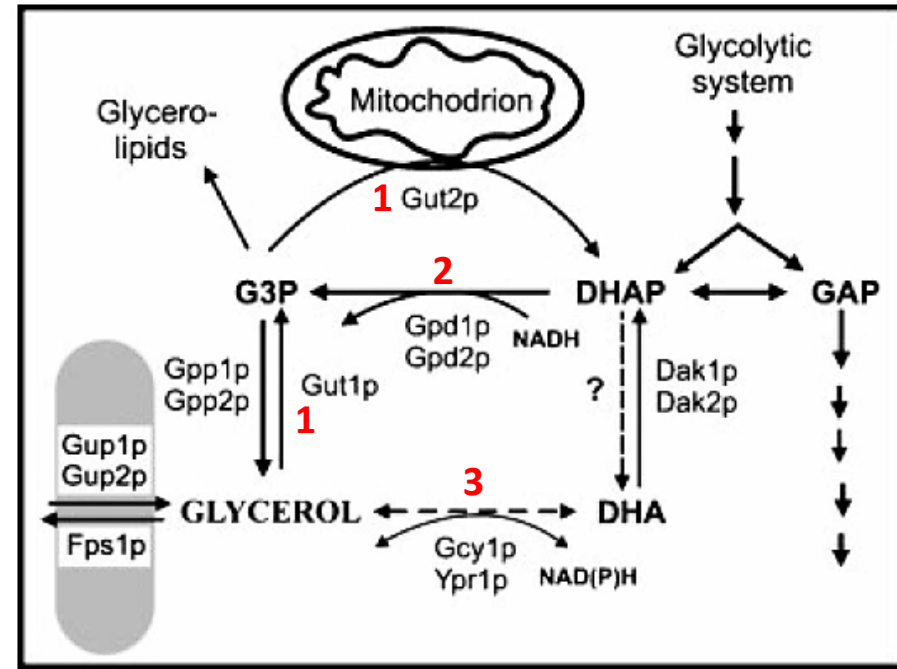
# Catabolismo del glicerolo

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

1) Il glicerolo può essere fosforilato dalla glicerolo chinasi (Gut1p) e il glicerolo-3-fosfato formato entra nel metabolismo centrale della cellula sottoforma di diidrossiacetone fosfato (Gut2p).

2) Il glicerolo 3-fosfato può formarsi dal diidrossiacetone fosfato dalla glicerolo 3-fosfato deidrogenasi NADH-dipendente (Gpd1p/2p).

3) Il glicerolo può diventare diidrossiacetone dalla glicerolo deidrogenasi NAD(P)-dipendente (Gcy1p e Ypr1p) e successivamente fosforilato a diidrossiacetone fosfato dalla diidrossiacetone chinasi.



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



# 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 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



**Fluidità della membrana:** un'eccessiva fluidità o rigidità impedisce il corretto funzionamento dei sistemi di trasporto cellulare.

---

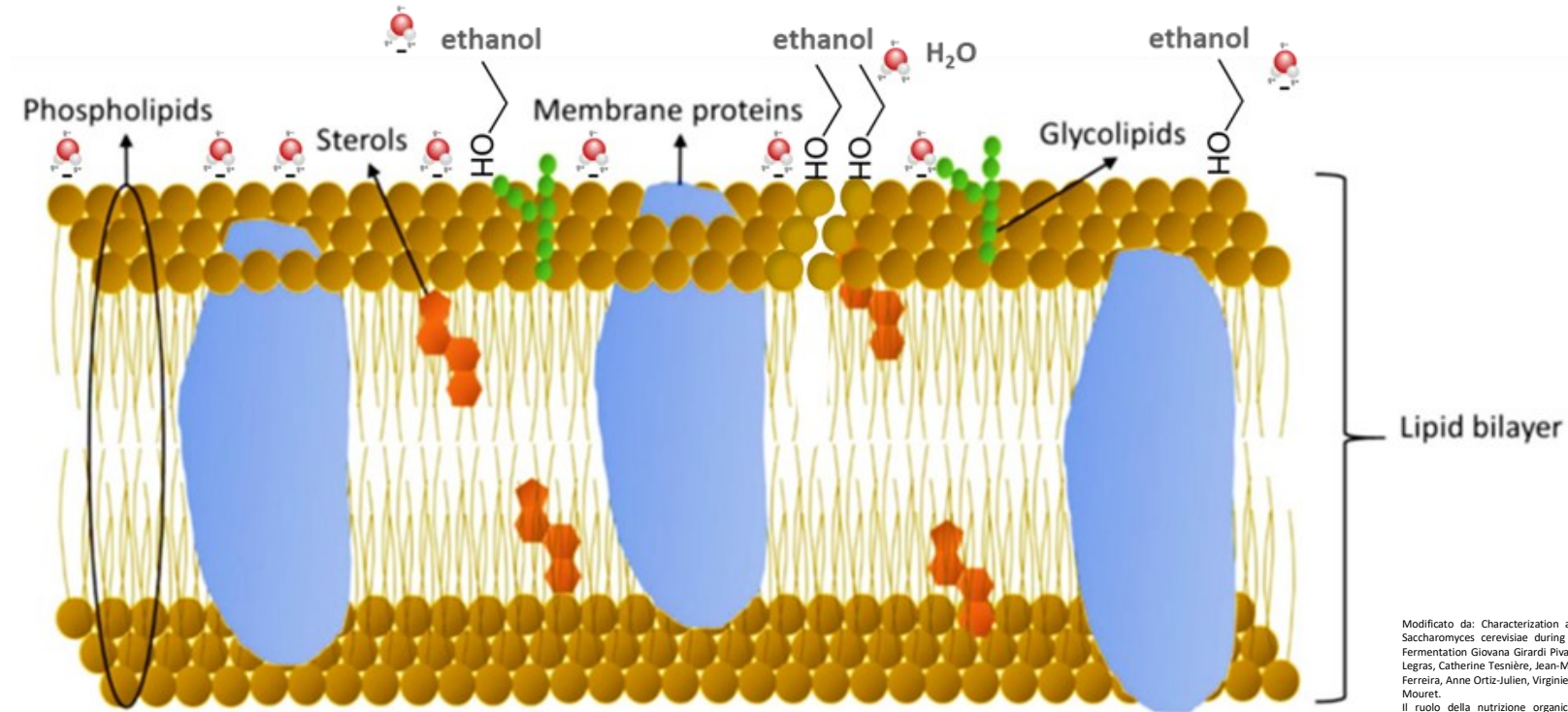
La fluidità della membrana plasmatica è notevolmente influenzata dalla temperatura e dalla concentrazione di etanolo.

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.



## 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%A0/01\\_ruolo\\_della\\_nutrizione\\_organica\\_nella\\_fermentazione\\_alcolica\\_sc\\_20742.htm](https://www.infowine.com/it/novit%C3%A0/01_ruolo_della_nutrizione_organica_nella_fermentazione_alcolica_sc_20742.htm)

L'etanolo è un solvente polare piccolo che si inserisce tra i fosfolipidi della membrana e riduce le interazioni tra catene lipidiche, aumentando la fluidità della membrana. Una maggiore fluidità può alterare la funzione di proteine di membrana, inclusi trasportatori di zuccheri e protoni. Le membrane più fluide diventano più permeabili a protoni e ioni, provocando la perdita del gradiente protonico ( $H^+$ ) essenziale per sintesi di ATP e trasporto attivo e piccoli metaboliti dalla cellula. L'etanolo può promuovere danno ossidativo ai lipidi della membrana (perossidazione lipidica). Questo peggiora la rigidità locale e la permeabilità della membrana.

# Per compensare i lieviti:

---

- Aumentano la sintesi di steroli (ergosterolo): stabilizza la membrana e riduce eccessiva fluidità.
- Modificano il rapporto acidi grassi saturi (palmitico e stearico ) e insaturi (palmitoleico e oleico). Molti insaturi aumentano la fluidità, più saturi o steroli stabilizzano la membrana, bilanciando l'effetto fluidificante dell'etanolo.
- Produzione di glicerolo e altri soluti compatibili: protegge la membrana e previene danni osmotici.

# Fluidità della membrana

Con una fermentazione più lenta e fredda (temperature di circa 12–18 °C). la membrana sarà inizialmente meno fluida.

Lo stress da etanolo progressivo porterà ai lieviti ad aumentare gradualmente l'ergosterolo e la saturazione dei lipidi. Con aumento moderato di acidi grassi saturi (palmitico (C16:0), stearico (C18:0))

Produzione di glicerolo più contenuta rispetto al rosso (per compensare l'osmolarità).



# Fluidità della membrana

Nei vini rossi, la fermentazione spesso avviene a temperature più alte (20–28 °C) rispetto ai vini bianchi (12–18 °C). Inoltre, i mosti rossi tendono ad avere concentrazioni di zuccheri iniziali più elevate.

Maggiore è lo stress da etanolo perché a temperature più alte la membrana è già più fluida, e la produzione di etanolo peggiora l'effetto fluidificante, aumentando permeabilità e rischio di danni.

Maggiore è lo stress osmotico, gli zuccheri più alti aumentano l'osmolarità del mosto, richiedendo ai lieviti di accumulare glicerolo o altri soluti compatibili per proteggere la membrana.

Le membrane devono resistere a fluidizzazione più marcata, con maggiore produzione di:

- Steroli (stabilizzano e limitano perdita di protoni).
- Acidi grassi saturi (palmitico (C16:0), stearico (C18:0) stabilizzano la struttura).
- Acidi grassi insaturi (C16:1, C18:1) mantengono la fluidità minima per le funzioni enzimatiche e trasporto.
- Glicerolo (per protezione osmotica).





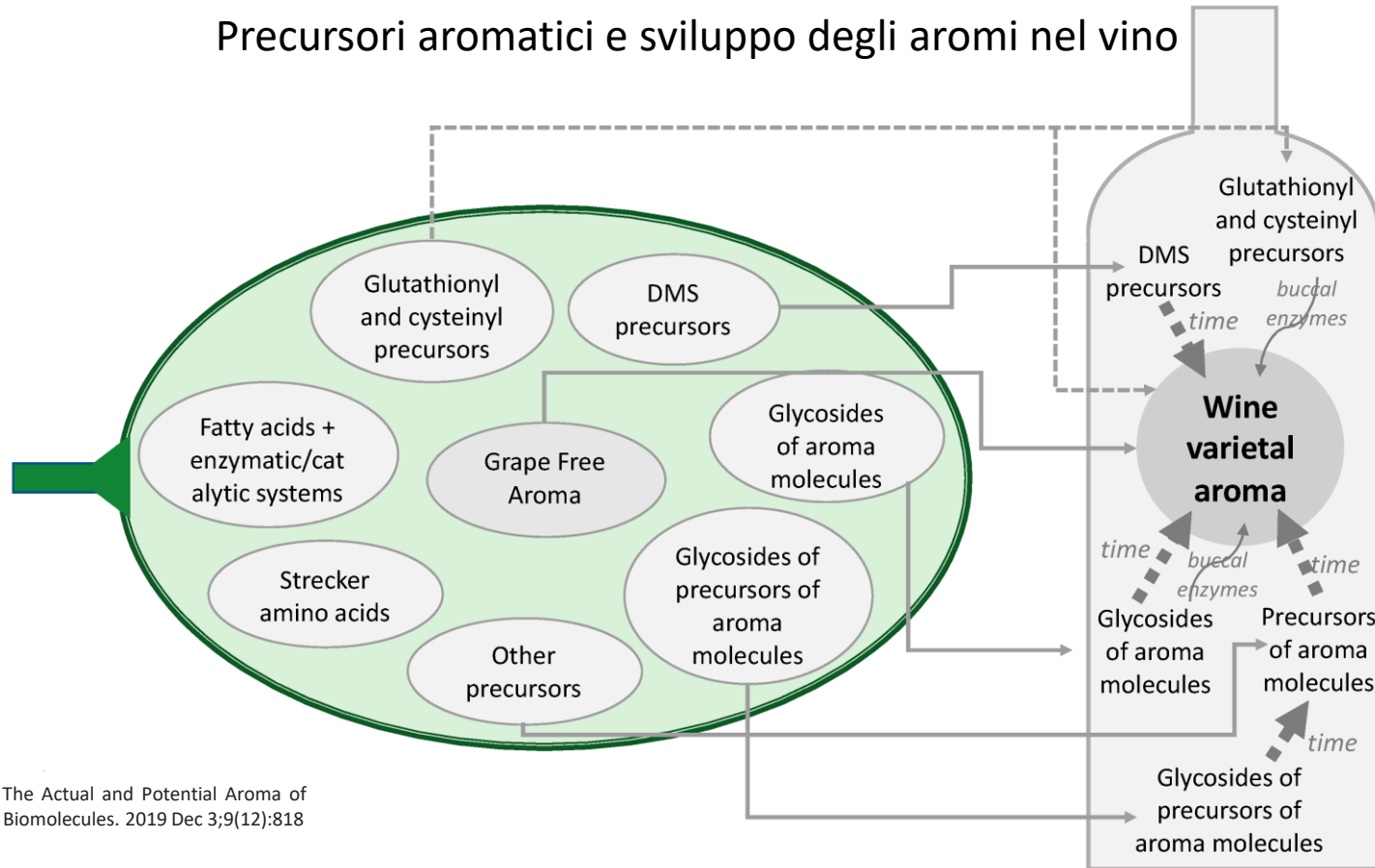
• Gli **aromi dei vini** possono essere distinti in tre categorie:

- **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



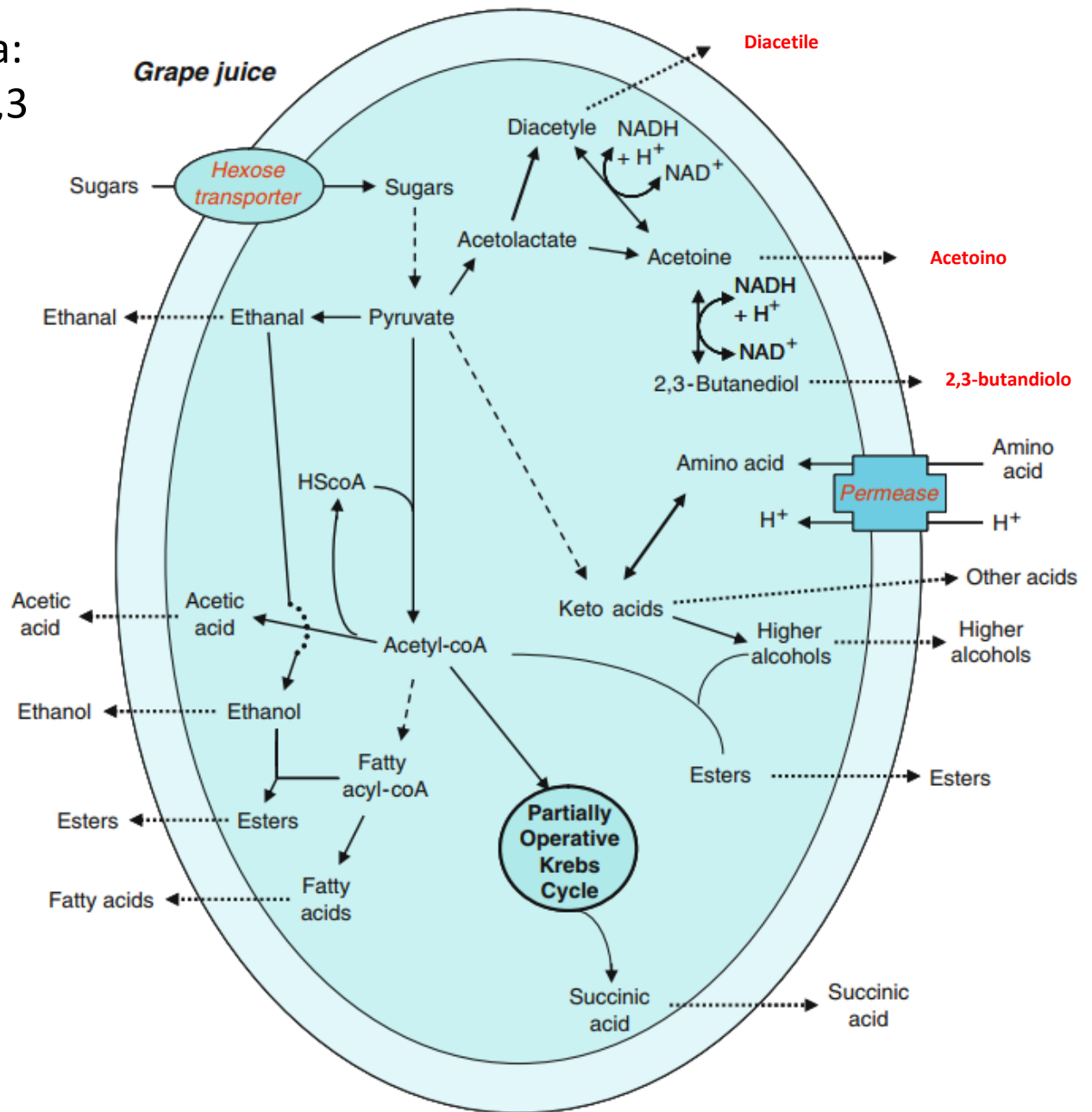
Ferreira V, Lopez R. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. Biomolecules. 2019 Dec 3;9(12):818

I precursori aromatici, sostanze inodore il cui aroma viene liberato nel corso della fermentazione alcolica, sono: glicosidi, glutathione-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.

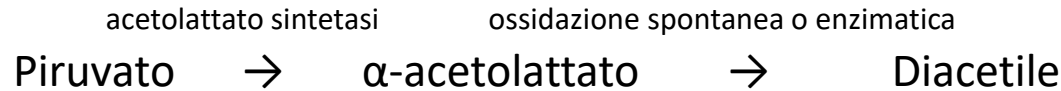
Al lievito servono circa 180-210 mg/L di azoto assimilabile presenti nel mosto per produrre un vino con una gradazione alcolica di 13-14%.

Sottoprodotti della fermentazione alcolica: diacetile, acetoino e 2,3 butandiolo

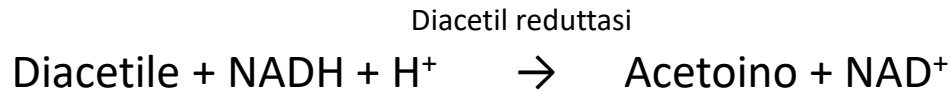


# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

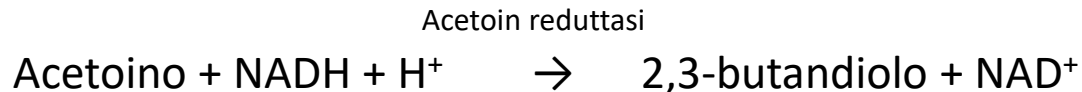
**Diacetile (2,3-butanedione):** è un composto carbonilico molto reattivo e volatile. Si forma principalmente come prodotto secondario dalla fermentazione del piruvato. La sua biosintesi avviene per decarbossilazione ossidativa del  $\alpha$ -acetolattato, un intermedio della biosintesi di valina e leucina.



**Acetoino (3-idrossi-2-butanone):** deriva dalla riduzione del diacetile tramite un enzima diacetil reduttasi. È meno volatile del diacetile.

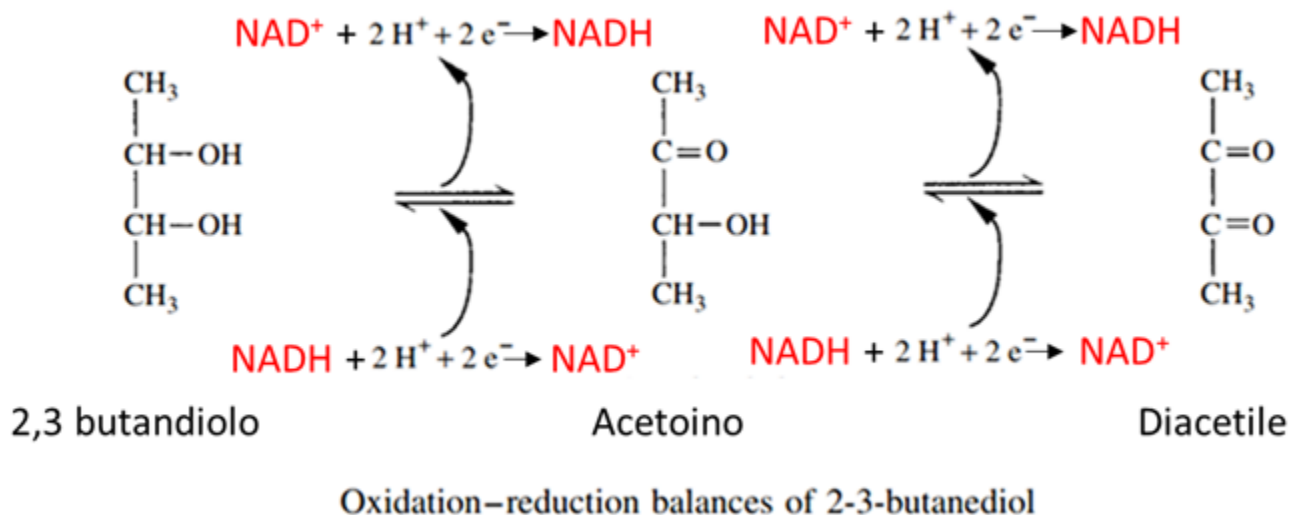


**2,3-Butandiolo:** deriva dall'ulteriore riduzione dell'acetoino tramite l'enzima acetoin reduttasi. È un composto più stabile e poco volatile, responsabile di aroma più dolce.





# Importanza metabolica della riduzione di diacetile ad acetoino e poi a 2,3-butandiolo



La riduzione di diacetile ad acetoino e poi a 2,3-butandiolo utilizza NADH, ossidandolo a NAD<sup>+</sup>.

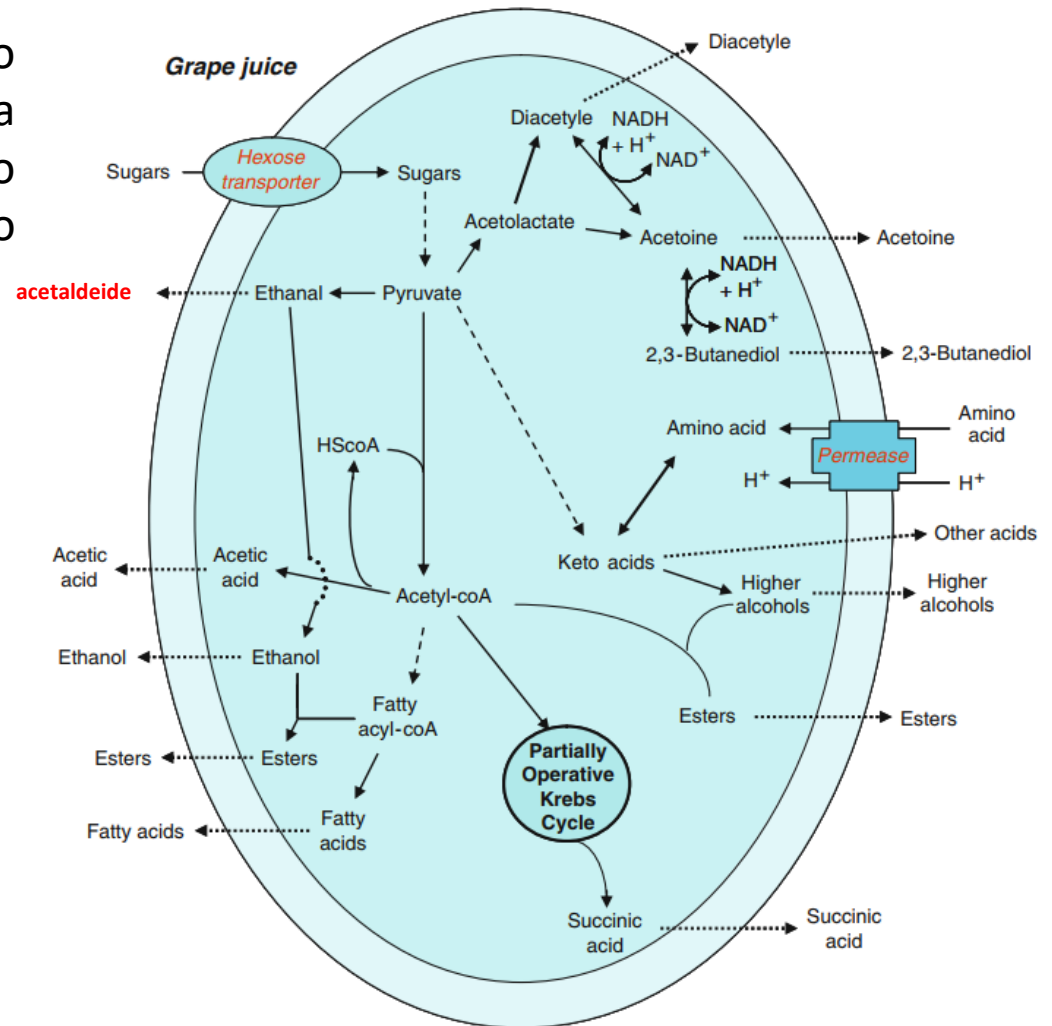
Questo processo aiuta a rigenerare NAD<sup>+</sup>, essenziale per mantenere attiva la glicolisi e altri processi metabolici.

In condizioni in cui l'ossigeno è limitato o la respirazione è rallentata, questa via alternativa permette di bilanciare il rapporto NADH/NAD<sup>+</sup>, evitando accumuli eccessivi di NADH.

Quindi, la conversione reversibile di questi composti è un meccanismo per mantenere l'omeostasi redox cellulare.

# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

**Etanale (acetaldeide):** intermedio della fermentazione, deriva dalla decarbossilazione del piruvato, ridotto ad etanolo anche se parte di esso viene rilasciato nel vino.



# Ruolo dell'acetaldeide nella fermentazione:

---

- **Rigenerazione del  $\text{NAD}^+$ :** La riduzione dell'acetaldeide ad etanolo permette di ossidare il NADH prodotto nella glicolisi, mantenendo il bilancio redox cellulare.
- **Ruolo nella regolazione del flusso metabolico;** L'acetaldeide può anche essere convertita in acetato o altri composti, partecipando al bilancio energetico e redox del lievito. L'accumulo o la scarsità di acetaldeide può influenzare il ritmo della fermentazione e la produzione di sottoprodotti aromatici.

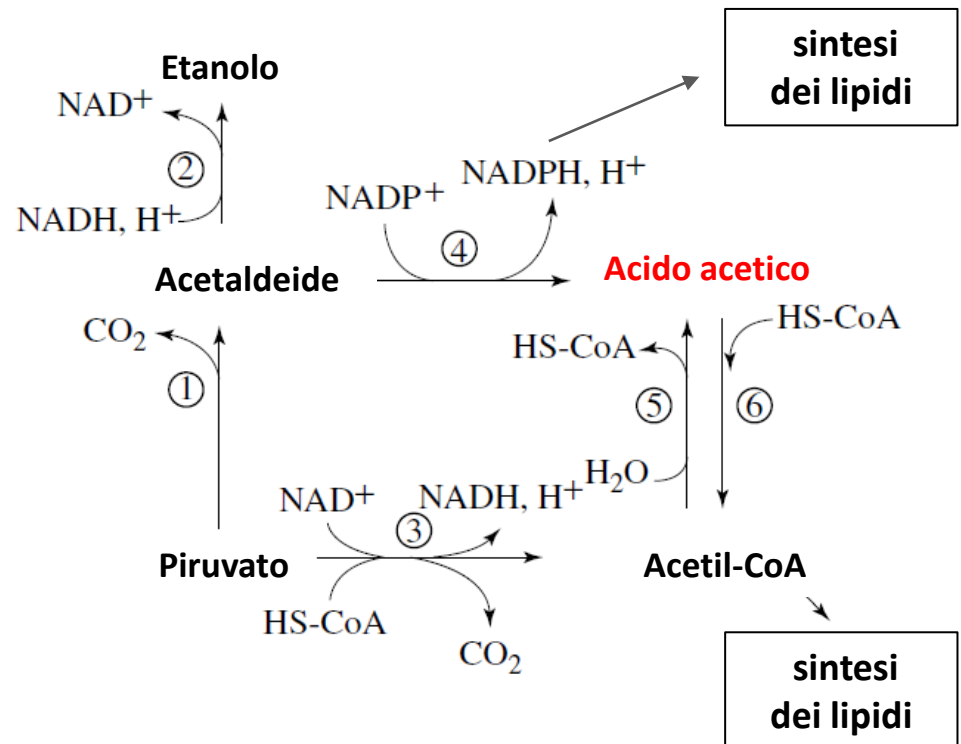
Se si accumula troppo, può diventare tossica per la cellula e rallentare l'attività degli enzimi coinvolti nella fermentazione, riducendo quindi la velocità di produzione di etanolo e  $\text{CO}_2$ . Inoltre, un eccesso di acetaldeide può essere convertita in altri composti aromatici che modificano il profilo sensoriale del prodotto finale (ad esempio, aumentando note pungenti o verdi).

# 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 acetaldeide mediante decarbossilazione del piruvato (PD) (1) oppure può diventare Acetil-CoA (PDH) (3).
- 2) L'ossidazione dell'acetaldeide tramite l'aldeide deidrogenasi (4), 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. Infatti, l'acetil-CoA sintetasi (6) trasforma l'acido acetico in acetil CoA e l'acetil CoA idrolasi (5) riforma acido acetico.

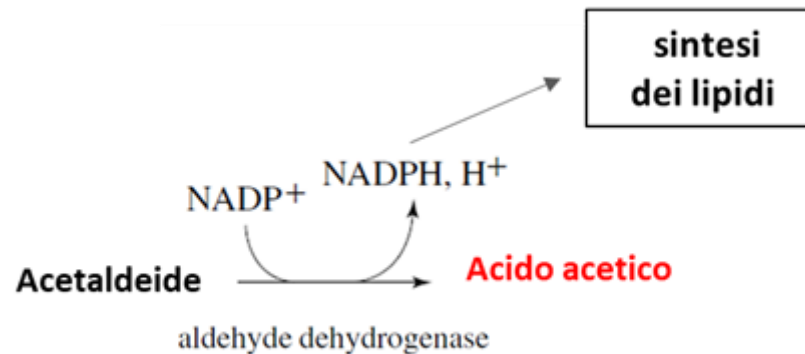


**Fig. 2.11.** Acetic acid formation pathways in yeasts. 1 = pyruvate decarboxylase; 2 = alcohol dehydrogenase; 3 = pyruvate dehydrogenase; 4 = aldehyde dehydrogenase; 5 = acetyl-CoA hydrolase; 6 = acetyl-CoA synthetase

# Ruolo dell'acido acetico nella fermentazione:

---

- La produzione di acido acetico serve per **regolare il bilancio redox** e per la sintesi di molecole importanti durante la fermentazione come i lipidi.



- L'acido acetico (acetato) è anche un sottoprodotto volatile che può influenzare il sapore e l'aroma.

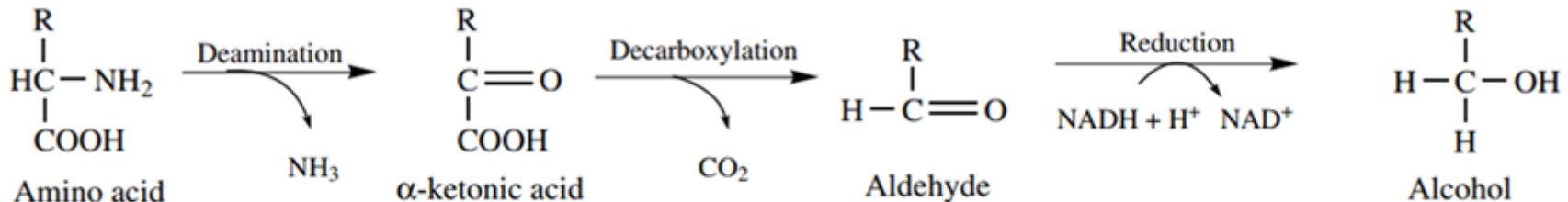
# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

**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.

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.

I passaggi principali sono:

- **Transaminazione:** l'amminoacido diventa un  $\alpha$ -chetoacido
- **Decarbossilazione:** l' $\alpha$ -chetoacido formato si trasforma in aldeide
- **Riduzione:** l'aldeide formata diventa alcol superiore



Formation of higher alcohols from amino acids (Ehrlich reactions)

# Ruolo degli alcol superiori nella fermentazione:

---

- **Servono per il bilancio redox:** la riduzione delle aldeidi ad alcoli consuma NADH, aiutando a rigenerare  $\text{NAD}^+$  per la glicolisi.
- **Sono sottoprodotti aromatici:** contribuiscono all'aroma e al gusto dei prodotti fermentati.
- **Tossicità:** in concentrazioni elevate possono inibire la crescita del lievito stesso.

# Alcoli come sottoprodotti della fermentazione alcolica

---

## Higher Alcohols

---

Propanol	Alcohol, solvent-like
Isobutanol	Alcohol, solvent-like
Isoamyl alcohol	Alcohol, banana, vinous
Amyl alcohol	Alcohol, solvent-like
2-Phenylethanol	Roses, sweet
Tyrosol	Bitter, chemical

---



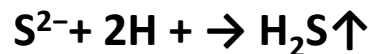
# Metabolismo dello zolfo nel *Saccharomyces*

Il lievito può utilizzare solfato inorganico ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) come fonte di zolfo.

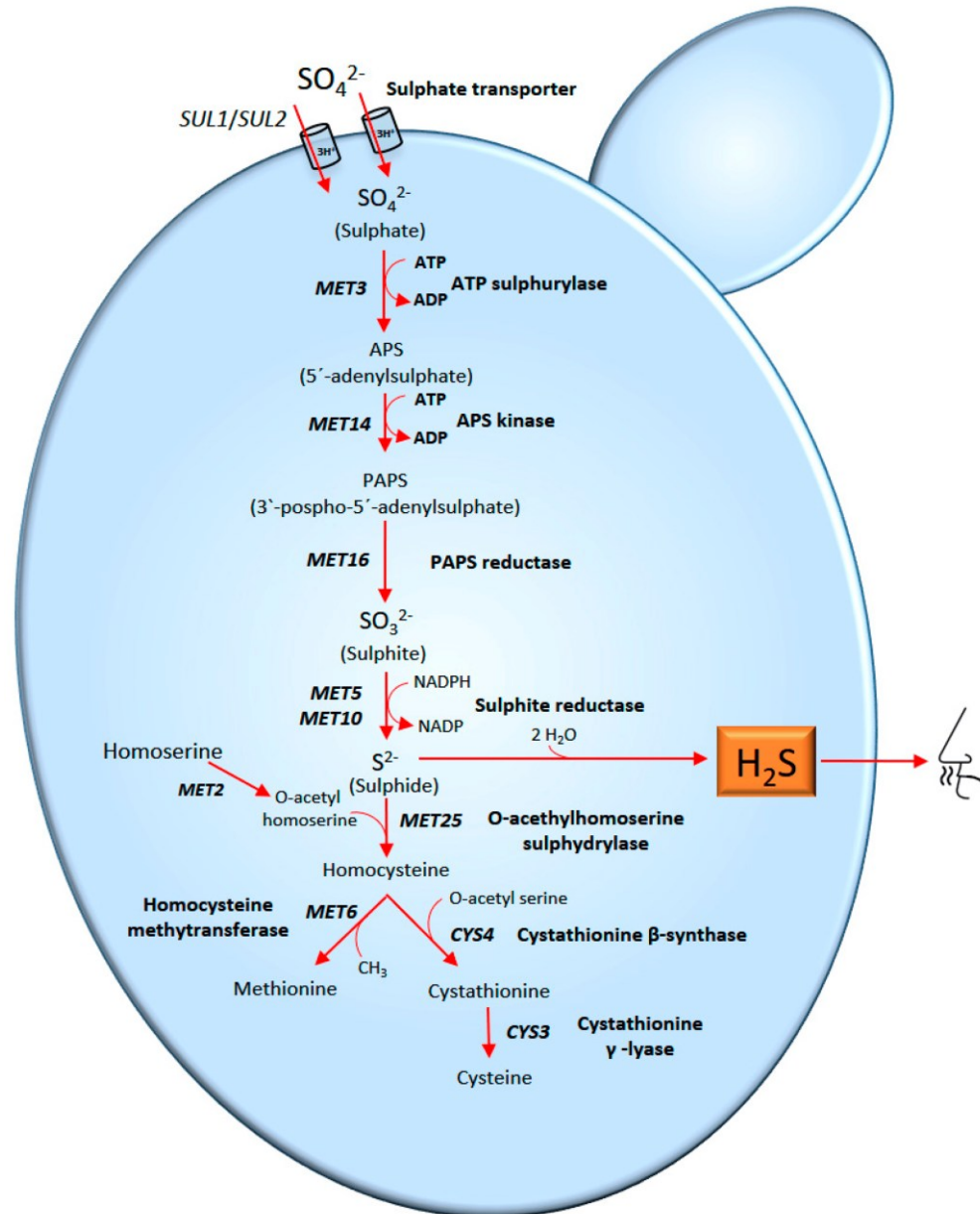
## Passaggi principali:

- Importazione del solfato nel citoplasma tramite trasportatori specifici.
- Attivazione del solfato a adenosina-5'-fosfosolfato (APS) tramite ATP.
- Riduzione dell'APS a solfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ).
- Riduzione del solfito a solfuro ( $\text{S}^{2-}$ ), forma attiva per la sintesi degli aminoacidi solforati.

Se il flusso metabolico è sbilanciato (ad esempio scarsa disponibilità di precursori carboniosi o aminoacidi solforati), il solfuro non incorporato accumulato viene rilasciato come solfuro di idrogeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ):



L' $\text{H}_2\text{S}$  è volatile e ha odore di "uova marce".



# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

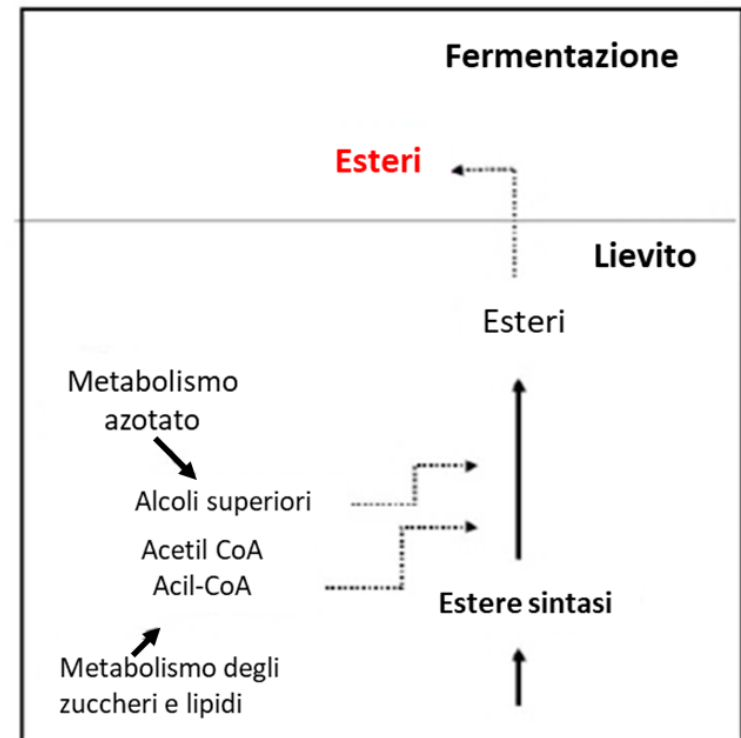
**Esteri:** sono composti chimici responsabili dei **profili aromatici fruttati e floreali**:



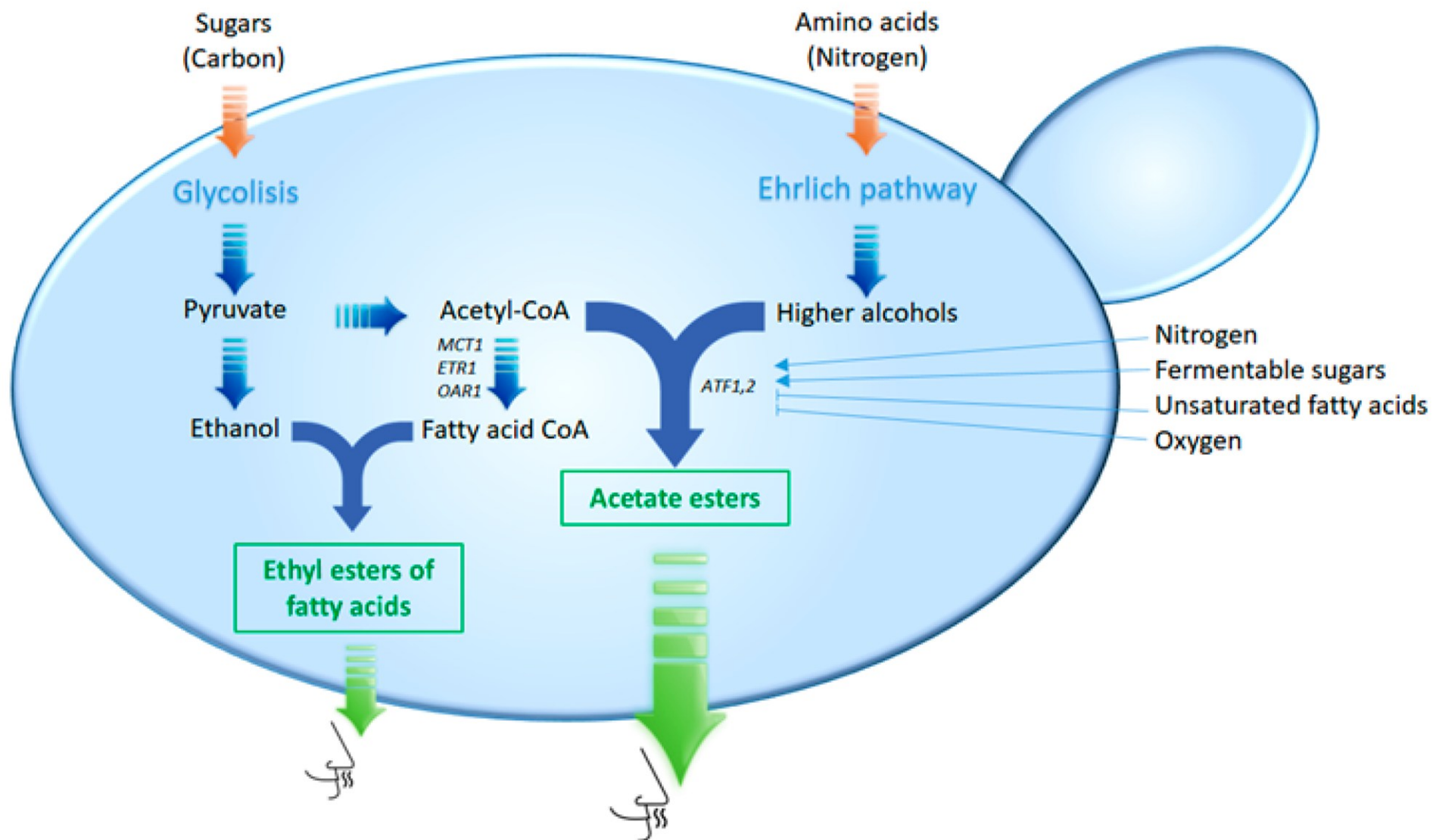
**Gli alcoli coinvolti sono:** etanolo, alcoli superiori (es. isoamyl alcol, feniletil alcol)

**Gli acidi coinvolti sono:** acido acetico, acidi a catena corta derivati dal metabolismo degli aminoacidi o da acidi grassi.

- Estere di acetato → Acetil-CoA + alcol superiore
- Estere di etile → acido grasso + etanolo
- **L'acetato di etile** (acido acetico + etanolo) 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.
- Il **caproato e caprilato di etile** (acido caproico e caprilico + etanolo), hanno odore molto piacevoli di ananas, mela o fruttato tropicale. Sono presenti ad una concentrazione totale di qualche mg/L.



# Sintesi degli esteri



# Importanza degli esteri nel lievito:

---

Gli esteri servono al lievito per eliminare l'eccesso di acetil-CoA. Durante la fermentazione la glicolisi è molto attiva e si forma una grande quantità di acetil-CoA, ma il ciclo di Krebs non funziona a pieno perché il lievito si trova in condizioni fermentative. Di conseguenza l'acetil-CoA tenderebbe ad accumularsi, e un suo eccesso risulta tossico.

**Un accumulo di acetil-CoA può infatti:**

- acetilare in modo non regolato proteine citosoliche,
- alterare lo stato di acetilazione degli istoni e di altre proteine strutturali,
- compromettere il controllo dell'espressione genica.

Gli esteri contribuiscono anche a eliminare gli acidi grassi a catena media (MCFA), che sono tossici per la cellula. Durante la fermentazione, il lievito produce e **accumula acidi grassi a catena media (C6–C12)**, i quali:

- si inseriscono nelle membrane,
- aumentano la permeabilità,
- destabilizzano sia la membrana plasmatica sia quella mitocondriale.

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

Esters		Sterol and Its Impact on Ester Biosynthesis
Acetate esters	Isoamyl acetate	(+) Ergosterol and phytosterols
	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.

# Esteri come sottoprodotti della fermentazione alcolica

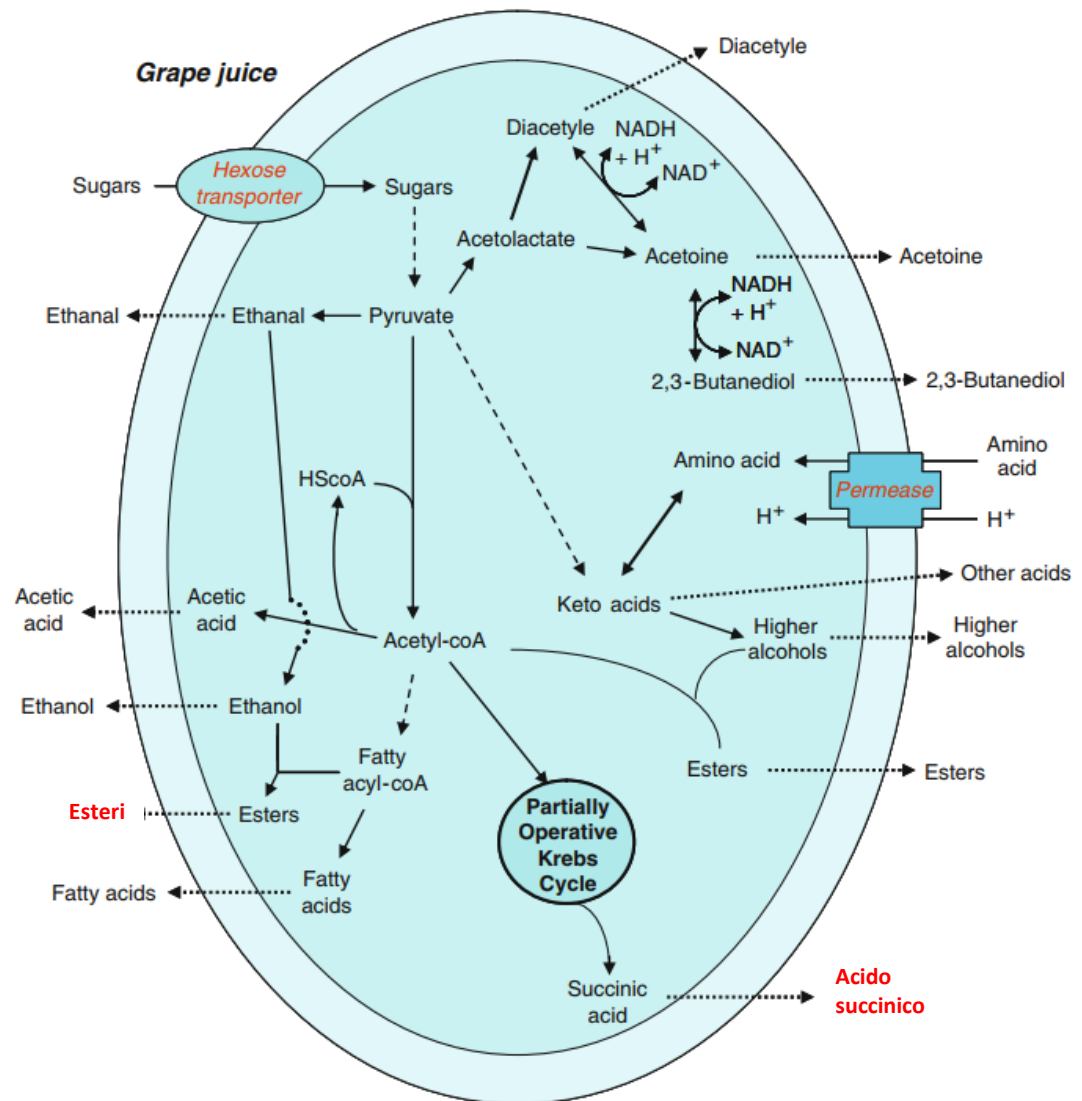
Compound	Aroma Impression
Esters	
Ethyl acetate	Fruity, solvent-like
Isoamyl acetate	Banana, pear
Phenylethyl acetate	Roses, honey, sweet
Ethyl hexanoate	Apple, fruity
Ethyl caproate	Apple, aniseed
Ethyl caprylate	Apple
Ethyl octanoate	Apple, aniseed

## 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.

l'acido succinico viene prodotto  
tramite diverse vie metaboliche





# Sottoprodotti della fermentazione alcolica

La via più attiva durante la fermentazione anaerobica è la via PEP → ossalacetato → malato → fumarato → succinato, detta anche via anaplerotica riduttiva.

Il PEP diventa ossalacetato, l'enzima è la PEP carbossilasi (PPC):



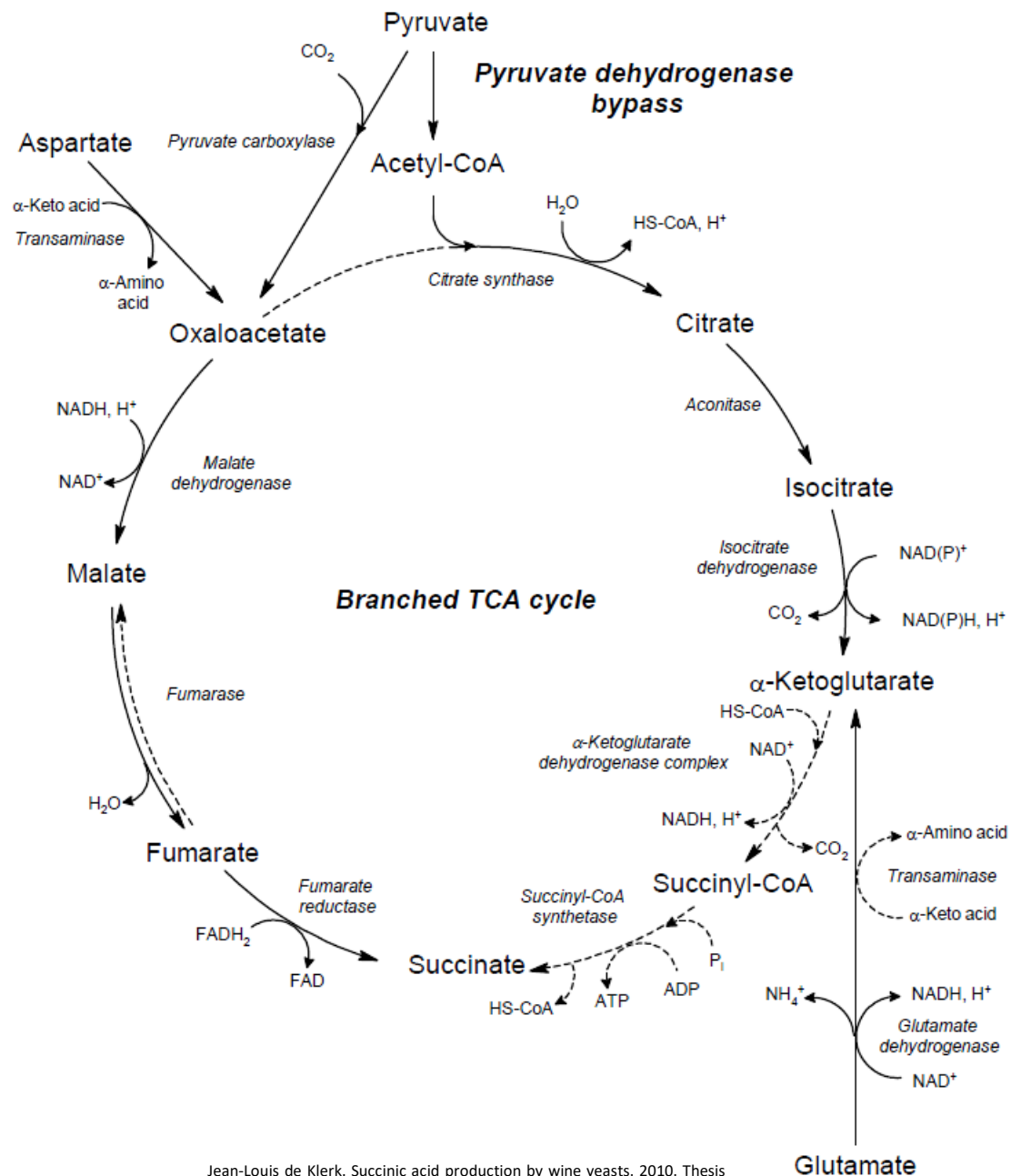
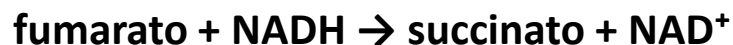
L'ossalacetato diventa malato, l'enzima è la malato deidrogenasi (MDH):



Il malato diventa fumarato, l'enzima è la fumarasi (FUM):



Il fumarato diventa succinato, l'enzima è la fumarato reduttasi (FRD):



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.

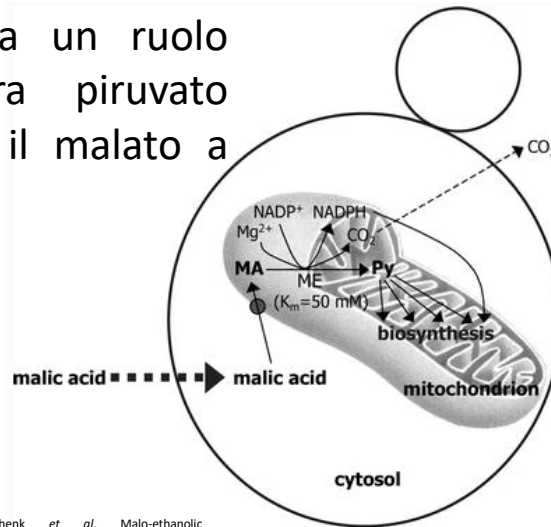


## Fermentazione malo-alcolica: decarbossilazione diretta dell'acido malico durante la fermentazione alcolica

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.

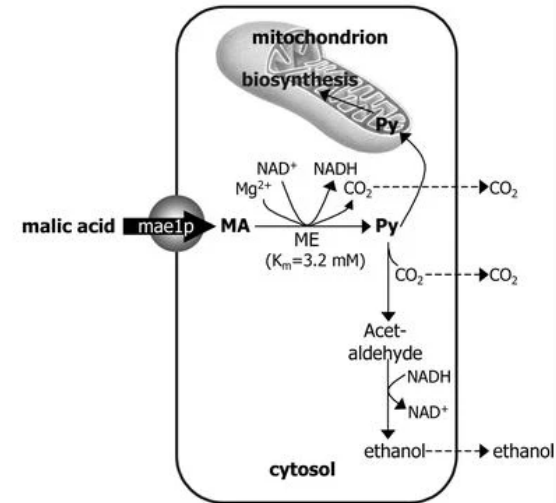
Nel *Saccharomyces* l'enzima malico è presente, ma non è la via principale durante la fermentazione alcolica. La via **malato piruvato** ha un ruolo **minore**, perché la cellula genera piruvato direttamente dalla glicolisi e riduce il malato a ossalacetato (MDH) o lo esporta.

Nello *Schizosaccharomyces pombe* il piruvato viene decarbossilato ad acetaldeide e infine trasformato dall'alcol deidrogenasi in etanolo.

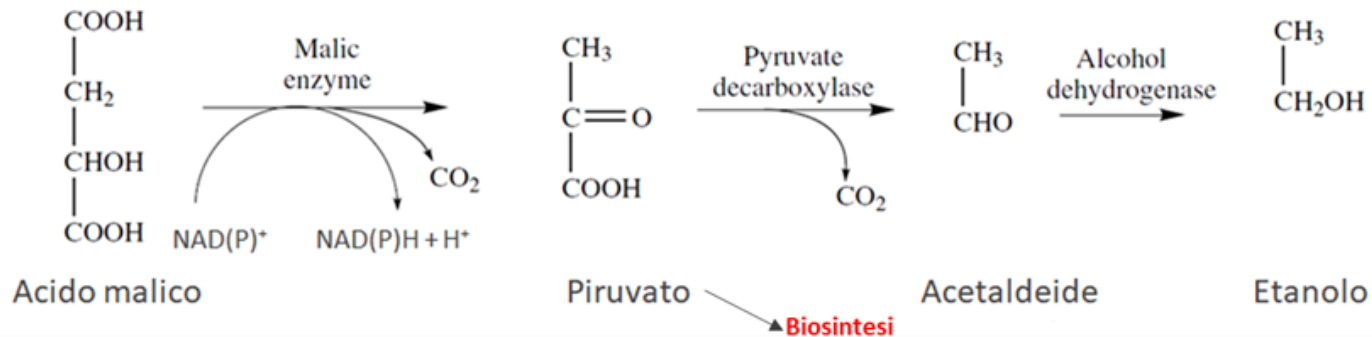


Voltschenk et al. Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr Genet* (2003) 43: 379–391. DOI 10.1007/s00294-003-0411-6

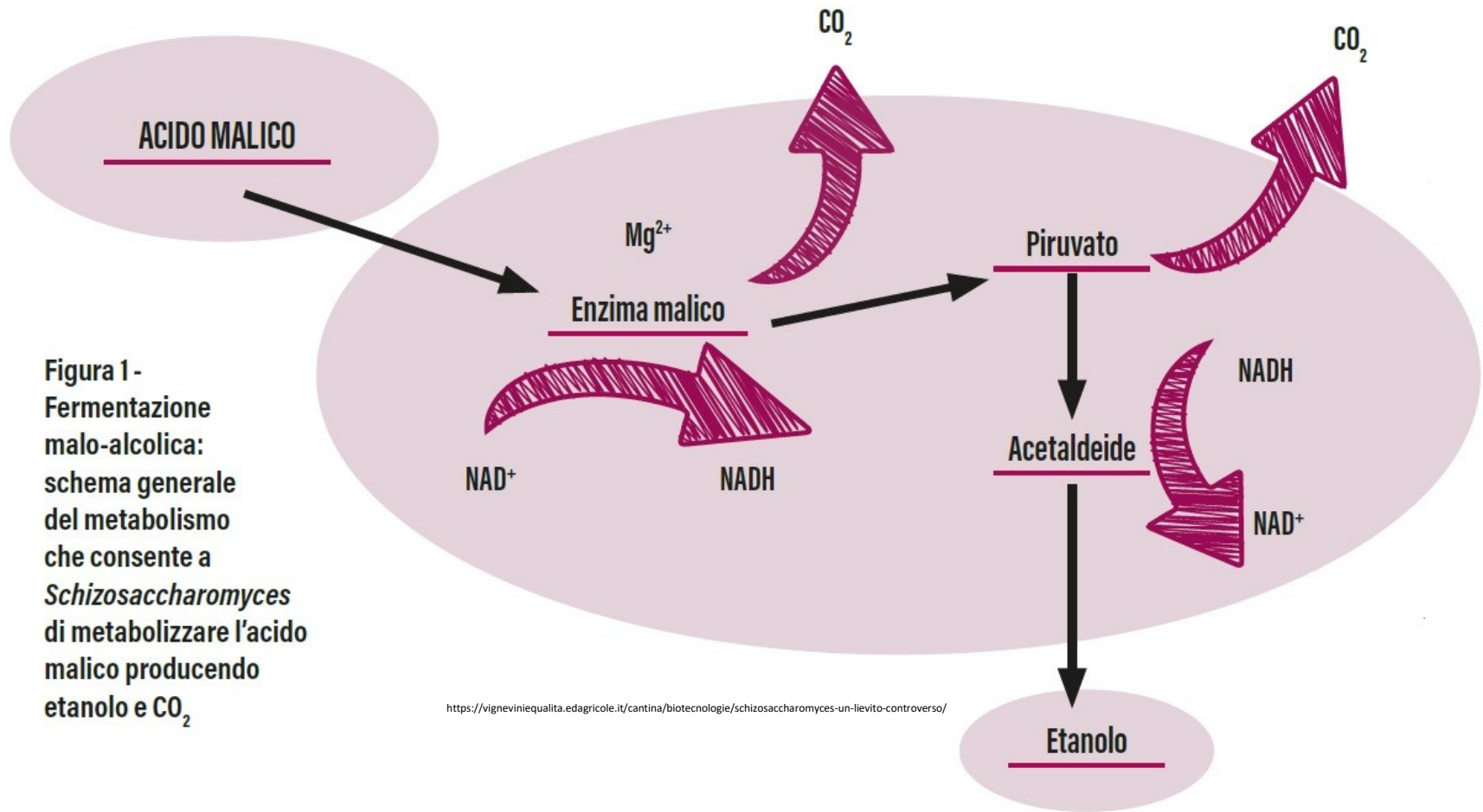
*S. cerevisiae*



*S. pombe*



# Fermentazione malo-alcolica nel lievito *Schizosaccharomyces*



Contribuisce al bilancio energetico e redox senza necessità del ciclo di Krebs completo, perché la reazione catalizzata dal malico enzima produce  $NAD(P)H$ , utilizzato per rigenerare  $NAD^+$  durante la fermentazione.

Riduce l'acidità del mosto, poiché l'acido malico (malato) viene convertito in piruvato e successivamente fermentato a etanolo nella fermentazione malo-alcolica, rendendo il vino meno aspro e aumentando la concentrazione di etanolo.