Indice

Riassunto – Abstract 2
Introduzione 3
Arresto fermentativo 5
Influenza di etanolo e temperatura sulla cinetica di fermentazione 7
Principali elementi caratterizzanti gli shock termici e l'esposizione a etanolo 10
Cambiamenti nella composizione lipidica 10
Cambiamenti a livello di ATP sintasi 11
Proteine da shock termico 12
Induzione di Hsp30 13
Elementi promotori di geni sensibili al calore e all'etanolo 14
Diagnosi dell'arresto di fermentazione 15
Profili fermentativi anomali 17
Fermentazione con inizio lento, che si normalizza con l'andare del tempo 19
Inizio normale della fermentazione, che tende ad arrestarsi col tempo 22
Fermentazione stentata per tutto il tempo 23
Brusco arresto fermentativo, di solito nella fase finale della fermentazione 24
Basi metaboliche degli arresti fermentativi 25
Assimilazione degli zuccheri in *Saccharomyces cerevisiae* 25
Trasporto del fruttosio in *Saccharomyces cerevisiae* 28
L'assimilazione selettiva del fruttosio da parte di lieviti enologici selezionati 29
Materiali e metodi 30
Risultati 31
Gli interventi nel caso di un arresto fermentativo 35
Protocollo di riavvio di una fermentazione stentata 35
Altri interventi possibili 37
Conclusioni 39
Bibliografia 40

Riassunto – Abstract

Obiettivo della presente tesi era di analizzare gli effetti sinergici che etanolo e temperatura hanno sul metabolismo di *Saccharomyces cerevisiae*, per poter comprendere meglio l'arresto di fermentazione.

Il lavoro si è essenzialmente basato sulla ricerca di articoli accademici inerenti: cambiamenti nella composizione lipidica e a livello di ATP-asi, proteine da shock termico, diagnosi dell'arresto di fermentazione (tipi di profili fermentativi) e basi metaboliche degli arresti fermentativi (assimilazione degli zuccheri e trasporto del fruttosio). È stata poi riportato un'esperienza sull'assimilazione del fruttosio da parte di alcuni lieviti selezionati valutando diversi parametri (zuccheri iniziali, rapporto glucosio/fruttosio, APA e temperatura di fermentazione), dimostrando che un lievito in particolare risulta essere maggiormente "fruttofilo" rispetto agli altri. Infine la parte finale illustra un procedimento di riavvio in caso di arresto fermentativo ed altri interventi possibili.

Comunque sia, le cause cui può essere dovuto un arresto fermentativo sono molteplici e difficili da individuare esattamente; ad oggi la prevenzione risulta il miglior intervento contro un eventuale problema in fase di fermentazione.

The aim of this thesis was to investigate the synergistic effects which ethanol and temperature have on the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, in order to better understand the stuck fermentation.

The work is essentially based on the research of academic articles relating to: changes in lipid composition and changes to ATP-ase, heat shock proteins, diagnosis of the stuck fermentation (types of fermentations profiles) and metabolic basis of the stuck fermentation (sugar uptake and transport of fructose). It was later reported an experience on fructose uptake by some selected yeasts considering different parameters (initial sugar, glucose/fructose ratio, APA and temperature of fermentation), demonstrating that a yeast in particular appears to be more "fructophilic" compared to the other. Finally the final part illustrating a method of restart in case of arrest fermentation and other possible interventions.

However, the causes of which may be due to a stuck fermentation are numerous and difficult to identify exactly; now prevention is the best intervention against a possible problem during wine fermentation.

Introduzione

Fermentazioni stentate ed arresti di fermentazione sono da sempre un problema molto sentito in ambito vinicolo ed hanno impatto, oltre che sulla qualità del vino, anche dal punto di vista economico. Se ancora oggi tali problemi si riscontrano in molte cantine, la ragione è da imputare principalmente ad un cambiamento nelle varietà di uve coltivate, che producono mosti con elevate concentrazioni zuccherine, maggiormente difficili da fermentare. Oltre a questo, vari fattori concorrono a rendere un mosto suscettibile ad arresti di fermentazione. Scarsa nutrizione azotata, eccessive (alte o basse) temperature, accumulo di etanolo, scorrette pratiche enologiche, contaminazioni microbiche e presenza di composti tossici (fungicidi), sono tutte cause potenziali che possono portare a fermentazioni incomplete.

L'arresto fermentativo è un problema che enologi ed enotecnici si trovano a dover fronteggiare abbastanza frequentemente nelle cantine dove:

- Il controllo della temperatura non è attuato per scelta aziendale;
- Il controllo della temperatura è fatto in maniera dozzinale;
- Si riscontra la mancanza di adeguati sistemi di refrigerazione dei vasi vinari.

La causa solitamente è da imputarsi ad una errata cinetica di fermentazione: all'inizio *Saccharomyces cerevisiae* fermenta velocemente lo zucchero presente (soprattutto il glucosio); la temperatura aumenta, favorendo questo metabolismo, in quanto il lievito è un microrganismo tipicamente mesofilo. Tuttavia, con l'aumentare della quantità di etanolo, l'attività inibente di questo composto alla fine prevale, proprio perché sostanzialmente il lievito non si è adattato gradualmente al cambiamento nell'ambiente ad esso circostante. A questo punto, c'è il rischio di incorrere nell'arresto di fermentazione; di solito si ritrova nel mezzo un residuo zuccherino (in particolar modo fruttosio) che va dai 6 ai 35-40 g/l ed una concentrazione di etanolo dai 10 ai 13-14% vol. È facilmente intuibile che far ripartire un vino "fermo" in queste condizioni è oltremodo difficoltoso.

Il presente lavoro si propone di analizzare in cosa consiste un arresto di fermentazione e gli effetti che temperatura ed etanolo hanno sul metabolismo di

Saccharomyces cerevisiae. In un secondo momento, spiegare le condizioni in cui generalmente si trovano il mosto/vino ed il lievito nel caso di una fermentazione bloccata; ed infine valutare come riconoscere un probabile arresto di fermentazione e come agire di conseguenza per ovviare al problema.

Arresto fermentativo

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

Le fermentazioni incomplete o "arrestate", sono definite come **"fermentazioni in cui si ritrova un residuo zuccherino maggiore, rispetto alla concentrazione di glucidi desiderata alla fine della fermentazione alcolica"**. Prendendo il caso dei vini rossi, la fermentazione è solitamente portata a termine in un periodo di 7-10 giorni. Al contrario, una fermentazione lenta e stentata richiede ovviamente, molto più tempo, a volte anche mesi, per fermentare completamente tutti gli zuccheri. Il lento consumo degli zuccheri è un indicatore di avverse condizioni ambientali o fisiologiche, per cui queste fermentazioni sono le più suscettibili ad un eventuale arresto fermentativo. Il fatto di avere alte concentrazioni zuccherine residue, fa sì che questi vini debbano essere seguiti con particolare attenzione al fine di evitare proliferazioni microbiche; va da sé inoltre, che non possono essere imbottigliati e messi sul mercato vini non stabili dal punto di vista microbiologico.

La velocità di fermentazione è funzione, sia della biomassa vitale presente, sia del tasso di utilizzo degli zuccheri da parte delle singole cellule. Per questo motivo i fattori che limitano la crescita o inducono la morte cellulare, riducendo la biomassa vitale, causano un decremento nella metabolizzazione dei glucidi, che si può trasformare in un arresto di fermentazione. Una fermentazione stentata si può verificare anche nel caso in cui si abbia una diminuzione della velocità di assimilazione degli zuccheri da parte delle singole cellule vitali, purtuttavia rimanendo alta la biomassa totale di queste.

Le circostanze che favoriscono gli arresti fermentativi possono essere solitamente minimizzate, favorendo così l'andamento della fermentazione fino al completo utilizzo degli zuccheri. Comunque sia, diagnosi precise ed accurate delle cause degli arresti di fermentazione sono fondamentali per poter eliminare correttamente e

tempestivamente lo stress a cui si trova sottoposto il lievito. Questo perché una volta che le cellule hanno perduto la loro vitalità o si sono adattate in maniera permanente alle avverse condizioni ambientali, riducendo il consumo di zuccheri, è molto difficile ripristinare la normale velocità di fermentazione. Solitamente, una fermentazione che tende ad arrestarsi non è "visibile" fintanto che la velocità di fermentazione non inizia a rallentare in modo anomalo. A questo problema in fase diagnostica si somma il fatto che spesse volte, quando l'andamento fermentativo decresce in modo repentino, è troppo tardi per modificare le condizioni avverse, o prevenire lo stress del lievito.

Ad oggi tuttavia, il maggior impedimento alla rapida identificazione di un arresto fermentativo, la sua corretta diagnosi ed il trattamento con cui intervenire in virtù della sua causa, è ancora la mancanza di adeguate informazioni sulla biologia del lievito durante la fermentazione del mosto d'uva. Si hanno infatti parecchie informazioni sulla biologia cellulare, sul metabolismo, sulla fisiologia ed anche sull'adattamento agli stress da parte di *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni di laboratorio. Nonostante ciò, questo organismo è stato poco "caratterizzato" nella condizione di maggior interesse enologico, ovvero il normale ambiente del mosto d'uva; e sappiamo bene che le condizioni di laboratorio non riflettono esattamente l'ambiente in cui avviene la fase di fermentazione, durante una qualsiasi vinificazione.

Influenza di etanolo e temperatura sulla cinetica di fermentazione

Si sa che diversi fattori hanno impatto sulla velocità di fermentazione e possono portare a fermentazioni stentate o incomplete:

- Carenza di nutrienti;
- Tossicità da etanolo;
- Tossicità da acidi grassi ed organici;
- Presenza di fattori-killer o altre tossine prodotte da microrganismi;
- Squilibri dal punto di vista ionico;
- Temperature estreme (alte e basse);
- Residui di insetticidi e antiparassitari;
- Competizione microbica;
- Pratiche enologiche scorrette (eccessivo uso di SO_2, eccessiva chiarifica dei mosti, mancanza di agitazione e mescolamento della massa da fermentare, scarsa attenzione alle temperature).

I fattori sopra elencati, oltre ad agire in maniera individuale, interagiscono in modo sinergico ed in combinazione possono avere un'inibizione anche maggiore. Questo è il tipico caso di due fattori che verranno analizzati di seguito: **etanolo e temperatura**.

L'equazione chimica della fermentazione alcolica:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

corrisponde ad una variazione di energia libera di 40 kcal per molecola di zucchero fermentato. Da questa, si ricavano 2 molecole di ATP (7,3 Kcal per ognuna); la differenza, circa 25 Kcal, è energia inutilizzata, la quale viene dissipata sotto forma di calore e provoca il riscaldamento della vasca di fermentazione. Tale aumento di temperatura comunque dipende da vari fattori:

- Tenore zuccherino iniziale;

- Temperatura iniziale;
- Velocità di fermentazione;
- Materiale e dimensioni dei vasi vinari in cui avviene la fermentazione alcolica;
- Ubicazione della cantina;
- Arieggiamento della cantina.

L'intensità respiratoria e fermentativa di *S. cerevisiae* sono profondamente influenzate dalla temperatura (tabella 1).

Temperatura	Intensità respiratoria	Intensità fermentativa
15 °C	4,2	118
20 °C	6,7	168
25 °C	9,6	229
30 °C	11,4	321
35 °C	6,2	440
40 °C	3,0	376

Tabella 1 - Intensità respiratoria e fermentativa media di diverse varietà di *S. cerevisiae* in funzione della temperatura (mm^3 di O_2 consumato e di CO_2 sviluppata per grammo di lievito secco attivo e per ora) (Ribéreau-Gayon, 1975)

Fra 15 e 35 °C, la fase di latenza e l'avvio della fermentazione, sono tanto più brevi quanto più alta è la temperatura. Tuttavia la maggior parte delle volte, nella pratica di cantina, si riscontra che una temperatura troppo elevata (30 – 35 °C) durante la fase di moltiplicazione dei lieviti accelera l'avvio della fermentazione, ma ne diminuisce notevolmente la vitalità, favorendo gli arresti fermentativi [1].

Per quanto riguarda l'etanolo, l'elevata tolleranza e la notevole produzione di questo composto, riscontrabile in *S. cerevisiae* sono le qualità più conosciute ed i fattori che maggiormente hanno contribuito all'elevato numero di ricerche affermate su questo lievito. L'etanolo prodotto nel corso della fermentazione alcolica, rallenta l'assimilazione dei composti azotati, modificando la permeabilità delle membrane cellulari. Inoltre, nel caso di un arresto fermentativo, quando il lievito viene reinoculato per far ripartire la fermentazione alcolica, la presenza di etanolo allunga la fase di latenza e riduce la moltiplicazione cellulare.

alcol aggiunto (% vol.)	ritardo nella partenza di fermentazione	n° di lieviti (10^6/ml)	grado alcolico raggiunto (% vol.)	grado alcolico formato (% vol.)	zucchero residuo (g/l)	azoto assimilato (mg/l)
+ 0	1 gg	80	14,0	14,0	2	252
+ 2	2 gg	67	15,6	13,6	6	233
+ 6	4 gg	62	18,2	12,2	15	194
+ 10	12 gg	30	16,0	6,0	125	80

Tabella 2 - Influenza dell'aggiunta di etanolo nel mosto sul decorso della fermentazione (fermentazione in anaerobiosi controllata; T = 25 °C) (Ribéreau-Gayon, 1975)

Molti dei cambiamenti indotti dall'etanolo, sono identici a quelli causati dagli stress termici; esiste dunque una sinergia molto marcata fra questi due fattori. Per questo motivo, i cambiamenti dovuti all'etanolo sono tanto più evidenti, quanto più alta è la temperatura. La tossicità dell'etanolo è generalmente attribuita all'affinità di questo composto per l'ambiente idrofobico dei doppi strati fosfolipidici delle membrane; il risultato è una modificazione nella struttura della membrana, che ha effetti negativi su molti processi associati ad essa [2].

L'aumento della tolleranza a vari stress è, di solito, inducibile. Nelle cellule vegetative del lievito, la tolleranza all'etanolo è frequentemente indotta dalle stesse condizioni che permettono un aumento della termo-tolleranza. Molti fattori determinano o meno la tolleranza dei lieviti alla temperatura e all'etanolo. Proteine da shock termico (Hsp, *heat shock proteins*), lipidi di membrana, attività ATP-asica delle membrane cellulari, trealosio e diversi altri cambiamenti, sono tutti importanti nella risposta agli stress.

Principali elementi caratterizzanti gli shock termici e l'esposizione a etanolo

Cambiamenti nella composizione lipidica

I lipidi della membrana cellulare del lievito sono essenzialmente fosfolipidi (fosfatidiletanolammina, fosfatidilcolina e fosfatidilinositolo i più rappresentati) e steroli. Gli acidi grassi dei fosfolipidi delle membrane contengono un numero pari (da 14 a 24) di atomi di carbonio; gli acidi C16 e C18 sono i più abbondanti. Possono essere saturi, acido palmitico (C16) e acido stearico (C18), oppure insaturi, acido oleico (C18:1), acido linoleico (C18:2) e acido linolenico (C18:3) [1]. Gli steroli sono sintetizzati nei mitocondri in aerobiosi, durante la fase di crescita del lievito; il più importante è l'ergosterolo. Le catene idrofobe degli acidi grassi del doppio strato fosfolipidico della membrana possono trovarsi in uno stato ordinato e rigido, oppure in uno stato relativamente disordinato e fluido. L'ergosterolo, come il colesterolo nei mammiferi, è un importante regolatore della fluidità della membrana plasmatica. Si interpone nel doppio strato fosfolipidico perpendicolarmente al piano della membrana; in questo modo ostacola la cristallizzazione delle catene di acidi grassi a bassa temperatura.

L'etanolo sembra irrigidire la membrana in un modo complesso; la polarità è ridotta dallo stesso in ambiente acquoso, ma al contrario viene incrementata in un ambiente idrofobico. In presenza di etanolo, la cellula risponde aumentando del doppio il contenuto in acidi grassi insaturi, mentre la quantità di ergosterolo aumenta di circa 18 volte; inoltre viene incrementata anche la porzione di acidi grassi saturi a lunga catena [3]. Va ricordato che l'etanolo è una molecola polare, per cui non si ritrova in elevate concentrazioni in ambienti non polari, come può essere l'interno del doppio strato fosfolipidico. È stato proposto invece, che l'etanolo abbia impatto sulle funzionalità delle membrane, attraverso interazioni polari e legami a idrogeno con le teste polari dei fosfolipidi e le proteine integrali di membrana. I

cambiamenti nel grado di insaturazione degli acidi grassi, la diminuzione del contenuto di proteine e l'aumento di ergosterolo, sarebbero così tutti effetti per contrastare l'azione denaturante dell'etanolo sulle teste idrofile degli acidi grassi e sulle proteine, piuttosto che cambiamenti per contrastare l'alterazione della fluidità delle membrane cellulari.

Oltre alla composizione in steroli, acidi grassi saturi a lunga catena ed acidi grassi insaturi, è importante soprattutto la disponibilità di questi nel mezzo da fermentare, in virtù del fatto che tali composti non possono essere direttamente sintetizzati dal lievito in condizioni anaerobiche (fermentazione alcolica). Infatti, gli enzimi *acido grasso desaturasi* e *squalene ossidasi*, necessitano di O_2 molecolare come accettore di elettroni; per questo motivo il mosto d'uva contiene acidi grassi insaturi e steroli vegetali che possono essere utilizzati dal lievito. Va detto tuttavia che i vari steroli ritrovati nella bacca d'uva (acido oleanolico, stigmasterolo, β-sitosterolo, campesterolo) hanno solamente i requisiti "strutturali" per poter rimpiazzare l'ergosterolo. Non hanno alcuna attività regolatrice nel controllo delle funzioni proteiche e sulle membrane; non sono efficaci come l'ergosterolo per la tolleranza all'etanolo ed, al contrario, è stato visto che il loro apporto al mosto d'uva provoca una fermentazione stentata.

Cambiamenti a livello di ATP sintasi

L'*ATP-asi* delle membrana plasmatica è una proteina integrale. L'idrolisi dell'ATP, mediata da questo enzima fornisce l'energia necessaria per il trasporto attivo dei soluti attraverso la membrana; simultaneamente la suddetta idrolisi crea un passaggio di protoni dall'interno verso l'esterno della cellula del lievito. Questo fenomeno garantisce che sia mantenuto un gradiente di potenziale elettrochimico lungo la membrana plasmatica [2]. Quando le cellule di lievito sono esposte a livelli di temperatura o etanolo sub-letali, l'attività H^+-ATP-asica è drasticamente stimolata. L'aggiunta dei due fattori infatti, provoca questa attivazione che è subito rilevabile come un incremento nell'estrusione di protoni da cellule intatte. Al contrario, la semplice aggiunta di etanolo a cellule cresciute in condizioni di laboratorio, non porta all'attivazione dell'*ATP-asi*, ma bensì ad una sua parziale

inibizione. Eccezionalmente l'effetto di questa inibizione, dovuta all'aggiunta di etanolo alle cellule in condizioni di laboratorio, è minore se le membrane cellulari provengono da cellule adattate alla presenza di etanolo. Ciò può essere dovuto ai cambiamenti nella composizione lipidica della membrana, in risposta all'adattamento nei confronti dell'etanolo.

Nonostante la stimolazione dell'*ATP-asi,* i livelli di proteina di questa pompa protonica mostrano un rapido declino, anche sottoponendo l'enzima a brevi periodi di entrambi gli stress, stabilizzandosi al 35 – 50% del loro livello iniziale. Questa rapida diminuzione delle proteine ATP-asiche di membrana contrasta con quanto detto prima, cioè con la stimolazione delle *ATP-asi*. In realtà, entrambe le modificazioni avvengono in maniera simultanea in caso di un'esposizione repentina al calore o all'etanolo. Ambedue i processi probabilmente influenzano la capacità delle cellule di ristabilire e sostenere l'omeostasi (ovvero il mantenimento dell'equilibrio interno al variare delle condizioni ambientali) immediatamente dopo gli stress subiti.

L'incremento dell'attività ATP-asica, nelle cellule stressate è causa di una maggiore estrusione di protoni; questo efflusso contrasterebbe la dissipazione della forza proton-motrice, risultante dall'aumento della permeabilità della membrana. Quanto detto è probabilmente una delle ragioni per cui le mutazioni che alterano l'attività H^+-ATP-asica della membrana plasmatica possono influenzare la tolleranza cellulare, sia al calore, che all'etanolo. Gli stress termici e da etanolo richiedono un notevole incremento in termini di dispendio energetico da parte delle cellule, per permettere a queste ultime di ristabilire e successivamente mantenere l'omeostasi.

Proteine da shock termico

Gli stress, sia da etanolo, che da temperature sub-letali inducono essenzialmente identici cambiamenti nella sintesi delle proteine. Oltre una certa soglia, entrambi gli stress inducono fortemente la codifica di Hsp (heat shock proteins), con la simultanea soppressione della maggior parte delle proteine che venivano sintetizzate prima dello stato di stress. Sono chiamate Hsp appunto perché consentono di contrastare l'effetto denaturante del calore; la loro sintesi è

fortemente dipendente dallo stress termico. Tuttavia sono indotte anche da una notevole varietà di altri stress, fra cui ovviamente la presenza di etanolo. In cellule vegetative di *S. cerevisiae*, cresciute a 25 °C, la soglia minima di etanolo, per ottenere un'apprezzabile induzione di Hsp è del 4 – 6 %vol. L'etanolo aggiunto al di sotto di questo livello produce soltanto piccole alterazioni alla sintesi proteica.

Ci sono differenti proteine di shock termico ed ognuna è indotta da particolari livelli di concentrazione di etanolo [2]. La Hsp104, Hsp70 ed Hsp26, ad esempio, sono indotte progressivamente all'aggiunta di etanolo dal 4 al 10 %vol. Al contrario, la Hsp82 e la proteina associata alla membrana plasmatica Hsp30, presentano la loro massima induzione in corrispondenza di 6 %vol. di alcol etilico. Questo significa che da un punto di vista strettamente tecnico, solo alcune di esse possono dare un contributo reale ed apprezzabile alla resistenza verso l'etanolo. Ad oggi, è stato dimostrato che la perdita di Hsp104 riduce la tolleranza a etanolo, calore e quella indotta verso l'etanolo tramite riscaldamento.

Induzione di Hsp30

L'Hsp30 è una proteina integrale di membrana, la sola Hsp associata alla membrana plasmatica. È indotta a livelli simili, sia da uno shock termico, che da un trattamento con 6 %vol. di etanolo, sebbene sembri essere apprezzabile ad una concentrazione in alcol di almeno 8 %vol. La perdita di questa proteina da parte delle cellule si traduce solitamente in una minore produzione di biomassa, al termine di una fermentazione in batch. Comunque sia, la perdita di Hsp30 non ha effetti sulla tolleranza alle alte temperature, né su quella nei riguardi dell'etanolo. Al contrario, è molto probabile che la funzione dell'Hsp30 sia quella di conservazione energetica, riducendo l'attività H^+-ATP-asica della membrana plasmatica, in modo che l'*ATP-asi* non consumi completamente le riserve energetiche della cellula. Si ritiene infatti che l'azione H^+-ATP-asica della membrana consumi dal 15 al 50% di tutto l'ATP generato da cellule non stressate. Calore ed etanolo indurrebbero un aumento di questo consumo, che conseguentemente implicherebbe una maggior domanda energetica da parte della cellula. Una volta adattate allo stress, di modo che la crescita possa riprendere, le cellule riescono a mantenere bassi livelli di ATP e ciò è dovuto alla perdita di Hsp30, riducendo la loro attività H^+-ATP-asica.

Elementi promotori di geni sensibili al calore e all'etanolo

Due elementi promotori di geni, l'elemento shock termico (HSE, heat shock element) e l'elemento di risposta allo stress generale (STRE, stress element), hanno dimostrato l'attivazione diretta dei geni per lo shock termico nei lieviti, in risposta a stress termici. Questi due elementi differiscono per gli stress che causano la loro attivazione. L'HSE è attivato esclusivamente in cellule vegetative durante uno shock termico; al contrario l'STRE è indotto dall'etanolo e anche da diversi altri stress, inclusi quello termico e quello osmotico. In *S. cerevisiae* alcuni geni indotti dal calore sono controllati da entrambi gli elementi, pochi hanno soltanto l'HSE, mentre una terza categoria sembra possedere unicamente l'STRE.

Diagnosi dell'arresto di fermentazione

Il primo passo nell'identificazione delle cause che portano ad un rallentamento nella velocità di fermentazione, è avere una conoscenza il più possibile approfondita e completa delle caratteristiche di un normale profilo di fermentazione. I vari ceppi di lieviti selezionati che si trovano in commercio mostrano una notevole varietà di "normali profili di fermentazione", ovvero ogni lievito ha una sua propria cinetica fermentativa. Tale cinetica oltre che dal ceppo di lievito, dipende anche da altri numerosi fattori, quali ad esempio:

- pH del mezzo;
- Temperatura;
- Livello di solidi;
- Procedura di moltiplicazione ed inoculo.

Tutti questi fattori possono avere impatto sul "normale" decorso della fermentazione, senza tuttavia portare ad un eventuale arresto o rallentamento della stessa. Cosa è necessario ad un particolare ceppo di lievito e le condizioni di fermentazione favorevoli ad esso devono essere definite chiaramente, al fine di poter essere in grado di stabilire con sicurezza un eventuale comportamento anomalo da parte del lievito. In molti casi infatti, la mancanza di informazioni riguardanti un normale decorso fermentativo compromette seriamente la

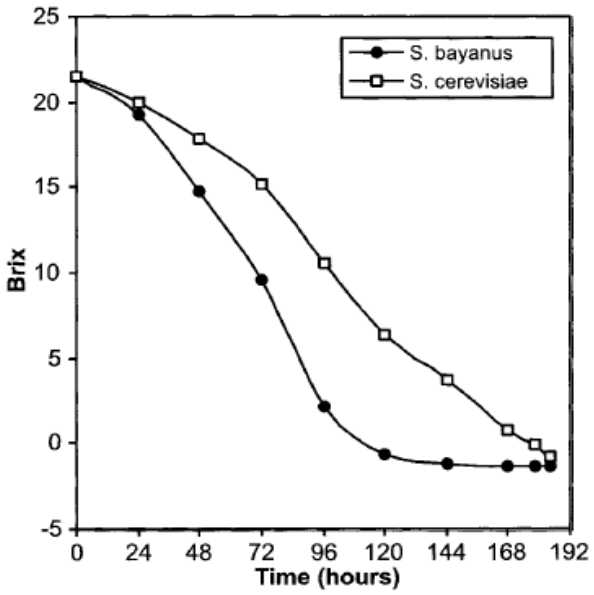

Figura 1 - Profili di fermentazione di due differenti ceppi di lievito nei mosti di Chardonnay

capacità dell'enologo, o chi di dovere, di identificare correttamente e rapidamente i problemi di fermentazione.

Generalmente ci sono 2 tipi di profili fermentativi (Figura 1):

- *Saccharomyces cerevisiae* tipo Epernay II (UCD 750, Redstar Cote des Blancs, Uvaferm CEG). Fermentatore lento, questo ceppo mostra una lunga fase di latenza ed un vigore fermentativo massimo piuttosto ridotto, ma di durata prolungata;
- *Saccharomyces bayanus* tipo presa di schiuma (UCD 796, Redstar Premier Cuvée, Uvaferm PM, Maurivin PDM, Fermivin PdM, Lalvin EC-1118) ed altri lieviti notoriamente vigorosi dal punto di vista fermentativo mostrano, al contrario, corte fasi di latenza e un vigore fermentativo che aumenta appena usciti dalla fase di latenza, ma che tuttavia non viene mantenuto a lungo, come nel caso dell'Epernay II. Questo tipo di lieviti inoltre, mostra un netto e marcato passaggio nella velocità di fermentazione da una prima fase rapida, ad una fase finale molto più lenta.

Nel definire cosa è "normale" per un determinato ceppo di lievito, ci sono diversi componenti che possono essere valutati per caratterizzare i vari profili di fermentazione [4]:

- Lunghezza della fase di latenza;
- Vigore fermentativo massimo e la sua durata;
- Punto di transizione (in cui l'etanolo diventa inibente, oppure finisce l'azoto assimilabile);
- Cambiamento del vigore fermentativo dopo il punto di transizione;
- Comparazione dei vigori fermentativi pre-punto di transizione e post-punto di transizione;
- Tempo totale di fermentazione (dalla fase di latenza alla completa metabolizzazione degli zuccheri).

Tutti questi parametri possono essere misurati facilmente ed i risultati ottenuti adoperati per la costruzione di profili storici, definendo in tal modo il "normale" comportamento di un ceppo di lievito (Figura 2) in una particolare cantina. Questo tipo di strategia può inoltre essere usato anche nelle fermentazioni spontanee. La presenza di questi dati nelle cantine permetterebbe una più rapida determinazione di performance fermentative anormali.

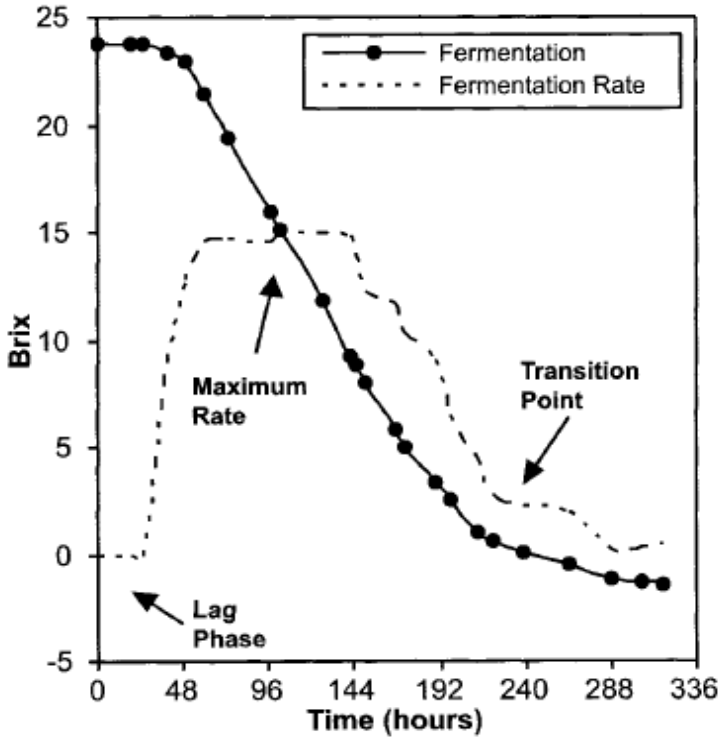

Figura 2 – Profilo di fermentazione con un marcato punto di transizione

Profili fermentativi anomali

Il modello di consumo degli zuccheri può essere un utile strumento diagnostico nel caso dei problemi fermentativi.

Le fermentazioni lente sono essenzialmente suddivise in 4 tipi, come si può notare osservando la figura 3:

- Inizio lento, con una lunga fase di latenza ed un decorso fermentativo che poi diventa normale;
- Inizio normale, ma fermentazione che tende ad arrestarsi con l'andare del tempo;
- Fermentazione stentata per tutto il tempo;
- Brusco arresto fermentativo, di solito quando siamo già nelle ultime fasi di fermentazione.

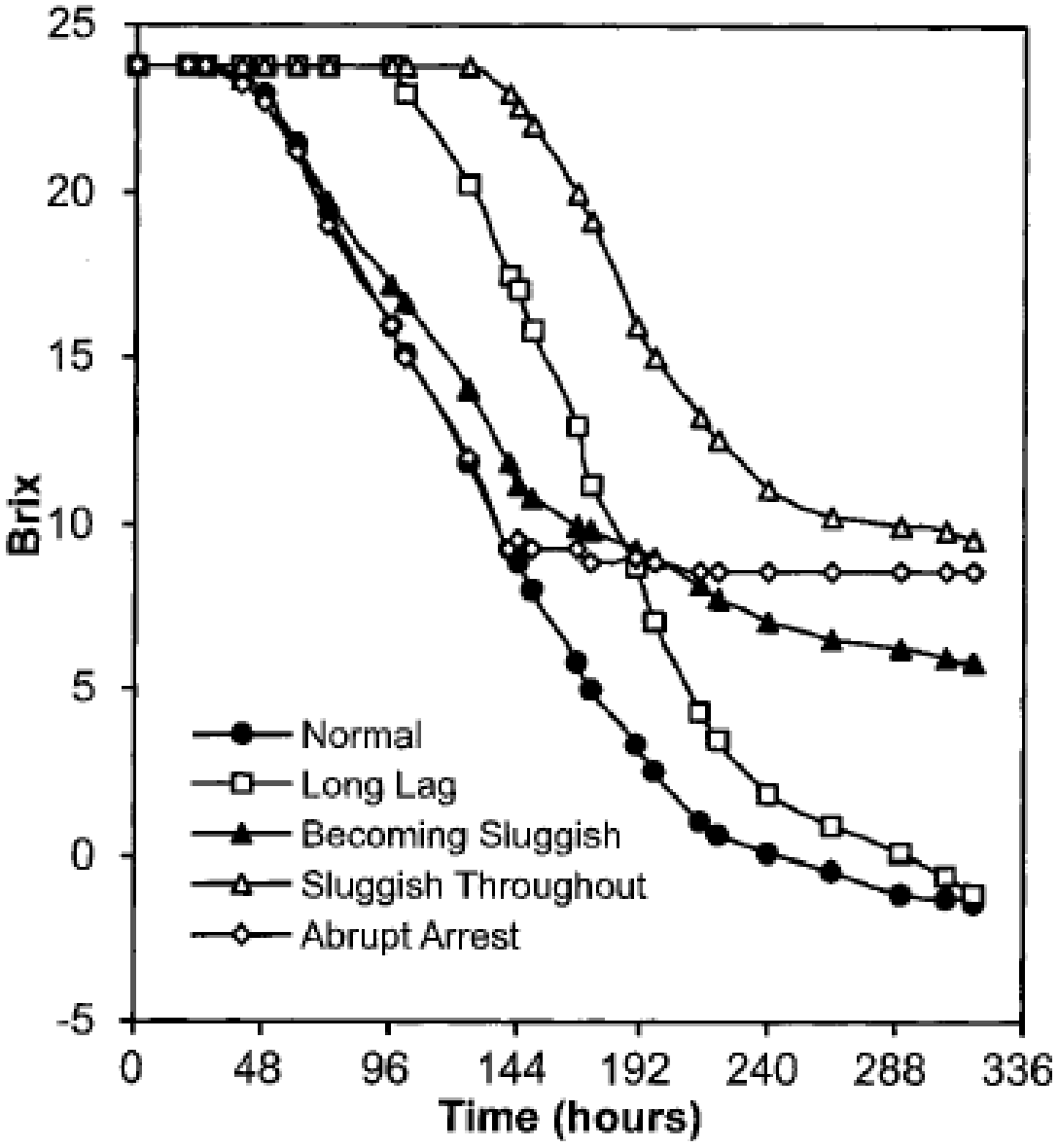

Figura 3 - Esempi di differenti profili fermentativi in fermentazioni lente ed incomplete

Nelle fermentazioni del primo tipo, con inizio stentato, i lieviti generalmente riescono a fermentare tutti gli zuccheri arrivando alla completa "secchezza". Comunque sia, l'iniziale fase di latenza genera un problema di possibile proliferazione di organismi non-*Saccharomyces* che portano ad un'elevata competitività nel mosto d'uva. Gli altri tre tipi di fermentazione lenta possono eventualmente, sia portare a termine la fermentazione arrivando alla secchezza, sia arrestarsi e bloccarsi con un determinato contenuto zuccherino residuo. I vari profili fermentativi illustrati sono ognuno una conseguenza di distinti tipi di stress, imposti al lievito in un determinato momento.

Fermentazione con inizio lento, che si normalizza con l'andare del tempo

Generalmente una lunga fase di latenza iniziale sta a significare la presenza di una tossina, un'alta viscosità, oppure una deficienza nella popolazione vitale dei lieviti scelti per portare a compimento la fermentazione; si può notare questo tipo di profilo, sia nelle fermentazioni con lieviti selezionati, sia in quelle spontanee.

In quest'ultimo caso di solito, l'avvio lento può essere dovuto semplicemente ad un basso numero di lieviti nel mosto, senza che vi siano altri particolari problemi. Sappiamo che la fermentazione si conclude abbastanza bene quando ad inizio fermentazione si ha un numero di cellule vitali/ml di *Saccharomyces*, che va da 100 a 1000; su questa quantità influiscono ovviamente le condizioni del mosto ed il numero di altri tipi di microrganismi. Gli acini che arrivano in cantina dal vigneto, possono talvolta essere deficienti in quanto a popolazione di *Saccharomyces cerevisiae* (< 100 cellule vitali/ml); tuttavia si nota che appena dopo i primi giorni di pigiatura, il passaggio del mosto attraverso le varie attrezzature di cantina aumenta non poco la popolazione presente. Si può ottenere un numero di cellule soddisfacente (10^4 - 10^5 cellule vitali/ml) solamente facendo passare il mosto attraverso le attrezzature di cantina, a seconda della sanitizzazione della cantina e del ceppo che ha colonizzato la stessa. Il mantenimento del mosto a basse temperature rende favorevole la colonizzazione del mezzo da parte di popolazioni di *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), a discapito delle popolazioni di *Saccharomyces* presenti, questo in virtù della poca tolleranza alle basse temperature di questo lievito rispetto ad altri. In queste fermentazioni *Saccharomyces cerevisiae* prende poi il sopravvento e riesce ad arrivare alla secchezza; questo a patto che il consumo di nutrienti da parte dei non-*Saccharomyces* non abbia creato una situazione di carenza, e lieviti e batteri non abbiano prodotto sostanze tossiche. L'aggiunta di azoto assimilabile ai mosti a basse temperature, va valutata attentamente, in quanto c'è il serio rischio di favorire la crescita batterica e dei lieviti non-*Saccharomyces*, che portano alla produzione di sostanze tossiche per il lievito fermentante e prodotti come l'acido acetico. Tanto più bassa è la popolazione iniziale di *Saccharomyces cerevisiae*, tanto più il mosto dovrà fornire i componenti necessari alla crescita delle cellule. Per esempio: un mosto con una concentrazione

iniziale di *Saccharomyces* di 100 cellule/ml, avrà da compiere 13 generazioni per raggiungere un livello normale di inoculo di 10^6 cellule/ml; al contrario, la fermentazione di un mosto avente già una popolazione iniziale di 10^6 – 10^7 cellule/ml, sarà condotta in massima parte da cellule che non si stanno riproducendo, per cui appare chiaro che i requisiti nutrizionali saranno ben diversi in un caso e nell'altro.

Prendendo in esame le fermentazioni svolte con lieviti selezionati invece, una delle maggiori cause che porta ad avere una lunga fase di latenza, è preparare l'inoculo in maniera dozzinale. L'inoculo per l'avvio della fermentazione può avvenire in vari modi:

- Utilizzando direttamente il lievito secco attivo reidratato;
- Adoperando la tecnica dello starter;
- Utilizzando mosto in fermentazione da altri tini di vinificazione.

Nel caso della reidratazione del lievito è molto importante seguire le istruzioni riportate sulle confezioni, facendo particolare attenzione alla temperatura (ottimale 38 – 41 °C). La temperatura massima non deve MAI essere superata, altrimenti si avrebbe uno shock per il lievito; stesso discorso dicasi per la temperatura minima, che porterebbe ad un decremento nella vitalità cellulare. È oltremodo importante il mezzo in cui avviene la reidratazione: alcuni ceppi tollerano la reidratazione in acqua o mosto, mentre altri vanno riattivati solo ed esclusivamente in acqua (che comunque è preferibile sempre); l'uso del vino per la reidratazione non è raccomandabile, poiché frequentemente porta problemi di vitalità dovuti essenzialmente allo shock da etanolo sul lievito. Gli altri suggerimenti per la reidratazione vanno comunque tutti seguiti: i lieviti vanno aggiunti lentamente ed agitando l'acqua per avere una miscelazione omogenea, evitando la formazione di grumi; non lasciare il lievito in acqua per più di 15-20 minuti ed alla fine di questo tempo, aggiungere al mosto. Le cellule di lievito, arrivate a 10µm di diametro, si depositano nel mosto con una velocità di circa 1 m/gg; questo significa che nei piccoli serbatoi di fermentazione (specialmente barriques e piccoli tini di legno), è importante che la fermentazione inizi prima che tutti i lieviti, inoculati o no, si siano

depositati sul fondo, creando così un ambiente non ideale per l'assimilazione di composti durante la fase di latenza. Inoltre, una volta depositatisi, le cellule di lievito tendono ad impacchettarsi insieme, col risultato di una ridotta superficie di scambio per il trasporto degli zuccheri. In virtù di quanto detto, si capisce quanto sia necessario agitare ed arieggiare la massa soprattutto nei primi gironi di fermentazione, quando la popolazione di lievito è in fase esponenziale. In più, questa pratica rifornisce i lieviti dell'ossigeno necessario a formare steroli e acidi grassi a lunga catena, che proteggono dall'etanolo.

Nel caso della fermentazione in più barriques di uno stesso mosto, a volte si osserva il verificarsi di apparenti arresti fermentativi o fermentazioni stentate; questo si spiega con lievi, ma significanti differenze nel contenuto di solidi e nutrienti. Solitamente succede quando le varie frazioni di mosto derivano da un vaso vinario mal rimescolato, oppure da una vasca che ha subito una decantazione a freddo.

Anche l'uso di mosto in fermentazione come inoculo può essere problematico. Se il contenuto di etanolo del mosto in fermentazione è troppo alto al momento in cui viene aggiunto al mezzo da fermentare, il lievito può subire uno shock osmotico. Le cellule che hanno già adattato le proprie membrane e le loro proteine alle elevate e basse concentrazioni, rispettivamente di etanolo e di zuccheri, hanno da riadattarsi alla brusca diluizione dell'etanolo nel mosto fresco. Nella pratica vinicola osserviamo che i migliori risultati nell'uso di questa tecnica, si ottengono se la concentrazione di etanolo nel mosto che verrà inoculato, è intorno al 3 – 5%, mai superiore al 7% (v/v). Un altro problema nell'uso di mosto in fermentazione come inoculo è il possibile utilizzo di colture "esauste" dal punto di vista nutritivo. Se viene utilizzato il lievito secco attivo come inoculo, i mosti con scarsi micronutrienti non porteranno ad una situazione di "fame" per il lievito, in quanto tali colture sono già state arricchite in micronutrienti. Al contrario, se l'inoculo è fatto utilizzando mosto in fermentazione, le carenze in micronutrienti possono portare eventualmente non sono un'inibizione dell'inizio di fermentazione, ma addirittura ne possono compromettere il suo decorso per il meglio. Nella pratica di cantina si riscontra che uno starter può essere adoperato una volta senza che incorrano ritardi nell'avvio della fermentazione; con

un secondo passaggio possono tuttavia sorgere inconvenienti, mentre un eventuale terzo passaggio porta quasi sicuramente ad ottenere fermentazioni stentate e molto probabilmente, anche arresti fermentativi. Quanto detto è virtù del fatto che di solito, il mosto d'uva provvede a tutte le vitamine, in piccola parte ma comunque in quantità sufficiente, inclusa soprattutto la biotina, che non è sintetizzabile dai lieviti.

Inizio normale della fermentazione, che tende ad arrestarsi col tempo

Frequentemente la fermentazione inizia normalmente raggiungendo, sia la massima quantità di biomassa, sia il massimo vigore fermentativo; tuttavia non riesce a mantenere il consumo di zuccheri e gradualmente rallenta fino a divenire stentata. Questo tipo di profilo suggerisce che i nutrienti necessari alla crescita fossero abbondanti e le condizioni molto favorevoli alla proliferazione. Tali problemi in fermentazione sembrano essere dovuti alla difficoltà nel mantenimento dell'attività metabolica o della vitalità durante la fase stazionaria; una lieve carenza di fattori di sopravvivenza può infatti portare ad avere problemi per quanto riguarda la tolleranza all'etanolo o all'acetaldeide, che non sarà visibile fintanto che la concentrazione alcolica non avrà raggiunto una determinata soglia. Oltre a ciò, il ruolo degli acidi grassi e degli steroli nella tolleranza all'etanolo è ben conosciuto, per cui si potrebbe addizionare il mosto con questi due componenti. È tuttavia importante aggiungerli prima dell'arresto di fermentazione, altrimenti potrebbe essere troppo tardi per porvi rimedio. Questo tipo di profilo è quello che si riscontra maggiormente nelle fermentazioni difficili di mosti con elevato tenore zuccherino iniziale (specie derivanti da climi caldi o annate particolarmente siccitose); si potrebbe prevenire questi problemi "tagliando" i mosti suscettibili al problema con altri simili dal punto di vista organolettico e analitico, ma aventi gradazioni alcoliche probabili inferiori. Vi potrebbe essere inoltre la presenza di tossine da antiparassitari che sarebbero tanto più tossiche, quanto più alta è la concentrazione di etanolo. Anche uno squilibrio di ioni potassio ed idrogeno può portare a questo profilo fermentativo, suggerendo che i problemi nella regolazione dell'influsso di ioni H^+ all'interno della cellula, può seriamente avere riflessi nella fase stazionaria della popolazione di lievito. Si nota inoltre che un inoculo fatto con dosi eccessive di lievito (10^8 cellule/ml) ha come risultato una fermentazione stentata. In questi casi

infatti, le fermentazioni aventi una massima densità cellulare iniziano rapidamente, ma progrediscono in maniera più lenta rispetto a quelle in cui la popolazione cresce col progredire del tempo. È spiegabile col fatto che il tentativo da parte di un elevato numero di cellule di assimilare un limitato quantitativo di azoto può portare a uno stato cellulare debole nell'intera popolazione, che si manifesta però solamente in fase stazionaria.

Un'ulteriore causa di questo tipo di arresti fermentativi, può essere un lieve shock termico. Si sa che la sensibilità alla temperatura aumenta col crescere del contenuto di etanolo e, se una fermentazione viene raffreddata, la temperatura scendendo può influire in modo dannoso, a seconda di quanto viene abbassata questa e del tipo di refrigerazione adoperato. Il deposito prematuro delle fecce di lievito è un buon indicatore delle difficoltà nel mantenimento di un'attività metabolica durante la fase stazionaria.

Nei tini di vini rossi ancora in fermentazione è stato osservato il deposito prematuro delle fecce, seguito da una completa cessazione dell'attività fermentativa, dopo che la temperatura del mosto era stata abbassata di soli 2 °C. In molti casi, il riaggiustamento di questo parametro non porta ad incrementi nel vigore fermentativo; anche piccole variazioni di temperatura rispetto al range prediletto dal nostro ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* possono portare ad arresti fermentativi. Ad esempio: un mosto che ha iniziato la fermentazione a 12 °C e la finirebbe senza problemi se continuasse a questa temperatura, verosimilmente si arresterebbe se subisse un incremento di temperatura a 19 °C e viceversa.

Fermentazione stentata per tutto il tempo

Questo tipo di profilo fermentativo è solitamente indice di problemi legati al raggiungimento e mantenimento di una accettabile biomassa vitale. Le cause di ciò possono essere molteplici, tuttavia spesse volte sono riconducibili a problemi di crescita e/o vitalità cellulare. Il conteggio delle cellule totali e di quelle vitali di *Saccharomyces cerevisiae*, può essere facilmente usato per conoscere quanto una popolazione è sana; in normali condizioni fermentative infatti, al 2° – 3° giorno di fermentazione e con una temperatura fra i 18 e i 25°C, il numero di cellule nel mezzo dovrebbe collocarsi intorno a 10^7 - 10^8 cellule/ml, con una vitalità oscillante dall'80

al 100%. Se il numero di cellule e la vitalità cellulare di una popolazione di *Saccharomyces* in condizioni fermentative normali (senza eccessivi apporti di SO_2 o una bassa temperatura di fermentazione) sono sotto a questi livelli, c'è il serio rischio di avere una fermentazione stentata per tutta la sua durata e di incorrere in un eventuale arresto fermentativo.

Brusco arresto fermentativo, di solito nella fase finale della fermentazione

Abbiamo detto che un vino è "secco" e al sicuro da eventuali rifermentazioni degli zuccheri quando ha un residuo zuccherino inferiore ai 2 g/l, mentre l'assenza della percezione di dolcezza si ottiene a concentrazioni inferiori ai 5 g/l. Nella maggior parte degli arresti fermentativi si ritrova nel mosto-vino un residuo zuccherino che va dai 2 ai 10 g/l. Quando si riscontra un drastico arresto nel consumo degli zuccheri da parte del lievito, solitamente la causa è riconducibile ad uno shock traumatico subito da quest'ultimo. È il caso dell'esposizione a temperature estreme, che sono tanto più dannose, quanto più è elevata la concentrazione di etanolo. Le fermentazioni senza controllo della temperatura (soprattutto senza raffreddamento dei vasi vinari) possono raggiungere una temperatura inibitoria, dovuta al rilascio del calore durante il catabolismo dei glucidi. Questo può accadere nel caso di fermentazioni in barriques, aventi una superficie a contatto con l'esterno molto piccola rispetto al volume totale.

Basi metaboliche degli arresti fermentativi

Qualunque sia il tipo di arresto fermentativo, in tutti i casi si riscontra nel mosto-vino un residuo zuccherino ancora da fermentare. La diminuzione del consumo degli zuccheri è correlata ad una diminuzione nell'assimilazione degli stessi all'interno della cellula, al contrario le altre vie glicolitiche rimangono intatte ed attive. La perdita della capacità di trasporto degli esosi rappresenta un importante meccanismo di sopravvivenza per le cellule. I consumi di glucosio e fruttosio sono ridotti in risposta a varie condizioni ambientali e cellulari che portano allo stress. Carenza di nutrienti (macronutrienti e micronutrienti), pH bassi, mancanza di ossigeno, mancanza di adeguata agitazione, temperature estreme, presenza di sostanze tossiche, altri microrganismi, squilibri cationici e bassa tolleranza ad etanolo ed acetaldeide, hanno impatto sull'attività di trasporto degli esosi.

In condizioni di pH acido del mezzo (quale è appunto il mosto d'uva) l'omeostasi dei protoni è mantenuta essenzialmente da un bilancio fra il flusso degli H^+ pompati fuori dalla ATP-asi e l'influsso degli ioni H^+ all'interno della cellula per diffusione passiva attraverso il doppio strato fosfolipidico [6]. Va detto inoltre che l'etanolo altera questo delicato equilibrio, inibendo i trasportatori ed incrementando la diffusione passiva degli ioni agendo così, sia sul pH intracellulare, che sulla forza proton-motrice della membrana plasmatica. In virtù di quanto detto, se il pH intracellulare diventa troppo acido, la cellula in risposta a questo shock interrompe all'istante l'assimilazione degli esosi.

Assimilazione degli zuccheri in *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces possiede una famiglia multigenica di trasportatori chiamati **geni *HXT* (Hexose Transporters)**; sono 18 membri (da *HXT1* fino a *HXT17* e *GAL2*) e mostrano tutti un'elevata somiglianza (65% - 95%) nella sequenza codificante [8]. I vari trasportatori si differenziano considerevolmente tra di loro per quanto riguarda

la specificità e l'affinità verso il substrato. *HXT1* e *HXT3* codificano trasportatori con bassa affinità per il glucosio (K_m 50-100 mM), mentre *HXT6*, *HXT7* e *GAL2* sono trasportatori ad alta affinità (K_m 1-2 mM); *HXT2* ed *HXT4* posseggono invece una moderata bassa affinità (K_m 10 mM). Il trasportatore *HXT2*, Hxt2p, sembra possa ritrovarsi in stato, sia di bassa, che di alta affinità, suggerendo così che le condizioni ambientali potrebbero modificare la cinetica di questa proteina. È stato dimostrato che la cancellazione del gene *HXT2* porta ad un rallentamento della fermentazione alcolica, confermando così il suo ruolo cruciale nel trasporto del glucosio. Oltre ai geni *HXT* vi sono altri due geni associati, *SNF3* e *RGT2*, i quali codificano proteine regolatrici coinvolte nel rilevamento del glucosio, ma che tuttavia non sono implicate direttamente nel trasporto dello stesso. La proteina Snf3p è un sensore per basse concentrazioni di glucosio, mentre la Rgt2p lo è per alte concentrazioni. Uno dei fattori chiave regolante l'espressione dei geni *HXT* è lo stesso glucosio. I geni trasportatori sono regolati sia dall'induzione glucosidica, che dalla repressione glucosidica a livello trascrizionale. I geni regolati da un'induzione di glucosio non si esprimono in assenza di glucosio nel mezzo, mentre quelli indotti dalla repressione del glucosio non si esprimono ad alte concentrazioni zuccherine. Come detto prima, alcuni geni (*HXT1*) sono indotti da alti livelli di glucosio all'interno della cellula, al contrario altri (*HXT2*, *HXT4*) sono repressi da elevate concentrazioni zuccherine intracellulari. Oltre alla concentrazione di glucidi, altri fattori regolano l'espressione genica degli *HXT*; importantissimo è che vi siano condizioni di crescita ottimali per il lievito.

La traslocazione di una molecola di zucchero all'interno della cellula richiede prima il legame e poi il riconoscimento dello zucchero da parte del trasportatore; per questo motivo il trasportatore deve possedere un meccanismo per l'identificazione del substrato. Così quelli che operano a basse concentrazioni di substrato (i trasportatori ad alta affinità) hanno una struttura più aperta, con più di un sito di attacco per il substrato. Queste proteine sono capaci di legare i substrati in più di una posizione, ciò significa che la molecola di zucchero può essere associata al trasportatore con diversi orientamenti. Una volta che il substrato zuccherino è riconosciuto e legato correttamente, si ha un cambiamento conformazionale; il

trasportatore assume una posizione rivolta verso l'interno, che ne permette il conseguente rilascio dello zucchero nella cellula. Ovviamente questo movimento controllato della proteina richiede una certa fluidità della membrana, che deve essere assicurata dalla composizione lipidica della stessa. La concentrazione di etanolo in teoria dovrebbe inibire completamente questo meccanismo; che ciò non avvenga è probabilmente dovuto al fatto che alcuni geni *HXT* sono designati a lavorare in questo ambiente sfavorevole. A concentrazioni elevate di substrato, i trasportatori con siti multipli di attacco sono soggetti ad inibizione da parte dello stesso substrato; questo avviene perché le molecole di substrato tentano di legarsi simultaneamente al trasportatore. Questo affollamento intorno al trasportatore, ne impedisce il cambiamento conformazionale e come risultato non si ha la traslocazione dello zucchero all'interno della cellula, e si avrebbe la conseguente diminuzione di assimilazione zuccherina. Per questo motivo con elevate concentrazioni di substrato sono necessari trasportatori con una struttura più chiusa avente un solo sito di attacco. Questi ultimi trasportatori hanno una K_m elevata (bassa affinità per il substrato) e di conseguenza non sono attivi a basse concentrazioni zuccherine.

Così si spiega anche perché *Saccharomyces cerevisiae* possieda un elevato numero di geni *HXT*, al fine di mantenere un certo flusso di glucidi nella cellula, nonostante il variare della concentrazione di substrato. La seconda ragione che spiega l'esistenza di questa moltitudine di proteine catalizzatrici dello stesso passaggio, riguarda la velocità di cambiamento alle mutevoli condizioni ambientali che una disposizione di questo tipo consente. È stato osservato che diversi trasportatori sono espressi simultaneamente dalle cellule ed il trasporto potrebbe essere visto come la somma di queste singole attività indipendenti: "*ipotesi consorzio*". Se infatti ci dovesse essere la necessità di ridurre parzialmente la capacità di assimilazione, è più facile raggiungere questo obiettivo eliminando completamente un trasportatore, piuttosto che tentare di regolare parzialmente una singola specie.

In *Saccharomyces* il trasporto degli zuccheri è il principale sito di controllo del tasso di fermentazione. Quando le condizioni ambientali diventano avverse, si ha una sua diminuzione dovuta alla specifica degradazione dei trasportatori *HXT*. Questa

degradazione avviene nel vacuolo e le proteine HXT perdono la loro funzione, grazie ad un unico meccanismo che è stato osservato nei trasportatori del galattosio e maltosio. Bloccare la proteolisi dei trasportatori equivarrebbe a dire morte cellulare, così come sarebbe tossico per la cellula continuare il catabolismo del glucosio in condizioni ambientali avverse.

Trasporto del fruttosio in *Saccharomyces cerevisiae*

Glucosio e fruttosio condividono gli stessi trasportatori [7], ciò significa che la loro assimilazione è competitiva; generalmente la K_m per il fruttosio è maggiore rispetto a quella per il glucosio di 2,5 – 5 volte, al contrario la V_{max} di trasporto del fruttosio è solitamente più alta di quella per il glucosio [3]. Tanto per citare alcuni valori, la K_m del trasportatore a bassa affinità Hxt3p corrisponde approssimativamente a 65 mM per il glucosio, contro i 125 mM per il fruttosio; il trasportatore ad alta affinità Hxt7p invece mostra valori di K_m di 2,2 mM per il glucosio e 4,6 mM per il fruttosio. La minore affinità per il fruttosio è probabilmente dovuta al fatto che il glucosio e gli altri zuccheri sono trasportati preferibilmente nella forma piranosica piuttosto che in quella furanosica, mentre nel caso del fruttosio la relazione è invertita. Quest'ultimo è assimilato preferenzialmente in forma furanosica, tuttavia soltanto il 30% del fruttosio è presente in questa forma. Dalle differenze nella cinetica, è prevedibile che il glucosio sarà consumato più velocemente, cambiando così il rapporto glucosio/fruttosio, che è di 1:1. Come adattamento a questa alterazione nelle relative concentrazioni di substrati l'enzima *esochinasi* passa da *esochinasi II*, avente un uguale reattività per entrambi gli zuccheri, ad *esochinasi I* che ha una maggiore reattività verso il fruttosio (rapporto glucosio/fruttosio 1:3). Questo passaggio permette alle cellule di compensare il cambiamento esterno nel rapporto glucosio/fruttosio e mantenere un corretto flusso glicolitico; recentemente è stato suggerito che bassi livelli di espressione di *esochinasi I* possano essere associati a ceppi particolarmente suscettibili di portare fermentazioni stentate.

La comprensione dell'assimilazione degli zuccheri è fondamentale per poter intervenire in caso di arresto della fermentazione; in questa situazione infatti nel mosto-vino si ritrova una concentrazione zuccherina relativamente bassa, in cui di solito la quantità di fruttosio è circa dieci volte quella del glucosio.

L’assimilazione selettiva del fruttosio da parte di lieviti enologici selezionati

Riporto qui uno studio fatto da Ann Dumont et al., per valutare le prestazioni fermentative di alcuni lieviti selezionati, prestando particolare attenzione alla capacità di consumare fruttosio in condizioni enologiche. È stato sviluppato un metodo per misurare un “**indice fruttofilo**” che aiuterebbe a determinare l’abilità di un particolare ceppo nell’assimilare fruttosio. Sono stati valutati diversi parametri enologici:

- Livello iniziale di zuccheri;
- Rapporto glucosio/fruttosio (**GFR**);
- Livello iniziale di azoto assimilabile per il lievito (APA);
- Temperatura di fermentazione.

I criteri valutati per ogni lievito erano:

- **Attività fermentativa**: la velocità di fermentazione è stata valutata in base alla sua durata o in termini di CO_2 emessa;
- **Cinetica del consumo di glucosio e fruttosio**: sono stati misurati i contenuti di entrambi gli zuccheri nel corso della fermentazione per valutare la cinetica di consumo degli stessi. L’indice fruttofilo si basa sul calcolo dell’area tra le curve di consumo di glucosio e fruttosio da parte di un determinato ceppo di lievito, in funzione della CO_2 emessa (figura 4). Il lavoro è stato focalizzato sostanzialmente sull’area corrispondente alla seconda metà della fermentazione, poiché si tratta del momento in cui sussistono maggiori rischi di rallentamento o arresti fermentativi: più piccola è l’area, più la cinetica di consumo del fruttosio è simile a quella del glucosio. È stato scelto questo valore per rappresentare ogni lievito e catalogare i ceppi a seconda della loro capacità di utilizzare il fruttosio. I lieviti enologici in cui la cinetica di consumo

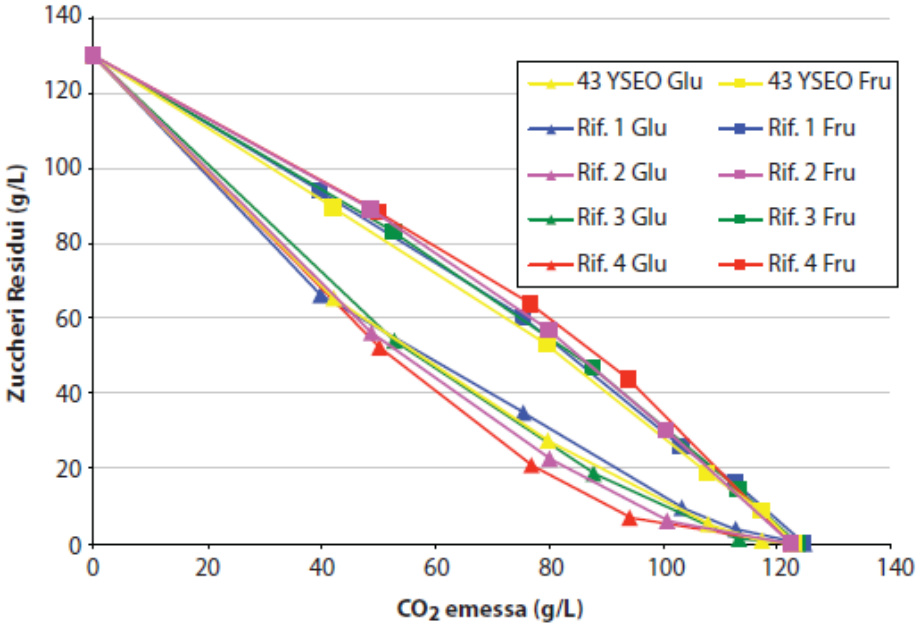

Figura 4 - Evoluzione di glucosio e fruttosio durante la fermentazione alcolica.
Confronto tra 5 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*: inoculo a 25 g/hl, terreno di crescita MS300 con glucosio e fruttosio (130 g/l di ogni zucchero), temperatura 24 °C.

del fruttosio è simile a quella del glucosio, sono quelli che presentano un carattere fruttofilo più elevato e che possono avere migliori prestazioni in situazioni di elevata concentrazione di fruttosio (quindi in arresto di fermentazione).

Materiali e metodi

Lieviti enologici. In un primo momento sono stati testati 19 lieviti commerciali: tra questi ne sono stati scelti 4 (codici identificativi da Rif. 1 a Rif. 4) in base alla loro notevole attitudine nel riavvio delle fermentazioni arrestate, in aggiunta ad UVAFERM 43 YSEO®. Nelle microvinificazioni i lieviti sono stati inoculati su 1,1 l di terreno di crescita in fermentatori con capacità di 1,2 l. Il tasso di inoculo è stato di 25 g/hl (5×10^6 cellule vive/ml).

Ambiente di fermentazione. Le fermentazioni sono state condotte in ambiente standard: un mezzo sintetico che simula la composizione del mosto (MS300), con alcune modifiche al livello iniziale di zucchero (contenuto in fruttosio uguale o maggiore rispetto al glucosio). In modo analogo, le concentrazioni di azoto totale variavano da 100 a 400 mg/l secondo l'esperimento. Le fermentazioni si sono svolte con agitazione costante a 18, 24 o 28 °C.

CO_2. La quantità di CO_2 emessa è stata determinata tramite misura automatica della perdita di peso in ogni fermentatore ogni 20 minuti.

Velocità di produzione di CO_2 (dCO_2/dt). La velocità di produzione di CO_2 è stata calcolata tramite interpolazione polinomiale degli ultimi 11 valori di CO_2 emessa.

Consumo di glucosio e fruttosio. I campioni sono stati prelevati durante la fermentazione; gli zuccheri sono stati dosati nel surnatante dopo centrifugazione. Durante le prove sono state valutate differenti condizioni enologiche, compresi diversi livelli iniziali di zuccheri; qui verranno riportati soltanto i casi più significativi:

1) Temperatura di fermentazione: 24 °C
   Mezzo sintetico ricco in APA: MS300, 400 mg/l APA
   Zuccheri totali: 260 g/l, GFR = 1 (glucosio 130 g/l + fruttosio 130 g/l)
2) Temperatura di fermentazione: 24 °C
   Mezzo sintetico ricco in APA: MS300, 400 mg/l APA
   Zuccheri totali: 260 g/l, GFR = 0.33 (glucosio 65 g/l + fruttosio 195 g/l)
3) Temperatura di fermentazione: 24 °C
   Mezzo sintetico carente in APA: MS70, 100 mg/l APA
   Zuccheri totali: 260 g/l, GFR = 0.33 (glucosio 65 g/l + fruttosio 195 g/l)
4) Temperatura di fermentazione: 18 °C
   Mezzo sintetico ricco in APA: MS300, 400 mg/l APA
   Zuccheri totali: 260 g/l, GFR = 0.33 (glucosio 65 g/l + fruttosio 195 g/l)
5) Temperatura di fermentazione: 28 °C
   Mezzo sintetico ricco in APA: MS300, 400 mg/l APA
   Zuccheri totali: 260 g/l, GFR = 0.33 (glucosio 65 g/l + fruttosio 195 g/l)

Risultati

Effetto del rapporto glucosio/fruttosio

L'unica variabile tra le condizioni enologiche 1 e 2 era il GFR: i rispettivi livelli dei due glucidi sono identici nella condizione 1, mentre nella 2 si ha tre volte più fruttosio che glucosio. I due zuccheri sono stati monitorati durante la fermentazione e le differenze nell'assimilazione di entrambi sono state calcolate per ricavare l'indice fruttofilo. La figura 5 mostra i risultati di cinque lieviti testati nelle condizioni 1 e 2; indipendentemente dal livello del GFR, UVAFERM 43 YSEO® è stato il lievito

che ha manifestato la miglior capacità di fermentare il fruttosio. C'è da notare comunque che quando GFR è inferiore ad 1, anche l'indice fruttofilo diminuisce, ma è comunque evidente che alcuni lieviti sono meno colpiti di altri.

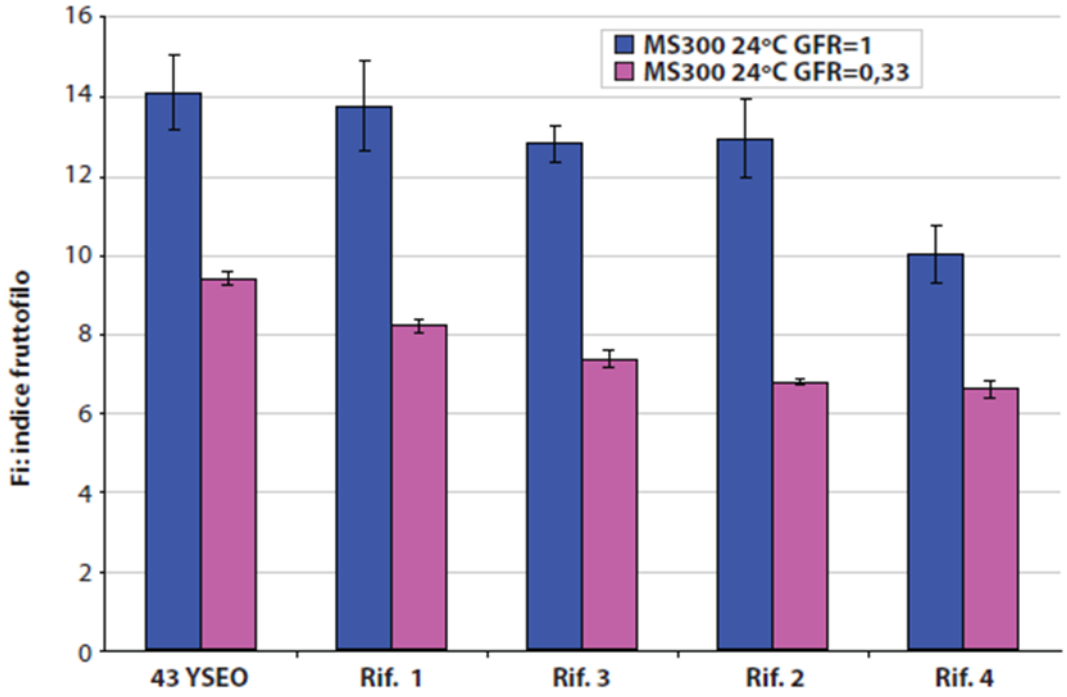

Figura 5 - Effetto del GFR sull'indice fruttofilo in differenti lieviti selezionati

Effetto del contenuto in azoto.

Nelle condizioni enologiche 2 e 3 con GFR <1, in cui la sola variabile era il livello iniziale di APA, si osserva ancora che il lievito UVAFERM 43 YSEO® presenta le migliori prestazioni relative al consumo di fruttosio (figura 6). La capacità dei lieviti di utilizzare fruttosio si è mantenuta comunque abbastanza costante, indipendentemente dal fatto che vi fosse o meno una carenza di azoto (APA < 150 mg/l).

La figura 7 invece, mostra l'effetto della carenza di azoto sull'attività fermentativa dei lieviti. Il metabolismo del lievito è significativamente rallentato ed i tempi di fermentazione sono circa quattro volte più lunghi nel mezzo MS70.

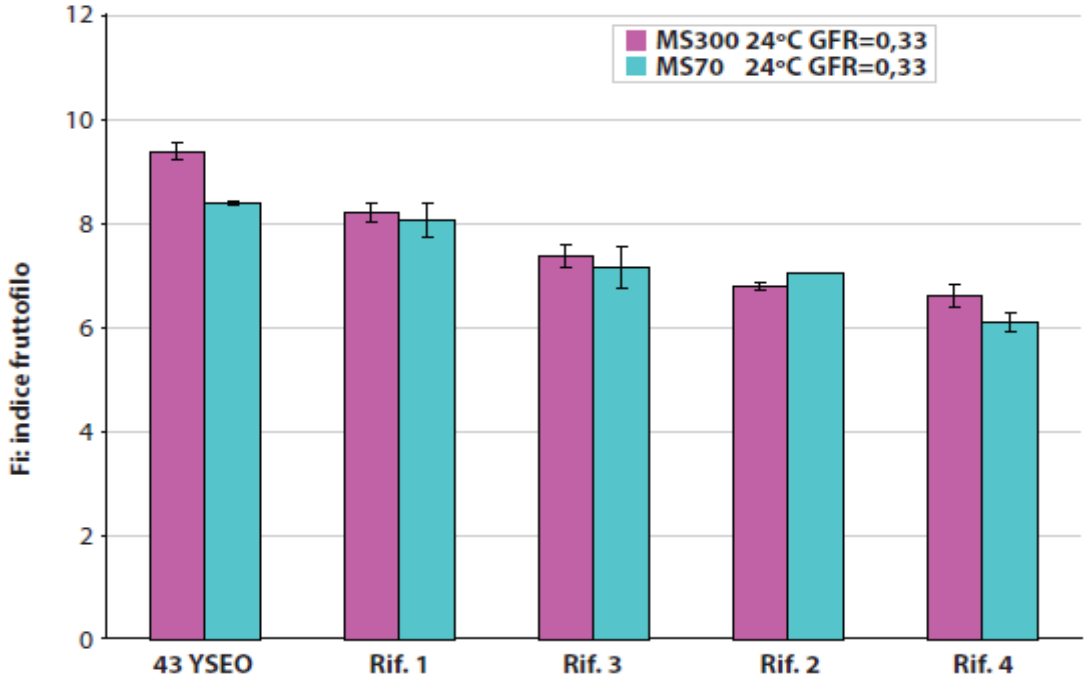

Figura 6 - Variazione dell'indice fruttofilo in terreni di crescita con GFR = 0.33 e differenti livelli di azoto (MS70: 100 mg/l APA; MS300: 400 mg/l APA)

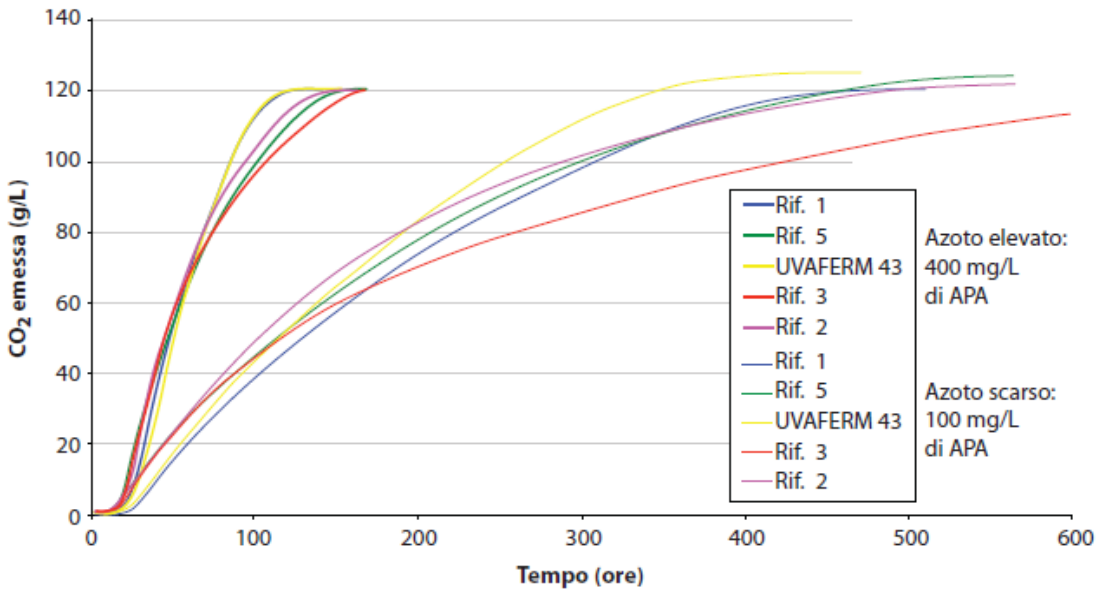

Figura 7 - Variazione della cinetica fermentativa in terreni di crescita con GFR = 0.33 e differenti livelli di azoto (MS70: 100 mg/l APA – linea sottile; MS300: 400 mg/l APA – linea spessa)

Effetto della temperatura.

I risultati illustrati in figura 8 indicano che la capacità dei lieviti di assimilare fruttosio aumenta con la temperatura, ad eccezione di un ceppo specifico (Rif. 3) che mostra un indice fruttofilo maggiore durante la fermentazione a 18 °C, rispetto non solo alle temperature più elevate, ma anche in confronto agli altri lieviti. Questo indica che il lievito Rif. 3 è particolarmente adatto per fermentazioni a basse temperature. Il miglior indice fruttofilo è ancora per UVAFERM 43 YSEO®.

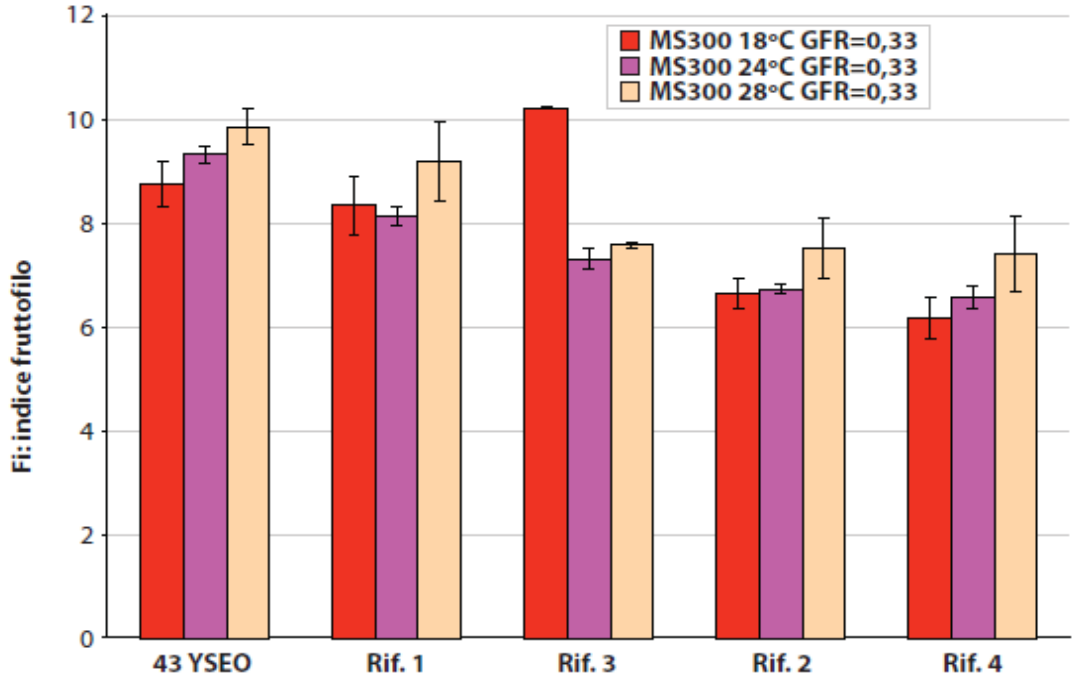

Figura 8 - Variazione dell'indice fruttofilo in un terreno di crescita con GFR = 0.33 a differenti temperature

Alla luce di tutti questi risultati si evince che il lievito UVAFERM 43 YSEO® ha costantemente presentato l'area più piccola tra le curve di consumo di glucosio e fruttosio durante la seconda metà della fermentazione, di conseguenza l'indice fruttofilo più elevato, indipendentemente dai livelli di GFR, azoto o temperatura. L'indice fruttofilo può essere un nuovo parametro da valutare in fase di selezione dei lieviti enologici, al fine di isolare ceppi più sicuri in caso di previste fermentazioni difficili o in arresto.

Gli interventi nel caso di un arresto fermentativo

Alla luce di quanto detto finora è facilmente intuibile quanto possa essere complesso e difficoltoso il riavvio di una fermentazione arrestata oppure l'aumento della velocità di una stentata. Una buona parte di questa difficoltà è dovuta all'incapacità di determinare precisamente la causa dell'arresto, specialmente dal momento che i fattori interagiscono in maniera complessa e spesso sinergica fra di loro; inoltre una volta che i microrganismi si sono adattati alle condizioni avverse, è difficile farli ritornare ad una situazione metabolica "normale". Va anche tenuto presente che spesso e volentieri gli arresti di fermentazione sono la conseguenza di errori in sede di vinificazione; frequentemente infatti, le operazioni da eseguire sono conosciute, ma mal condotte. Bisogna comunque sottolineare che la miglior cura contro gli arresti fermentativi è la **prevenzione** attraverso l'uso di corrette pratiche di cantina.

Protocollo di riavvio di una fermentazione stentata

Il riavvio della fermentazione arrestata comporta diversi passaggi.

1) Travaso e/o filtrazione grossolana del vino in arresto fermentativo per evitare il contatto con le fecce, aggiunta di 30 mg/l di SO_2 e portare la vasca ad una temperatura di 20 – 22 °C. Nel caso dei vini rossi, al momento dell'arresto la vasca contiene ancora il mosto e le vinacce ricche di batteri. Si consiglia pertanto di effettuare una rapida svinatura, anche se la macerazione di bucce e vinaccioli non ha raggiunto il livello desiderato. Il travaso o la svinatura consentono inoltre di ossigenare leggermente il mosto, favorendone così la ripresa fermentativa.
2) Preparare un mezzo di riavvio: per 1000 l di mosto arrestato, preparare una soluzione di 15 l d'acqua aggiungendovi circa 3000 g di mosto concentrato rettificato (65 °Brix) e 300 g di DAP. Portare anche questo ad una temperatura di 20 – 22 °C.

3) Reidratare 1000 g di lievito secco attivo (ceppo *Saccharomyces bayanus*) in 5 l d'acqua a 38 – 41 °C per 15 - 20 minuti, agitando il tutto una volta soltanto per evitare la formazione di grumi.
4) Dopo altri 15 – 20 minuti aggiungere gradualmente al lievito reidratato la soluzione di acqua e mosto concentrato, ottenendo quindi una soluzione di 20 l di volume totale.
5) Lasciare fermentare e monitorare l'andamento della fermentazione fino a che la metà degli zuccheri non è stata fermentata, il che dovrebbe accadere nel giro di poche ore.
6) Raddoppiare il volume della soluzione aggiungendo una prima porzione di mosto in arresto fermentativo; questo va fatto areando la massa mediante un piccolo rimontaggio. Lasciare ancora fermentare finché la rimanente parte di zucchero non è stata assimilata e ripetere questa operazione di raddoppio fino all'ottenimento di 160 l di inoculo adattato (altri 2 raddoppi). Il tempo per l'intera procedura va dalle 12 ore ai tre giorni.
7) Aggiungere l'inoculo alla rimanente parte di mosto arrestato (840 l) ed aggiungere 20 mg/l di DAP; tenere ad una temperatura di 20 – 22 °C e rimontare la massa una volta al giorno senza areazione.

È comunque cruciale che durante l'adattamento dell'inoculo, questo non arrivi mai alla secchezza o al raggiungimento di un grado zuccherino inferiore a quello del mosto da far ripartire. Questo è importante perché se lo starter ha perso vigore, non sarà "competitivo" nel riavviare la fermentazione bloccata; perfetto sarebbe avere soltanto uno starter con un paio di °Brix in più rispetto al mosto arrestato. Nella ripresa di una fermentazione arrestata tuttavia, deve essere contemplato il rischio di un aumento tangibile dell'acidità volatile; ciò accade quando il lievito si trova in situazioni di difficoltà a fermentare e va detto che certi ceppi hanno al riguardo una predilezione più marcata rispetto ad altri. Con l'aggiunta di acido pantotenico si può non solo limitare la formazione di acidità volatile, ma addirittura ridurre la scomparsa di un eccesso di acido acetico.

Altri interventi possibili

Alcune fermentazioni bloccate, nonostante tutte le precauzioni sopra descritte usate in sede di riavvio, rimangono tali. In questa situazione la causa dell'arresto fermentativo è verosimilmente dovuta non alla scarsa tolleranza del ceppo verso l'etanolo, ma piuttosto alla presenza di una qualche sostanza tossica nel mezzo. Per questo motivo è raccomandabile anche l'aggiunta di scorze di lievito al mosto da fermentare, al fine di rimuovere potenziali composti inibitori (sia gli acidi grassi che l'acetaldeide possono essere rimossi con questa metodologia). Questi coadiuvanti sono certamente il mezzo più efficace per facilitare la ripresa fermentativa, anche se la loro efficacia è maggiore se dati prima dell'arresto vero e proprio. Le scorze possono essere utilizzate nella preparazione dell'inoculo e/o aggiunte (20 – 30 g/hl) nello stesso mezzo in arresto fermentativo.

	Zuccheri residui in funzione del tempo della seconda fermentazione (g/l)		
	9° giorno	16° giorno	36° giorno
Testimone	57	36	13
+ 50 g/l di scorze	53	23	1,4

Tabella 3 - Stimolazione di una seconda fermentazione, dopo un arresto spontaneo, per aggiunta di scorze di lievito

La tabella 3 mostra i risultati di una sperimentazione di Lafoun-Lafourcade del 1984: la prima fermentazione di un mosto contenente 250 g/l di zucchero si arresta, lasciandone un residuo di 67 g/l. La seconda è condotta dopo l'inoculo di *Saccharomyces cerevisiae* alla concentrazione di 10^6 cellule/ml, senza aggiunta di scorze o 24 ore dopo l'aggiunta di 0,5 g/l di scorze di lievito. L'aggiunta permette in 36 giorni, una fermentazione completa che non è possibile invece, nel testimone. Comunque sia, l'aggiunta massiccia di scorze di lievito, provenienti dall'autolisi delle cellule aventi un alto contenuto di componenti grassi, può comportare modifiche olfattive, specie nei vini più leggeri (bianchi e rosati), dovute alla rimozione di composti aromatici volatili, specialmente quelli idrofobici.

Un altro intervento efficace è la flash-pastorizzazione (riscaldamento tra 72 e 76 °C per 20 secondi), che migliora la fermentescibilità dei vini in arresto di fermentazione. L'operazione va effettuata prima di un nuovo inoculo; malgrado la distruzione dei

lieviti, i mosti riscaldati fermentano particolarmente bene. Ciò potrebbe essere dovuto a :

- Fermentazione da parte di un ceppo puro di lievito, evitando gli antagonismi microbici;
- Arricchimento in elementi nutritivi dovuto alla lisi dei lieviti;
- Eliminazione di sostanze tossiche;
- Modificazione della struttura colloidale.

Altro intervento, conosciuto ormai da tempo, è l'utilizzo del carbone attivo (10 – 20 g/hl). Questa aggiunta è ovviamente poco concepibile nei vini rossi, ma la sua efficacia è comprovata nei bianchi, in cui agisce eliminando degli inibitori del lievito [1].

In qualunque caso, le riprese di fermentazioni arrestate devono essere controllate molto accuratamente, valutando in particolare l'acidità volatile e le eventuali deviazioni organolettiche, per essere sicuri di una fermentazione alcolica pura. Una solfitazione appropriata deve prevenire ogni possibile deviazione ed anche se rallenta la fermentazione successiva, impedisce ogni sviluppo batterico prima del consumo totale degli zuccheri: cosa fondamentale per l'ottenimento di vini puliti e senza difetti.

Conclusioni

In questa tesi mi sono soffermato sulle problematiche degli arresti fermentativi, focalizzandomi in particolare sul parametro temperatura, che ad oggi è uno dei più semplici ed economici da valutare nella pratica quotidiana di cantina, in fase di vinificazione. Va da sé che vi sono diversi altri parametri qui non citati o citati in modo approssimativo, che influiscono o possono influire sul normale andamento di una fermentazione, primo fra tutti la nutrizione azotata.

Nonostante tutti i vari possibili interventi descritti nell'ultimo capitolo per far ripartire una fermentazione bloccata, la migliore arma contro questo inconveniente è solo e soltanto la prevenzione. Compito di ogni tecnico che opera in campo vitivinicolo, e di ogni professionista in generale, è quello di riuscire ad ottenere il massimo dalle caratteristiche dell'azienda in questione di volta in volta, e dare fondo egli stesso a tutti i mezzi che ha a disposizione. Vendemmiare un uva sana ed al giusto grado di maturazione sulla base delle analisi delle uve, definire a monte protocolli di vinificazione adatti ad ogni singola vasca, adottare quindi le tecniche più giuste per ciascuna di esse e controllare il più frequentemente possibile che tutto proceda per il verso giusto (e previsto), anche e soprattutto, dal punto di vista organolettico. Tutto ciò e nient'altro è il migliore intervento per poter gestire fermentazioni senza inconvenienti e di conseguenza ottenere vini privi di "difetti tecnici".

Bibliografia

[1] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud. 2007. *Trattato di enologia vol. I*. Ed. Edagricole

[2] Peter W. Piper. 1995. *The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap*. FEMS Microbiology Letters 134: p. 121 – 127

[3] Linda F. Bisson. 1999. *Stuck and sluggish fermentations*. Am. J. Enol. Vitic., Vol. 50, No. 1

[4] Linda F. Bisson, Christian E. Butzke. 2000. *Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations*. Am. J. Enol. Vitic., Vol. 51, No. 2

[5] Ann Dumont, Céline Raynal, Françoise Raginel, Anne Ortiz-Julien. 2008. *The ability of wine yeast to consume fructose.* Wynboer

[6] Tiago Viana, Maria C. Loureiro-Dias, Virgilio Loureiro, Catarina Prista. 2012. *Peculiar H^+ homeostasis of Saccharomyces cerevisiae during the late stages of wine fermentations.* Applied and Environmental Microbiology, Vol. 78, No. 17, p. 6302 – 6308

[7] N. J. Berthels, R. R. Cordero Otero, F. F. Bauer, J. M. Thevelein, I. S. Pretorius. 2004. *Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains.* Federation of European Microbiological Societies Yeast Research 4: p. 683 – 689

[8] Carole Guillaume, Pierre Delobel, Jean-Marie Sablayrolles, Bruno Blondin. 2007. *Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast Saccharomyces cerevisiae: a mutate HXT3 allele enhances fructose fermentation.* Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 8, p. 2432 – 2439

[9] P. W. Piper, K. Talreja, B. Panaretou, P. Moradas-Ferreira, K. Byrne, U. M. Praekelt, P. Meacock, M. Récnacq, H. Boucherie. 1994. *Induction of major heat-shock proteins of Saccharomyces cerevisiae, including plasma membrane Hsp30, by*

ethanol levels above a critical threshold. Society for General Microbiology 140, p. 3031 – 3038.

[10] Jordi Tronchoni, Amparo Gamero, Francisco Noé Arroyo-Lopez, Eladio Barrio, Amparo Querol. 2009. *Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse saccharomyces wine species and theirHybrids during grape juice fermentation*. International Journal of Food Microbiology 134, p. 237 – 243.