



# Batteri lattici

---

Sono anaerobi facoltativi e acidofili



# Classificazione dei batteri lattici del vino

**Table 4.3.** List of the most widespread lactic acid bacteria species in grape must and wine

Lactobacilli	Facultative heterofermenters (Group II)	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Strict heterofermenters (Group III)	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
	Homofermenters	<i>Pediococcus damnosus</i>
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Cocci	Heterofermenters	<i>Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni)</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>

I batteri **omofermentativi** producono più dell'85% di acido lattico a partire da glucosio

I batteri **eterofermentativi** producono, oltre all'acido lattico, anidride carbonica, etanolo ed acido acetico.

# Metabolismo omofermentativo degli zuccheri

i batteri omofermentativi trasformano la quasi totalità degli esosi che utilizzano, specialmente il glucosio, in acido lattico come unico prodotto finale, tramite la fermentazione omolattica.

La via metabolica principale è la glicolisi, i batteri trasformano una molecola di glucosio in due molecole di lattato, **generando 2 molecole di ATP per molecola di glucosio**. Non producono  $\text{CO}_2$  in quantità significativa.

**Bilancio redox:** il NADH prodotto dalla glicolisi viene ossidato a  $\text{NAD}^+$  dalla LDH durante la produzione di lattato.

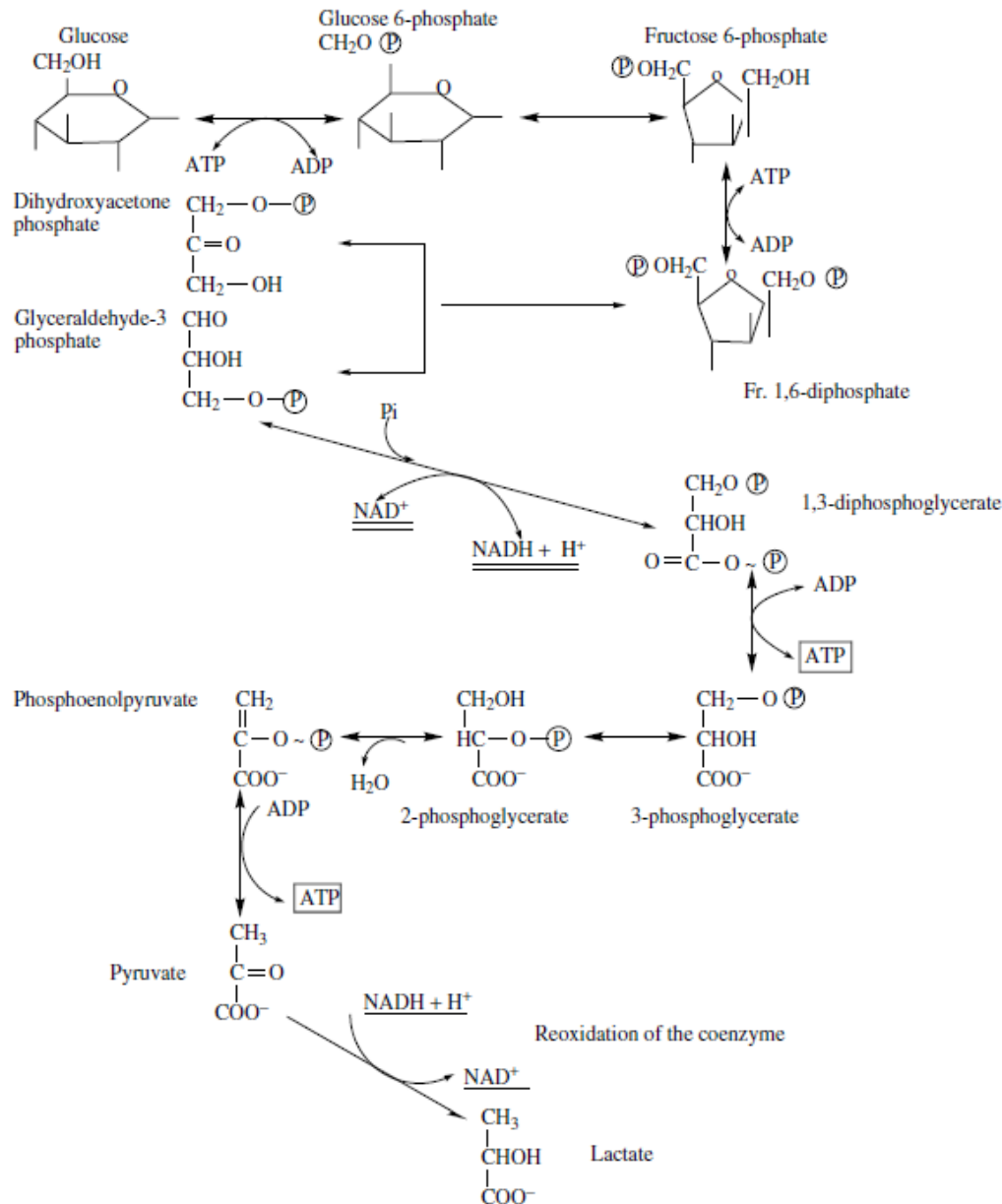
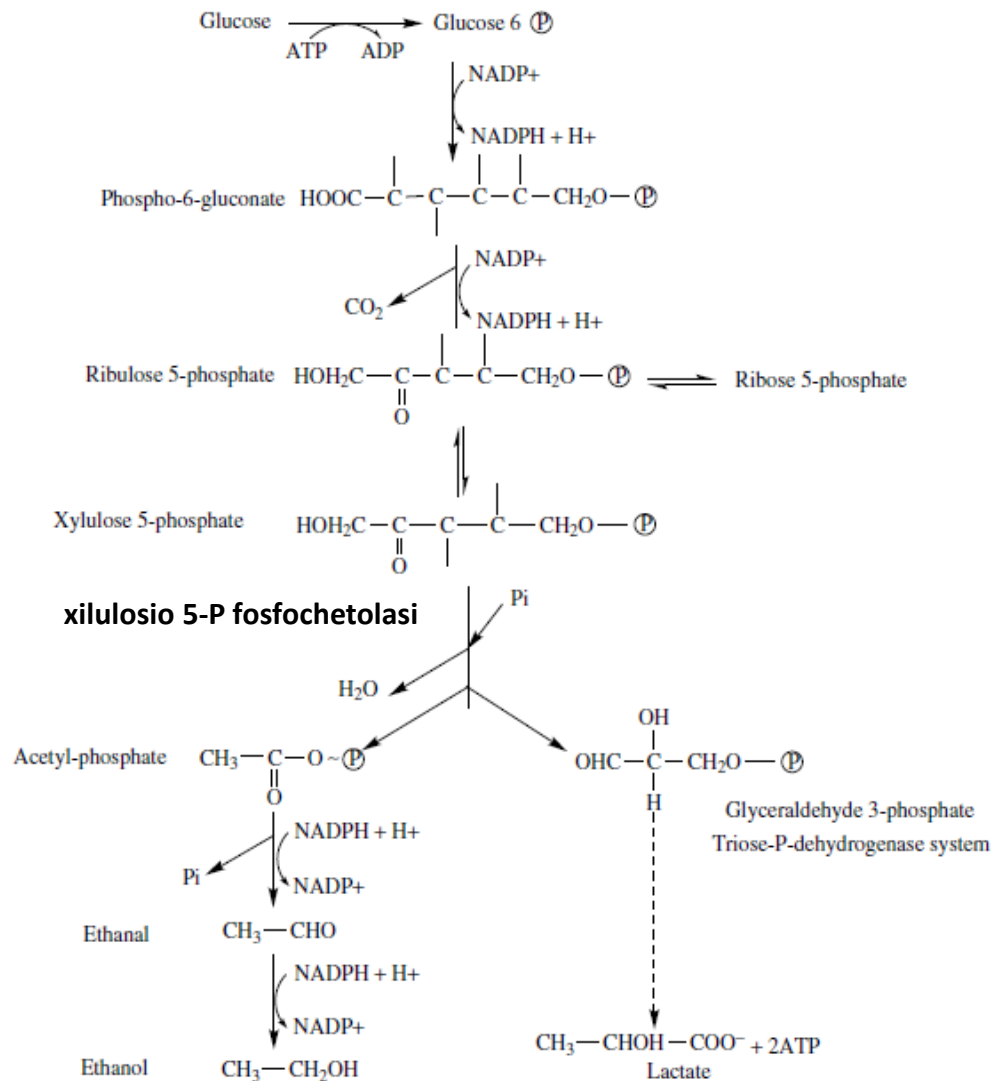


Fig. 5.1. Metabolic pathway of glucose fermentation by homolactic bacteria

# Metabolismo eterofermentativo degli zuccheri

I batteri che utilizzano la via eterofermentativa trasformano gli esosi principalmente in lattato, come prodotto principale, ma non esclusivo. Le altre molecole provenienti da questo metabolismo sono essenzialmente la  $\text{CO}_2$ , l'acetato e l'etanolo. Si tratta della via dei pentosi fosfati. Producono **1 molecola di ATP per molecola di glucosio**, quindi rendimento energetico più basso rispetto agli omofermentativi.



La **xilulosio 5-P fosfochetolasi** è l'enzima chiave di questa via, catalizza la scissione dello xilulosio 5-P in acetil-P e gliceraldeide 3-P.

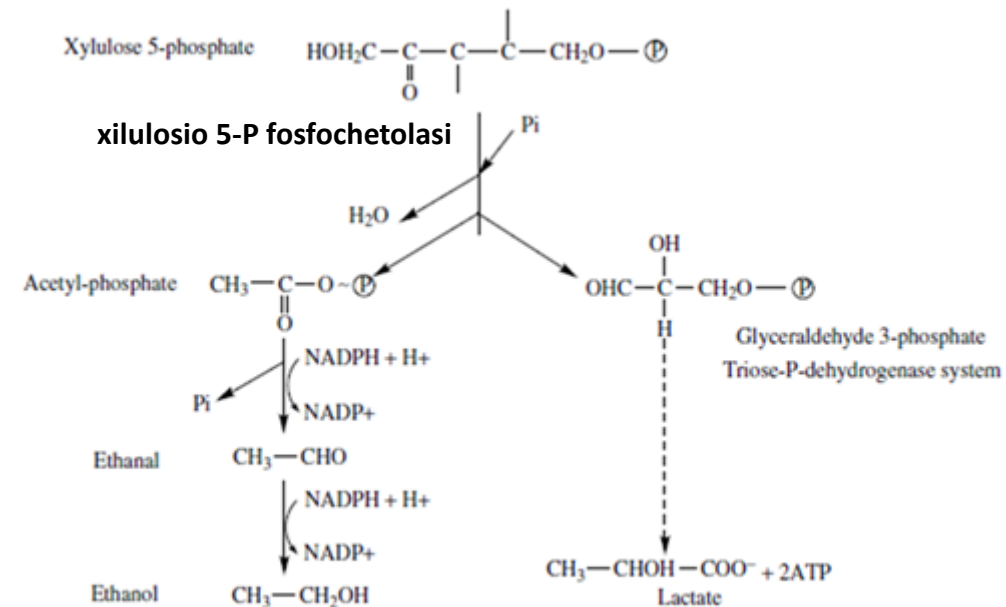
La gliceraldeide 3-P segue la via della glicolisi ed è metabolizzata ad acido lattico.

Fig. 5.2. Metabolic pathway of glucose fermentation by heterolactic bacteria (pentose phosphate pathway)

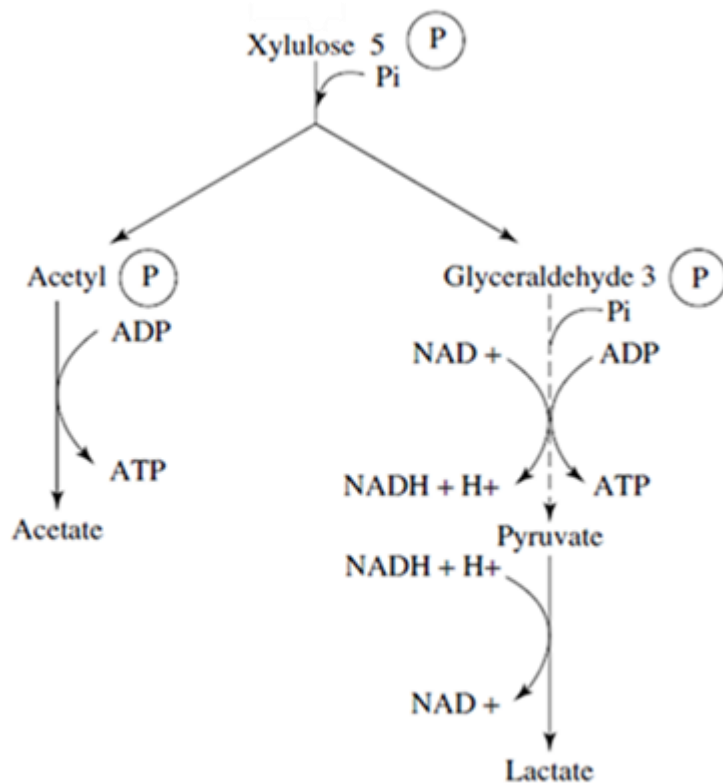
# Metabolismo eterofermentativo degli zuccheri

L'acetil-P ha due possibili destini:

- 1) La molecola può essere ridotta ad acetaldeide (etanale) e successivamente ad etanolo. Questo passaggio è essenziale per rigenerare il potenziale in coenzima. Per ridurre l'acetil-P a etanolo serve NADH. L'etanolo viene prodotto unicamente per rigenerare  $\text{NAD}^+$  e non viene prodotto ATP.



Metabolic pathway of glucose fermentation by heterolactic bacteria (pentose phosphate pathway)



Pentose fermentation pathway by lactic acid bacteria

2) L'acetyl-P può generare acetato con produzione di ATP tramite l'enzima acetato chinasi.

Se l'acetyl-P segue questa via serve una fonte alternativa per rigenerare  $\text{NAD}^+$  necessari per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, perché l'enzima utilizza i  $\text{NAD}^+$  per generare NADH, necessari per ridurre l'acetyl-P a etanolo o il piruvato a lattato.

Per ogni molecola di pentosio fermentata questa via fornisce 1 molecola di ATP in più, oltre a quella prodotta dal 1,3-BPG al 3-PG con la fosforilazione a livello di substrato. Il rendimento energetico è superiore ma non viene rigenerato  $\text{NAD}^+$  quindi il flusso verso lattato rallenta o si ferma.

# Resa energetica della via eterofermentativa

Per ogni molecola di glucosio che entra nella via del pentoso fosfato (via fosfochetolasi):

Il glucosio viene convertito in 1 G3P e 1 acetil-P.

La G3P viene metabolizzata a lattato, producendo 1 ATP netto (fosforilazione a livello di substrato). Durante il processo viene generato NADH che viene rigenerato a  $\text{NAD}^+$ .

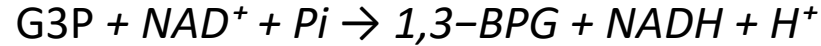
L'acetil-P ha due possibili destini:

- Riduzione ad etanolo con consumo di NADH senza produrre ATP, ma rigenera  $\text{NAD}^+$  necessario per continuare la fermentazione.
- Conversione ad acetato con produzione di 1 ATP (fosforilazione a livello del substrato), ma non rigenera  $\text{NAD}^+$ .

Quindi, nella fermentazione eterolattica con produzione di lattato + etanolo: 1 ATP netto per glucosio. Se l'acetil-P si trasforma in acetato, la resa energetica aumenta a 2 ATP, ma serve una fonte alternativa per rigenerare  $\text{NAD}^+$ .

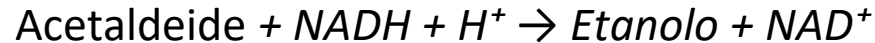
## Bilancio redox nella fermentazione eterolattica

**Formazione di G3P:** dal glucosio tramite la via del pentoso fosfato si genera 1 G3P (per molecola di glucosio). La G3P deidrogenasi ossida G3P a 1,3-BPG:



Produzione di NADH = 1 molecola.

**Riduzione dell'acetil-P ad etanolo:** L'acetil-P viene prima convertito in acetaldeide, poi ridotto a etanolo:



Questa reazione consuma 1 NADH, rigenerando 1 NAD<sup>+</sup>.

### **Riduzione del piruvato a lattato:**

In alcuni batteri eterofermentativi, la G3P si trasforma in lattato (via piruvato-lattato) e produce NAD<sup>+</sup> a partire da NADH generato nella stessa via (bilancio redox locale).

Bilancio totale NADH/NAD<sup>+</sup> per 1 glucosio:

NADH prodotto dalla G3P deidrogenasi = 1

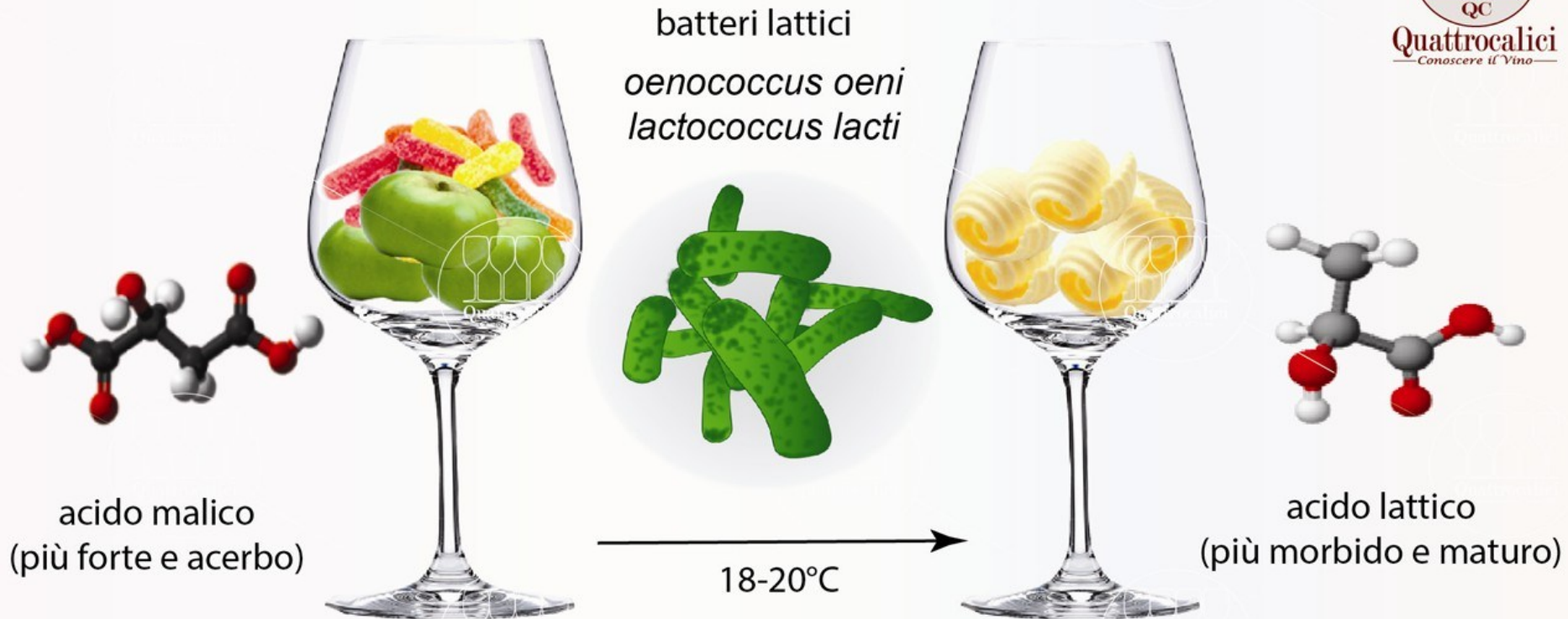
NADH consumato per ridurre acetil-P → etanolo = 1

Bilancio netto = 0

Quando il NAD<sup>+</sup> viene rigenerato la fermentazione può continuare.



# La fermentazione malolattica

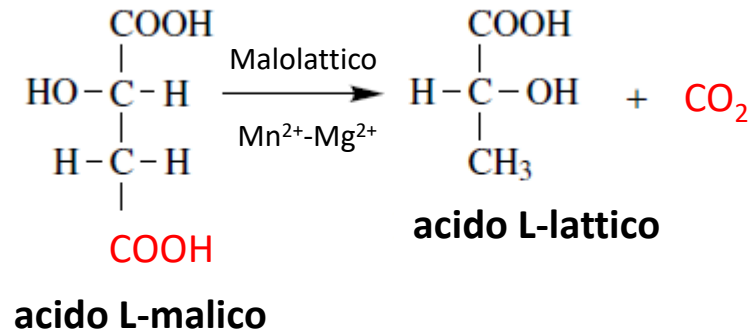


©Quattroclici 2019

non è una vera e propria fermentazione perché dal punto di vista chimico è una reazione di decarbossilazione ossia di trasformazione di un gruppo acido ( $\text{-COOH}$ ) proveniente dalla molecola di acido malico in acqua e anidride carbonica ( $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ ) ad opera dei lattobatteri *oenococcus oeni* e *lactococcus lacti*, mentre l'acido malico si trasforma in acido lattico. La formazione di  $\text{CO}_2$  può rendere il vino leggermente frizzante

# Fermentazione malolattica: formazione di acido lattico partendo dall'acido malico

I batteri eterofermentanti (*Oenococcus*) sono abbondanti durante la vinificazione



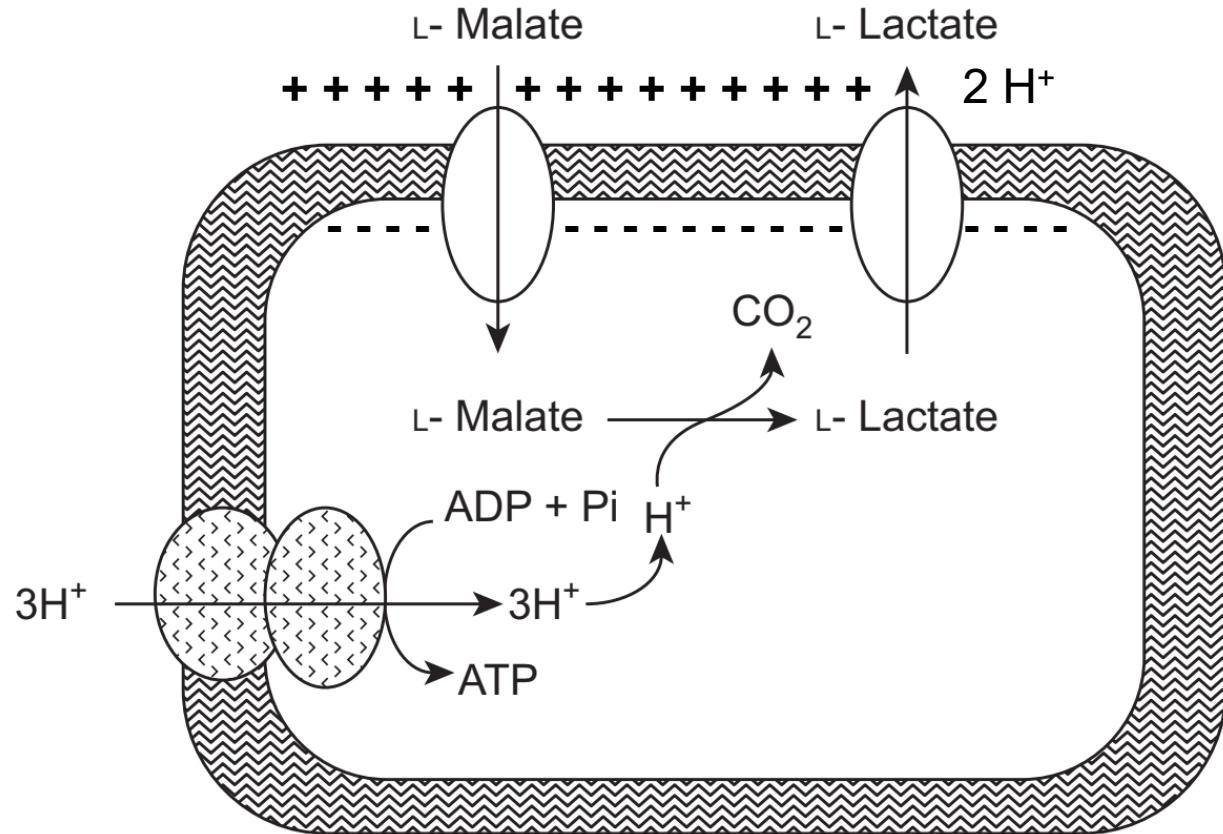
Trasformazione acido malico in acido lattico e CO<sub>2</sub> (Ribéreau Gayon *et al.*, 2018)

La reazione è catalizzata dall'enzima malolattico, un enzima NAD<sup>+</sup> dipendente che necessita di cationi bivalenti, come ioni Mn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>. L'acido succinico, l'acido citrico e l'acido L-tartarico sono degli inibitori di tipo competitivo, mentre l'acido L-lattico, prodotto della reazione, è un inibitore non competitivo.

la FML non è di per sé una reazione che genera energia bensì è il sistema enzimatico presente sulle membrane cellulari. Il processo di decarbossilazione dell'acido malico è vantaggioso per i LAB da un punto di vista energetico, in quanto si genera una forza protone-motrice che permette la sintesi di ATP a livello delle ATP sintasi presenti sulle membrane cellulari.

La decarbossilazione del malato, che comporta la fissazione di uno ione  $H^+$  nel lattato prodotto, porta a una riduzione complessiva dell'acidità del mezzo: un acido bicarbossilico (malato) viene infatti convertito in un acido monocarbossilico (lattato).

La successiva escrezione del lattato all'esterno della cellula genera una forza proton-motrice (differenza di potenziale elettrico ( $\Delta\psi$ ) e gradiente protonico ( $\Delta pH$ )) attraverso la membrana batterica. Questa forza elettrochimica viene poi utilizzata dalla cellula per produrre ATP e sostenere i processi di crescita, sopravvivenza e metabolismo.



The microbial dynamics of wine fermentation L.F. Bisson, G.A. Walker. 2015 University of California, Davis, CA, USA. Advances in Fermented Foods and Beverages. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00019-0>

**Oenococcus oeni** è il principale batterio responsabile della fermentazione malolattica, grazie alla sua elevata tolleranza a condizioni ambientali estreme rispetto ad altri batteri lattici (LAB), tra cui: pH molto acido (inferiore a 3,5), alte concentrazioni di etanolo e presenza di anidride solforosa.

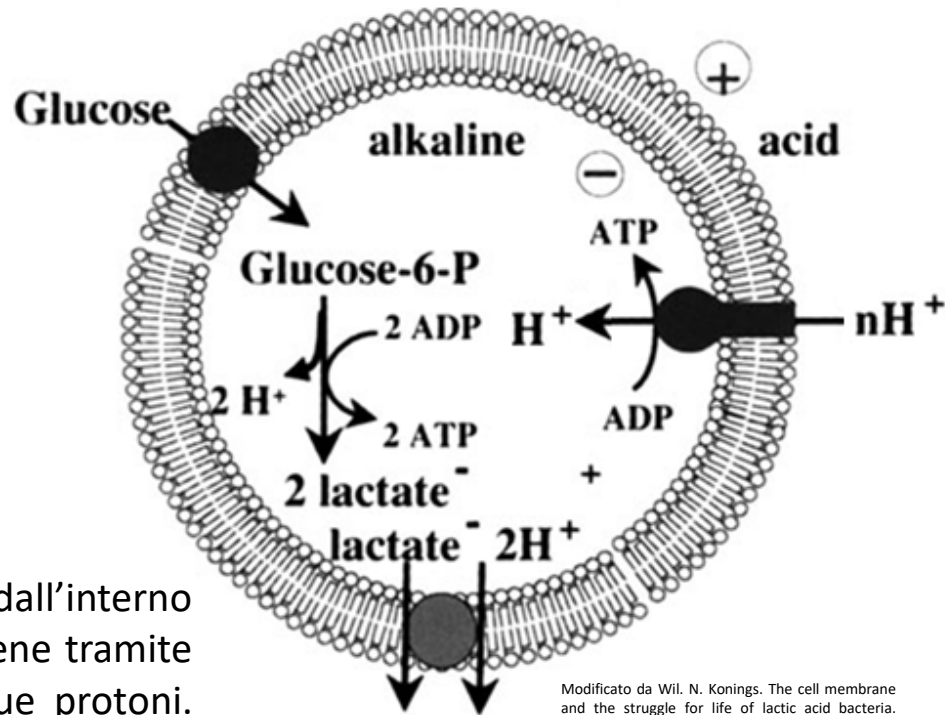
## Conservazione dell'energia metabolica mediante l'estrusione del lattato.

Durante la glicolisi, i batteri lattici (sia omofermentativi sia eterofermentativi) producono continuamente lattato, un acido debole. Nella maggior parte dei LAB, il pH intracellulare durante la glicolisi rimane superiore a 7, quindi il lattato si trova prevalentemente nella sua forma dissociata anionica (lattato<sup>-</sup>). A differenza della forma non dissociata (H-lattato), il lattato<sup>-</sup> non è permeabile alla membrana cellulare e può attraversarla solo tramite trasportatori specifici.

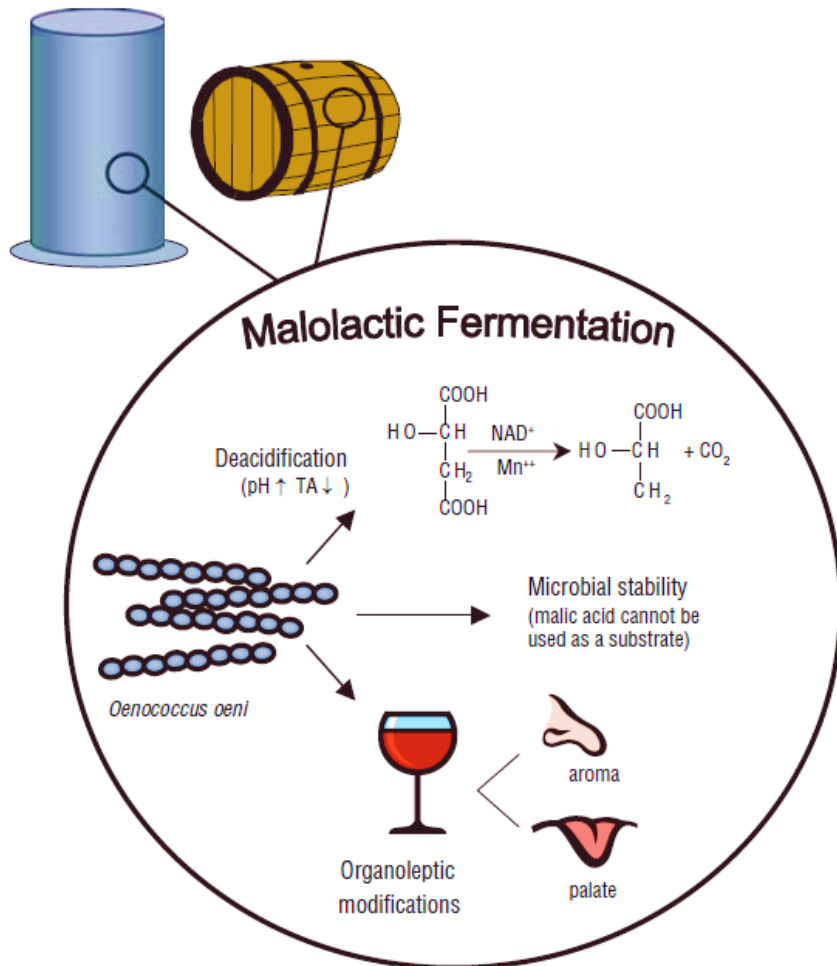
Il gradiente di concentrazione del lattato è diretto dall'interno verso l'esterno della cellula, e il suo trasporto avviene tramite un meccanismo di simporto insieme a almeno due protoni. Questo processo genera una differenza di potenziale elettrico ( $\Delta\psi$ ), negativa all'interno, e un gradiente protonico ( $\Delta\text{pH}$ ), più alcalino all'interno.

La combinazione di  $\Delta\psi$  e  $\Delta\text{pH}$  produce una forza proton-motrice (PMF) attraverso la membrana batterica, che la cellula può utilizzare per produrre energia. Questo meccanismo è spesso indicato come «riciclo energetico».

In *Lactococcus lactis*, in condizioni ottimali di crescita, ogni molecola di lattato escretata è associata al trasporto di 2 protoni, la fermentazione completa di una molecola di glucosio in lattato genera complessivamente 2 ATP.



Modificato da Wil. N. Konings. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 3-27, 2002.



I principali effetti della fermentazione malolattica (FML) nel vino sono:

- **Stabilità microbiologica:** la FML rimuove l'acido malico, che rappresenta una possibile fonte di carbonio per altri microrganismi, contribuendo così alla stabilità del vino.
- **Deacidificazione:** il processo porta a un leggero aumento del pH (circa 0,1–0,2 unità) e a una diminuzione dell'acidità titolabile (TA).
- **Modifiche sensoriali:** la FML induce variazioni nell'aroma e nel palato del vino, conferendogli maggiore complessità e morbidezza.

# **Fattori che favoriscono la fermentazione lattica**

## **Temperatura ottimale**

Ogni specie di LAB ha un intervallo ottimale di crescita (solitamente 25–37 °C per i mesofili, 42–45 °C per i termofili) che massimizza l'attività enzimatica e la produzione di lattato.

## **pH iniziale moderato**

Un pH intorno a 5–6 favorisce la crescita e la produzione di lattato

## **Disponibilità di zuccheri fermentabili**

Glucosio, lattosio, saccarosio o altri carboidrati rappresentano la fonte di carbonio principale.

## **Sostanze nutrienti**

Aminoacidi, vitamine e minerali (es.  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) necessari per attività enzimatica e replicazione cellulare.

## **Bassa concentrazione di ossigeno**

I LAB sono generalmente anaerobi o microaerofili; condizioni con poco ossigeno favoriscono la fermentazione.

# **Fattori che inibiscono la fermentazione lattica**

## **pH troppo basso**

Acidità eccessiva ( $\text{pH} < 4$ ) può inibire gli enzimi e arrestare la crescita.

## **Concentrazione troppo elevata di prodotti**

Accumulo di lattato o altri acidi può ridurre l'attività enzimatica e inibire la crescita.

## **Alti livelli di etanolo**

Tossico per la membrana e gli enzimi dei LAB.

## **Alti livelli di $\text{SO}_2$**

Interferisce con il metabolismo enzimatico e può inattivare i LAB.

## **Temperature non ottimali**

Troppo bassa rallenta la crescita; troppo alta denatura enzimi.

## **Mancanza di nutrienti**

Carenza di aminoacidi, vitamine o minerali limita la fermentazione.

## **Ossigeno eccessivo**

Alcuni LAB, soprattutto gli anaerobi obbligati, rallentano la fermentazione in presenza di ossigeno.



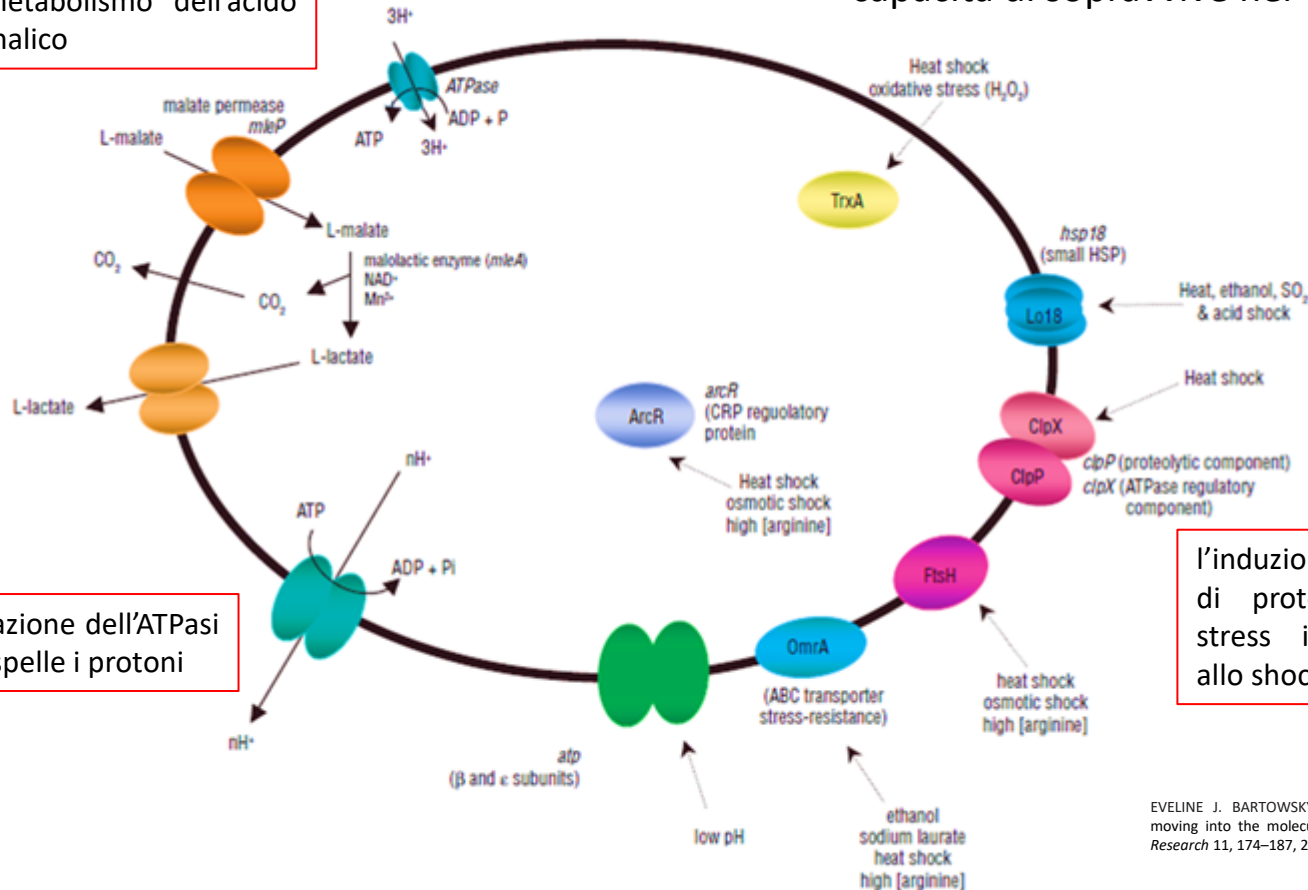
1

La forza motrice generata dal metabolismo dell'acido malico

Meccanismi che conferiscono a *Oenococcus oeni* la capacità di sopravvivere nel vino

2

l'attivazione dell'ATPasi che espelle i protoni



3

l'induzione e sintesi di proteine dello stress in risposta allo shock

EVELINE J. BARTOWSKY. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 174–187, 2005

**1) e 2) Sistemi di trasporto e riciclo energetico:** il trasporto attivo del lattato e dei protoni (sinporto lattato/H<sup>+</sup>) per mantenere la forza proton-motrice e produrre ATP. Il riciclo energetico permette di estrarre più energia da zuccheri e acidi organici, compensando condizioni sfavorevoli.

**3) Induzione e sintesi di proteine dello stress come le chaperonine (es. GroEL, DnaK):** proteggono le proteine dalla denaturazione. Mentre gli enzimi antiossidanti neutralizzano i radicali e le specie reattive prodotte dallo stress ossidativo o dall' SO<sub>2</sub>.



**Durante la FML, i batteri lattici producono composti aromatici che arricchiscono il bouquet del vino**

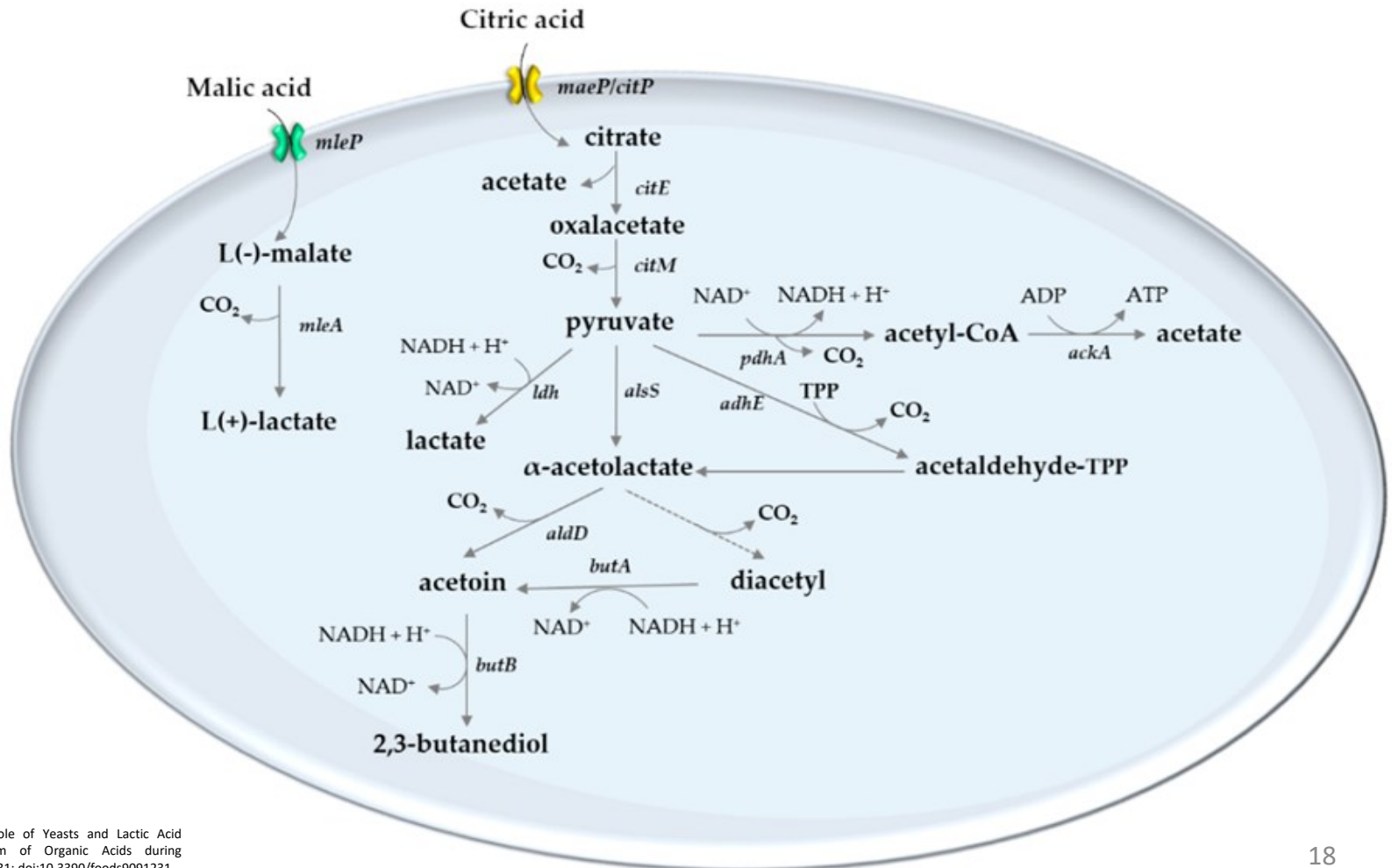
<b>Substrato</b>	<b>Prodotto</b>	<b>Aroma</b>
Acido malico	Acido-L-lattico	Morbidezza
Fruttosio	Acido-D-lattico	Leggera morbidezza
	Acido acetico	Pungente
Acido citrico	Diacetile, 2,3 butandiolo, acetoino	Note di caramello, nocciola, burro
Glicerolo	Acroleina	Amaro
Mannitolo	Esteri acetici	Leggermente dolce
Acetaldeide	Acido acetico	Pungente
Amminoacidi	Composti solfidrici	Note di zolfo, floreale, fruttato, tostato e arrostito

Biosintesi di composti aromatici durante la fermentazione malolattica (Henick-Kling, 1993; Bartowsky et al., 2002; Matthews et al., 2004).

Il **metabolismo dell'acido citrico** nei batteri lattici contribuisce alla produzione di aromi e alla regolazione del pH.

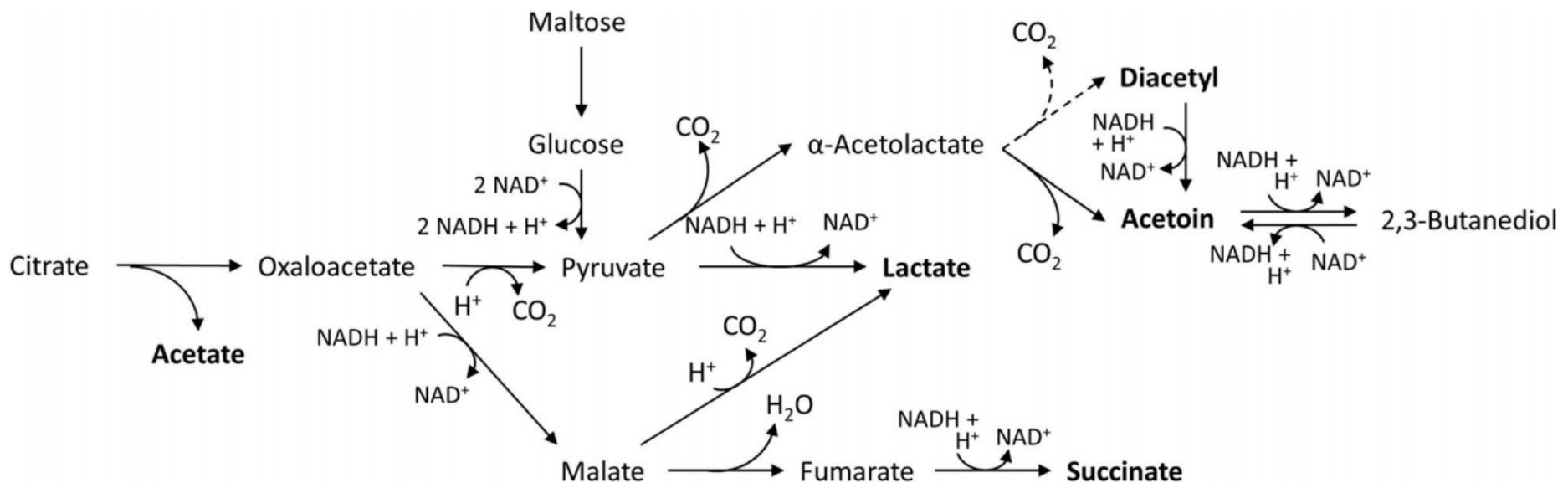
### Assorbimento dell'acido citrico:

Alcuni LAB (es. *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oenococcus oeni*) possono trasportare il citrato all'interno della cellula tramite trasportatori specifici di citrato. L'ingresso è spesso associato a scambio con un anione organico o con protoni, contribuendo al bilancio energetico.



## All'interno della cellula, l'acido citrico subisce diversi passaggi:

- Il citrato viene trasformato in ossalacetato + acetato, la reazione è catalizzata dalla citrato liasi.
- L'ossalacetato è trasformato in piruvato, catalizzata dall'ossalacetato decarbossilasi, produce  $\text{CO}_2$  e acetato.
- Si generano intermedi che possono entrare nella fermentazione (piruvato, ossalacetato, acetato) o essere ridotti ad altri composti aromatici come il diacetile (note burrose), acetoino e 2,3-butanediolo (morbidezza e complessità), acido acetico (leggero sapore acidulo) e  $\text{CO}_2$  (effervescenza o sensazione frizzante). Serve soprattutto per il bilancio redox  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ .



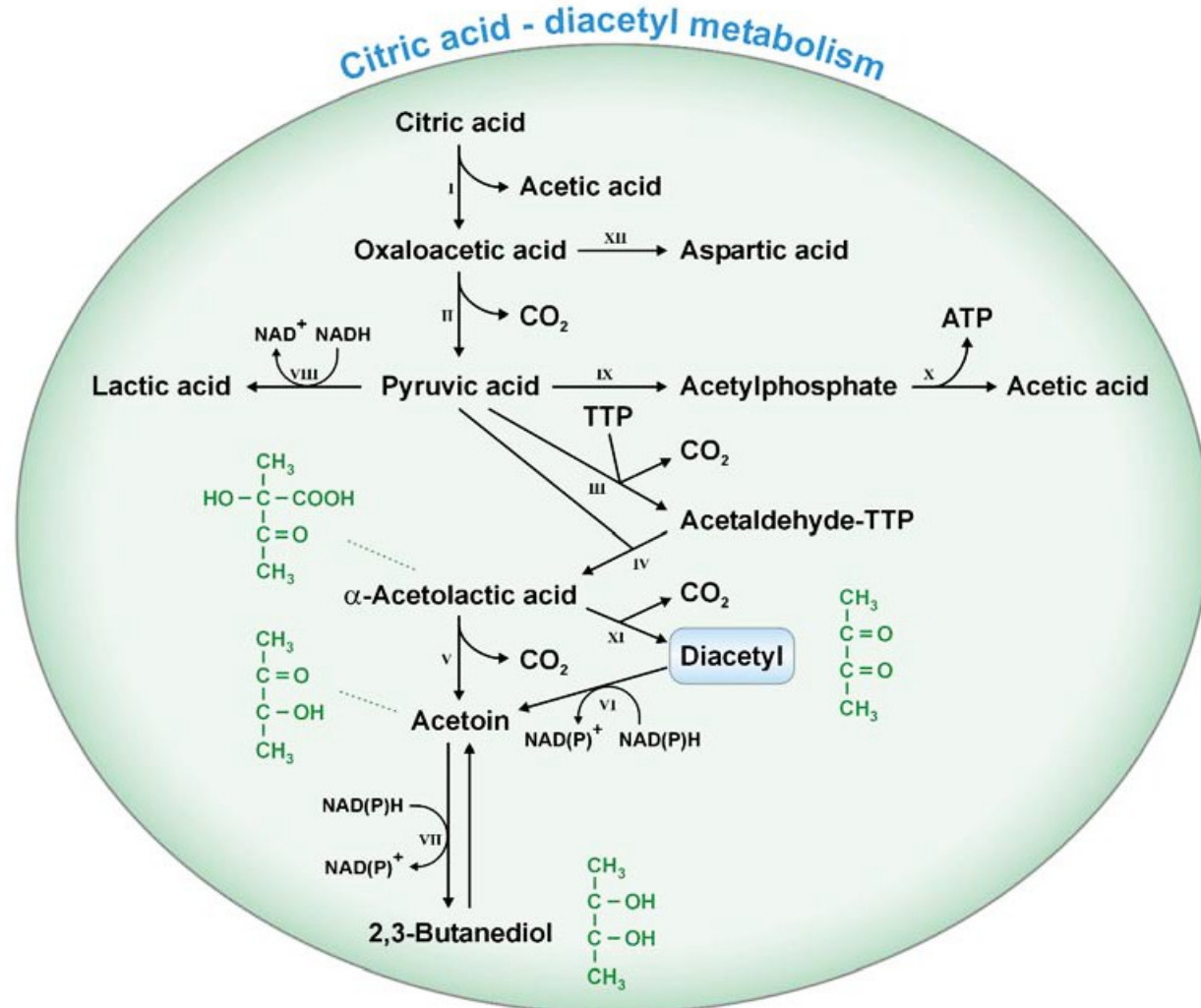
Il metabolismo del citrato è una via anaplerotica perché rigenera intermedi metabolici, inoltre, produce composti aromatici:

Il citrato viene convertito in ossalacetato → piruvato → lattato.

La metabolizzazione del citrato porta alla produzione di composti aromatici come:

**Diacetile:** aroma “burroso” tipico di latticini fermentati

**Acetoino:** aroma e sapore delicato.



- I Citrate lyase
- II Oxaloacetate decarboxylase
- III Pyruvate decarboxylase
- IV  $\alpha$ -Acetolactate synthase
- V  $\alpha$ -Acetolactate decarboxylase
- VI Diacetyl reductase

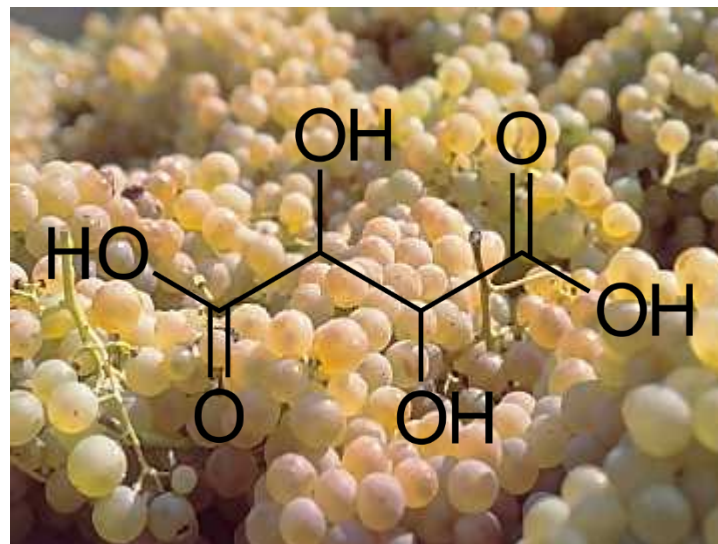
- VII Acetoin reductase
- VIII Lactate dehydrogenase
- IX Pyruvate dehydrogenase complex
- X Acetate kinase
- XI Non-enzymatic decarboxylation
- XII Aspartate aminotransferase

Swiegers, Bartowsky, Henschke & Pretorius. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 139–173, 2005

**L'acido tartarico** è un acido dicarbossilico (HOOC–CHOH–CHOH–COOH) presente in grandi quantità nell'uva (1.5–2 a 6 g/L).

I LAB normalmente non metabolizzano direttamente l'acido tartarico, ma alcune specie come *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus plantarum* hanno sistemi capaci di trasformarlo o ridurlo indirettamente.

Il metabolismo dell'acido tartarico influenza il pH e l'aromaticità del vino.



## Metabolismo dell'acido tartarico

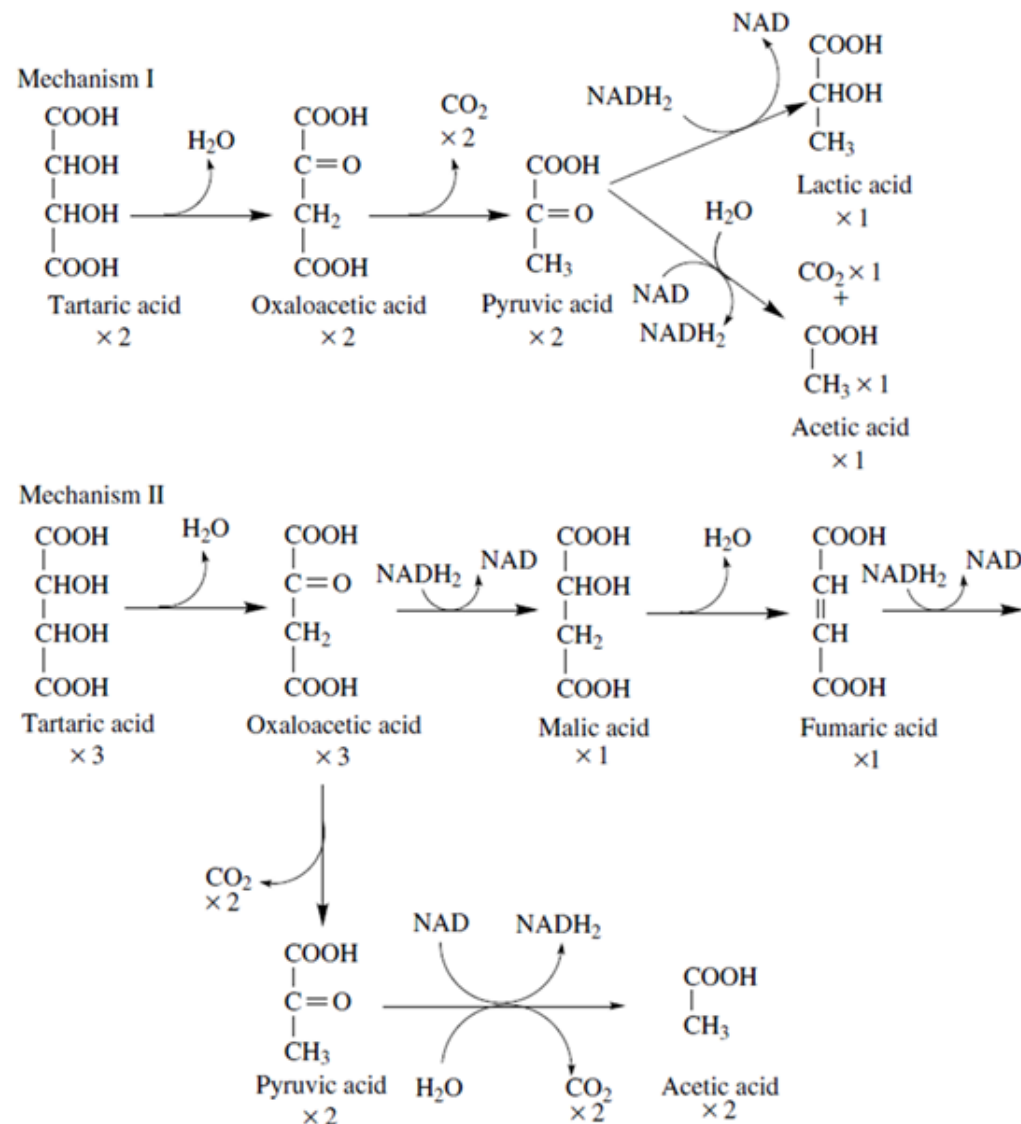
I batteri metabolizzano l'acido tartarico e lo utilizzano come fonte di carbonio.

In seguito a questa degradazione, si producono  $\text{CO}_2$ , acido lattico e acido acetico.

La formazione di questi composti causa difetti organolettici nel vino:

- $\text{CO}_2$  può provocare effervescenza indesiderata;
- Acido lattico e acido acetico modificano l'acidità e il gusto;
- L'insieme porta a un sapore alterato e poco gradevole;

In sintesi, si tratta di una alterazione batterica indesiderata, perché i batteri attaccano l'acido producendo sostanze che compromettono il profilo sensoriale e la qualità del vino.



Tartaric acid metabolism by lactic acid bacteria (Radler and Yannissis, 1972)

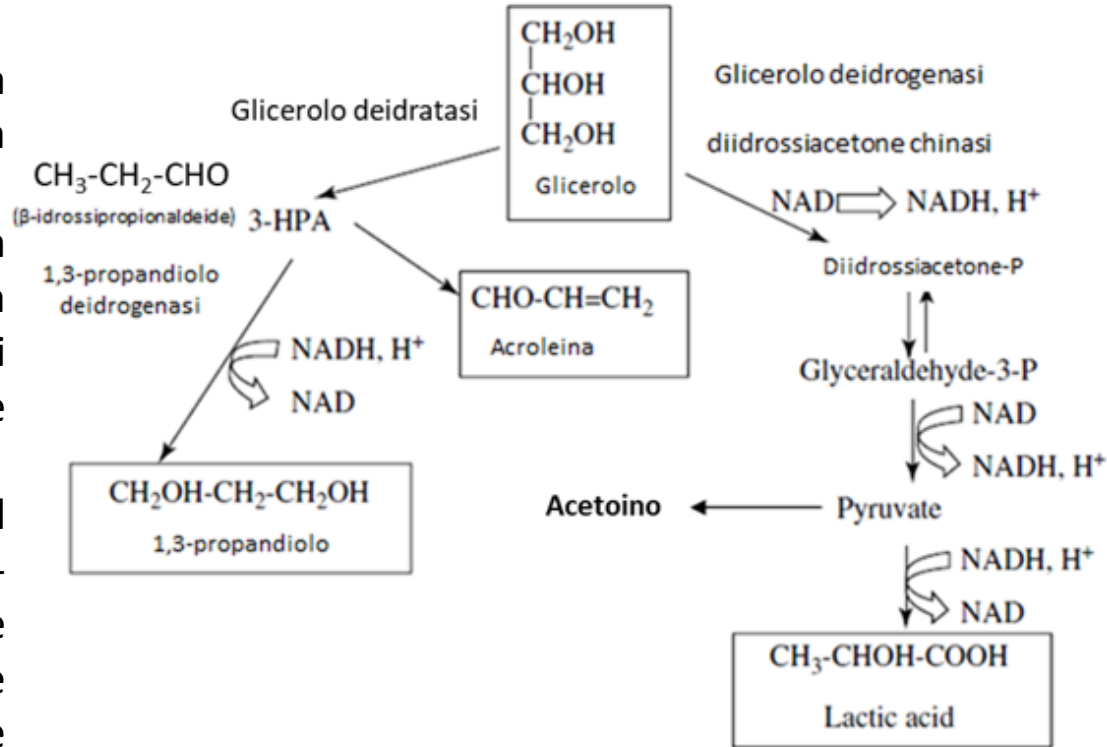


## Degradazione del glicerolo può influenzare l'aroma e la qualità del vino

Il glicerolo può essere ossidato a diidrossiacetone (DHA) tramite la glicerolo deidrogenasi.

Il DHA può poi essere fosforilato a glicerolo-3-fosfato, che entra nella glicolisi. Questo consente ai LAB di rigenerare  $\text{NAD}^+$ , utile per mantenere l'equilibrio redox.

Alcune specie batteriche ossidano il glicerolo a 3-idrossipropionaldeide (3-HPA), che può poi subire deidratazione spontanea o enzimatica per formare acroleina. L'acroleina è tossica per le cellule e può contribuire al sapore "amarognolo" nei prodotti fermentati. Per limitare la tossicità, la 3-HPA può essere ridotta a 1,3-propandiolo tramite 1,3-propandiolo deidrogenasi, consumando  $\text{NADH}$  e rigenerando  $\text{NAD}^+$ . Questo processo evita l'accumulo intracellulare di acroleina.



Glycerol degradation pathways by lactic acid bacteria (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975)

**Bilancio redox:** Il glicerolo è un accettore di elettroni, la sua degradazione permette ai LAB di rigenerare  $\text{NAD}^+$  e continuare la fermentazione dei carboidrati.

**Produzione di aromi:** Alcuni derivati del glicerolo (diacetile, acetoino, 1,3-propandiolo) contribuiscono al profilo organolettico del vino.

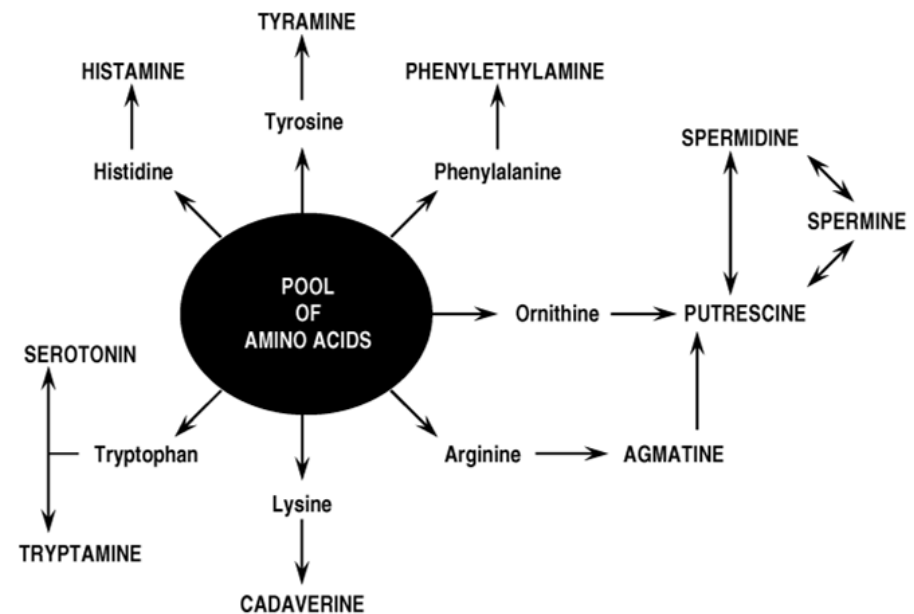
Le **ammine biogene** sono composti azotati **biologicamente attivi**, derivati principalmente dalla decarbossilazione degli amminoacidi precursori, la reazione è catalizzata da enzimi amminoacido-decarbossilasi di origine endogena e microbica.

Ci sono tre possibili origini di ammine biogene nei vini:

- possono essere presenti nel mosto
- possono essere formati dai lieviti durante la fermentazione alcolica
- possono derivare dall'azione dei batteri coinvolti nella fermentazione malolattica

- **Istamina** → dall'**istidina**
- **Tiramina** → dalla **tirosina**
- **Putrescina** → dall'**ornitina o arginina**
- **Cadaverina** → dalla **lisina**
- **Feniletilamina** → dalla **fenilalanina**

La quantità di ammine biogene varia nei vini a seconda di diversi fattori come la zona di produzione, il tipo di vinificazione, il pH, la temperatura di fermentazione.



Precursor amino acids of biogenic amines.

Il contenuto totale di ammine nel vino varia da livelli di tracce a livelli di 130 mg/L.

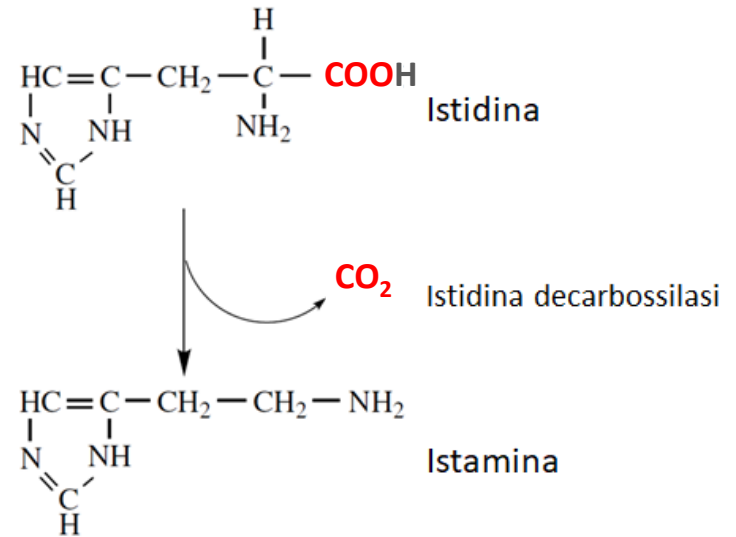


## La formazione di ammine biogene

La decarbossilazione implica la rimozione del gruppo  $\alpha$ -carbossilico dall'aminoacido per ottenere l'amina corrispondente. L'enzima è una amminoacido decarbossilasi specifica.

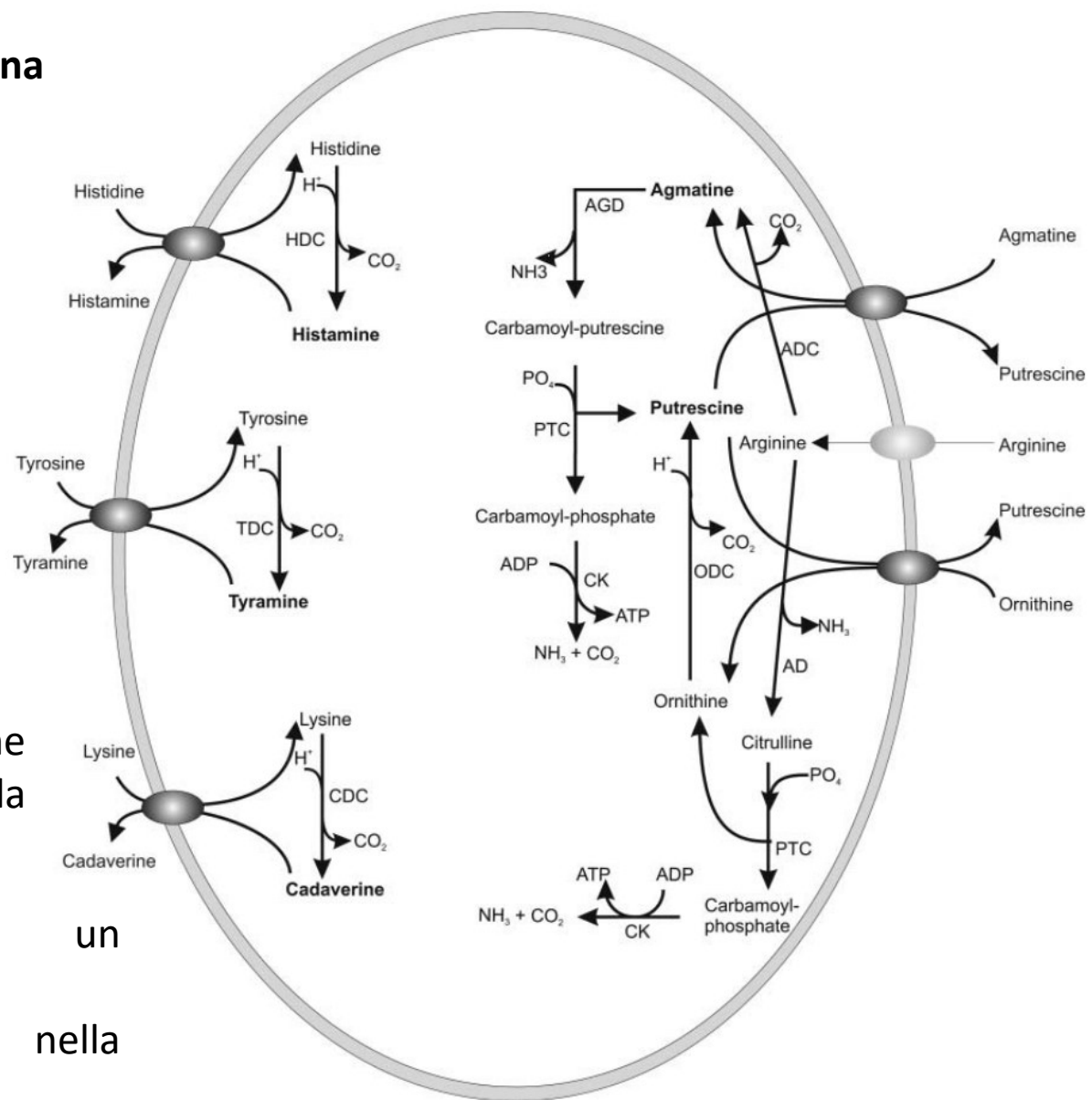
Vengono prodotti quando le cellule si trovano in condizione di stress nutrizionale e lo sviluppo microbico viene limitato da condizioni ostili, come l'assenza di fonti azotate, di carboidrati fermentabili e la presenza di alte concentrazioni di acido malico.

Le ammine biogene, spesso l'istamina, sono più abbondanti nei vini dopo la fermentazione malolattica. Ciò spiega perché i vini rossi sono più ricchi in ammine rispetto ai vini bianchi.



**Fig. 5.9.** Histidine decarboxylation reaction

**amminoacido/ammina biogena**



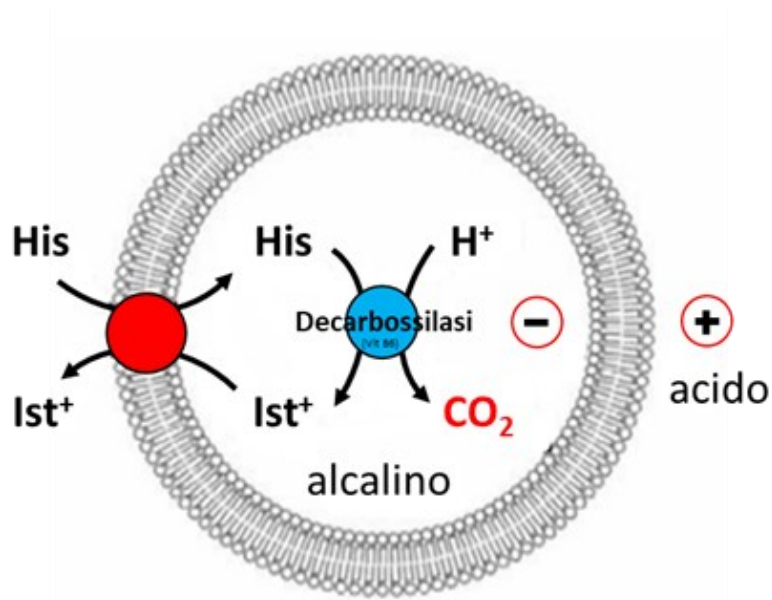
Una volta prodotte, le ammine devono essere espulse dalla cellula.

Questo avviene tramite un trasportatore antiporto:

- Ingresso di un aminoacido nella cellula
- Uscita contemporanea dell'ammina biogene prodotta

Daniel M. Linares et al., Biogenic Amines in Dairy Products. 2011, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51:7, 691-703 . <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.582813>

## Sistema antiporto amminoacido/ammine biogene e generazione della forza proton- motrice



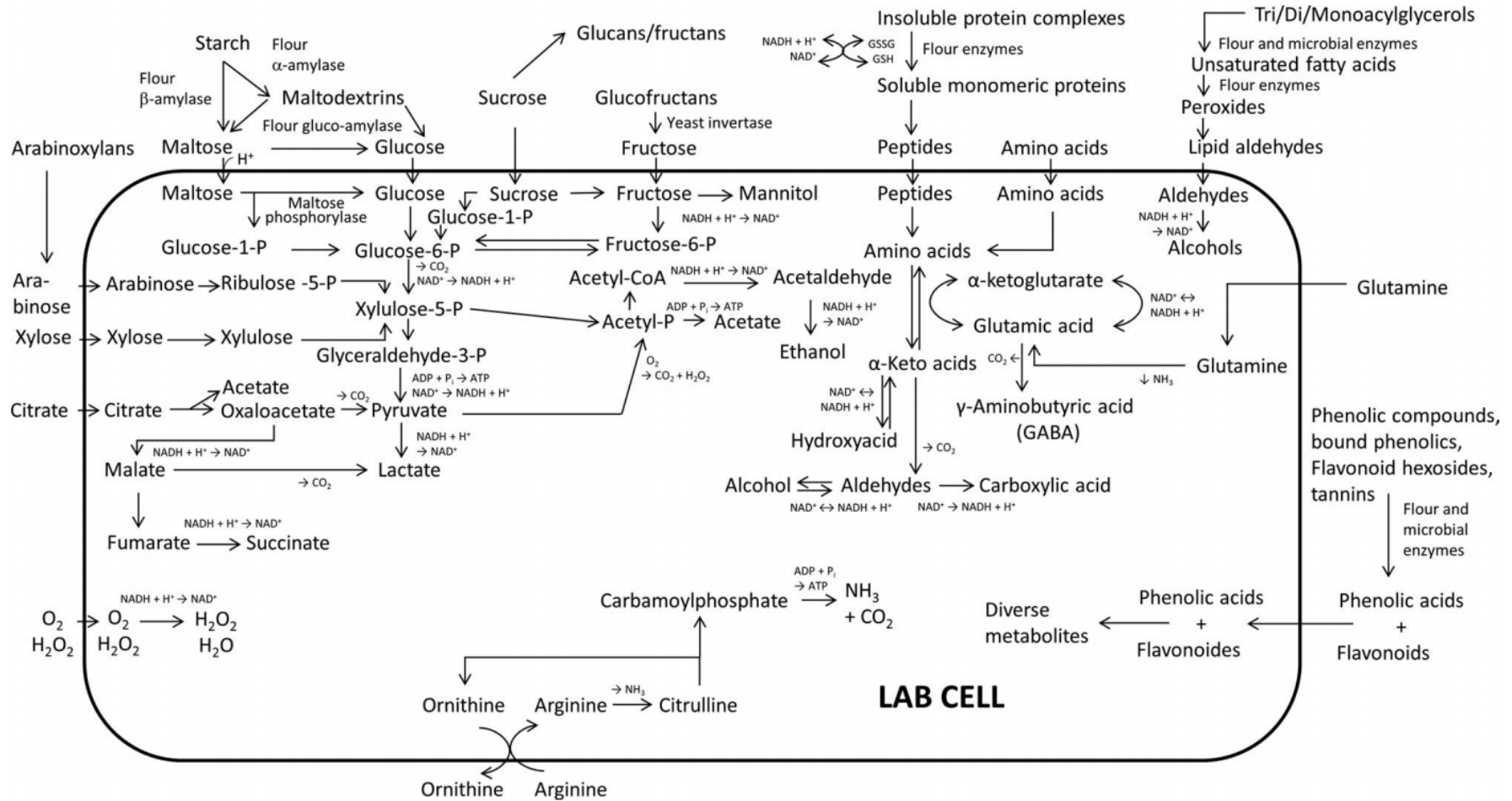
L'amminoacido entra nella cellula, spesso legato a un protone (H<sup>+</sup>). Nella decarbossilazione intracellulare, l'amminoacido viene trasformato in ammine biogene e CO<sub>2</sub>. Questa reazione consuma H<sup>+</sup> all'interno, contribuendo a rendere meno acido il citoplasma. L'ammina prodotta viene espulsa tramite un trasportatore antiporto, dove l'amminoacido entra e l'ammine biogene esce.

Questo meccanismo ha effetto sul gradiente protonico, anche se l'ammina non trasporta direttamente H<sup>+</sup>, il consumo di H<sup>+</sup> e il movimento degli ioni rendono l'interno della cellula più alcalino. Questo crea un gradiente di protoni attraverso la membrana: più H<sup>+</sup> all'esterno, interno più negativo e alcalino.

Il gradiente (forza proton-motrice) può essere usato per:

- Sintesi di ATP tramite ATP sintasi
- Trasporto attivo di nutrienti
- Regolazione del pH intracellulare

# Panoramica del metabolismo dei LAB eterofermentativi



Luc De Vuyst, Andrea Comasio & Simon Van Kerrebroeck (2021): Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: [10.1080/10408398.2021.1976100](https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1976100)