

NUTRIZIONE AZOTATA DEI LIEVITI

Daniel GRANES, Edouard MEDINA, Lucile BLATEYRON, Céline ROMERO, Eric BRU, Christophe ROUX, Caroline BONNEFOND, Agnès PIPERNO, Myriam ROUANET, Thomas OUI
ICV Montpellier, France

Il fabbisogno del lievito in azoto

Negli organismi viventi, l'azoto è un elemento essenziale che entra nella composizione degli amminoacidi, dei protidi e delle proteine.

Per i lieviti in particolare, le proteine sono degli **elementi costitutivi della cellula** e dei suoi organelli (proteine strutturali) o degli **enzimi** che intervengono come trasportatori o nelle reazioni metaboliche (proteine funzionali). L'azoto è dunque un fattore chiave per la moltiplicazione e l'attività fisiologica del lievito.

Quando si parla di azoto, si intende l'insieme di molecole che contengono uno o diversi atomi di azoto. Pertanto, non tutto l'azoto è utilizzabile dai lieviti: P. Barre, V. Jiranek e altri hanno definito l'**azoto assimilabile** come la quantità di azoto in mg/L disponibile e suscettibile di essere utilizzato dal lievito. Quando noi parleremo di azoto, ci riferiremo sempre a tale definizione, in assenza di indicazioni contrarie.

L'azoto assimilabile è costituito d'azoto ammoniacale e da amminoacidi. Tra tutti gli amminoacidi, alcuni come la prolina non sono assimilabili dal lievito. La misura dell'azoto assimilabile prende in considerazione solo gli amminoacidi assimilabili.

In mezzo sintetico e in coltura pura, la fermentazione completa di 200 g / L di zucchero (circa 12° potenziali) può essere portata a termine con un tenore iniziale in azoto assimilabile superiore a 150 mg/L, definito come livello di "carenza assoluta".

Contrariamente ad altri lieviti, *Saccharomyces cerevisiae* non possiede proteasi esterne e non può idrolizzare i peptidi e le proteine per ricuperare gli amminoacidi. Per questo, l'azoto assimilabile può rappresentare meno del 50% dell'azoto totale.

L' azoto assimilato dal lievito interviene a quattro livelli importanti e in parte dipendenti gli uni dagli altri :

- La **moltiplicazione cellulare** viene aumentata dagli apporti azotati che risultano efficaci fino a metà fermentazione (intorno a 1050 di densità) poi diminuiscono progressivamente per perdere efficacia nell'ultimo terzo della FA (dopo 1030 di densità). Una parte dell'azoto assimilato è incorporato nelle proteine strutturali che sono necessarie per la costruzione di nuove cellule. Sablayrolles (INRA) ha mostrato che è pericoloso apportare troppo azoto (cf. calcolo del fabbisogno medio nella FA in funzione del grado potenziale) : una popolazione troppo forte conduce a una mortalità elevata per effetto dell'accelerazione della cinetica fermentativa che conduce a un aumento della temperatura e della concorrenza tra i lieviti per gli altri fattori di sopravvivenza.
- La **cinetica della fermentazione** alcolica è legata al livello della popolazione dei lieviti. Si considera che 100-150 milioni di cellule per ml in un buono stato fisiologico durante la fase stazionaria (da 2 a 3 giorni dopo l'inizio della FA) sono in grado di completare la fermentazione. L'azoto incide sulla fermentazione alcolica consentendo la sintesi delle proteine che sono deputate al trasporto degli zuccheri verso l'interno della cellula dove vengono fermentati a etanolo. Tali proteine si degradano durante la fermentazione alcolica e il lievito ha dunque bisogno di rinnovare tali proteine per completare la FA. Però il lievito incontra difficoltà crescenti nel prelevare l'azoto quando il mezzo si arricchisce di etanolo e ciò spiega così la minore efficacia degli apporti tardivi di azoto rispetto a quelli precoci. Ciò nonostante, gli studi mostrano che l'impatto degli apporti azotati sulla cinetica fermentativa dura più a lungo rispetto a quello sulla moltiplicazione cellulare (circa fino

all'ultimo quarto della FA \approx 1020 di densità). Infine, esiste una sinergia tra l'azoto e l'ossigeno : in una FA condotta in anaerobiosi (nessun apporto di O₂) la permeabilità cellulare si deteriora rapidamente rendendo molto difficoltoso l'assorbimento dell'azoto mentre gli zuccheri continuano ad essere prelevati : vi è uno scarto di circa 2 giorni tra l'inizio della carenza azotata e l'arresto della FA. Quest'ultimo dato spiega il motivo per cui si raccomanda di agire preventivamente e di apportare sia azoto che ossigeno nel primo terzo di fermentazione.

- La produzione di **composti solforati** dipende in modo diretto dalla carenza di azoto. La spiegazione più plausibile è che, in carenza azotata, il lievito preleva e metabolizza lo zolfo aggiunto (SO₂) o presente naturalmente nel mosto (solfati) per produrre amminoacidi solforati che gli serviranno per "costruire" le proteine. In tali condizioni, l'aumento delle dosi di zolfo favorisce la produzione di composti solforati. Gli elementi sviluppati nel paragrafo precedente spiegano anche il motivo per cui gli apporti tardivi di azoto assimilabile siano poco efficaci sugli odori solforati. Infine, la comparsa di odori solforati è un buon indicatore del rischio di arresto di FA poiché la loro produzione inizia quasi simultaneamente all'inizio della carenza azotata.

- La produzione di **composti aromatici**, soprattutto degli esteri, dipende in larga misura dal livello di azoto assimilabile dal lievito. Più generalmente la quantità di composti aromatici prodotti durante la FA dipende dalla concentrazione iniziale in azoto assimilabile del mosto.

Il vinificatore deve dunque combinare tutti questi elementi per definire una strategia coerente di correzione delle carenze di azoto : non troppo tardi, con un po' di ossigeno e senza eccedere.

Un altro elemento importante è la **forma di azoto** che svolge un ruolo non trascurabile. Sono stati eseguiti pochi studi di fisiologia.

I principali risultati sono i seguenti :

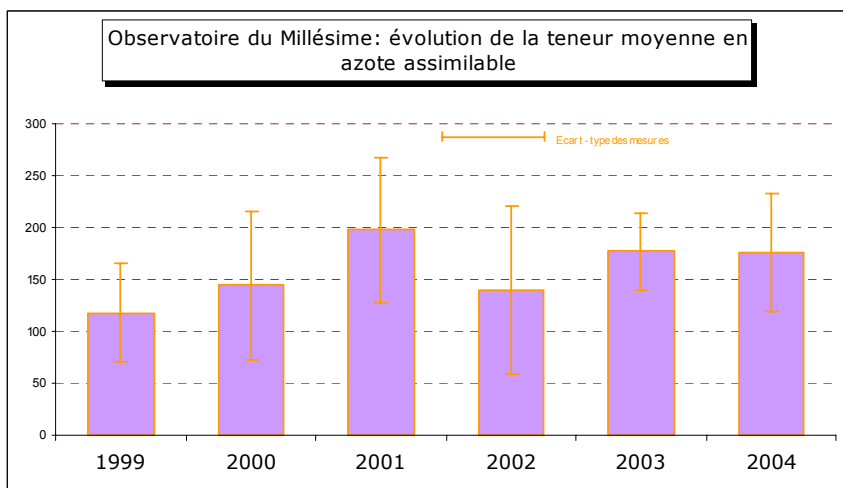
- Per gli apporti tardivi (considerati curativi / FA stentate) l'azoto amminico è più efficace rispetto all'azoto ammoniacale.
- La formazione di alcoli superiori aromatici che partecipano positivamente ai composti fruttati e speziati dei vini è più debole quando l'unica sorgente di azoto è l'ammoniaca, risultati confermati in campo e presso R&D paragonando FeraidE[®] - NH₄⁺. Si tratta di un oggetto di studio attuale poiché l'Università di Saragozza ha mostrato la **relazione stretta tra la composizione amminica e le molecole aromatiche prodotte durante la FA**.

Gli apporti di amminoacidi assimilabili hanno un'efficacia paragonabile a quella dell'azoto ammoniacale per controllare gli odori solforati.

L'azoto dell'uva e del mosto

Da quando l'ICV ha iniziato a effettuare delle misure, i risultati mostrano che la zona mediterranea è globalmente una zona dove l'azoto si trova a bassa concentrazione al momento della raccolta.

La media nel 2005 di più di 600 misurazioni effettuate dall'ICV Pyrénées – Roussillon era di **120 mg/L per gradazioni potenziali tra 10,1° e 17,5°**. Il **78% dei valori erano inferiori a 150 mg/L**, tenore considerato soglia di "carenza assoluta" per *Saccharomyces cerevisiae* (cf. capitolo seguente).



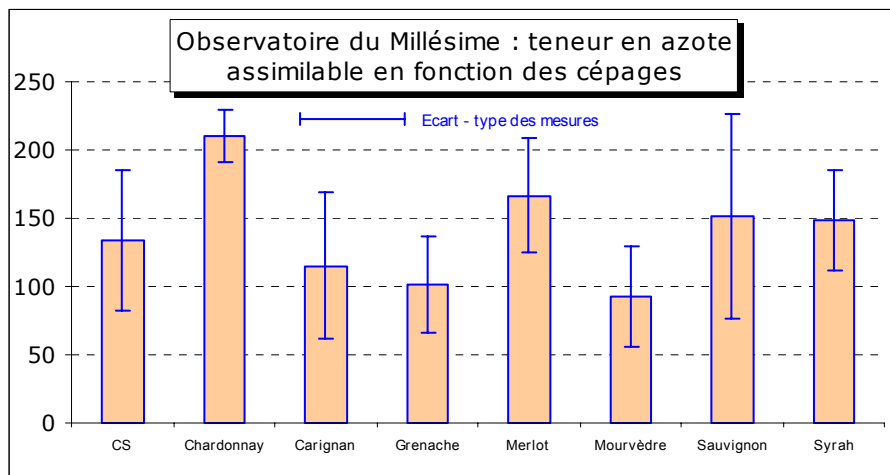
I risultati dell'Observatoire du Millésime confermano questi dati con **delle variazioni tra le annate, i vitigni e le zone**. Il grafico a lato illustra le misure condotte dal 1999 al momento della raccolta dell'uva, con gradazioni di 12% o maggiori. Sono stati osservati dei cali del tenore in azoto degli acini nel corso della maturazione, ma si tratta di un'eccezione. Le variazioni tra le annate sono principalmente dovute alla

disponibilità idrica : le annate di stress determinano più spesso tenori più deboli.

Le misure annunciate dagli enologi ICV sulla base delle misure dell'Observatoire du Millésime, forniscono una buona tendenza dell'annata e delle differenze legate al vitigno. Poche cantine hanno a disposizione gli strumenti necessari per seguire in tempo reale e vasca per vasca il tenore in azoto per correggerlo caso per caso. Inoltre, come vedremo, tutti i lieviti non hanno le stesse necessità. Non è dunque giusto rendere sistematiche queste misure.

Il vitigno ha un impatto paragonabile a quello dell'annata, come risulta dalle medie su 6 anni (pag. 5) al momento della raccolta presso la R&D (gradazione potenziale generalmente superiore a 12%).

I vitigni mediterranei presentano dei valori bassi (fatta eccezione per lo Syrah) mentre i vitigni "importati" da altre zone hanno valori più elevati. Si constata che, come per l'effetto annata, l'effetto vitigno presenta una grande variabilità intra-vitigno.



Le altre cause conosciute della variabilità del tenore di azoto dell'uva sono di ordine agronomico : fertilizzazione azotata del vigneto (organica o minerale), pratica dell'inerbimento (o diserbi insufficienti), irrigazione.

L'azoto assimilabile presente nell'uva si trova generalmente per metà sotto forma ammoniacale e per metà sotto forma amminica (i risultati ICV danno un'oscillazione dal 40% al 60% di amminoacidi, mentre quelli dell'INRA di Montpellier arrivano a un po' meno del 60%). Pertanto sui risultati dell'ICV Pyrénées – Roussillon, l'azoto ammoniacale rappresentava circa l'80% dell'azoto assimilabile, diversità probabilmente imputabile alla zona o all'annata.

La maggior parte dei risultati mostrano che nel corso della maturazione il tenore in azoto amminico assimilabile varia poco. I risultati dell'ICV Pyrénées – Roussillon, ottenuti nel 2005, tendono a mostrare che, quando il tenore in azoto assimilabile è inferiore alla soglia di "carezza assoluta"

(circa 150 mg / L), il tenore in amminoacidi assimilabili scende della metà: quando si verifica un deficit, questo è ben più mercato per gli amminoacidi.

Gestione della nutrizione azotata durante la FA

Benché **non sia l'unica leva di controllo della FA**, si può **correlare il fabbisogno medio di azoto dei lieviti al livello della concentrazione in zuccheri** : sulla base di un fabbisogno di 150 mg / L di azoto per una gradazione potenziale di 12% e una FA realizzata in 8 giorni a 24°C, occorre apportare da 25 a 30 mg / L di azoto assimilabile per ogni grado potenziale supplementare. Per una gradazione di 13%, occorreranno circa 180 mg / L, per 14% circa 210 mg / L... Si tratta certamente di un ordine di grandezza per limitare i rischi di FA stentate con rischi di contaminazioni o di arresto di FA.

Occorre però ricordare che è più pericoloso che di aiuto superare tali valori e che il solo controllo del livello dell'azoto non elimina i rischi di arresto di FA. E' utile rileggere il documento sui 13 punti chiave della FA...

Il lievito preleva l'azoto dal mezzo piuttosto rapidamente : dal 50 all'80% dell'azoto viene consumato in meno di 10 ore e ciò vuol dire che una partenza spontanea della fermentazione crea o accentua la carenza quasi per certo.

Ma non tutti i lieviti sono uguali dal punto di vista della loro reattività agli apporti di azoto.

Le analisi vengono eseguite su dei mezzi sintetici carenti, con gradazione alcolica intorno a 12% e a 24°C. L'inconveniente di tale tipo di analisi è che prende in considerazione un solo fattore : se si lavorasse a 14% di gradazione potenziale i risultati potrebbero essere diversi...Ciononostante tali risultati sono rappresentativi di una gran parte della realtà.

In base a tali analisi, i lieviti come il D21[®] o il D47[®] sono poco esigenti, mentre il K1M[®] o il D80[®] hanno dei fabbisogni significativamente più elevati. Si può vedere che in queste condizioni il K1M[®] non va molto bene lasciando supporre che fermenta difficilmente dei mosti poveri. Tuttavia le prove di campo danno valori opposti. Ma non si trovano quasi mai quelle condizioni in campo. In condizioni di maggiore ricchezza di zuccheri, di temperatura mal controllata, di stato sanitario insufficiente o di concorrenza con lieviti indigeni il K1M[®] dà il meglio di sé. Ma si sa che il K1M[®] reagisce positivamente agli apporti azotati (cinetica della FA, odori solforati) e in modo più intenso rispetto alla maggior parte degli altri lieviti della gamma ICV.

Il problema che si pone in seguito è quello dell'**impatto delle fasi prefermentative** sul livello dell'azoto assimilabile nel mosto, in assenza di sviluppo di flora spontanea (*Saccharomyces* o altri). Le misure della R&D che paragonano, per una stessa materia prima, la macerazione pellicolare e la pigiatura diretta mostrano che non vi sono differenze significative tra le 2 opzioni. Tuttavia, le macerazioni pellicolari conducono a FA spesso più facili, provando che l'azoto non è il solo elemento implicato nella cinetica della FA.

L'illimpimento del mosto dovrebbe avere un impatto negativo sul tenore in azoto assimilabile del mosto. Su dei valori bassi (< 100 mg / L), il dosaggio rivela che le differenze vanno sempre nello stesso senso ma sono appena più elevate della ripetibilità dell'analisi : circa da 5 a 15 mg/L di più sul mosto non illimpidito. Sui mosti più ricchi in azoto, l'illimpimento può far diminuire del 30% il tenore di azoto assimilabile, potendo causarne una carenza. L'illimpimento ha dunque un impatto sull'azoto assimilabile : comunque, l'analisi realizzata in laboratorio viene eseguita su un mosto limpido, simile quindi ad un mosto illimpidito. Inoltre, l'illimpimento impoverisce il mosto in steroli e in acidi grassi che sono dei fattori di sopravvivenza molto importanti per i lieviti. Le fecce fini che vengono reincorporate limitano tale impoverimento.

Da notare che è impossibile controllare in cantina tale tipo di tendenza perché occorre effettuare il dosaggio tramite aldeide formica – titolazione (al Foss occorre chiarificare prima di effettuare l'analisi).

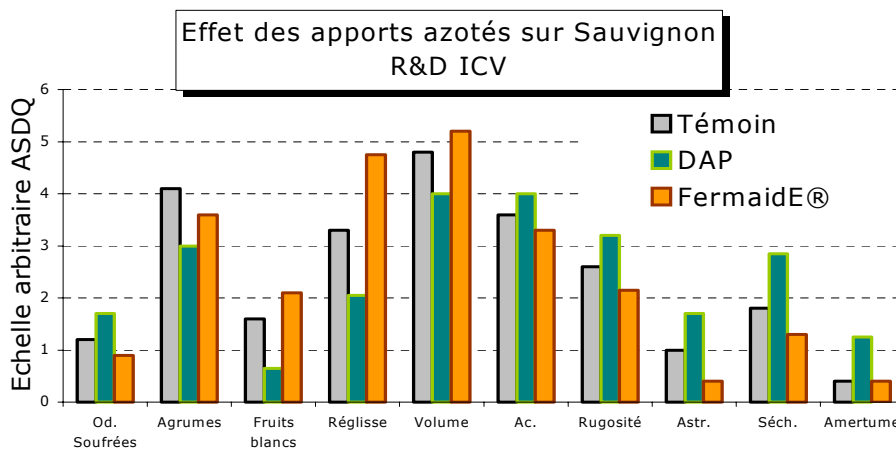
Come gestire gli apporti azotati ?

Il primo punto riguarda la **scelta dei prodotti** e della relativa dose tenendo in considerazione gli aspetti tecnici (livello di carenza valutato/concentrazione degli zuccheri, efficacia), organolettici, economici (costo a ettolitro) e regolamentativi (dose massima legale di fosfato o solfato biammonico, tenore in tiamina dei alimenti arricchiti con tale vitamina) :

- Il solfato o fosfato biammonico è tra i più efficaci, i più concentrati e i meno costosi. Per un apporto di 30 g/hl si apportano 60 mg/l di azoto assimilabile. L'impatto organolettico è regolare : aromi tecnologici, volatili e chimici a forte concentrazione e un gusto più aggressivo (rugosità nei bianchi o rosati, astringenza e secchezza in tutti i vini).
- I nutrienti complessi come il FermaidE® non sono tutti efficaci, sono in media meno concentrati (45 mg / L di azoto assimilabile per un apporto di 30 g / hL di FermaidE®), hanno impatti organolettici diversi tra di loro ma generalmente orientati verso note più mature e di maggior dolcezza in bocca (cf. grafico a lato).

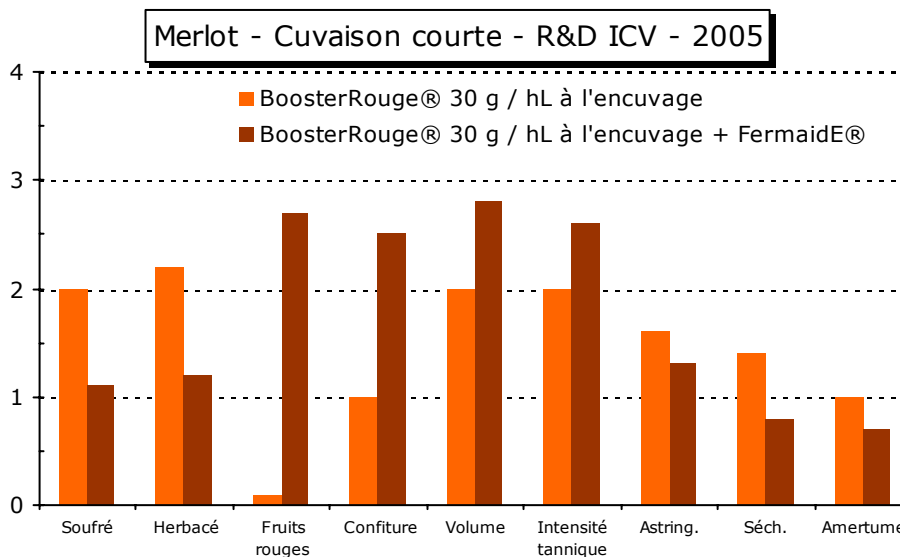
Sono da 4 a 6 volte più costosi rispetto al fosfato biammonico.

Il prezzo più elevato è legato alla presenza di lieviti secchi inattivati che costano 10 volte di più rispetto al fosfato biammonico. L'apporto azotato organico è garanzia di miglior efficacia per gli apporti tardivi (dopo metà fermentazione) sia preventivi che "correttivi".



Aumentando la percentuale di fosfato biammonico nei nutrienti complessi si fa abbassare il prezzo e maggiore è la quantità di azoto assimilabile liberato per grammo di prodotto. Più un prodotto è concentrato e poco costoso, più la proporzione di azoto minerale risulta elevata.

Non occorre utilizzare solo composti organici come nutrienti azotati. I Booster® per esempio apportano solo ¼ dell'azoto apportato da FermaidE® ovvero da 10 a 15 mg / L per una dose di 30 g / hL. D'altra parte, le prove condotte dall'ICV confermano tutte che una cattiva gestione della nutrizione azotata fa perdere tutti gli effetti positivi di Booster®.



Il grafico a lato illustra i risultati per i rossi. Oltre ad una leggera scalarità sulla durata della FA (da 1 a 3 giorni in più in generale), l'assenza di FermaidE® fa abbassare tutti i cursori positivi. Non è sempre così intenso in termini di impatto, ma la tendenza è costante.

Il secondo punto riguarda la **strategia di apporto** : gli apporti più efficaci sono quelli eseguiti durante la fase di moltiplicazione e la fase stazionaria. E' dunque sempre preferibile agire preventivamente. Attenzione però a una cattiva interpretazione dell'apporto detto "iniziale" : non bisogna apportare l'azoto con i lieviti ma all'inizio della FA (da -5 a -10 punti di densità) quando la fase di moltiplicazione è avviata.

Con l'**apporto classico alla fine della fase di crescita (circa a 1/3 della FA)** l'aggiunta combinata di O₂ deve essere sistematica sia nella vinificazione in rosso che in bianco che in rosato.

A questo stadio, i 4 - 8 mg / L di ossigeno apportati sono immediatamente consumati dai lieviti senza poter ossidare delle molecole aromatiche o i loro precursori.

Qualora le analisi o i dati dell'annata mostrano carenze che non possono essere corrette solo con apporti di nutrimenti complessi (limitati spesso dal loro tenore in tiamina), occorre completare l'apporto con solfato o fosfato biammonico. Per gli apporti tardivi (dopo la metà FA), che sarebbe meglio non dover fare, preferire sempre l'azoto complesso.

Quando gli apporti azotati correggono solo parzialmente il problema nonostante vi sia una corretta gestione degli altri punti chiave della FA, occorre utilizzare prodotti specifici tipo GofermProtect[®], fortemente consigliati anche per le gradazioni elevate (> 13,5 – 14% pot.)(cf. tabella seguente).

Infine, ci si può porre la questione **dell'impatto sulla FML** della gestione dell'azoto in FA. In effetti i batteri lattici sono consumatori di azoto solo sotto forma organica (amminoacidi e piccoli peptidi). In questo senso dei residui di FermaidE[®] potrebbero avere un impatto sulla cinetica della FML. Ciò non è stato mai dimostrato, anche sulle prove condotte presso la R&D. D'altronde, gli attivatori della FML sono essenzialmente a base di amminoacidi poiché una loro carenza potrebbe impedire la FML. Nonostante ciò, non garantiscono che la FML si svolga senza problemi...la nutrizione azotata dei batteri lattici non è l'unico fattore per una buona riuscita della FML.

Nei casi classici, è l'autolisi dei lieviti che assicura la copertura del fabbisogno dei batteri lattici. Nel caso dei lieviti più lenti nel svolgere l'autolisi come il PDM o il K1M[®], indipendentemente da altri fattori, i ritardi o le difficoltà della FML possono essere spiegati almeno parzialmente da questo motivo.

FermaidE[®] o GofermProtect[®] : le basi della scelta dei prodotti

30 gr/Hl di FermaidE[®] o FermaidBlanc[®] apportano circa 45 mg/l di azoto assimilabile, steroli e vitamine (soprattutto tiamina). Svolgono dunque un ruolo positivo innanzitutto sulla carenza azotata ma anche, su scala minore, sulla resistenza del lievito alla fine della FA (grazie agli steroli e alle vitamine assimilate). Quest'ultimo punto spiega la strategia "storica" dell'ICV di frazionare gli apporti: a densità iniziale – 5 à – 10 punti e alla fine del primo terzo della FA.

GofermProtect[®] è stato sviluppato da Lallemand per fornire ai lieviti, in fase di reidratazione, gli steroli, le vitamine e gli oligoelementi che assicurano una migliore sopravvivenza del lievito, particolarmente importante per le gradazioni elevate o per fermentazioni "stressanti" (soprattutto scarsa torbidità, temperatura bassa). **Non si tratta di uno strumento di gestione delle carenze azotate !**

Schematicamente si raccomanda :

	Carenza azotata	Assenza di carenza azotata
Gradazione potenziale elevata o fermentazione stressante	GofermProtect [®] poi FermaidE [®]	GofermProtect [®]
Bassa gradazione potenziale e fermentazione classica	FermaidE [®]	–

Articolo tratto dalla Flash Info Vendanges settembre 2006