



Metabolismo azotato nei lieviti

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

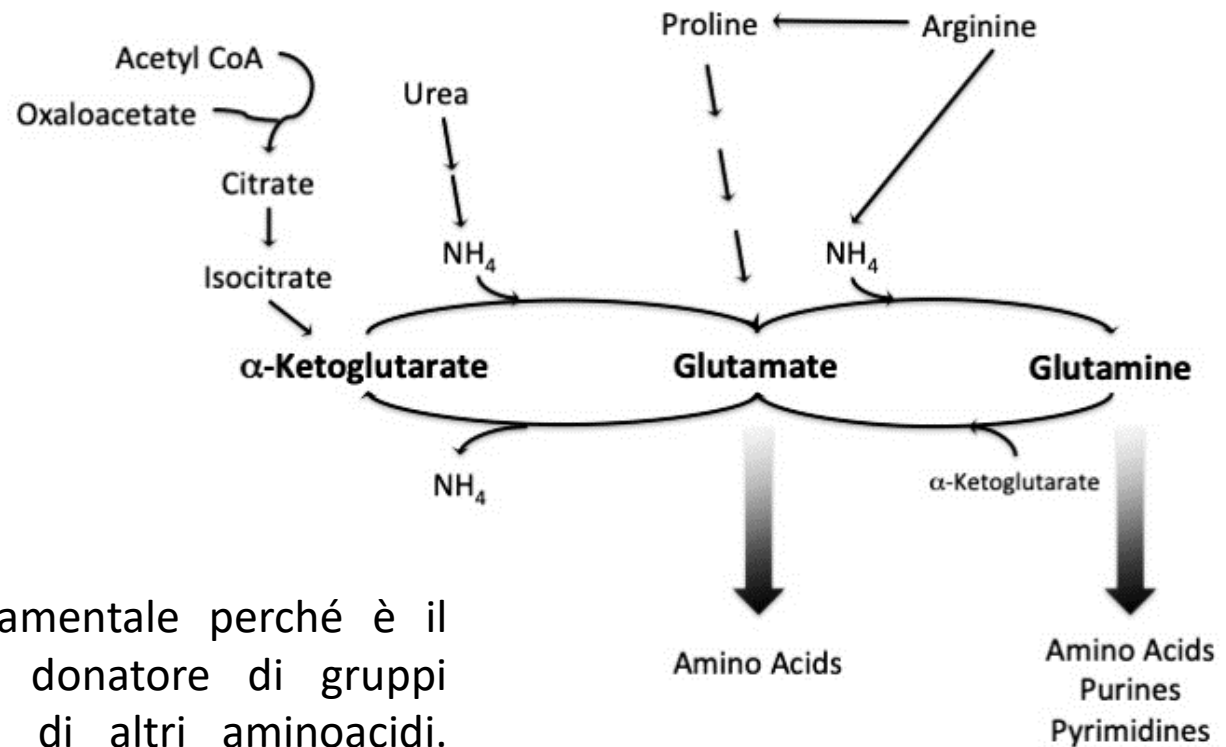
- Aminoacidi formano le proteine
- Nucleotidi componenti di DNA e RNA
- Coenzimi e altre molecole cellulari formano il NAD, FAD, glutatione, ecc.
- Alcuni lipidi azotati come la fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina, sfingolipidi.

Il lievito non può utilizzare qualunque fonte di azoto, quello assimilabile è costituito solo da ammonio (NH_4^+), aminoacidi liberi, nitrati, urea, peptidi (richiede trasporto attivo).

L'azoto assimilato è importante per:

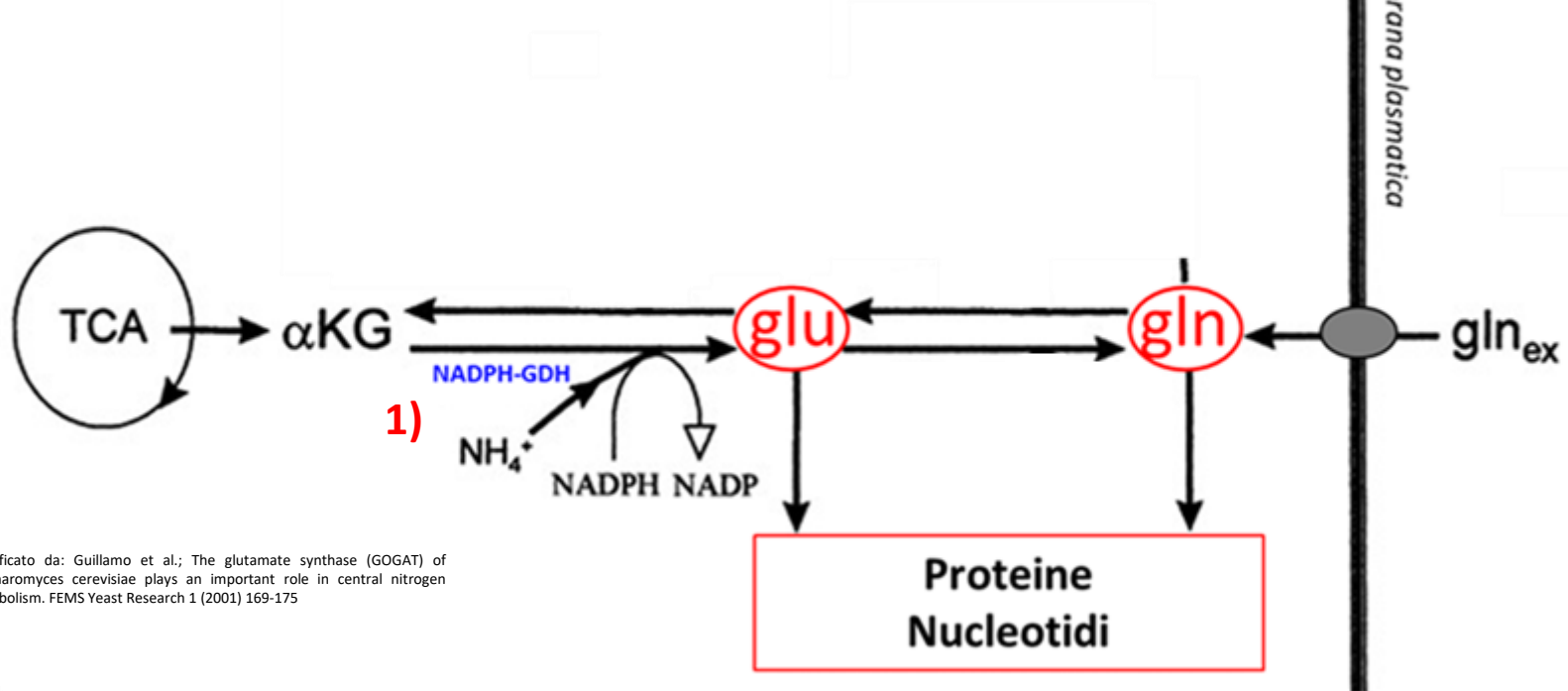
- La moltiplicazione cellulare dove una parte dell'azoto viene incorporato nelle proteine strutturali che servono per le nuove cellule (crescita rapida o conservazione delle risorse). Nella fermentazione alcolica, l'azoto è necessario per la sintesi delle proteine che trasportano gli zuccheri verso l'interno della cellula per essere trasformati in etanolo. L'azoto determina la crescita dei lieviti, quanti metaboliti azotati producono e la gestione delle riserve lipidiche e steroliche, la cellula cresce rapidamente e richiede nuove membrane, gli esteri sterolici e trigliceridi di riserva vengono utilizzati perché la cellula preferisce usare i propri lipidi per la sintesi delle membrane. È un fattore chiave sia per la vitalità cellulare sia per la qualità della fermentazione.
- La produzione di composti aromatici, molti derivano dal metabolismo degli aminoacidi, la quantità di queste sostanze prodotte durante la fermentazione dipende dalla concentrazione iniziale di azoto assimilabile del mosto.

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



Il glutammato è fondamentale perché è il principale aminoacido donatore di gruppi amminici nella sintesi di altri aminoacidi. Partecipa al metabolismo dell'azoto, incorporando l'ammonio (NH_4^+) in molecole organiche. Funziona inoltre come precursore per la glutamina, la prolina, l'arginina e altri composti azotati.

Il glutammato e la glutammina giocano un ruolo centrale nel metabolismo azotato del lievito

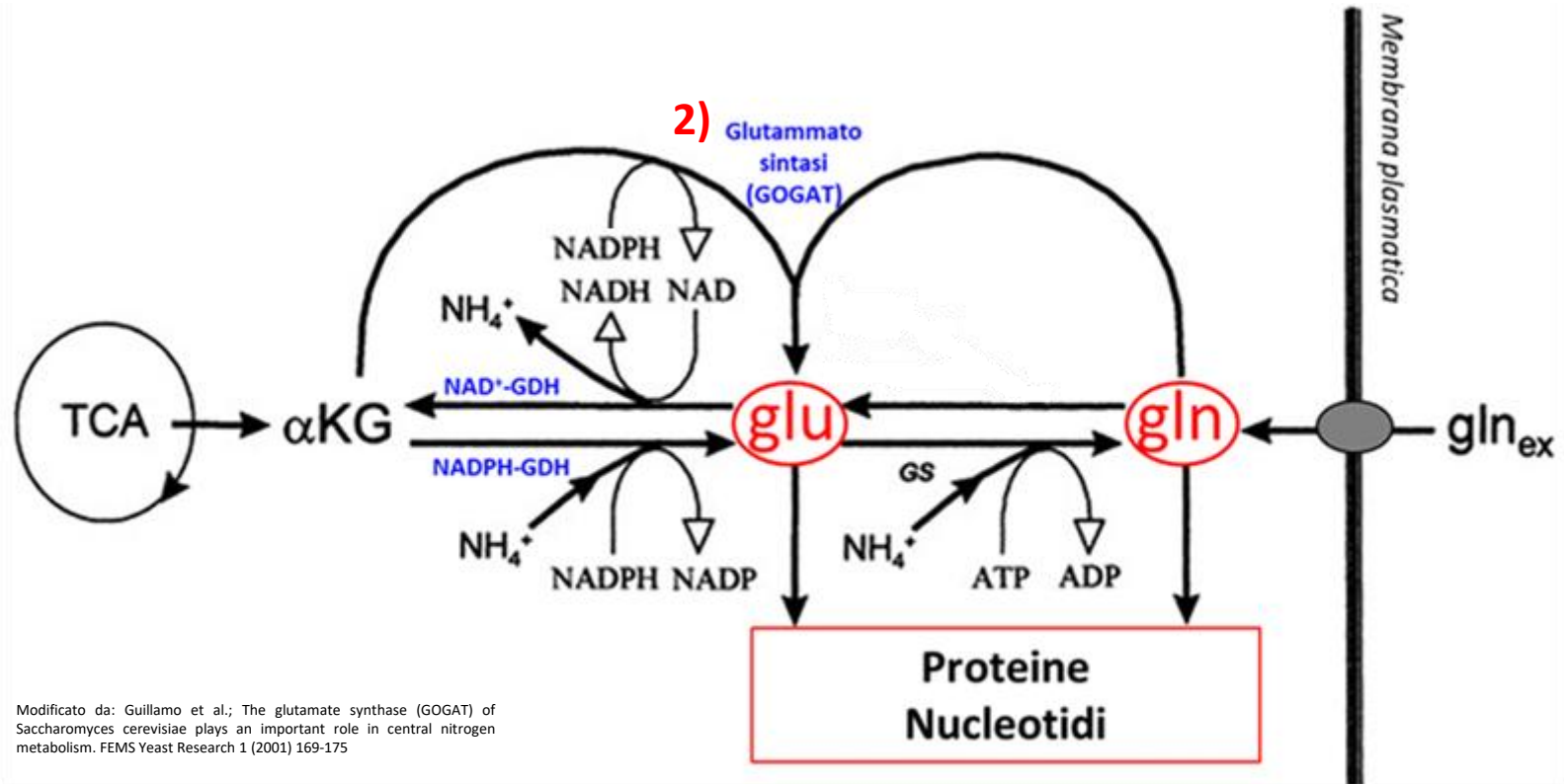


Il lievito usa due vie principali per sintetizzare glutammato.

1) La via della Glutammato Deidrogenasi (GDH1/GDH3, nel citoplasma/mitocondrio) è la via principale quando c'è abbondanza di NH_4^+ :



Esistono due enzimi, uno citoplasmatico GDH1 e uno mitocondriale GDH3, entrambi sono enzimi NADPH dipendenti.

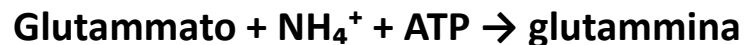


2) La via GS–GOGAT (via della glutamina-sintetasi/glutammato sintasi) è un via che richiede due enzimi ed è presente quando l’azoto è meno abbondante.

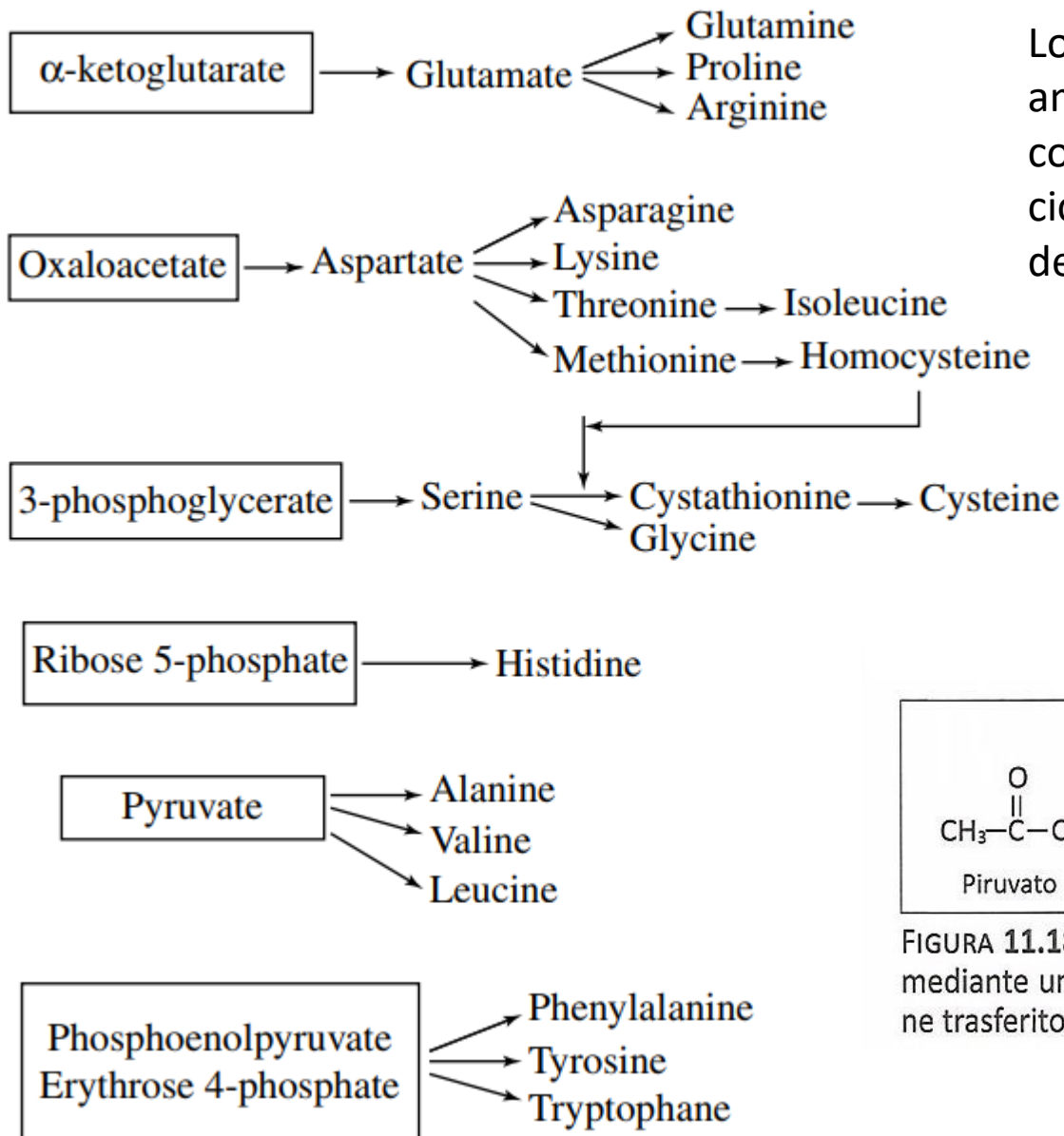
La Glutammato Sintasi (GOGAT, Glutamate Oxoglutarate Glutamate Aminotransferase) catalizza:



La Glutamina Sintetasi (GS) catalizza la seguente reazione:



Queste reazioni richiedono ATP e NADPH e mantengono l’equilibrio tra glutammato e glutamina.



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

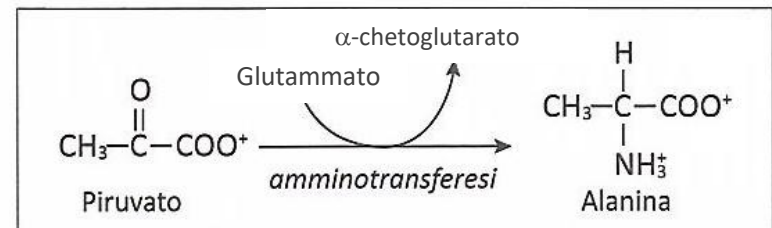


FIGURA 11.18. Sintesi dell'amminoacido alanina (ALA) mediante una reazione di transaminazione in cui viene trasferito il gruppo amminico all'acido piruvico.

Biosintesi degli amminoacidi

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

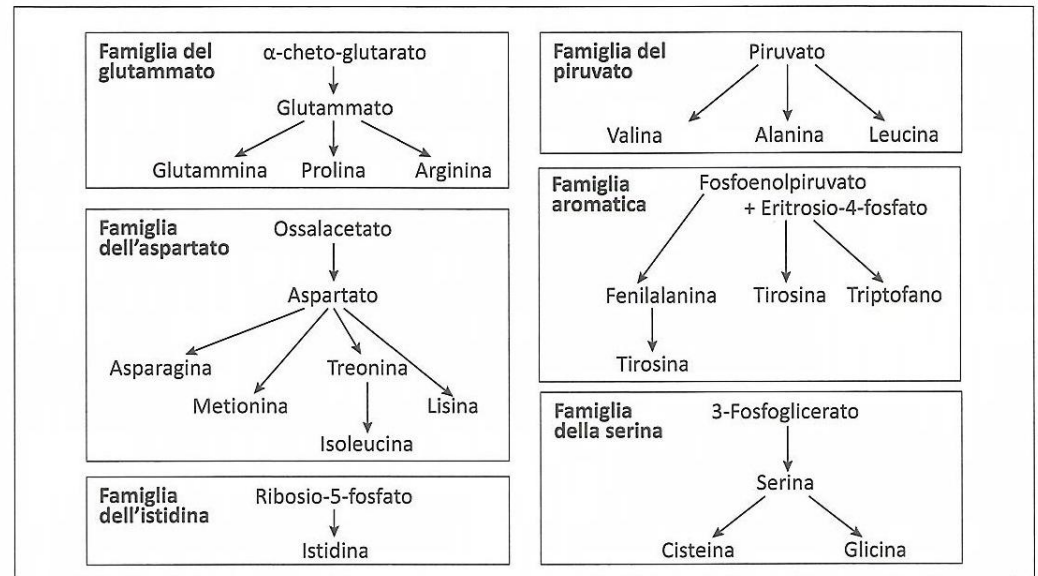


FIGURA 11.17. Le famiglie di amminoacidi.

Richiamando il ruolo anfibolico del ciclo dell'acido citrico, è importante sottolineare come questo, insieme alle reazioni contigue che coinvolgono l'acetil-CoA e il piruvato, sia strettamente correlato non solo alla biosintesi degli amminoacidi, ma anche al loro catabolismo.

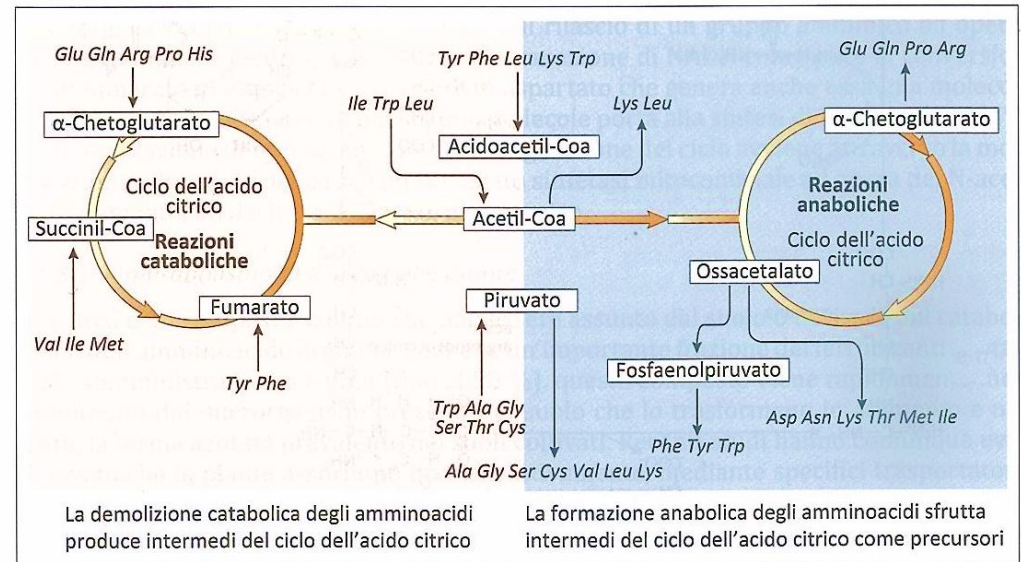


FIGURA 11.19. Relazioni fra metabolismo amminoacidico e ciclo dell'acido citrico.

Lo ione NH_4^+ entra nella cellula attraverso **trasportatori specifici** chiamati **Mep**

Mep1: Alta capacità di trasporto

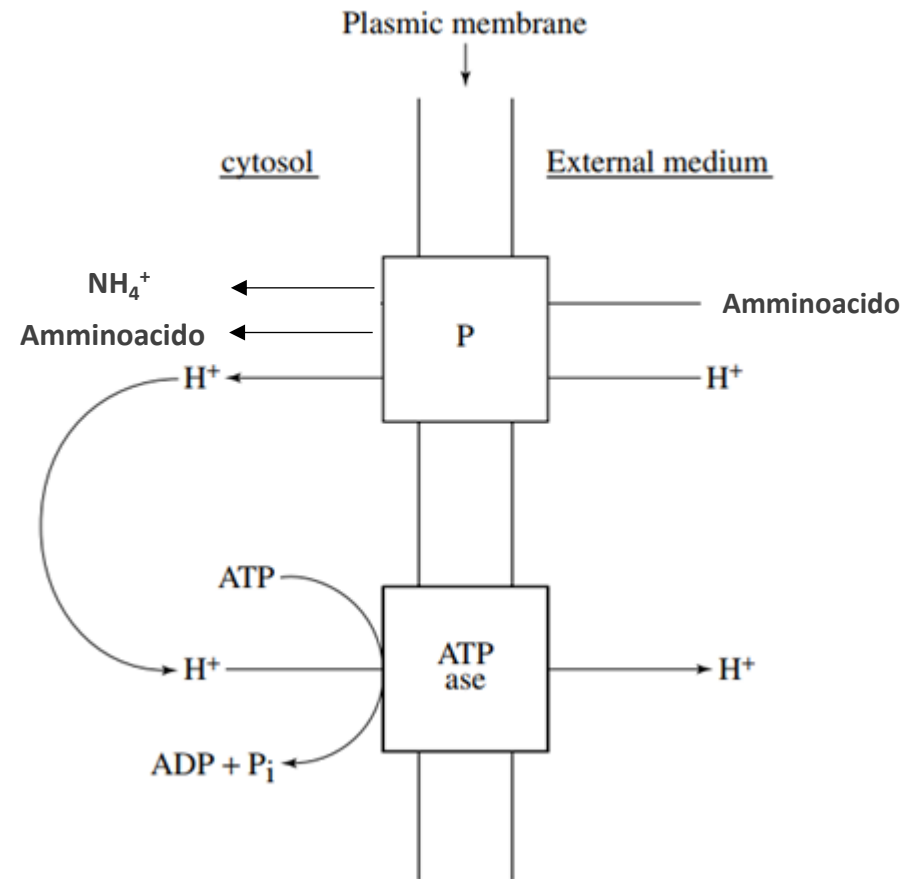
Mep2: Sensore e trasportatore ad alta affinità

Mep3: Alta affinità, bassa capacità di trasporto

Gli aminoacidi seguono un trasporto attivo secondario (simporto o antiporto).

Il funzionamento delle permeasi accoppia al trasporto di una molecola di aminoacido o di ione NH_4^+ uno ione H^+ nel senso del gradiente di concentrazione, l'amminoacido ed il H^+ si legano alla stessa proteina di trasporto ed entrano simultaneamente nella cellula.

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



Gli aminoacidi non passano liberamente attraverso la membrana plasmatica, perché sono molecole polari.

Nei lieviti, il trasporto avviene tramite trasportatori specifici di membrana (permeasi), che possono avere:

Alta affinità sono attivi quando l'aminoacido è scarso;

Bassa affinità sono attivi quando l'aminoacido è abbondante.

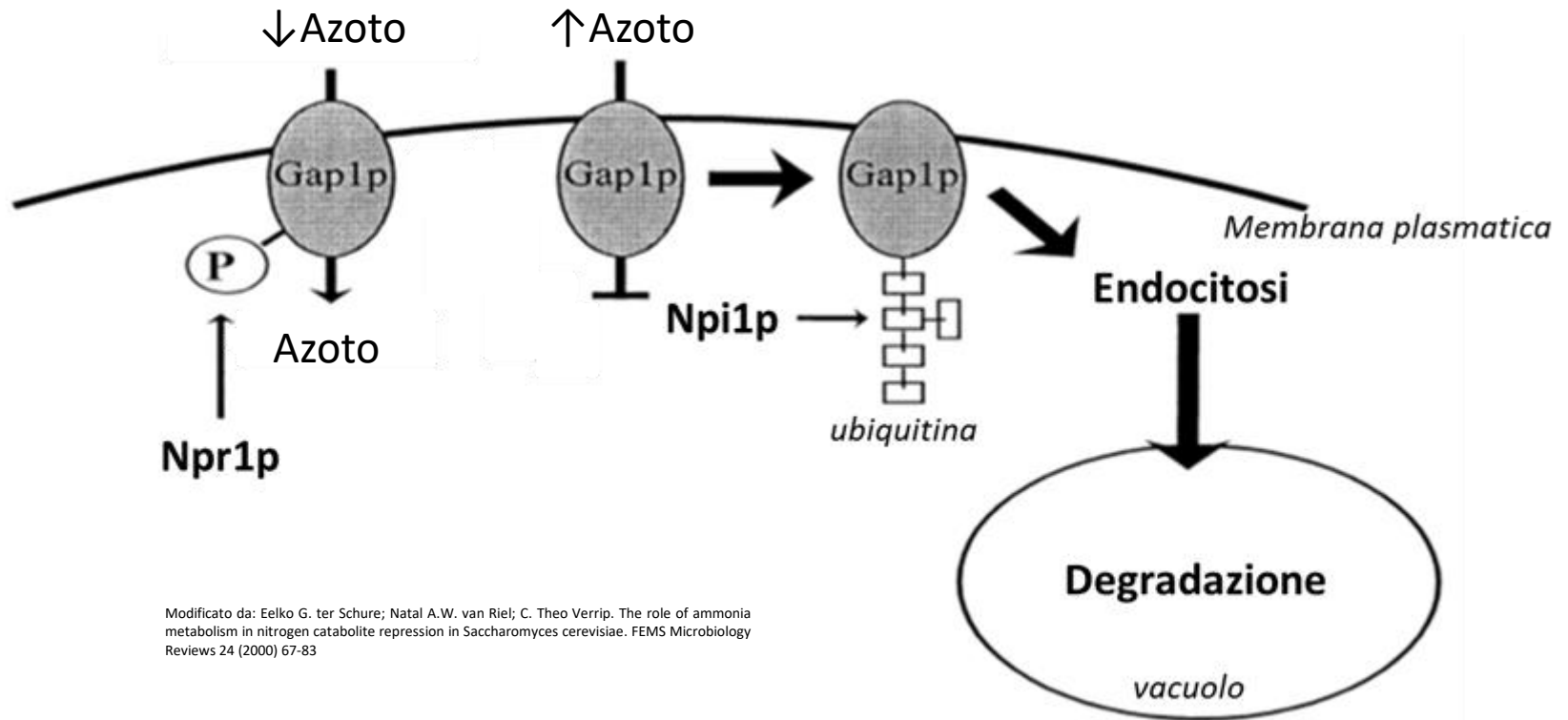
I trasportatori possono essere specifici per un aminoacido o generali (trasportano più aminoacidi).

Proteina trasportatrice	Aminoacido trasportato	Regolazione
GAP1 (permeasi generale)	Molti aminoacidi, incluso glutammato e glutamina	Attivo in scarsità di azoto
AGP1 (permeasi ad alta affinità)	Glutamina e asparagina	Attivo in condizioni di aminoacidi bassi
GNP1 (permeasi ad alta affinità)	Glutamina e altri aminoacidi neutri	Indotta da scarso azoto
CAN1 (specifico)	Arginina	Regolato da repressori di aminoacidi
LYP1 (specifico)	Lisina	Regolato da disponibilità extracellulare

Repressione catabolica dell'azoto (NCR)

- È un meccanismo regolatorio mediante il quale la cellula reprime l'espressione dei trasportatori e degli enzimi coinvolti nell'utilizzo di fonti di azoto alternative (come aminoacidi, peptidi e urea) quando è presente una fonte di azoto abbondante e facilmente assimilabile, come l'ammonio (NH_4^+) o la glutamina.
- Questo sistema rappresenta il principale controllo nell'assorbimento di ammonio e aminoacidi.
- In condizioni di carenza di azoto, la repressione si allenta, consentendo l'attivazione dei trasportatori ad alta affinità (ad esempio Mep2, AGP1, GNP1) e delle vie metaboliche per l'utilizzo di fonti alternative.
- Quando ammonio o glutamina sono abbondanti, trasportatori generali come GAP1 vengono inibiti o degradati per evitare un consumo energetico inutile.

Regolazione post-traduzionale della permeasi Gap1p in funzione dell'azoto.



Quando l'**azoto è scarso** la proteina chinasi (Npr1p) è attiva, fosforila il trasportatore di azoto GAP1 e previene la ubiquitinazione e la degradazione della GAP1 nel vacuolo. La fosforilazione di Npr1p è protettiva perché impedisce il riconoscimento di GAP1 da parte dell'ubiquitina.

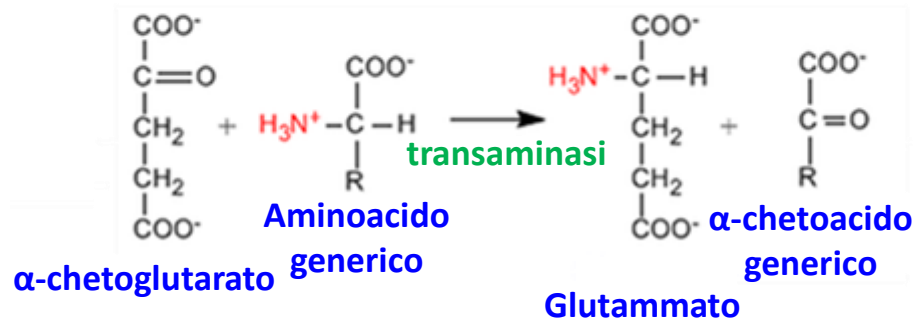
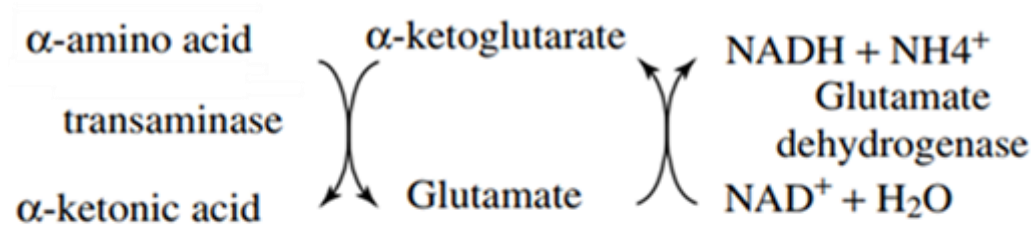
Quando l'**azoto è abbondante**, la cellula riduce l'espressione della GAP1 sulla membrana. La proteina Npi1P veicola la Gap1p ubiquitinata al vacuolo per degradazione.

Catabolismo degli aminoacidi nei lieviti

Il catabolismo degli aminoacidi serve a **riciclare azoto e carbonio**. Il lievito attiva queste vie soprattutto quando:

- l'azoto è scarso
- la fonte principale di carbonio (es. glucosio) è limitata
- deve riequilibrare riserve metaboliche
- deve produrre composti aromatici (durante la fermentazione)

Vie di degradazione del glutammato nel lievito

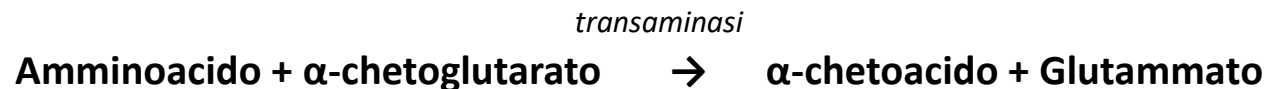


La via della Glutammato deidrogenasi (GDH2) è la via principale, specialmente quando l'azoto scarseggia. È un enzima NAD⁺ dipendente.

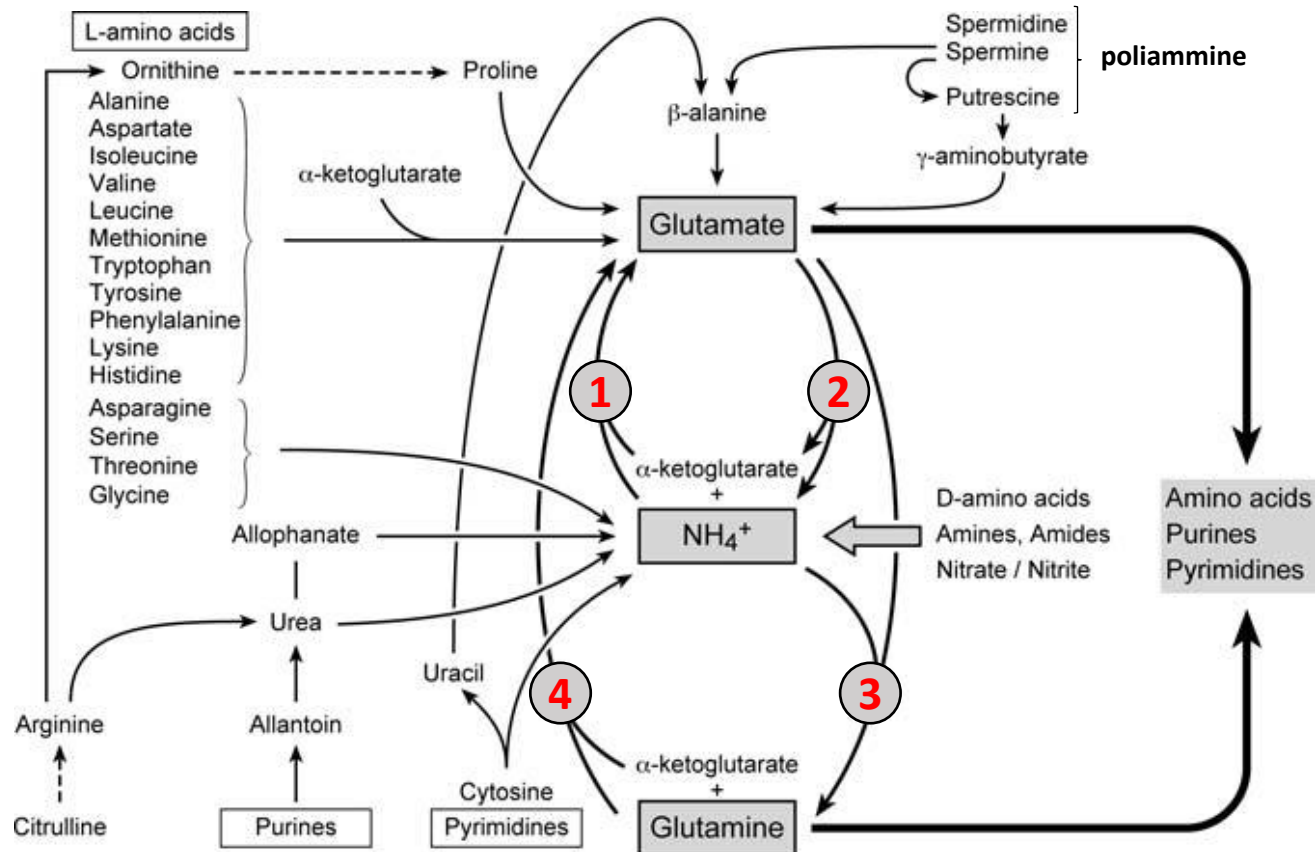


È una via importante perché libera NH₄⁺ che può essere riutilizzati per sintetizzare altri amminoacidi.

Nella reazione di transaminazione, il glutammato è il donatore del gruppo amminico ad altri α-chetoacidi:



La maggior parte dei percorsi di degradazione degli amminoacidi converte l'azoto in glutammato o ammoniaca, poiché queste molecole rappresentano forme centrali per il riciclo dell'azoto nella cellula.



- 1) Glutammato deidrogenasi NADP-dipendente (GDH1/GDH3)
- 2) Glutammato deidrogenasi NAD^+ -dipendente (GDH2)
- 3) Glutamina sintetasi (GS)
- 4) Glutammato sintasi (GOGAT)

Nel *Saccharomyces cerevisiae*, la degradazione degli aminoacidi avviene in diversi compartimenti cellulari, a seconda del tipo di aminoacido e della via metabolica coinvolta.

Mitocondrio: avviene la degradazione degli aminoacidi ramificati (leucina, isoleucina, valina) e di altri aminoacidi come glutammato, glutamina, prolina, arginina.

Gli aminoacidi vengono convertiti in α -chetoacidi, entrano nel ciclo dell'acido citrico o in altre vie energetiche. Alcuni passaggi richiedono $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ come cofattori ossidativi.

Citoplasma: alcune transaminazioni iniziali avvengono nel citoplasma, come la reazione generica: amminoacido + α -chetoglutarato \rightarrow α -chetoacido + glutammato

Vacuolo: è coinvolto nella degradazione proteica generale e nel riciclo degli aminoacidi. Le proteine danneggiate vengono idrolizzate nel vacuolo e gli aminoacidi liberi possono essere riutilizzati.