



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.

I batteri lattici utilizzano come accettore di elettroni, per ossidare il NADH, il piruvato formato durante la glicolisi, questa è la definizione della fermentazione lattica.

Globalmente, attraverso la via omolattica, i batteri trasformano una molecola di glucosio in due molecole di lattato.

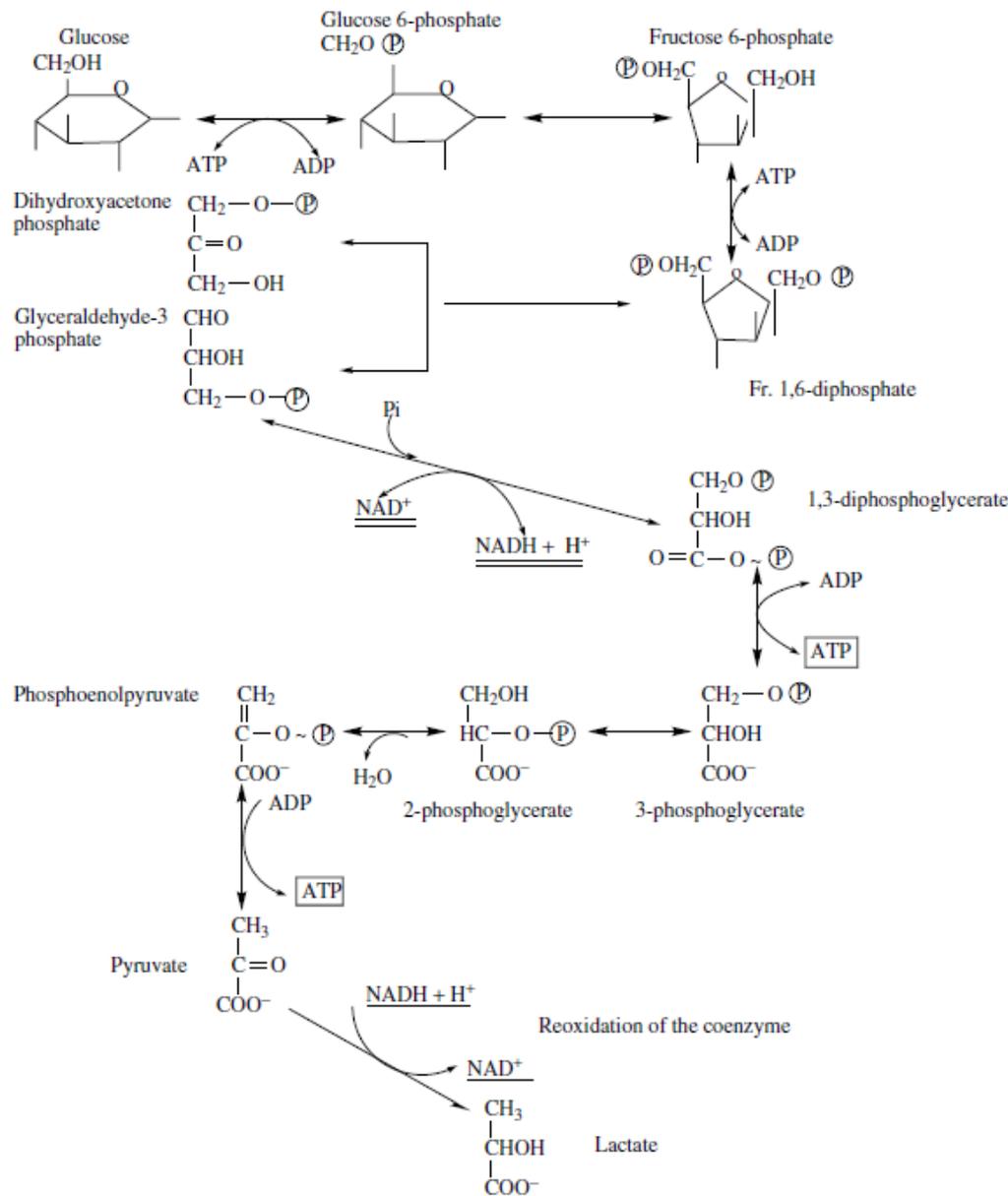


Fig. 5.1. Metabolic pathway of glucose fermentation by homolactic bacteria

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 CO_2 , l'acetato e l'etanolo. Si tratta della via dei pentosi fosfati.

Il glucosio dopo essere stato trasportato nella cellula, e fosforilato per azione della glucochinasi a glucosio 6-P, la cui destinazione è completamente diversa da quella della via omofermentativa.

Intervengono due reazioni di ossidazione successive; la prima porta al gluconato 6-P; mentre la seconda, accompagnata da una decarbossilazione, forma ribulosio 5-P.

In ciascuna delle due reazioni, viene ridotta una molecola del coenzima NAD^+ o NADP^+ .

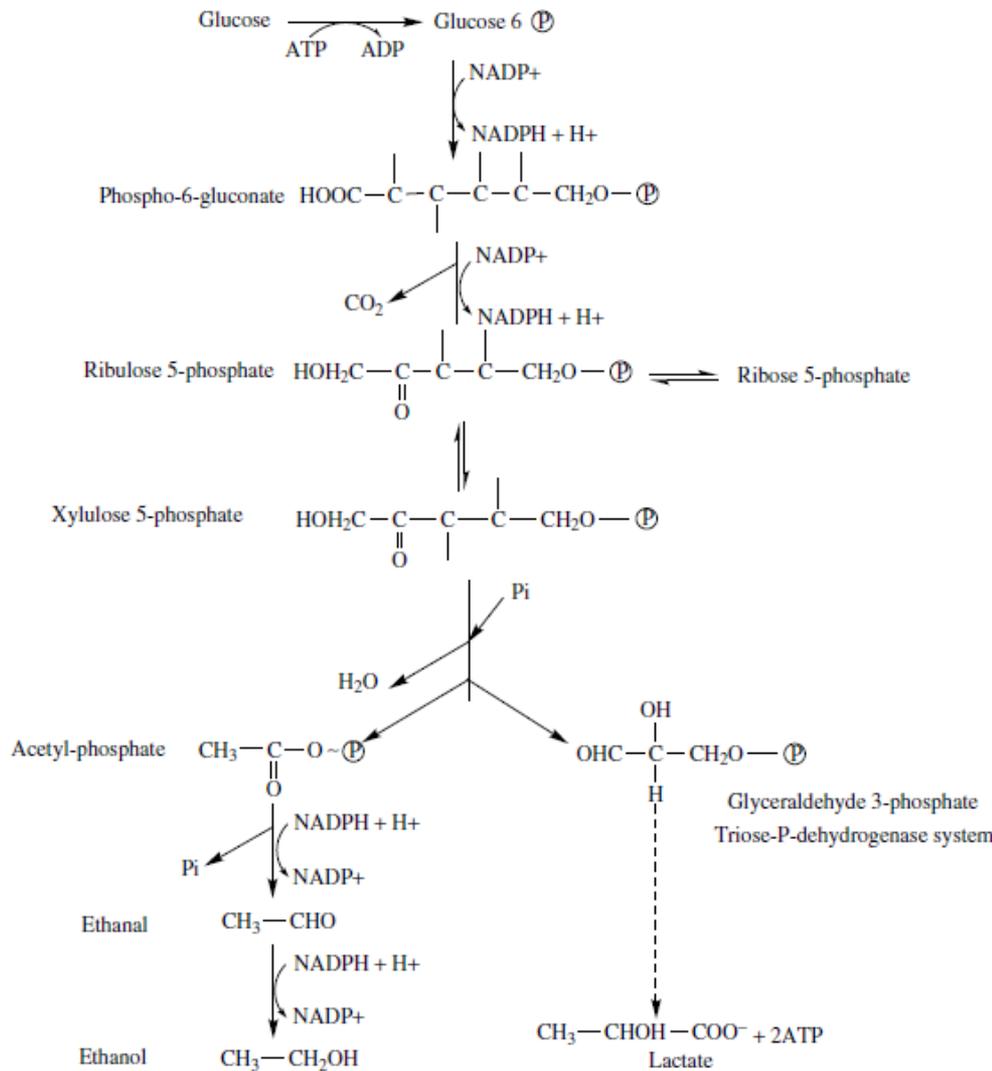


Fig. 5.2. Metabolic pathway of glucose fermentation by heterolactic bacteria (pentose phosphate pathway)

Metabolismo eterofermentativo degli zuccheri

Il ribulosio 5-P è epimerizzato in xilulosio 5-P. La **xilulosio 5-P fosfochetolasi** è l'enzima chiave di questa via: catalizza la scissione della molecola di xilulosio 5-P in acetil-P e gliceraldeide 3-P. La gliceraldeide 3-P è infine metabolizzata ad acido lattico.

L'acetil-P ha due possibili destini:

1) La molecola può essere ridotta ad etanale e successivamente ad etanolo. Questo passaggio è essenziale per rigenerare il potenziale in coenzima.

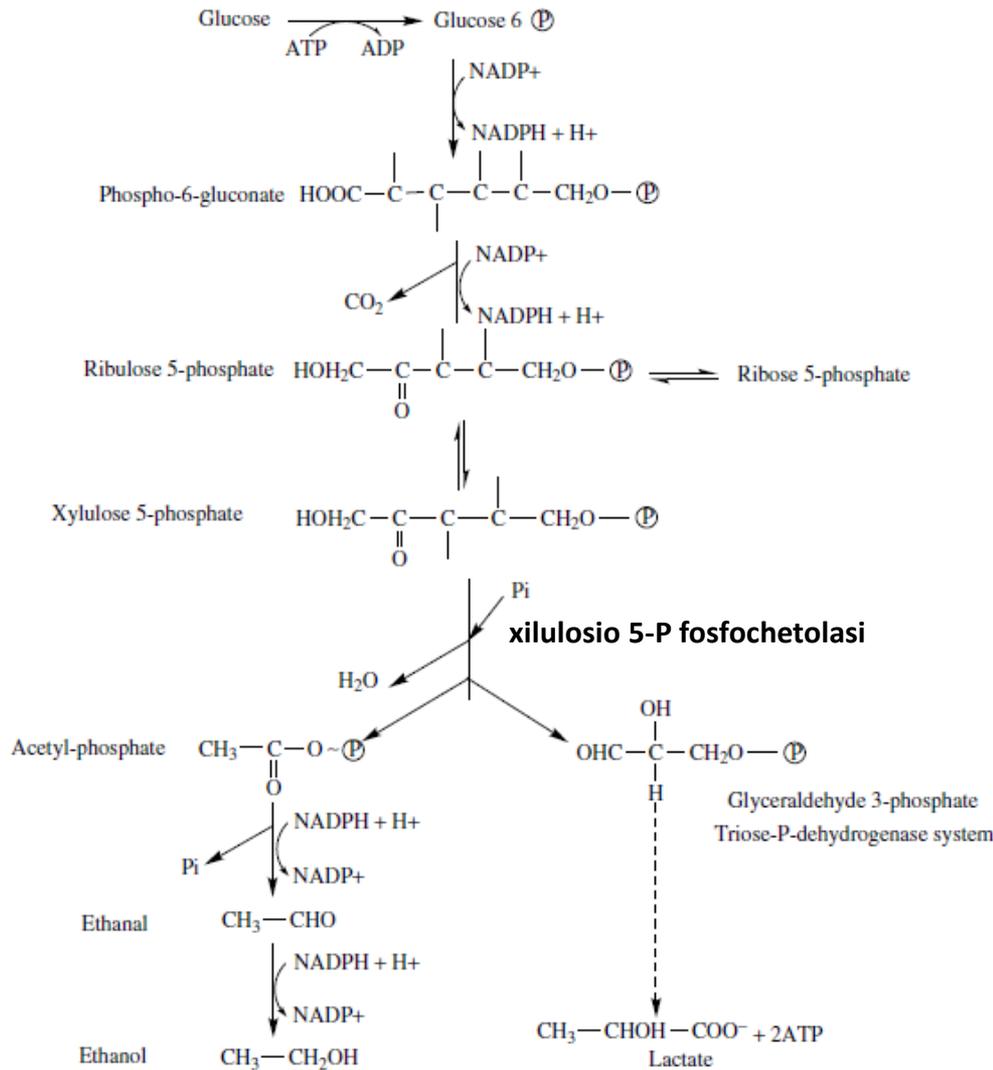


Fig. 5.2. Metabolic pathway of glucose fermentation by heterolactic bacteria (pentose phosphate pathway)

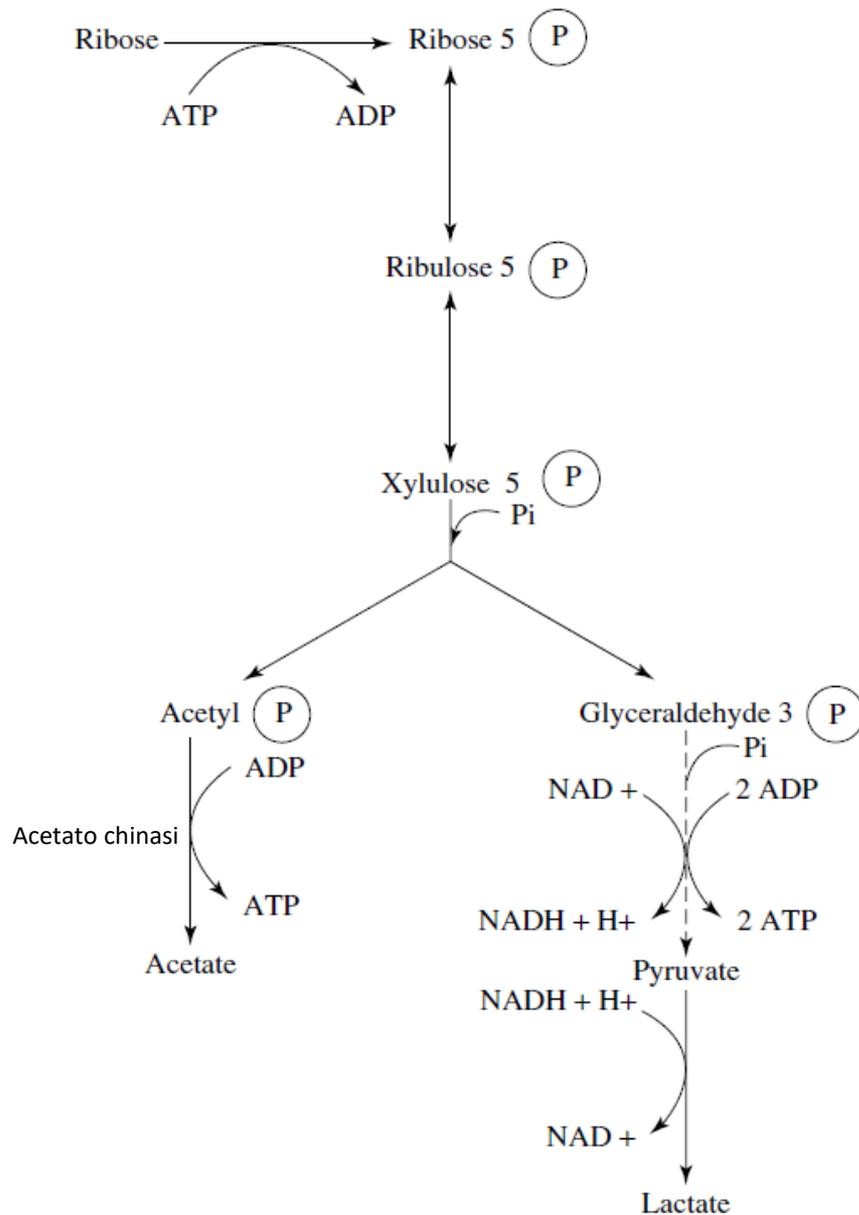


Fig. 5.3. Pentose fermentation pathway by lactic acid bacteria

Metabolismo dei pentosi

2) L'acetyl-P porta all'acetato in una reazione accoppiata con recupero dell'energia di legame del gruppo fosfato attraverso la sintesi di una molecola di ATP.

In questa via, si ha certamente un vantaggio energetico.

I pentosi sono fosforilati, in reazioni che coinvolgono chinasi e che utilizzano l'ATP. Isomerasi specifiche portano, poi alla molecola di xilulosio-5-P.

Questa via fornisce 2 molecole di ATP, per ogni molecola di pentosio fermentata. Il rendimento è superiore a quello della fermentazione di un esoso attraverso la via dei pentosi fosfato

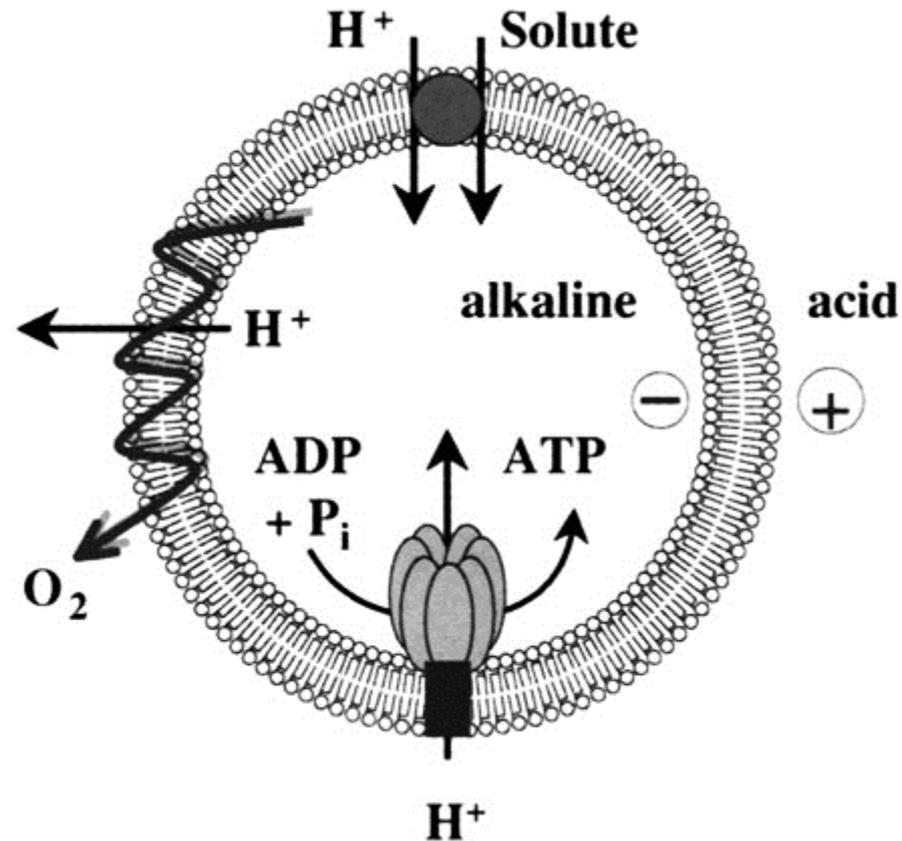
Ruolo funzionale della membrana citoplasmatica nei batteri

La membrana citoplasmatica è l'unica membrana presente nella parte interna della parete cellulare della maggior parte dei batteri. Forma una barriera fisica tra il citoplasma e l'ambiente esterno.

La membrana citoplasmatica consente di svolgere due importanti funzioni in tutti gli organismi viventi.

- La conservazione dell'integrità del citoplasma prevenendo la diffusione incontrollata all'esterno e/o all'interno di composti e di ioni che si diffondono liberamente.
- La trasduzione dell'energia chemiosmotica: i protoni sono pompati verso l'esterno dalla catena respiratoria citoplasmatica con conseguente generazione di una forza motrice protonica, internamente negativa e alcalina, mentre all'esterno positiva e acida.

Questa forza guida l'energia richiesta nei processi di membrana come la sintesi di ATP e trasporto di soluti.



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

Louis Pasteur e Hermann Müller-Thurgau sono stati i primi ricercatori a comprendere che i responsabili della fermentazione malolattica (FML) erano i batteri. Solo a metà degli anni 60 fu isolato e caratterizzato il batterio responsabile (*Leuconostoc oenos*).

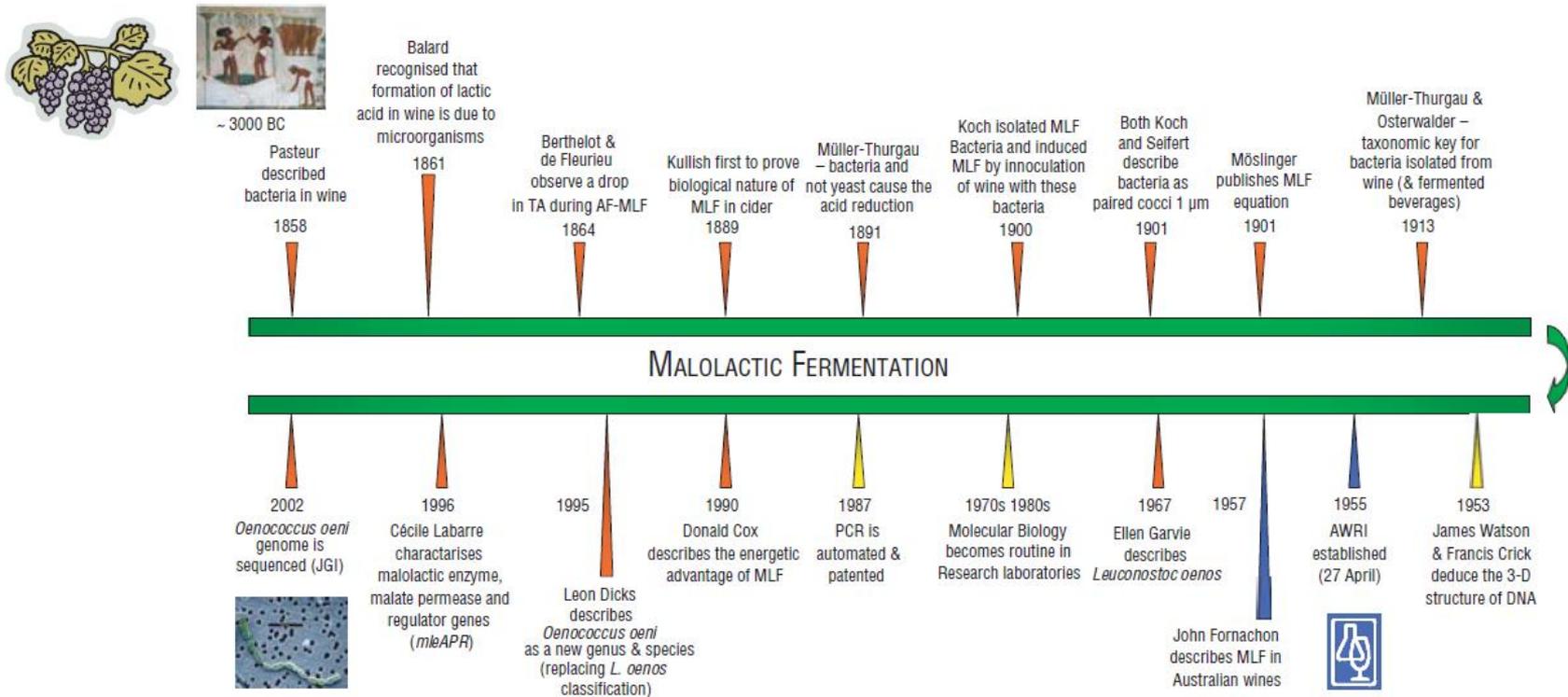
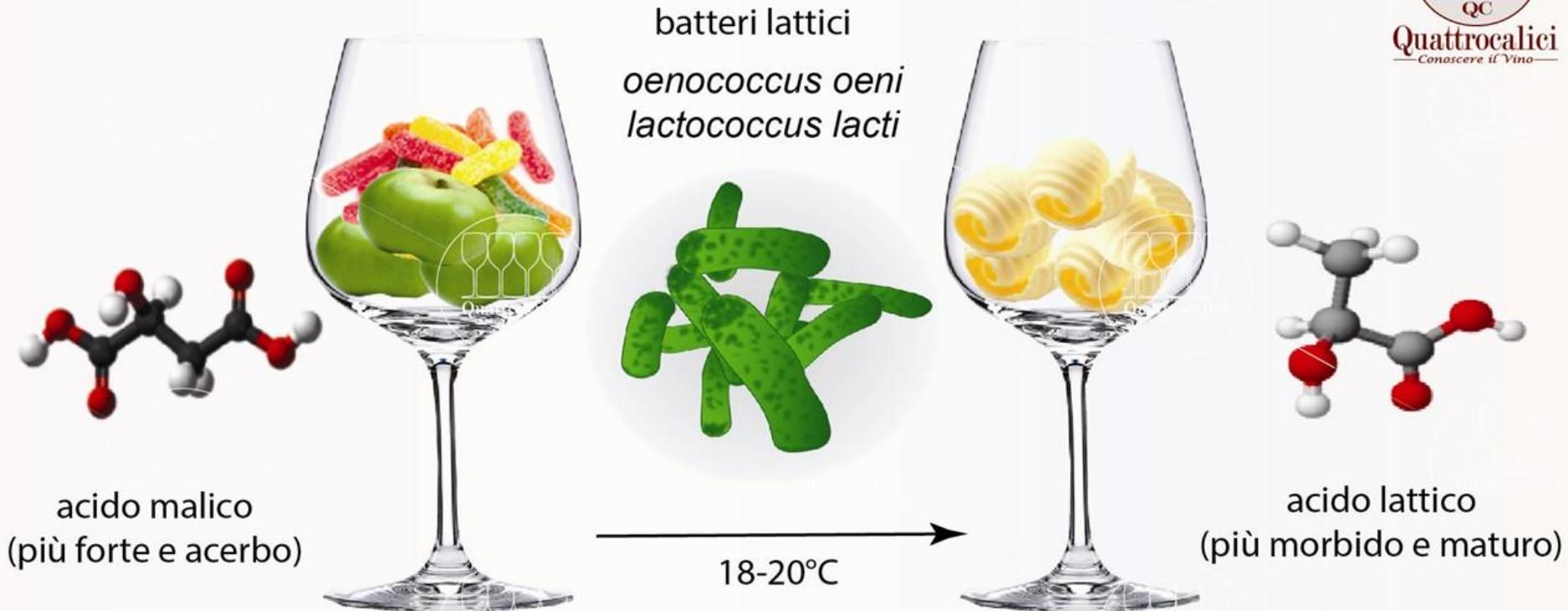


Figure 1. A historical perspective and milestones in the elucidation of MLF, the MLF reaction, and identification and characterisation of the bacterium responsible.

La fermentazione malolattica



©Quattrocalici 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 (-COOH) proveniente dalla molecola di acido malico in acqua e anidride carbonica (H_2O e CO_2) ad opera dei lattobatteri *oenococcus oeni* e *lactococcus lacti*, mentre l'acido malico si trasforma in acido lattico. La formazione di CO_2 può rendere il vino leggermente frizzante

I LAB trasformano l'acido L-malico in acido L-lattico e una molecola di CO₂. La reazione consiste in una decarbossilazione senza intermedio capace di seguire un'altra via metabolica. I batteri eterofermentativi (*O. oeni*) abbondanti durante la vinificazione, hanno le seguenti proprietà: formano solo l'acido D-lattico a partire dal glucosio e acido L-lattico a partire dall'acido L-malico.

Gli enzimi in grado di catalizzare una reazione in cui il substrato è l'acido L-malico sono la malato deidrogenasi (MDH) e l'enzima malico. I due enzimi catalizzano le reazioni seguenti:

MDH:



Enzima malico:



L'ossalacetato è facilmente decarbossilato a piruvato e CO₂, entrambe le reazioni portano alla formazione del piruvato a partire dall'acido L-malico.

Il prodotto finale della fermentazione malolattica nel vino è l'acido L-lattico.

In questa via metabolica, l'enzima malico dovrebbe essere associato a una lattato deidrogenasi (LDH) che catalizza la riduzione del piruvato ad acido L-lattico.

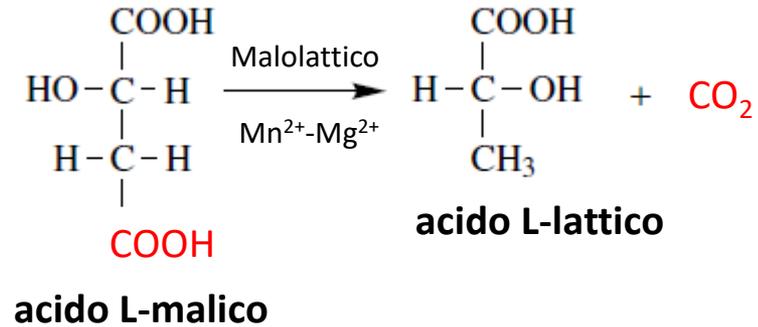
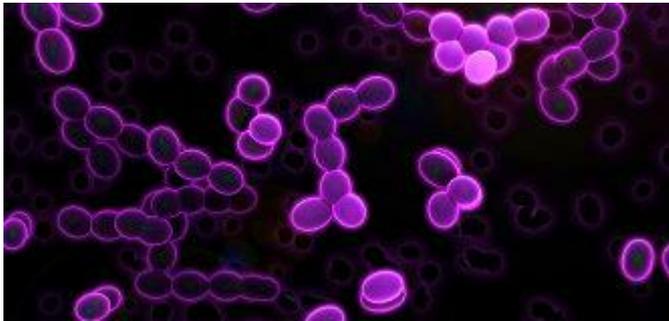


Tuttavia, i batteri del vino (*O. oeni*) possiedono solo la D-LDH, che a partire dell'acido malico dovrebbe portare al solo alla formazione dell'acido D-lattico.

È stata ipotizzata l'esistenza di un enzima catalizzante la decarbossilazione diretta dell'acido L-malico in acido L-lattico.

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 CO₂ (Ribéreau Gayon *et al.*, 2018)

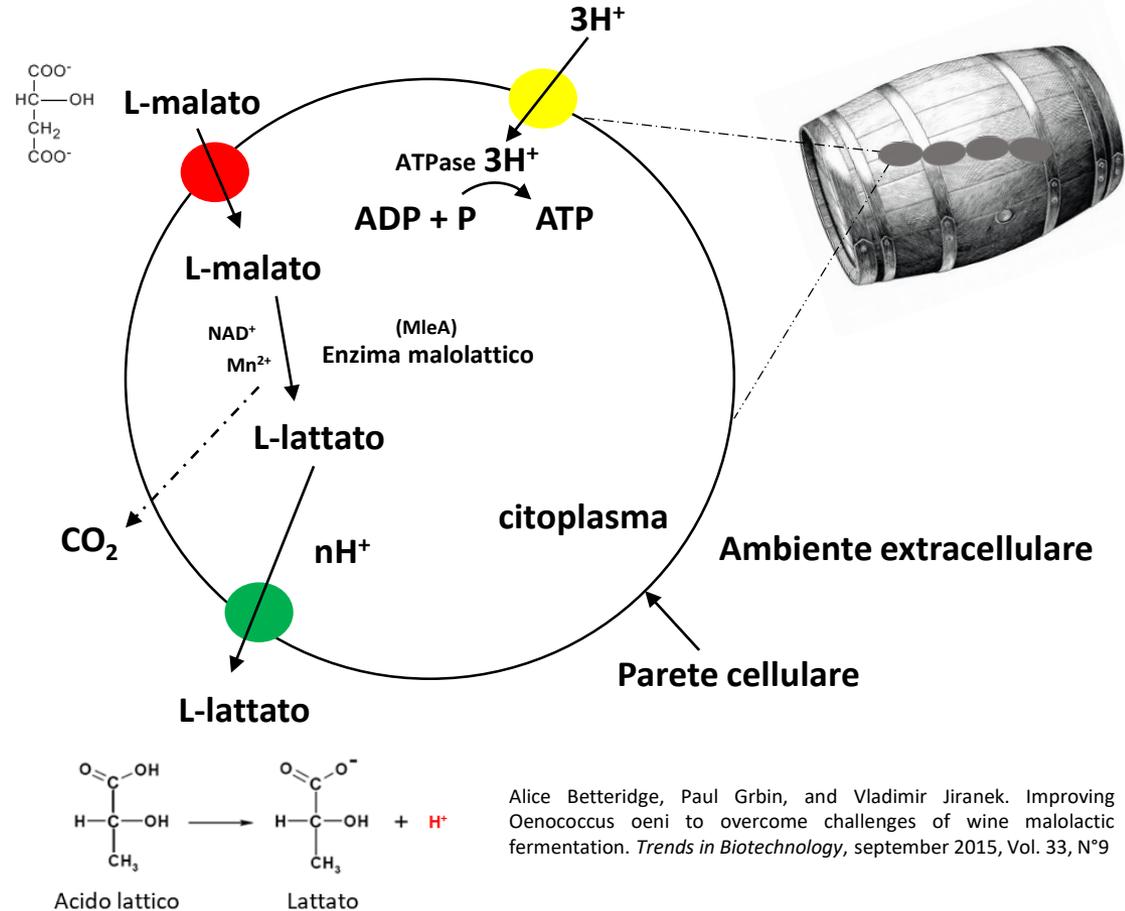
La reazione è catalizzata dall'enzima malolattico, un enzima NAD⁺ dipendente che necessita di cationi bivalenti, come ioni Mn²⁺ o Mg²⁺. L'acido succinico, l'acido citrico e l'acido L-tartarico sono degli inibitori di tipo competitivo, mentre l'acido L-lattico, prodotto della reazione, è un inibitore 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.

Il processo di decarbossilazione dell'acido malico è vantaggioso per i batteri lattici

l'influsso nella cellula del malato (carico negativamente) avviene attraverso un trasportatore e genera una differenza di potenziale elettrico, (l'interno della cellula è negativo).

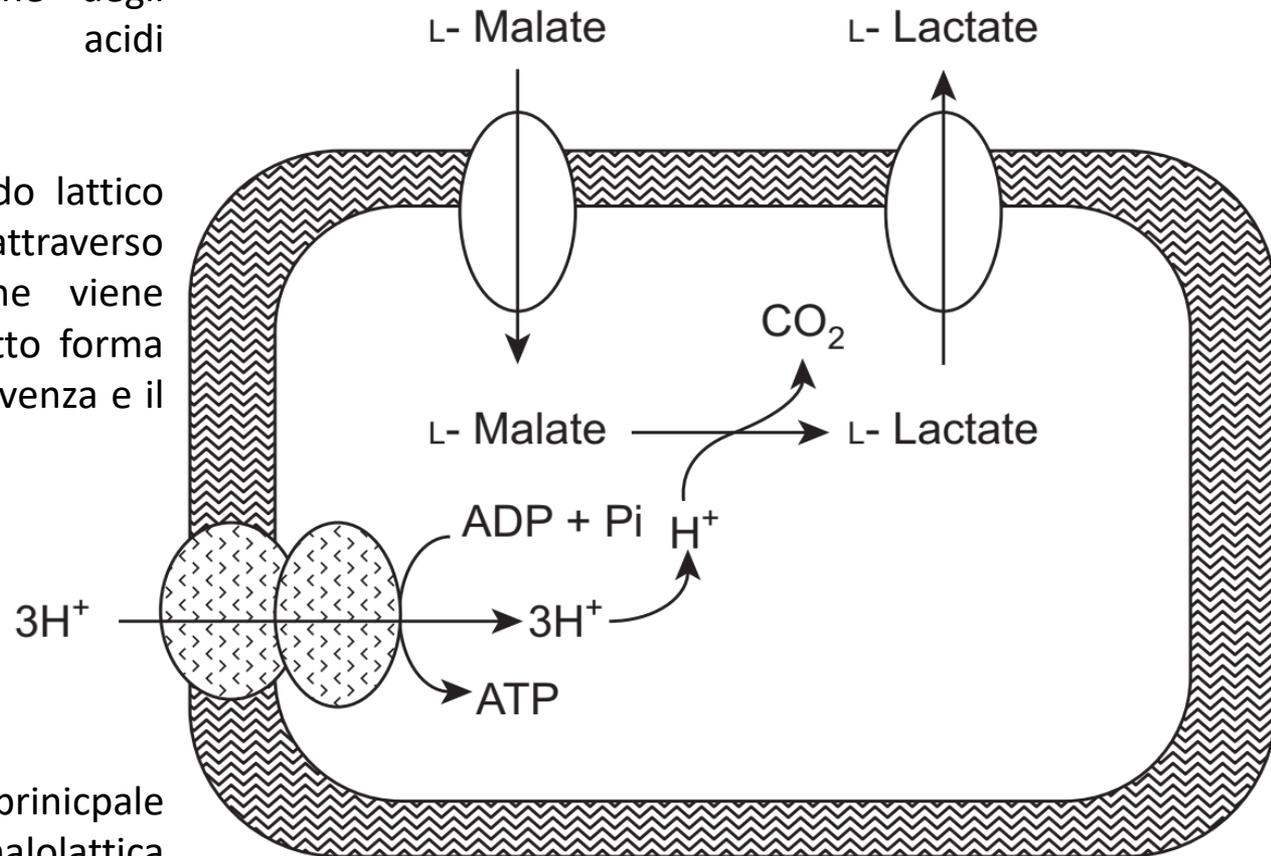
Dopo la reazione di decarbossilazione, l'acido lattico e la molecola di CO₂ escono dalla cellula per diffusione passiva (equivale a una traslocazione di uno ione idrogeno verso l'esterno), quindi si crea un gradiente di pH con valori alcalini nel citoplasma cellulare.



L'uso del malato genera quindi una forza protonmotrice formata da due componenti: differenza di potenziale elettrico ($\Delta\psi$) e gradiente protonico (ΔpH). Questa forma di energia viene sfruttata dalla ATPasi di membrana per sintetizzare ATP.

La decarbossilazione del malato con la fissazione di uno H^+ sull'acido lattico riduce l'acidità complessiva (conversione degli acidi bicarbossilici in acidi monocarbossilici).

La successiva escrezione dell'acido lattico genera una forza protonmotrice attraverso la membrana del batterio che viene utilizzata per fornire energia (sotto forma di ATP) per la crescita, la sopravvivenza e il metabolismo del batterio.



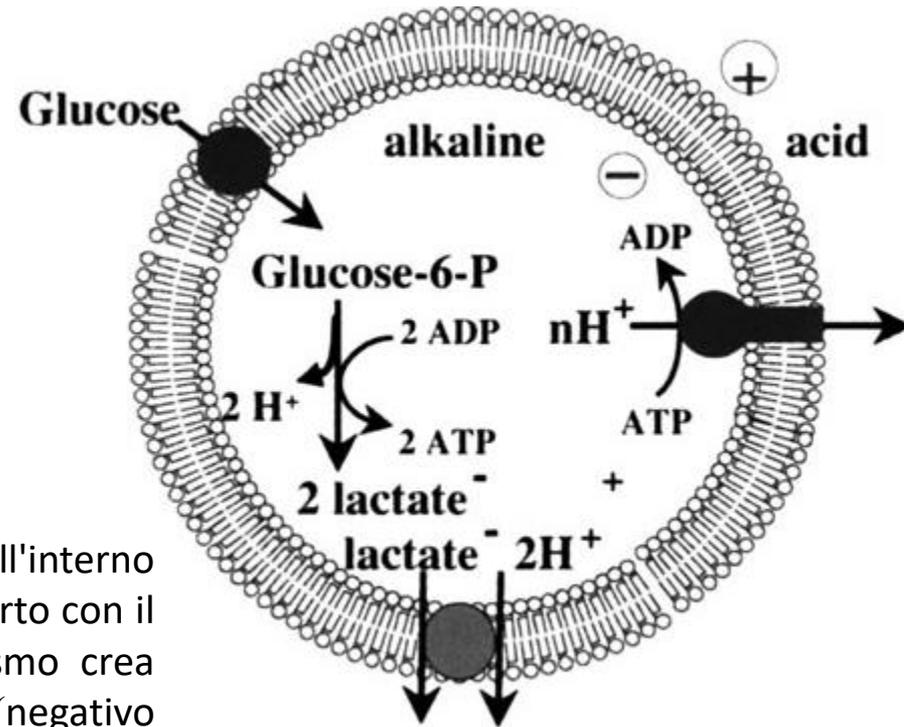
Il batterio *Oenococcus Oeni* è il principale batterio della fermentazione malolattica perché è il più tollerante al pH acido (inferiore a 3,5), alla concentrazione elevata di etanolo e all'anidride solforosa rispetto ad altri LAB.

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

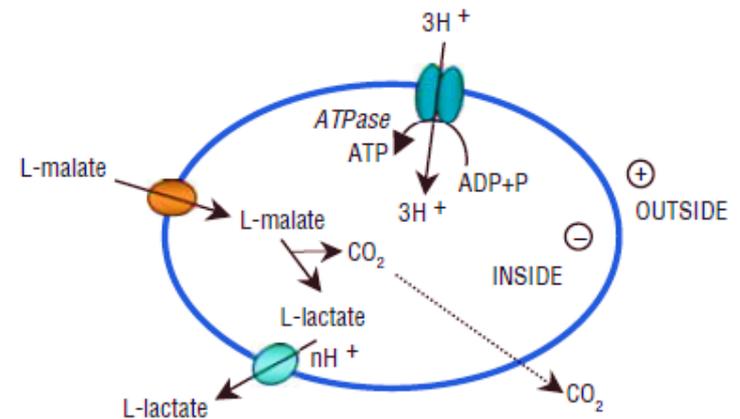
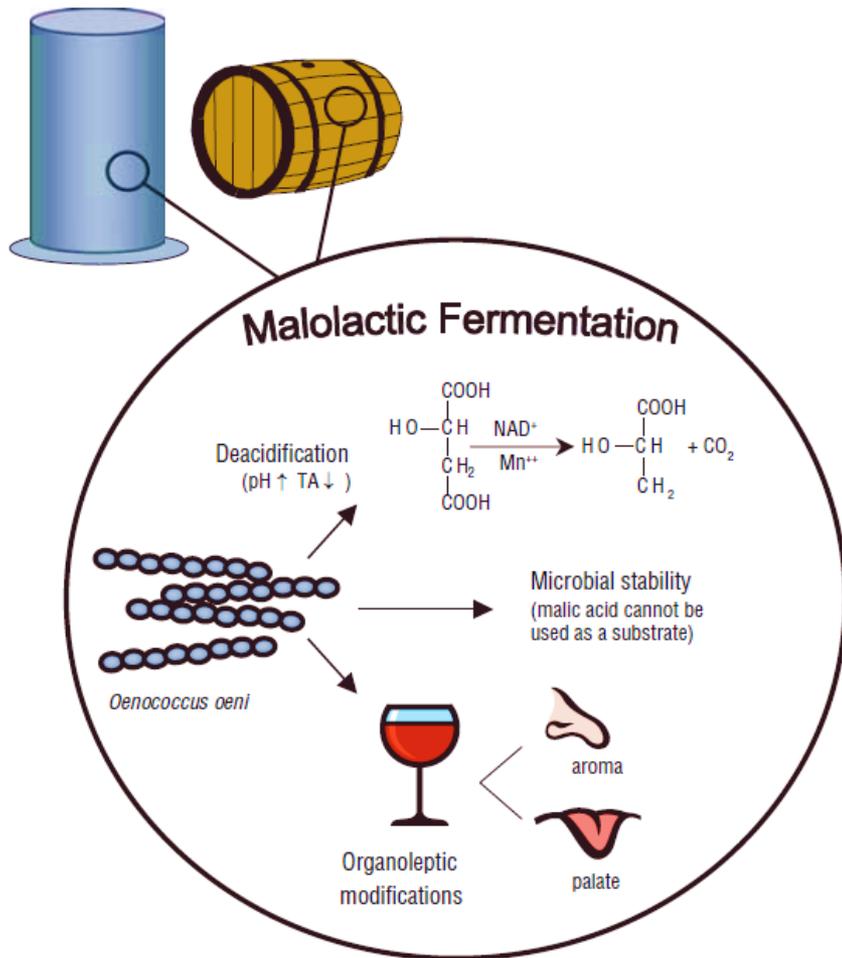
Durante la glicolisi i LAB (sia omo che eterofermentativi) producono continuamente lattato (acido debole). Per la maggior parte dei LAB il pH interno durante la glicolisi è superiore a pH 7 e tutto il lattato si troverà nella forma dissociata anionica (Lattato⁻). A differenza del lattato non dissociato (H-lattato), il Lattato⁻ non è permeabile alla membrana e la può attraversare solo tramite un trasporto specifico.

Il gradiente di concentrazione del lattato è diretto dall'interno verso l'esterno e il flusso di lattato è un sistema sinporto con il trasporto di almeno due protoni. Questo meccanismo crea una differenza di potenziale elettrico ($\Delta\psi$) (negativo all'interno) e un gradiente protonico (ΔpH) (alcalino all'interno), così si genera una forza protonmotrice attraverso la membrana batterica che viene utilizzata per fornire energia. Questo meccanismo spesso è chiamato «riciclo energetico».

Il numero di protoni escreti con il lattato, in condizioni ottimali di crescita in *Lactococcus lactis*, è di 2 e può essere espresso in ATP-equivalenti; il guadagno di energia per ogni lattato oscilla tra 0,66 e 0,5 ATP equivalente e la fermentazione del glucosio in lattato produce da 2,5 a 2,66 ATP equivalenti.



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 FML nel vino:

- (1) La FML conferisce stabilità microbica al vino attraverso la rimozione di una possibile fonte di carbonio (l'acido malico) per altri microrganismi.
- (2) La deacidificazione del vino (aumento del pH di 0,1-0,2 unità e diminuzione dell'acidità titolabile [TA]).
- (3) Conferisce al vino alterazioni sensoriali (aroma e palato).

La decarbossilazione dell'acido L-malico ad acido L-lattico comporta il trasporto attivo nella cellula dell'acido malico, la decarbossilazione e il trasporto dell'acido lattico fuori dalla cellula. Sono tre i geni coinvolti nella reazione malolattica: il gene *mleA* codifica per l'enzima malolattico, il gene *mleP* codifica per la permeasi del malato e il gene *mleR* è una proteina regolatrice.

I fattori che possono favorire o inibire la FML nel vino sono molteplici

Variabili che influenzano la fermentazione malolattica (Torriani e Felis, 2018)

Parametro	Condizioni		
	Facili	Medie	Difficili
pH	>3,4	3,1-3,4	<3,1
Alcol (% vol)	<13	13-15	>15
SO ₂ totale (mg/L)	<30	30-50	>50
Temperatura (°C)	18-22	14-18 e 22-26	>26 e <14

Perché la fermentazione malolattica abbia inizio sono necessarie le seguenti condizioni:

- pH del vino non eccessivamente basso (vini non eccessivamente acidi);
- bassa concentrazione di anidride solforosa;
- alcol etilico inferiore al 15%;
- temperatura tra i 18° e i 20°.

La FML oltre a ridurre l'acidità, modifica le caratteristiche organolettiche. La trasformazione dell'acido malico, dal gusto relativamente aspro, in acido lattico, rende più dolce il gusto del vino.

I fattori che possono favorire o inibire la FML nel vino sono molteplici

Fattori che possono inibire o favorire la FML (Torriani e Felis 2018).

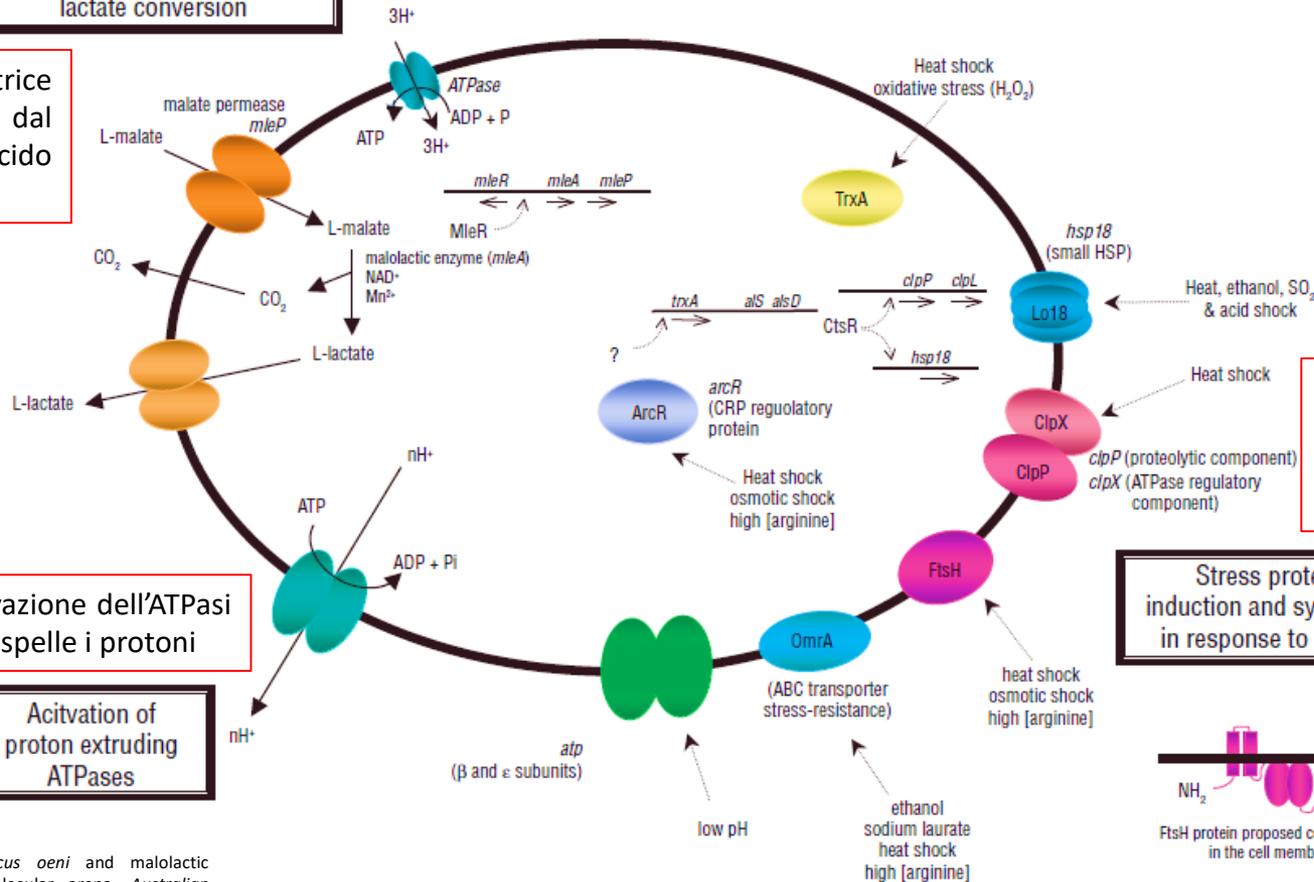
Temperatura	I LAB vinari si moltiplicano a temperature comprese tra 15 e 45°C, con un ottimo compreso tra 20 e 37°C. La $T_{optimum}$ di <i>O. oeni</i> è compresa tra 27 e 30°C, ma in presenza di etanolo, essa scende a valori di 20-23°C. La crescita rallenta al diminuire della temperatura fino ad arrestarsi a un valore di 14-15°C. La $T_{optimum}$ per lo svolgimento della FML è di 20-25°C, il tempo necessario per degradare tutto l'acido malico varia tra i 5-6 giorni fino alle diverse settimane o mesi proprio in funzione della temperatura.
Acidità	L'acidità seleziona i LAB presenti, nonostante la loro natura acidofila e la capacità di tollerare range di pH anche molto acidi. Il pH influisce sulla natura dei substrati trasformati; il pH minimo per la FML è più basso di quello per l'assimilazione degli zuccheri, per cui a basso pH i LAB preferiscono degradare l'acido malico senza fermentare gli zuccheri e quindi senza produrre acidità volatile. Il pH è importante perché influenza anche l'azione antisettica della SO ₂ .
Etanolo	L'etanolo condiziona la crescita e l'attività metabolica dei LAB danneggiando in alcuni la membrana cellulare. Le alte concentrazioni di etanolo diminuiscono la $T_{optimum}$ di crescita dei LAB e la tolleranza del medesimo è ridotta a temperature elevate. In base al genere, alla specie e al ceppo, la sensibilità all'etanolo varia; i ceppi isolati da vino di <i>O. oeni</i> sono attivati da concentrazioni di etanolo del 5-6%, rallentati da concentrazioni superiori al 7% e inibiti in presenza di etanolo al 13-14%. I lattobacilli e i pediococchi sono più tolleranti alle alte concentrazioni di etanolo rispetto <i>O. oeni</i> .
Solfitazione	I LAB sono sensibili alla SO ₂ che agisce sia in forma libera sia in forma combinata. L'SO ₂ molecolare è la frazione più attiva e aumenta con la diminuzione del pH del vino. In questa forma, infatti, l'SO ₂ può entrare nella cellula per diffusione causandone la morte. Durante la vinificazione, la solfitazione alla svinatura è evitata proprio per favorire l'inizio del processo. La sensibilità alla SO ₂ varia a seconda del ceppo, <i>O. oeni</i> è in grado di sviluppare fino a 30 mg/L quando le cellule subiscono un processo di pre-adattamento in un substrato acido (pH 3,5) contenente una concentrazione quasi letale di solfito (15 mg/L).

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

1

Proton motive force generation during malate to lactate conversion

La forza motrice protonica generata dal metabolismo dell'acido malico



l'attivazione dell'ATPasi che espelle i protoni

2

Acitvation of proton extruding ATPases

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

Stress protein induction and synthesis in response to shock

3

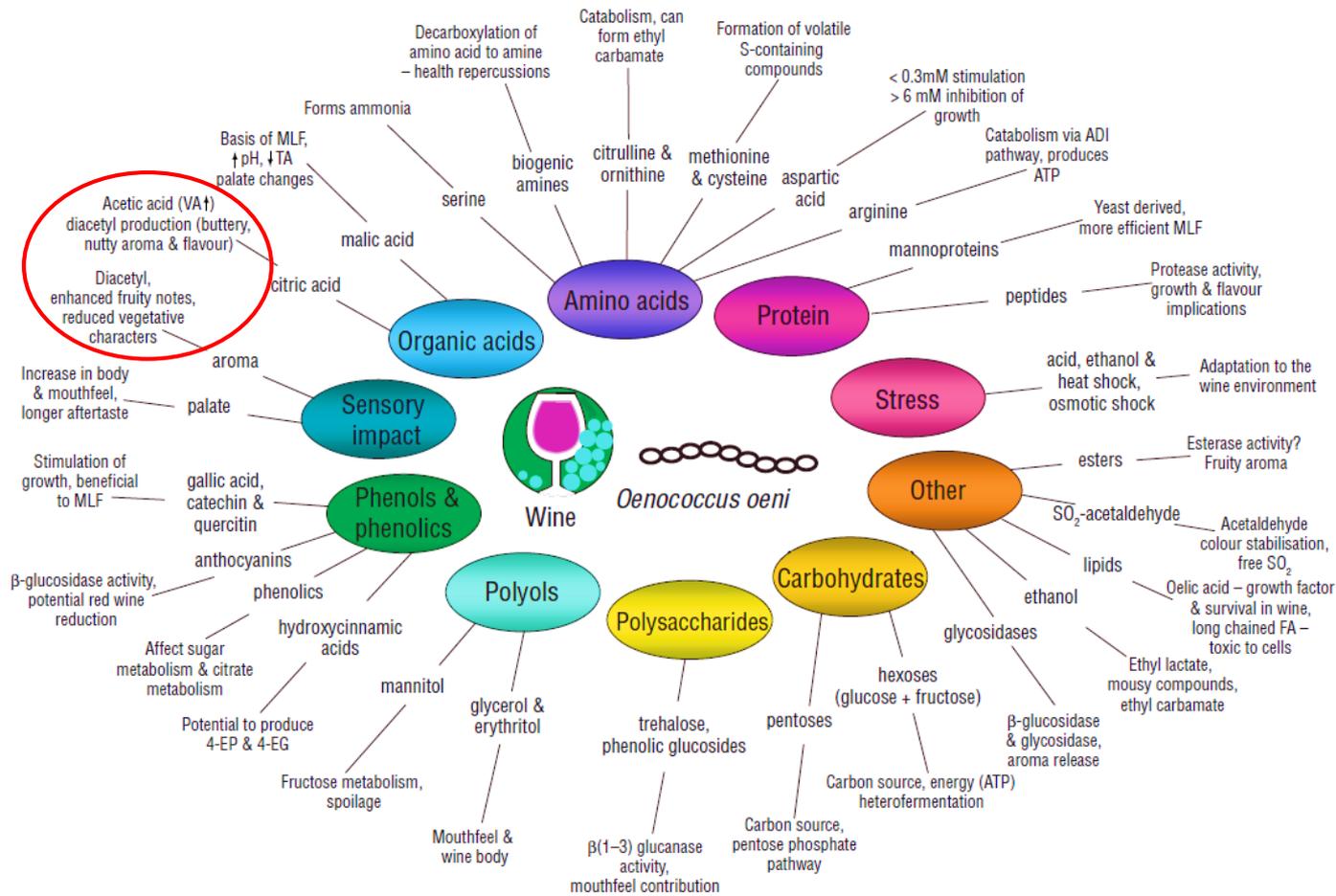
EVELINE J. BARTOWSKY. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 174–187, 2005

1) La forza motrice protonica generata dal metabolismo dell'acido malico; 2) l'attivazione dell'ATPasi che espelle i protoni e 3) l'induzione e sintesi di proteine dello stress in risposta allo shock. La fermentazione malolattica è coinvolta nella generazione della forza motrice protonica e nel mantenimento del pH interno mediante il consumo di protoni durante la fase di decarbossilazione del L-malato. Il sistema ATPasi che funziona come una pompa di estrusioni di protoni fornisce i mezzi per l'acido tolleranza regolando il pH intracellulare. La sintesi proteica da stress avviene tipicamente in risposta a uno shock ambientale innescato dal vino.

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

Substrato	Prodotto	Aroma
Acido malico	Acido-L-lattico	Morbidezza
Fruttosio	Acido-D-lattico	Leggera morbidezza
Acido citrico	Acido acetico	Pungente
	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

Questo processo influenza notevolmente il profilo organolettico e aumenta la complessità aromatica del vino, in funzione della specie/ceppo utilizzato per indurla. Di solito, la FML aumenta le note “fruttate” e di “burro” e riduce il carattere “vegetale”. L’aroma di burro è legato alla produzione di diacetile dal metabolismo dell’acido citrico, che ad alti livelli conferisce questa nota sgradevole, mentre a bassi livelli note positive di caramello o nocciola. Alla FML sono stati associati anche altri aromi caratteristici, indicati come floreale, tostato, vaniglia, dolce, legnoso, affumicato, amaro, miele.



O. oeni apporta numerosi cambiamenti nella composizione chimica del vino che incidono sostanzialmente sulle proprietà aromatiche e gustative del prodotto finale. Uno dei più importanti composti aromatici prodotti durante la FML è il diacetile. Questo dicetone conferisce al vino un aroma e un sapore burroso, deriva dal metabolismo dell'acido citrico ed è il prodotto di una decarbossilazione non enzimatica dell' α -acetolattato

Metabolismo dell'acido citrico

I batteri lattici come *L. plantarum*, *casei*, *mesenteroides*, *O. oeni* utilizzano rapidamente l'acido citrico. Ceppi del genere *Pediococcus* e le specie *L. hilgardii* e *brevis* ne sono incapaci.

I ceppi che non degradano l'acido citrico sono carente del primo enzima del via metabolica: la citrato liasi.

L'acido citrico è scisso dalla liasi in una molecola di ossalacetato e una molecola di acetato. L'enzima è sintetizzato, in quantità maggiore, in mezzi poco zuccherini e contenenti acido citrico; il glucosio agisce da repressore.

Questa prima tappa di degradazione porta alla formazione di una molecola di acetato per ogni molecola di substrato, mentre l'ossalacetato è decarbossilato a piruvato.

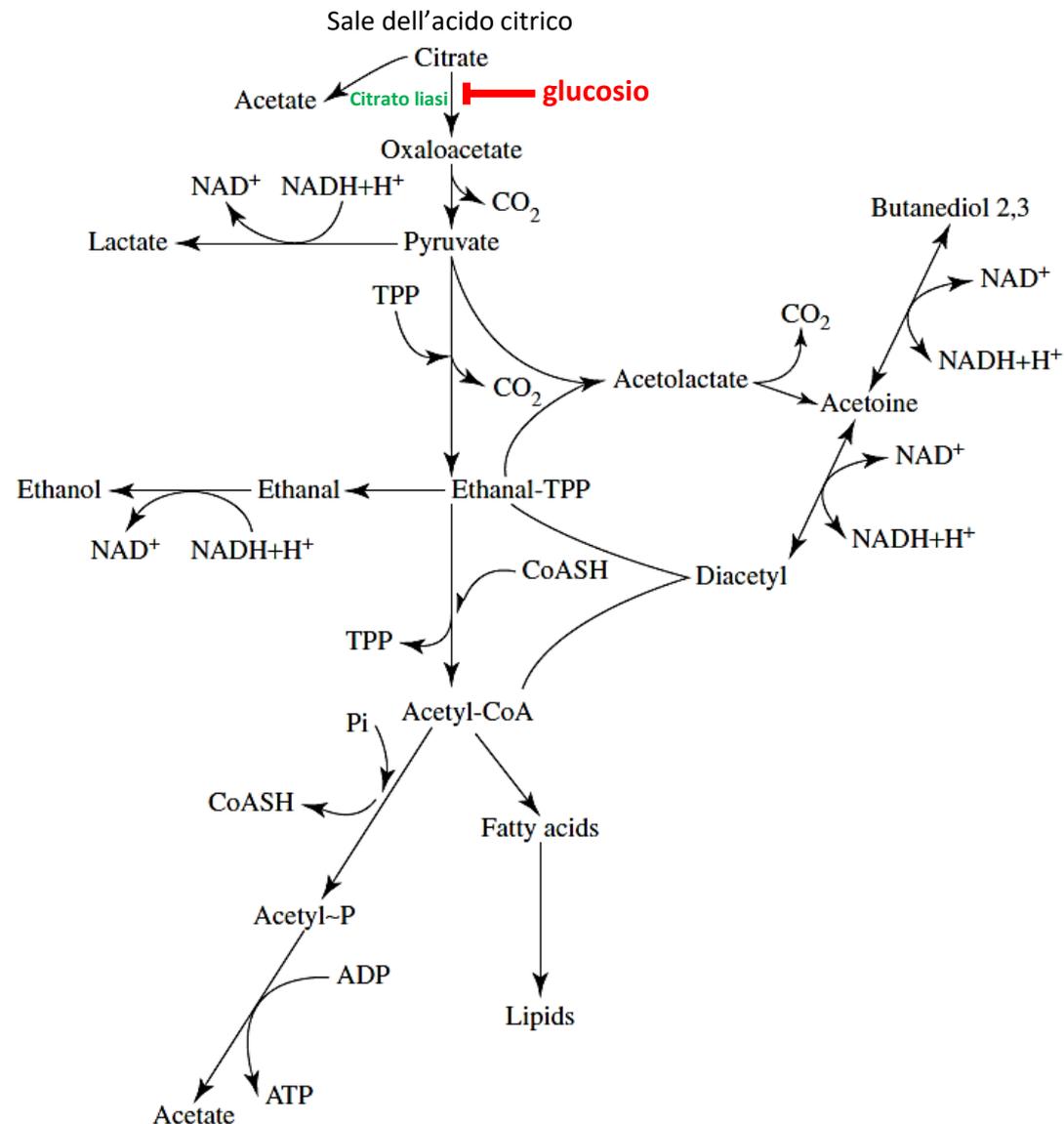


Fig. 5.6. Metabolic pathway for citric acid degradation by lactic acid bacteria

Metabolismo dell'acido citrico

Il piruvato è all'origine dei composti acetoinici: diacetile, acetoino e 2,3-butandiolo. Per il diacetile sono state proposte due vie di sintesi:

- il diacetile risulta dalla reazione dell'acetil CoA con l'etanale-TPP (acetaldeide attiva), catalizzata da una diacetilsintetasi.
- a partire da 2 molecole di piruvato, l' α -acetolattato sintetasi forma l' α -acetolattato, che è decarbossilato ad acetoino; il diacetile si forma per ossidazione dell'acetoino. Questa via è aerobia.

La degradazione di acido citrico rappresenta una fonte addizionale di energia. Infatti, si forma ATP a partire dall'acetil-P che, proveniente dal piruvato, si orienta verso la formazione di materiale cellulare (lipidi).

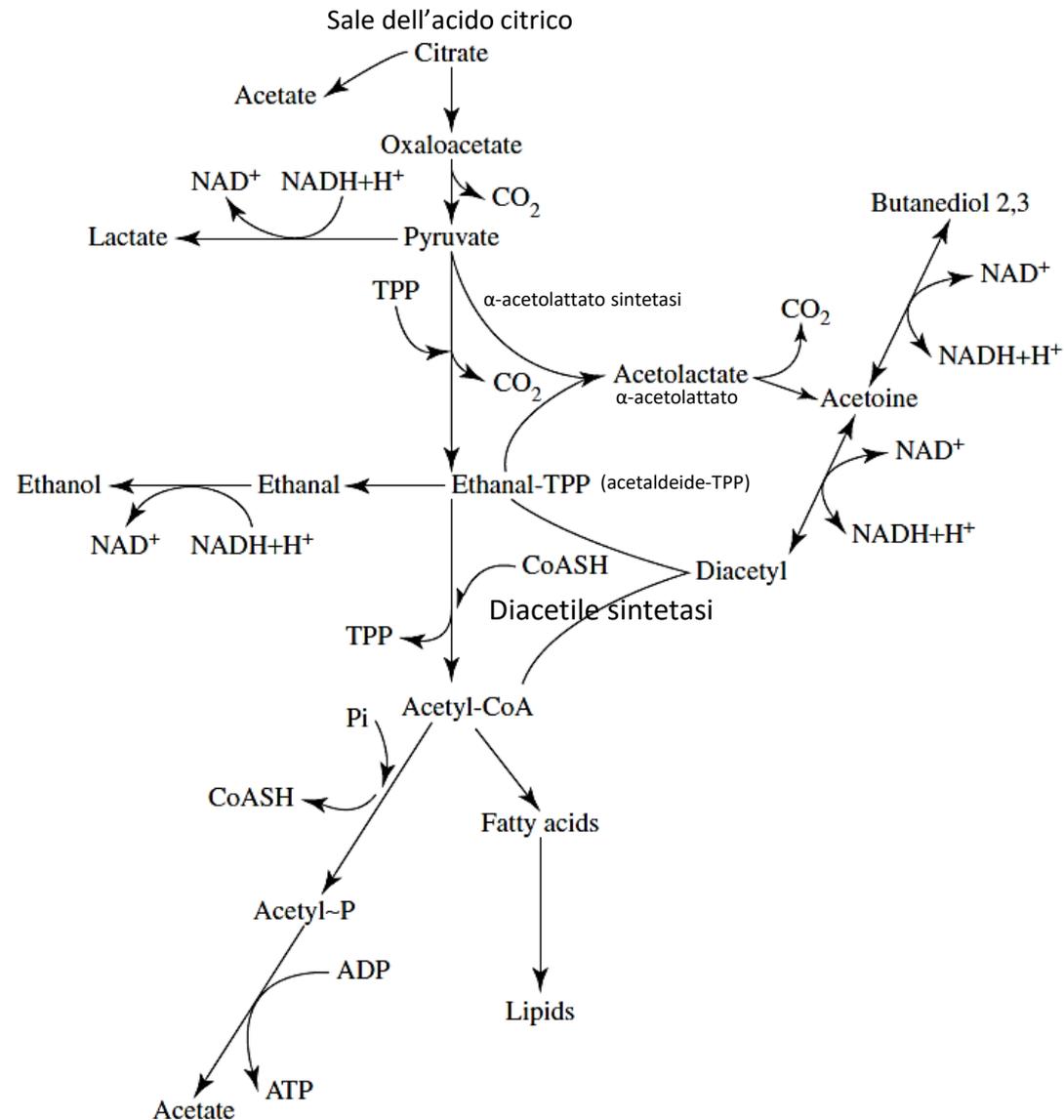
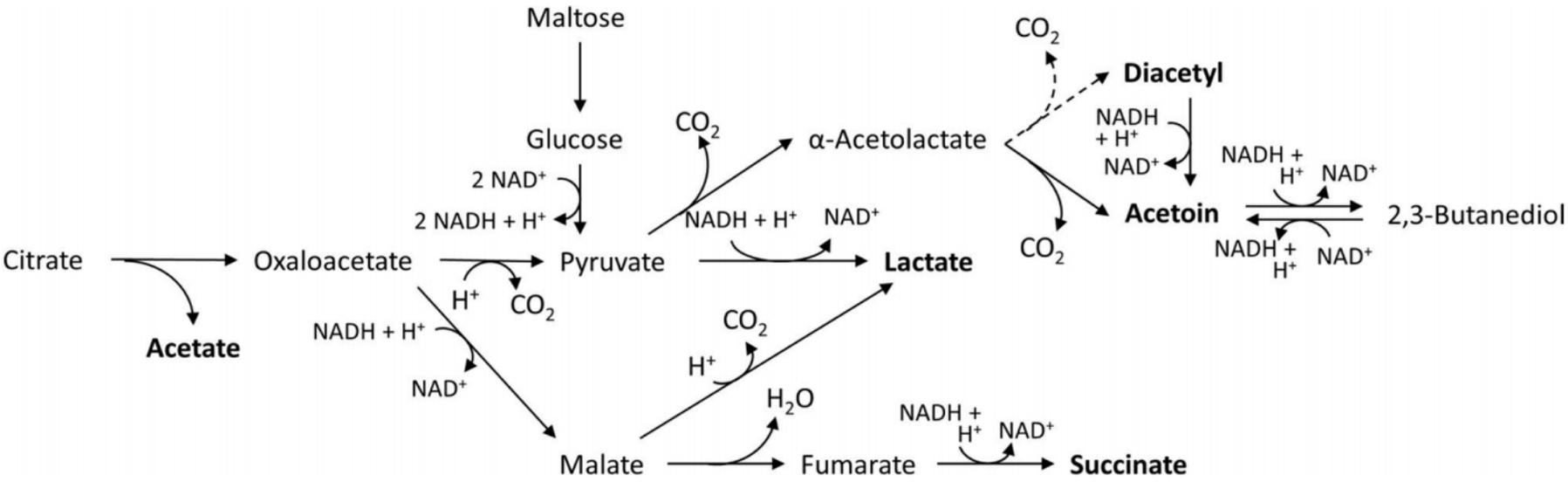


Fig. 5.6. Metabolic pathway for citric acid degradation by lactic acid bacteria

Il metabolismo del citrato inizia con l'enzima citrato liasi che lo converte in acetato e ossalacetato; quest'ultima può essere ulteriormente convertito in succinato (nei LAB eterofermentativi) dal ciclo dell'acido citrico oppure in piruvato dall'enzima ossalacetato decarbossilasi.

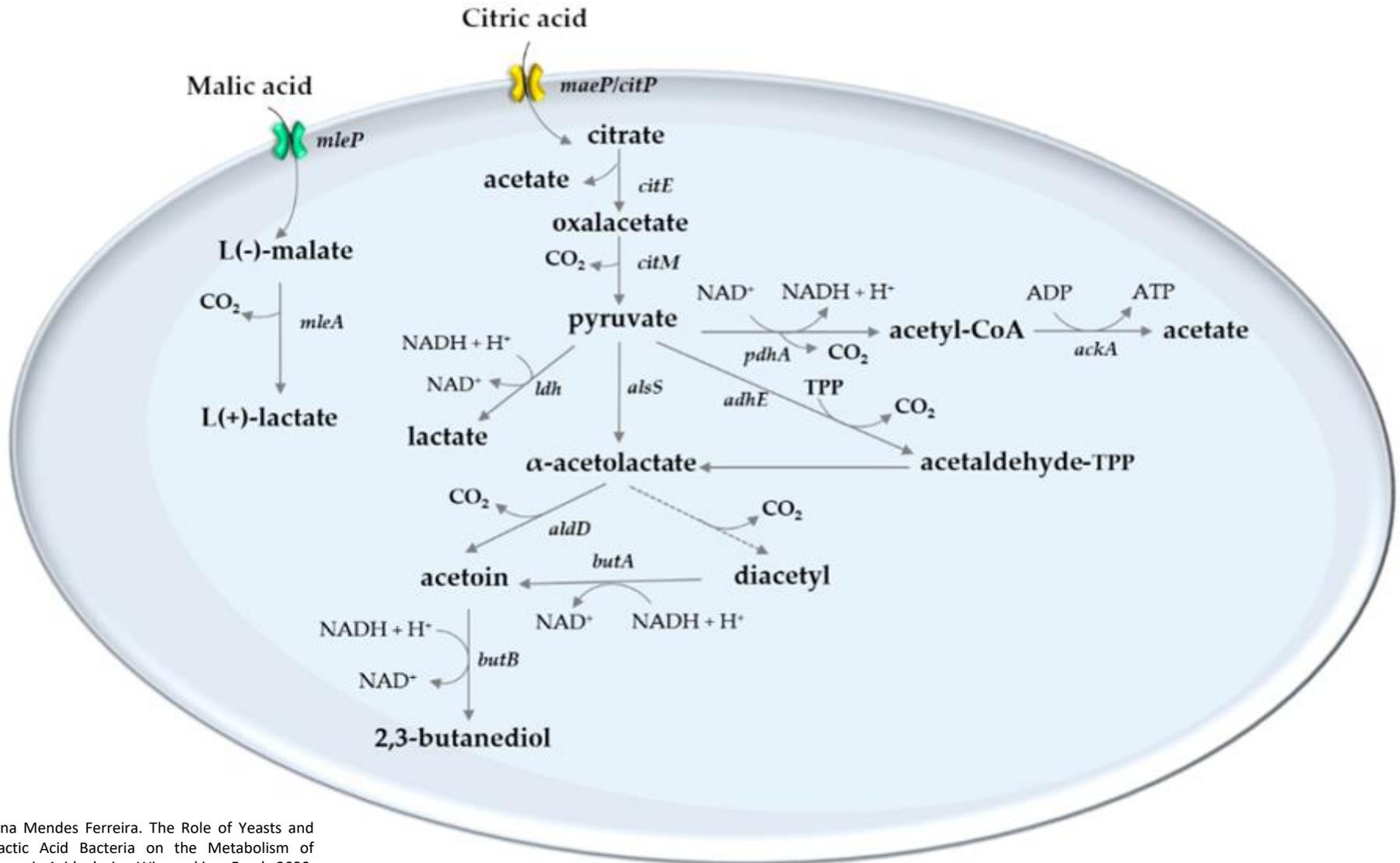
Il piruvato può essere ulteriormente ridotto in acido lattico o decarbossilato ad α -acetolattato, nel primo caso con l'enzima lattato deidrogenasi, nel secondo con l'enzima α -acetolattato sintasi. L' α -acetolattato può essere decarbossilato in acetoino dall'enzima acetolattato decarbossilasi oppure in diacetile da una decarbossilazione ossidativa (reazione non enzimatica).

Infine, il malato può essere decarbossilato in lattato dall'enzima malolattico.

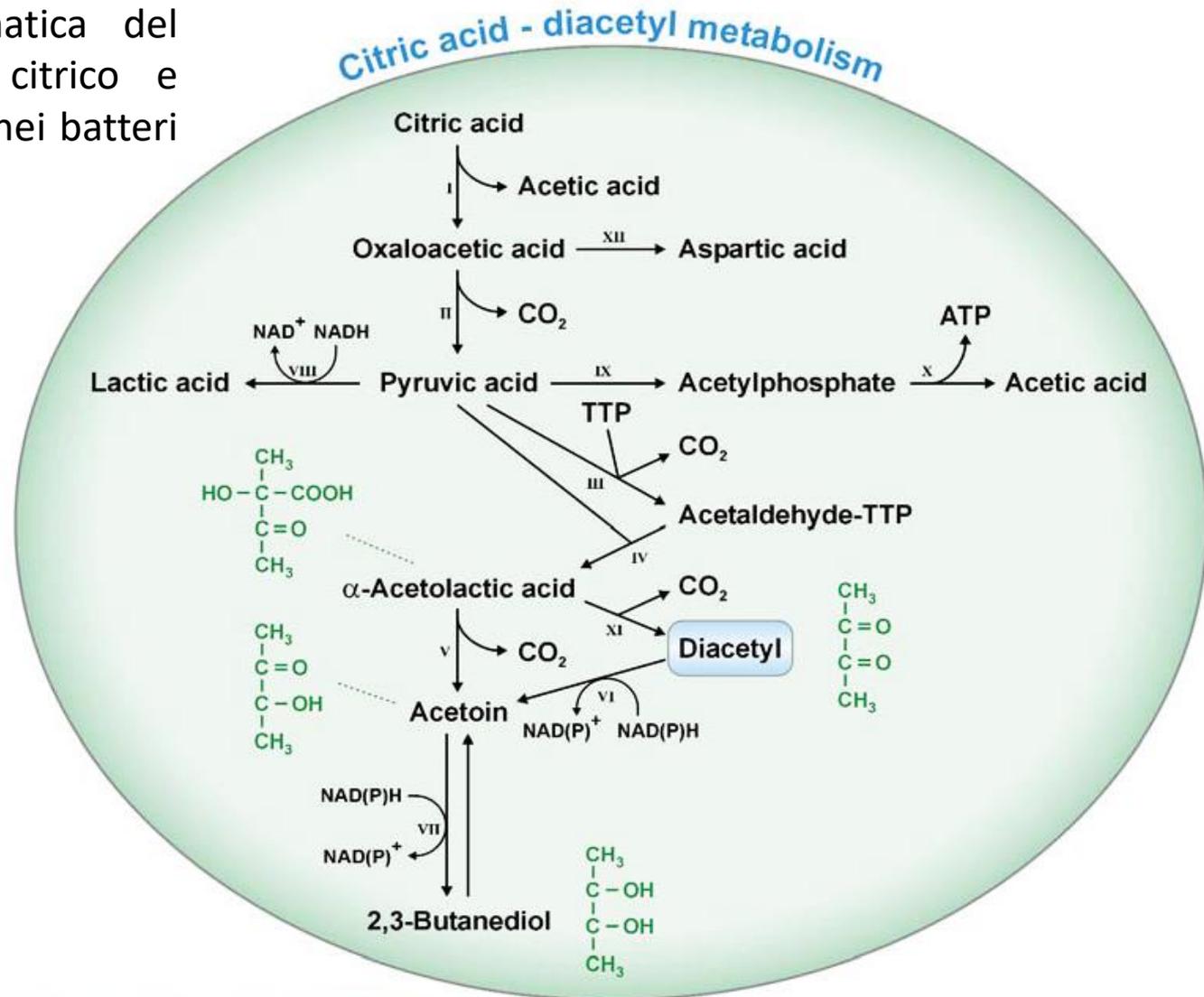


Luc De Vuyst, Andrea Comasio & Simon Van Kerrebroeck (2021): Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: 10.1080/10408398.2021.1976100

Rappresentazione schematica del metabolismo del citrato e del malato nei batteri lattici



Rappresentazione schematica del metabolismo dell'acido citrico e della sintesi del diacetile nei batteri lattici



- I Citrate lyase
- II Oxaloacetate decarboxylase
- III Pyruvate decarboxylase
- IV α -Acetolactate synthase
- V α -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

Acido tartarico:

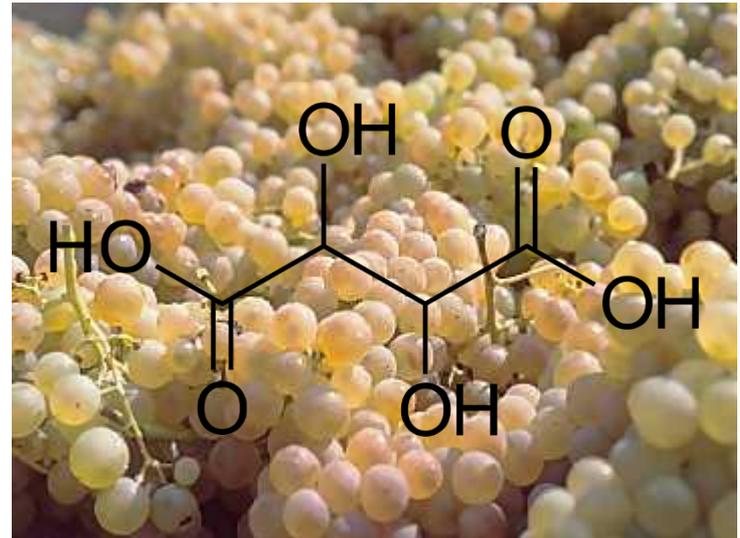
È l'acido più abbondante e rappresentativo sia nell'uva che nel mosto con concentrazioni da 1.5–2 a 6 g/L. Scarsamente diffuso in altri frutti.

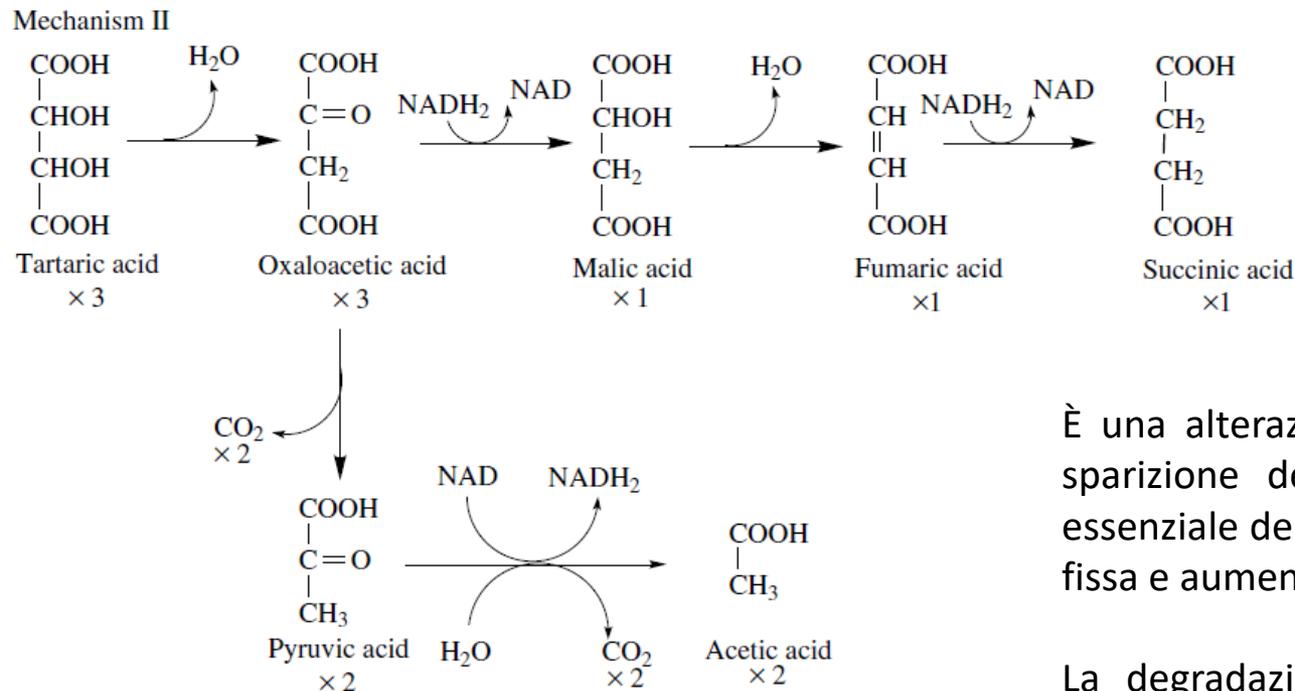
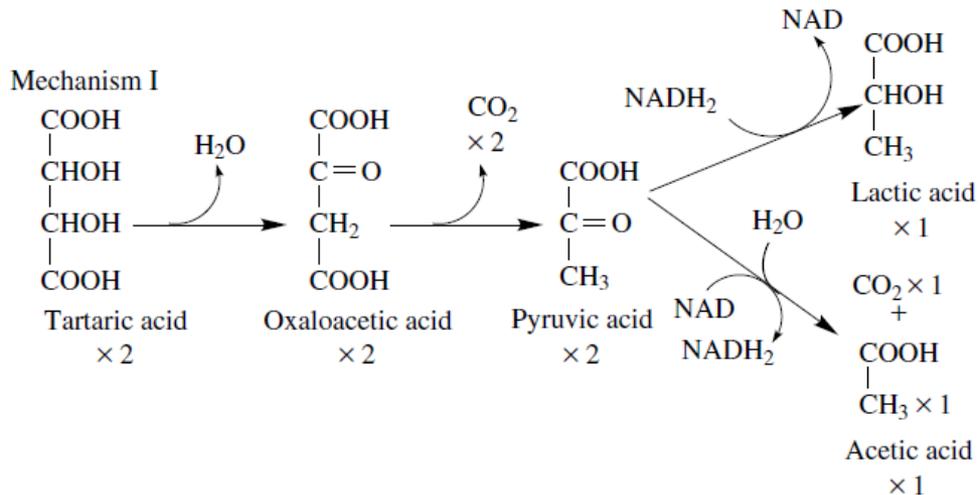
È l'acido più forte e maggiormente dissociato, conferendo al vino un pH di circa 3.0 – 3.5.

Nell'uva è sintetizzato sotto forma dell'isomero L(+)-Tartarico ed è un metabolita secondario del glucosio.

A pH normale del vino non viene degradato, ma a pH > 4.00 può essere attaccato dai batteri lattici e trasformato in acido lattico che evolverà in acido acetico (difetto di girato).

L'acido tartarico, l'acido malico, l'acido lattico e i loro sali costituiscono l'acidità fissa che è una importante caratteristica dei vini.





Metabolismo dell'acido tartarico

l'acido tartarico può essere degradato dai batteri lattici del vino, si tratta di una vera alterazione batterica, denominata malattia del girato: i batteri attaccano l'acido tartarico, liberando CO₂, acido lattico e acido acetico.

È una alterazione temibile, perché la sparizione dell'acido tartarico, acido essenziale del vino, diminuisce l'acidità fissa e aumenta l'acidità volatile.

La degradazione è sempre dannosa per la qualità del vino.

Fig. 5.7. Tartaric acid metabolism by lactic acid bacteria (Radler and Yannissis, 1972)

Il glicerolo è uno dei principali componenti del vino, sia per la concentrazione, dell'ordine di 5–8 g/l, sia per il suo ruolo nella degustazione. La degradazione del glicerolo è dannosa per la qualità del vino, perché la sua concentrazione diminuisce mentre aumentano prodotti dal sapore amaro come l'acroleina.

I batteri lattici utilizzano l'enzima glicerolo disidratasi per trasformare il glicerolo in β-idrossipropionaldeide che è il precursore dell'acroleina. Quest'ultima combinata con i tannini del vino darà luogo a sostanze dal gusto amaro.

L'aldeide può essere trasformata in 1,3-propandiolo, quando l'ambiente esterno contiene ancora glucosio e/o fruttosio e NADH (o NADPH).

La via della 3-P-glicerolo deidrogenasi porta alla formazione di 3-P-diidrossiacetone. Questa molecola entra nel flusso delle reazioni della glicolisi che portano al piruvato. Si forma grandi quantità di acido lattico e di conseguenza aumenta l'acidità del vino.

Degradazione del glicerolo

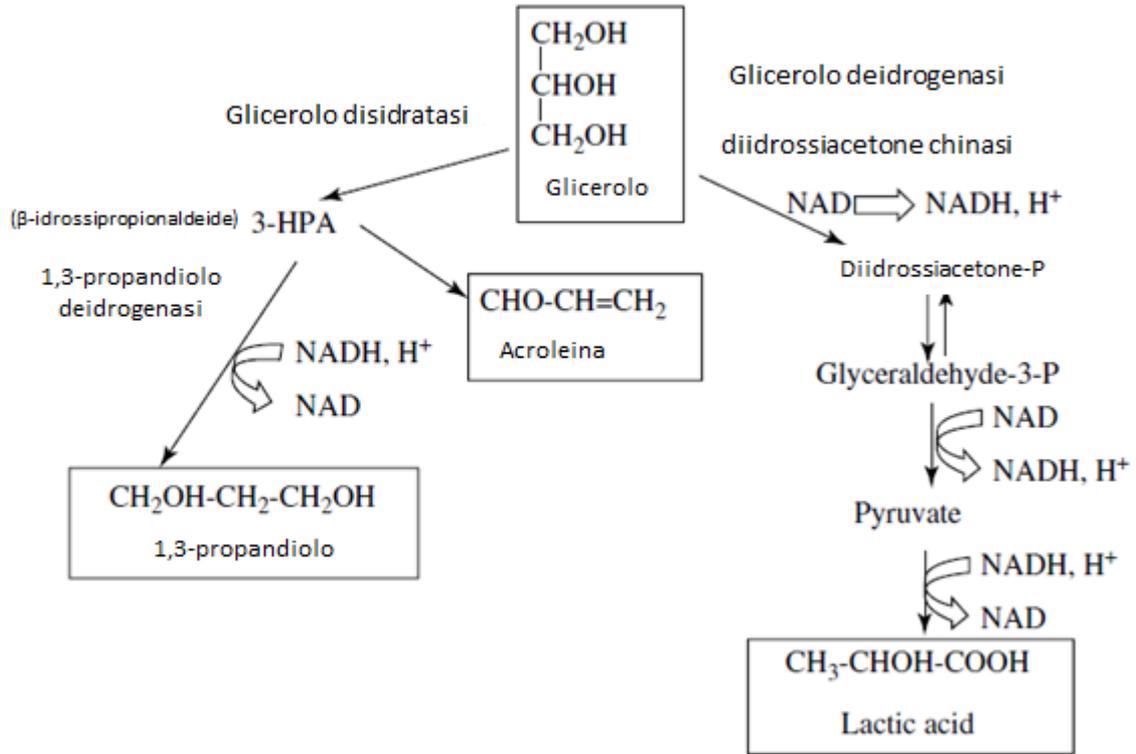


Fig. 5.8. Glycerol degradation pathways by lactic acid bacteria (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975)

È probabile che sia il livello di disponibilità dei coenzimi NADH/NAD (lo stato di ossidoriduzione intracellulare) a dirigere la trasformazione del piruvato. Se il NADH è disponibile sarà prodotto il lattato, nel caso contrario il piruvato sarà eliminato nella forma di composti acetoinici.

Le **ammine biogene** derivano principalmente dalla decarbossilazione degli aminoacidi precursori, la reazione è catalizzata da enzimi aminoacido-decarbossilasi di origine endogena e microbica.

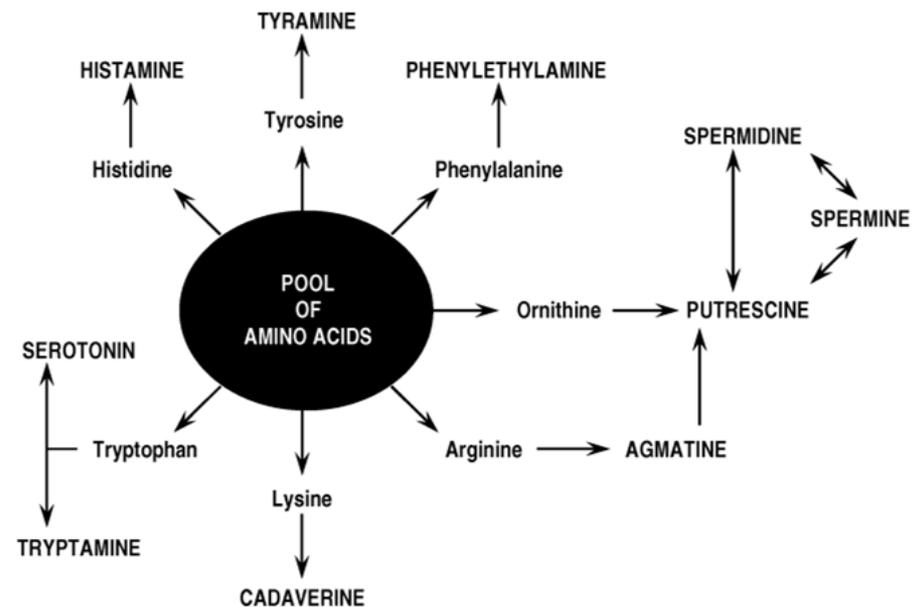
Ci sono tre possibili origini di ammine biogene nei vini:

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

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.

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

Le ammine biogene possono costituire una fonte di azoto e fungere da precursori per la sintesi di ormoni, alcaloidi, acidi nucleici e proteine.



Precursor amino acids of biogenic amines.

La formazione di ammine biogene

La decarbossilazione implica la rimozione del gruppo α -carbossilico dall'aminoacido per ottenere l'amina corrispondente.

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.

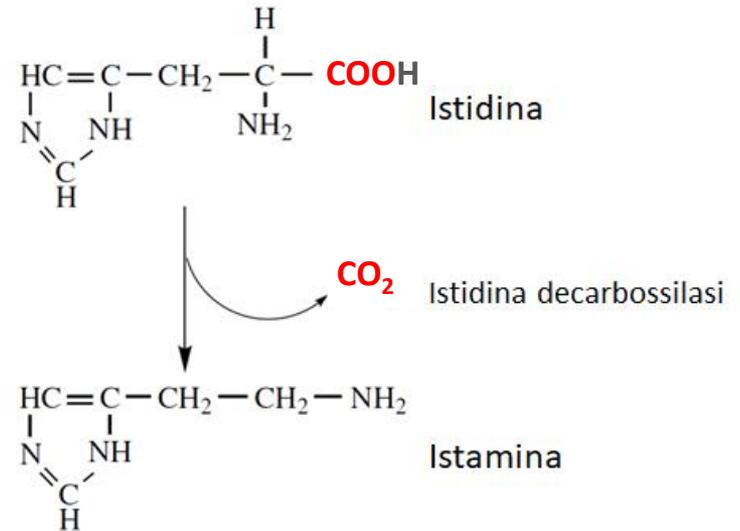


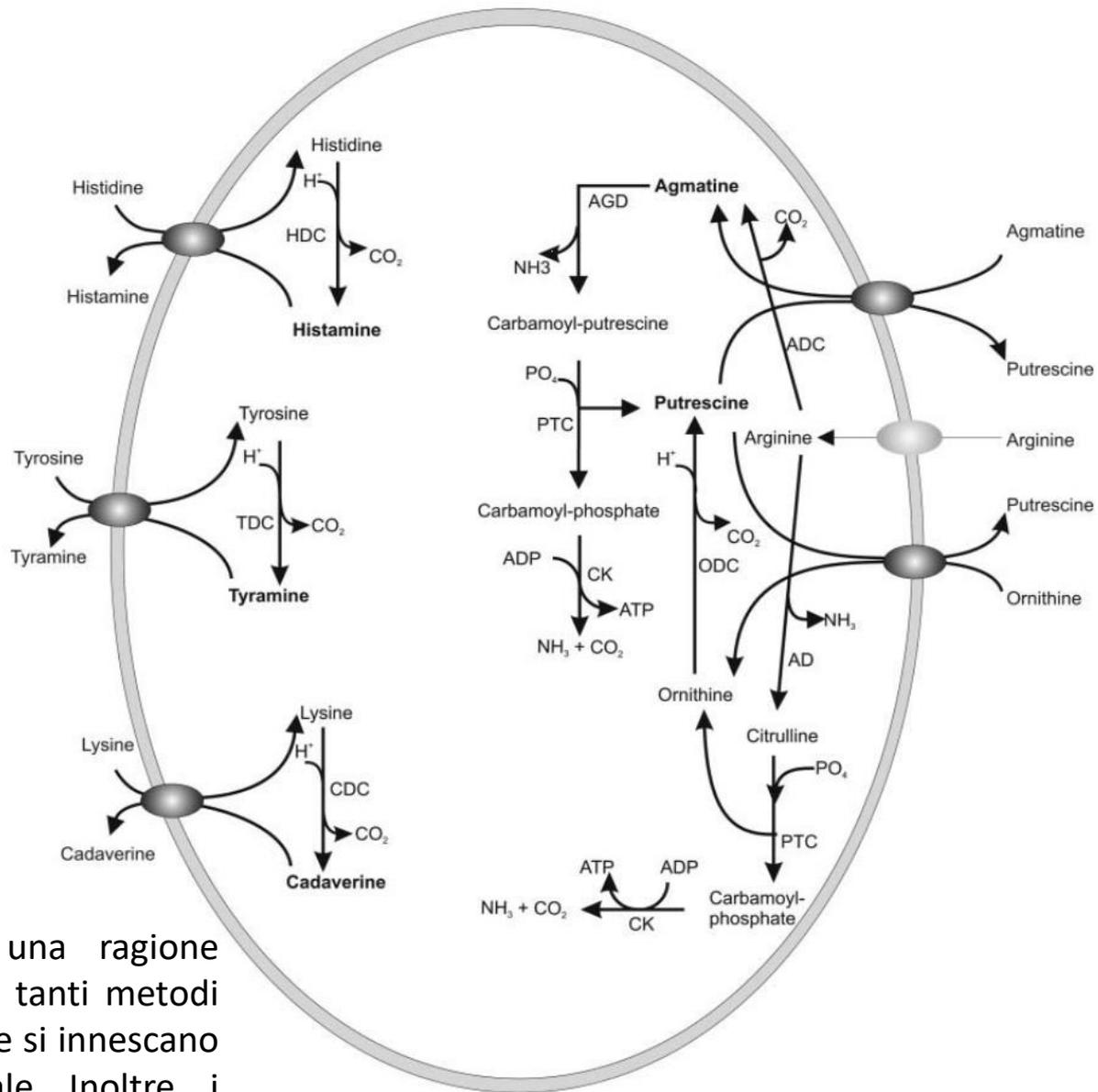
Fig. 5.9. Histidine decarboxylation reaction

La produzione di ammine biogene può anche offrire un modo per ottenere energia:

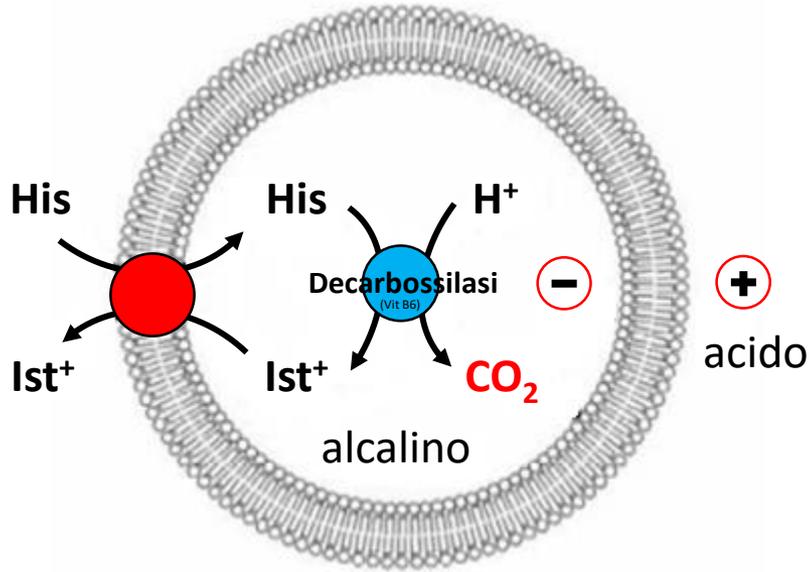
Il sistema di trasporto antiporto amminoacido/ammina biogena può portare alla generazione di una forza motrice protonica. Questa funzione sarebbe particolarmente importante per i batteri dell'acido lattico privi di una catena respiratoria per generare molecole di ATP.

La produzione di ammine biogene può anche mediare altre funzioni fisiologiche nei batteri, come le risposte allo stress osmotico e ossidativo.

La formazione delle ammine ha una ragione energetica poiché costituisce uno dei tanti metodi secondari di produzione di energia, che si innescano in condizioni di difficoltà nutrizionale. Inoltre, i meccanismi energetici secondari sono sfruttati dai microrganismi per espellere dalla cellula composti metabolici che potrebbero accumularsi.



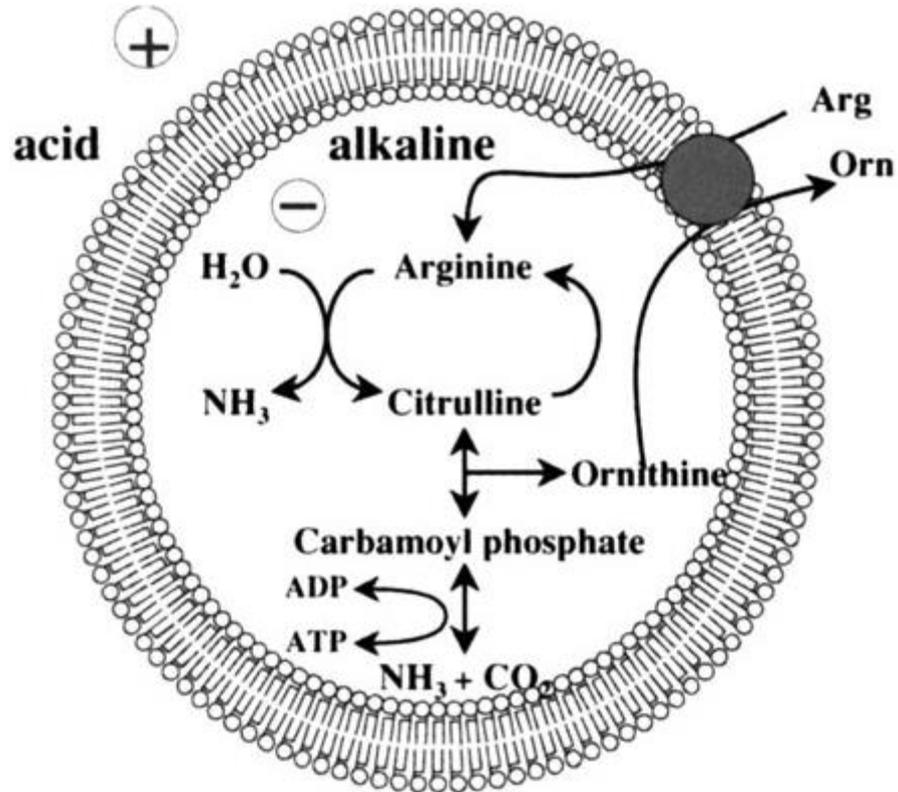
La formazione di ammine biogene



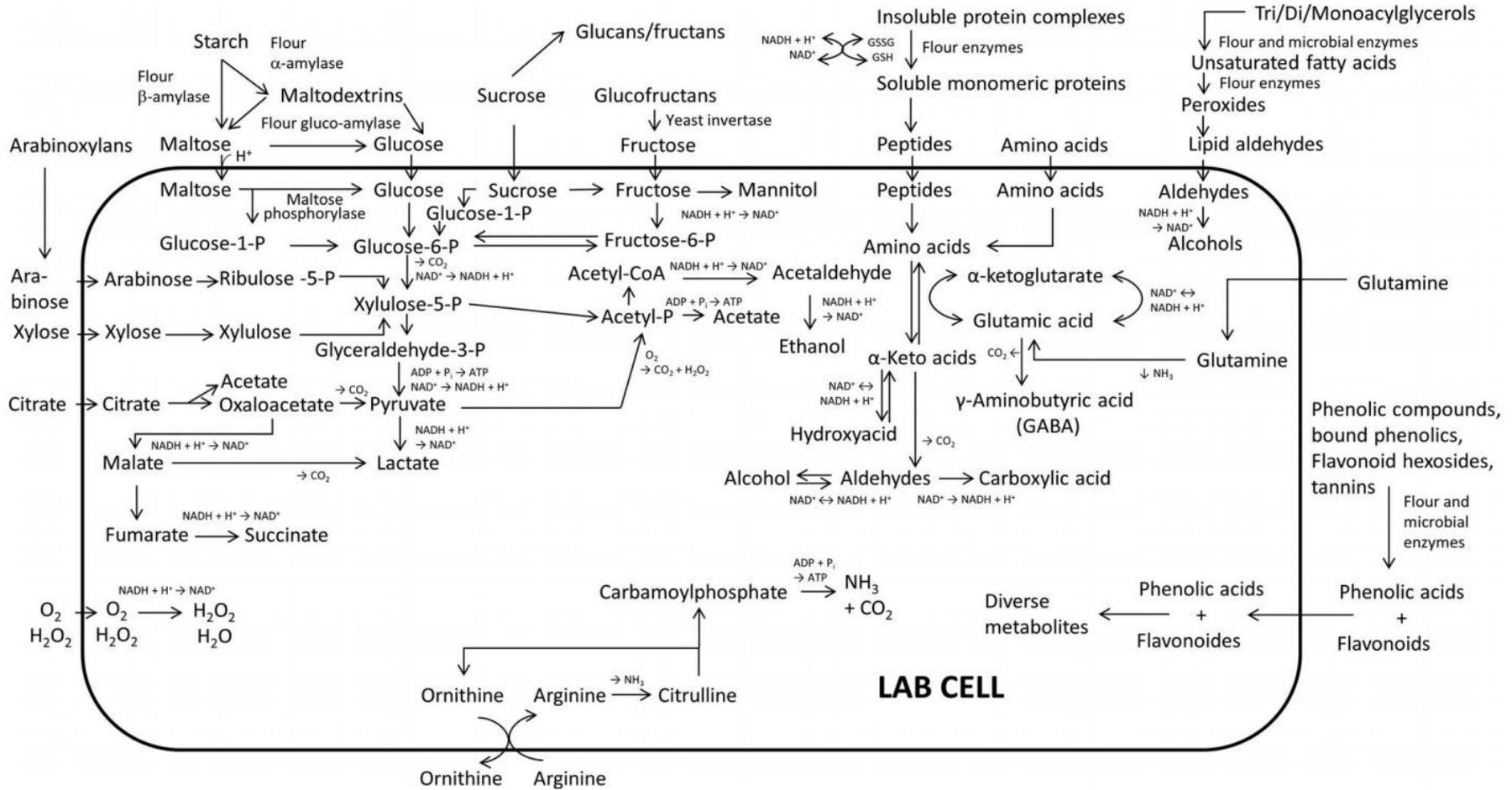
La decarbossilazione degli amminoacidi è per il microrganismo una via per produrre energia. Questo sistema può generare una traslocazione di cariche attraverso la membrana citoplasmatica modificando il potenziale elettrico con conseguente produzione di energia. La possibilità di creare il potenziale necessario per attuare un gradiente ionico elettrochimico sta nella permeabilità limitata della membrana cellulare, per questo motivo la membrana è fornita di pompe protoniche che garantiscono questo gradiente.

L'assorbimento intracellulare dell'istidina neutra (His) avviene mediante un trasportatore specifico che, dopo la decarbossilazione espelle l'istamina carica positivamente (Ist⁺). La fuoriuscita di una carica positiva genera un potenziale di membrana e lo scambio His/Ist⁺ diventa un processo elettrogenico, con formazione di un potenziale. Quest'ultimo, insieme al diverso pH, genera una forza protonmotrice che consente la conservazione dell'energia metabolica del batterio. Il vantaggio energetico deve potersi spiegare con lo scambio, tra l'istidina e l'istamina a livello della membrana, che si traduce nella creazione di un gradiente di protoni e di una forza protonmotrice, generatrice di ATP.

Percorso dell'arginina deaminasi in *Lactococcus lactis*



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