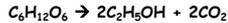


Fermentazione alcolica



Rendimento in etanolo del 51,11% in peso rispetto al glucosio fermentato:
da una molecola di glucosio (pm 180) → 2 molecole di EtOH (pm 46) e 2 molecole di CO₂ (pm 44).

Peso specifico di EtOH (a 20°C) è 0,78. Per l'equazione di Gay-Lussac, il rendimento della fermentazione alcolica è:
51,11 : 0,78 = 65,52%

1) Una parte del lievito viene usato dal lievito per la propria biomassa;
2) EtOH e CO₂ non sono i soli prodotti, ma esistono anche altri come glicerina e acido succinico;

Rendimento della fermentazione : 60%.

Il grado alcolico ottenuto da una fermentazione in condizioni normali:

contenuto iniziale di zuccheri fermentescibili (g per cento) per 0,6.
Es.: 20% zuccheri → vino di 12°.

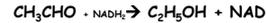
Biochimica della fermentazione alcolica

La demolizione del glucosio avviene attraverso il processo di glicolisi, con l'intervento di enzimi.
Il primo stadio della glicolisi si conclude con la produzione di gliceraldeide-3-fosfato, richiede 2 ATP; il secondo si conclude con la produzione di acido piruvico ed è esoergonico, produce 4 ATP (2 + 2).

Fermentazione alcolica - decarbossilazione dell'acido piruvico ad acetaldeide:



Riduzione di quest'ultima ad alcool etilico e la riossidazione del NAD



Fermentazione lattica - riduzione dell'acido piruvico ad acido lattico:



Prodotti secondari della fermentazione alcolica

Durante la fermentazione alcolica, oltre all'alcol etilico e all'anidride carbonica, il lievito produce piccole quantità di altri composti noti come sottoprodotti della fermentazione.
I più importanti sono la glicerina e l'acido succinico, come già mostrato da Pasteur il quale formulò il seguente bilancio:

prodotti formati per fermentazione di 100 g di glucosio

Prodotto	grammi
Etanolo	48,4
Anidride carbonica	46,6
Glicerina	3,3
Ac. succinico	0,6
Lievito secco	1,2

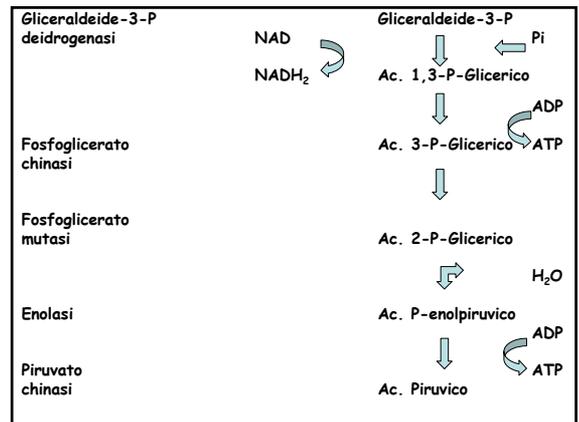
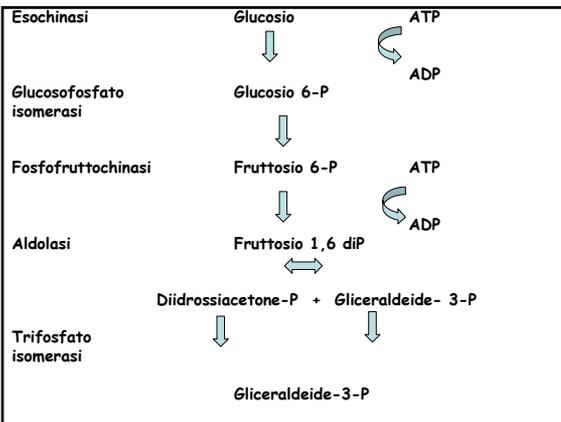
Altri sottoprodotti

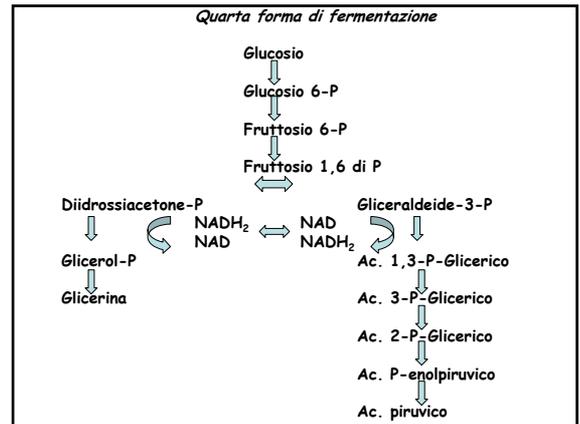
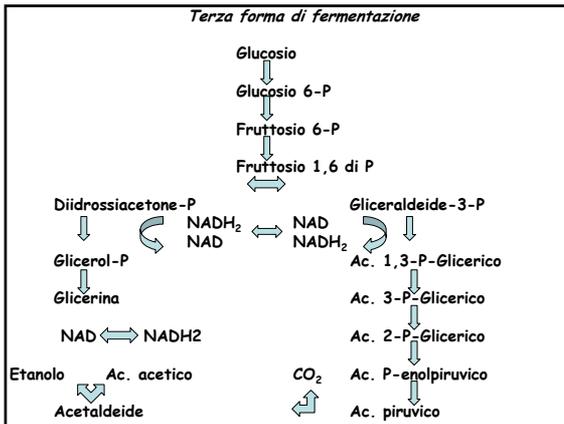
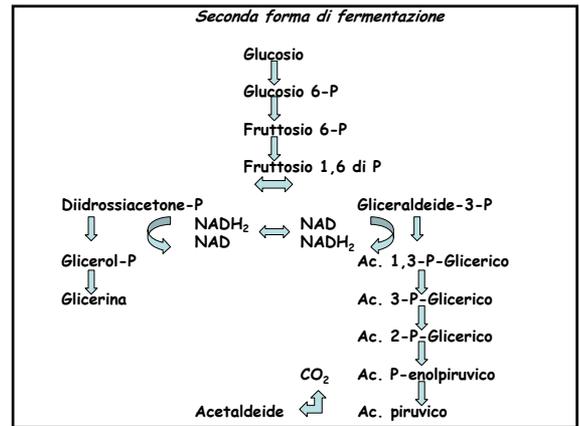
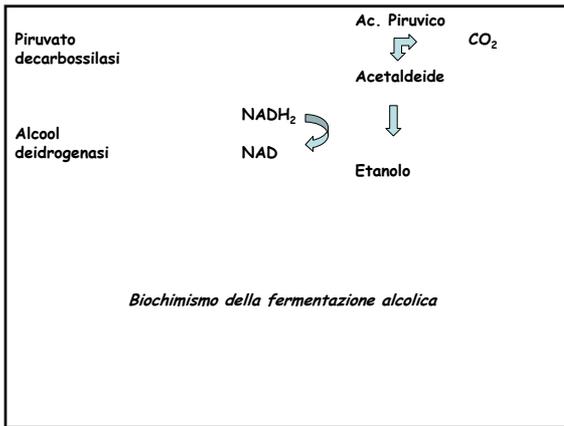
Acido acetico, aldeide acetica, acido piruvico, acetoino e butilenglicole. Altre sostanze, fra le quali gli alcoli superiori, non sono veri e propri sottoprodotti della fermentazione perché non derivano direttamente dal glucosio, bensì dalla trasformazione operata dai lieviti di composti presenti nel mezzo o da altri metabolismi cellulari.

Glicerina

Secondo lo schema classico della fermentazione, la glicerina non si dovrebbe formare. Poiché l'ossidazione del NADH₂ a NAD è essenziale dal punto di vista del lievito, mentre l'etanolo è un sottoprodotto, se si verifica un blocco a livello di acido piruvico o di aldeide acetica, la ricostituzione del NAD avviene attraverso la via alternativa con la riduzione del diidrossiacetone-fosfato a glicerofosfato.

Oltre alla prima e più importante forma di fermentazione se ne individuano quindi altre che portano alla produzione prevalente di glicerina.





Origine dell'acido succinico

Controversa, una frazione notevole proviene da acido glutammico per via ossidativa, con acido α -chetoglutarico come intermedio. In anaerobiosi può originare per condensazione di due molecole di acido acetico, per riduzione dell'acido piruvico via ac. ossalacetico, malico, fumarico.

Collegamento tra i sottoprodotti

Tutti i sottoprodotti sono strettamente collegati con la fermentazione glicerica, quindi fra glicerina e gli altri sottoprodotti deve esistere un rapporto costante.

Genevois, 1950; Lafon, 1954, 1959:

$$2A + B + 2M + H + 5S = \Sigma = G$$

dove A = ac. acetico
 B = butilenglicole
 M = acetoino
 H = acetaldeide
 S = ac. succinico
 G = glicerina

Altri prodotti

Nel corso della fermentazione alcolica si possono formare anche altri prodotti, in quantità molto piccola, derivanti comunque dall'attività dei lieviti e non dalla trasformazione di composti presenti nel mezzo.

La capacità di formazione di questi prodotti può assumere grande importanza agli effetti della qualità dei vini ed è certo che alla loro presenza si devono i profumi che caratterizzano i vini, specialmente spumanti, ottenuti per rifermentazione con determinati ceppi.

Alcoli superiori

Nel corso della fermentazione alcolica del mosto d'uva si formano costantemente alcoli superiori in quantità piuttosto rilevanti. Come dimostrato da Ehrlich già nel 1907, questi composti derivano dall'attività dei lieviti sugli aminoacidi, per una duplice azione di deaminazione e decarbossilazione.

Gli aminoacidi interessati sono quelli presenti nel mosto ma anche quelli che i lieviti stessi sintetizzano. Questi composti possono formarsi per via catabolica dagli aminoacidi dei mosti e per via anabolica dagli aminoacidi sintetizzati dai lieviti.

I più importanti alcoli superiori sono:

n-propanolo, derivante dalla treonina;
isobutanolo, derivante dalla valina;
l'alcol amilico attivo, derivante dalla isoleucina;
l'alcol isoamilico, derivante dalla leucina.

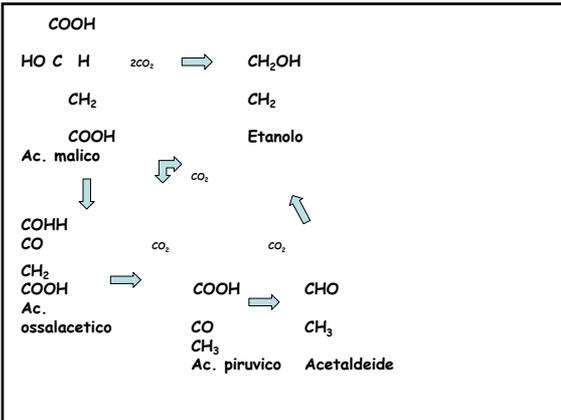
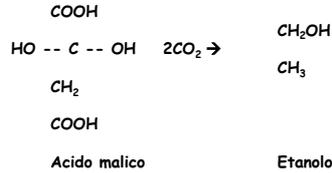
Un altro alcol superiore di notevole importanza per la sua azione sulla qualità dei vini è il β -feniletanolo il cui aminoacido corrispondente, da cui potrebbe derivare è la fenilalanina.

L'alcol isoamilico conferisce gusti nettamente negativi, in modo positivo è considerato invece il β -feniletanolo che impartisce una gradevole profumo di rosa.

La capacità di formare quantità più o meno elevate dei singoli alcoli è influenzata dagli aminoacidi del mosto, ma anche dalla specie e dal ceppo di lievito.

FERMENTAZIONE MALO-ALCOLICA

Propria dei lieviti del genere *Schizosaccharomyces*, tra cui *S. pombe* è il più importante, ma anche di altri fra cui *S. cerevisiae* (in misura minore).



LA FERMENTAZIONE MALO ALCOLICA

9. La disacidificazione biologica dei vini

Tabella 29 - Proprietà fermentative dei ceppi di *Schizosacch. pombe* e di *Schizosacch. del gruppo «japonicus-versatilis»* isolati da uve, da melassi e da vini (in mosto d'uva al 30% di zuccheri, dopo 25 gg. a 28°C da Florenzano, 1972).

N. di ceppi esaminati	Alcool. % in vol.	Acidi volatili g/l	Glicerina g/l	2,3 butilene g/l	Acido succinico g/l	Acetaldeide mg/l	Capacità malolattica in % dell'acido malico fermentato
I - Ceppi di <i>S. pombe</i> da uve veneziane							
media	13,2	0,90	7,6	0,25	1,05	35,8	43,2
min.	10,2	1,25	5,7	0,10	0,80	20,3	26,4
max.	15,5	0,65	9,1	0,40	1,65	53,7	74,0
II - Ceppi di <i>S. pombe</i> da melassi di canna							
media	11,35	1,01	6,45	0,33	0,86	48,5	26,5
min.	8,5	0,70	5,7	0,12	0,41	25,7	12,3
max.	14,7	1,60	8,2	0,45	1,29	87,1	44,5
III - Ceppi di <i>S. pombe</i> da uve dei Castelli Romani							
media	10,8	0,43	5,0	0,32	1,3	37,5	40,6
min.	9,2	0,30	4,6	0,27	1,10	24,9	38,0
max.	11,5	0,48	5,6	0,45	1,66	50,6	45,1
IV - Ceppi di <i>S. gruppo «japonicus-versatilis»</i> da vini toscani							
media	9,5	0,13	8,87	0,67	1,5	36,95	19,8
min.	8,6	0,09	8,12	0,40	1,02	27,8	14,9
max.	10,1	0,15	9,92	0,85	1,81	44,1	25,0

I batteri del vino

Batteri acetici: caratterizzati per un intenso metabolismo ossidativo che ossidando l'alcol etilico ad acido acetico, sono i responsabili della fermentazione acetica.

La madre dell'aceto è costituita da un organismo microscopico, la *Ulvina aceti* (Kützing, 1837).

Il microrganismo responsabile della ossidazione dell'etanolo fu individuato da Pasteur (1864) come *Mycoderma aceti*, con formazione di pellicole.

Successivamente altri autori contribuirono alla conoscenza di questi batteri (Hanse, Brown, Henneberg, Beijerinck) ne svilupparono le conoscenze. Beijerinck definì il nome del genere, *Acetobacter*, che ha validità tutt'oggi.

Acetobatteri: gruppo omogeneo che ossida l'etanolo ad acido acetico

Classificazione dei batteri acetici

Regno: *Prokaryotes*
Divisione: *Gracilicutes*

Divisione di batteri tutti Gram-negativi, aerobi.

VI famiglia: *Acetobacteraceae*.

Famiglia *Acetobacteraceae*: cellule Gram-negative, ellittiche o bastoncellari, singole, in paia o in catenelle. Mobili per flagelli polari o peritrichi. Aerobi, metabolismo respiratorio, usano O₂, T= 25-30°C, pH 5-6.

La Famiglia comprende due generi_

Genere I. *Acetobacter* (Beijerinck, 1898). Lattato e acetato ossidati a CO₂. Mobile per flagelli peritrichi o non mobili.

Genere II. *Gluconobacter* (Asai, 1935). Lattato o acetato non ossidati a CO₂. Mobili per flagelli polari.

Specie del Genere *Acetobacter*:

Acetobacter aceti;
A. liquefaciens;
A. pasteurianus;
A. Hansenii.

Specie del Genere *Gluconobacter*:

Gluconobacter oxydans;
G. asaii;
G. cerinus.

BATTERI ACETICI

I batteri acido acetici sono microrganismi Gram negativi con forma bastoncellare che hanno la peculiare capacità metabolica di ossidare l'etanolo ad acido acetico. Classificati in due generi: *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

(vedi Tabella)

I batteri acido acetici causano il deterioramento del vino in aceto, attraverso l'ossidazione di etanolo ad acetaldeide ed acido acetico. Tuttavia questi batteri possono alterare la qualità del vino attraverso meccanismi diversi oltre alla ossidazione di etanolo. Sono comuni abitanti delle uve soprattutto se sono danneggiati o infestati con *Botrytis cinerea*.

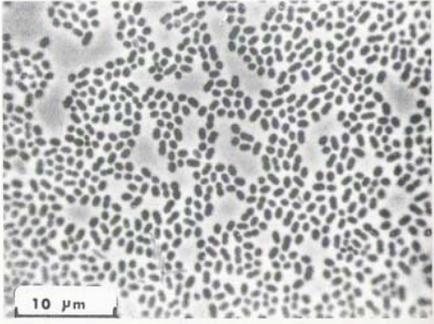
Isolamento, conta ed identificazione

Isolamento per "spread plate" direttamente su terreni solidi appropriati: agar con glucosio-estratto di lievito - calcio carbonato. Le colonie sono circondate da un alone chiaro dovuto alla solubilizzazione del carbonato di calcio.

L'identificazione a livello di specie è effettuata per mezzo di pochi specifici test culturali, soprattutto quella di ossidare D.L-lattato, ossidare etanolo, formare pigmenti solubili in acqua, ossidare glicerolo, produrre vari acidi chetoglucuronici dal glucosio ed utilizzare etanolo o sodio acetato come fonti di carbonio.

In particolare, le specie di *Acetobacter* possono ossidare completamente l'etanolo attraverso acido acetico a biossido di carbonio e acqua, mentre le specie di *Gluconobacter* sono incapaci di ossidare l'etanolo oltre acido acetico.

Altre tecniche di identificazione: 1. analisi numerica delle proprietà fenotipiche, 2. Profili elettroforetici delle proteine, 3. Distribuzione dei chinoni respiratori, 4. Ibridazione degli acidi nucleici, 5. Profili citometrici.

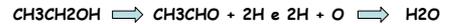


Fotografia di cellule di batteri acetici *Gluconobacter* sp.

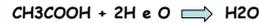
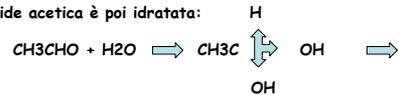
Chimismo della fermentazione acetica, o biossidazione acetica dell'etanolo



l'intermedio è l'aldeide acetica:



L'aldeide acetica è poi idratata:



Batteri lattici

Hanno cellule non mobili e non formano spore;
Sono Gram-positivi sono anaerobi o anaerobi facoltativi;
Sono catalasi negativi con l'eccezione di alcune specie del genere *Pediococcus*;
Hanno esigenze nutritive complesse (aminoacidi e vitamine);
Per fermentazione degli zuccheri producono o solo acido lattico (omolattici o lattici omofermentanti) oppure acido lattico più acido acetico, anidride carbonica e, talvolta, alcoli (eterolattici o lattici eterofermentanti).

(Bergey, 1986):

Genere *Streptococcus*;

Genere *Leuconostoc*;

Genere *Pediococcus*.

Batteri lattici di interesse enologico

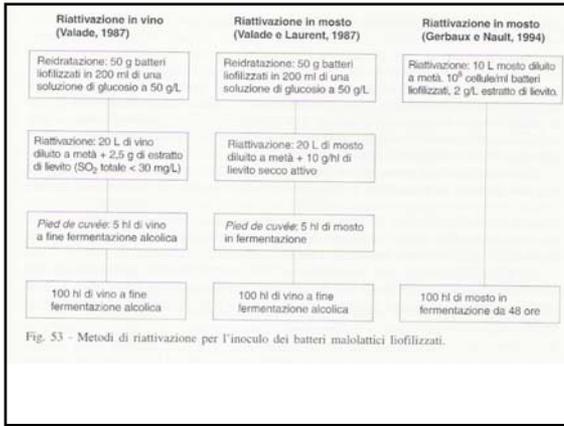
Il vino costituisce un mezzo nutritivo idoneo allo sviluppo di batteri lattici a causa della presenza di miscele complete di aminoacidi e vitamine e di composti fermentescibili quali l'acido malico, l'acido tartarico e, talvolta, zuccheri.

Le malattie dei vini provocate da batteri lattici

Agridolce: si manifesta nei vini dolci. Il vino diviene torbido e acquisisce un sapore dolciastro e nauseante con acidità acetica. E' dovuto alla fermentazione eterolattica del fruttosio. Prevenzione con anidride solforosa.

Filante: malattia dei vini dolci, si hanno vini di consistenza mucillaginosa e vischiosa, provocata probabilmente da batteri del genere *Leuconostoc* e si previene con SO_2 .

Girato: Colpisce vini poco alcolici o provenienti da uve peronosperate, al termine della fermentazione alcolica e si ha un sobbollimento, una nuova fermentazione. Presenza di acidità volatile. Rimedi difficili.



BATTERI LATTICI

Possono causare deterioramento dei vini e sono responsabili della fermentazione malolattica. Alla fine di quest'ultima, i vini rimangono spesso a contatto con un contenuto di batteri acido lattici di 10⁷ cellule/ml¹, la cui azione può influenzare la qualità dei vini.

TABLE 1.2. Species of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria found in wines.

Lactic acid bacteria

Lactococcus spp.
Lactococcus fermentans, *L. parvulus*, *L. delbrueckii*
Lactobacillus plantarum, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentans*
L. kefir, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. hilgardii*, *L. acetivorans*

Acetic acid bacteria

Gluconobacter spp.
Acetobacter spp., *A. pomorum*

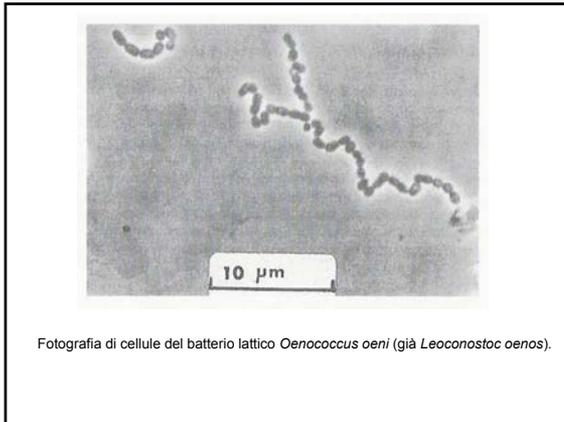
Isolamento e conta

Batteri acido lattici sono stati isolati da uve e vini tramite procedure differenti:

- (i) arricchimento del campione in brodo di coltura seguito da crescita su piastra di questa coltura su terreno con agar;
- (ii) inoculo diretto del campione (appropriatamente diluito) su terreno con agar;
- (iii) filtrazione su membrana seguito da incubazione della membrana su terreno con agar.

Termini di coltura per l'isolamento e la conta di batteri acido lattici da campioni di uve e di vini: 1. terreno agar de Man, Rogosa Sharpe (MRS); 2. agar succo di pomodoro (T₂); 3. agar Immann; 4. Agar vino e succo di pomodoro; modifiche di MRS con succo d'uva (...).

Aggiunte di cidoacetico (100 mg l⁻¹) o di pirruvato (50 mg l⁻¹) al terreno delle piastre per la crescita di batteri acido lattici.



Identificazione

Batteri acido lattici isolati dai vini che sono Gram positivi e catalasi negativi sono assegnati al genere di appartenenza attraverso due tests: osservazione microscopica della morfologia cellulare ed esame per la produzione di gas dalla fermentazione del glucosio. *Leuconostoc* sono cocco-bacilli o cocci in coppie o catene che producono gas dal glucosio (eterofermentante); *Pediococcus* sono cocci in coppie o tetraedi che non producono gas dal glucosio (omofermentante) e le specie *Lactobacillus* sono bastoncini che possono o non produrre gas dal glucosio.

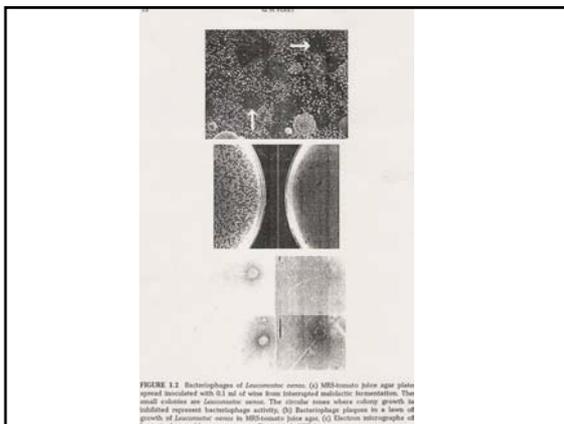
La produzione di mannitolo dal fruttosio (*Leuconostoc* e *Lactobacillus* eterofermentanti) e la produzione di ammoniaca dall'arginina (*Leuconostoc* e *Lactobacillus* eterofermentanti), sono semplici tests aggiuntivi che possono essere usati nei passaggi iniziali della identificazione.

Ulteriori descrizioni tassonomiche standard sono inoltre richieste gallerie API 50 CH tests. Utilizzando queste gallerie si può eseguire la classificazione degli isolati sulla base del loro profilo di fermentazione dei carboidrati.

A causa della sua importanza nella vinificazione, *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) è stato il soggetto di particolari e dettagliati studi tassonomici, mostrando una considerevole diversità tassonomica.

Batteriofagi

La presenza di batteriofagi nei vini o isolati da batteri acido lattici dei vini può essere dimostrata attraverso varie procedure, es.:



METABOLISMO DEI COMPOSTI DELL'AZOTO

I composti dell'azoto sono essenziali per la crescita e per il metabolismo dei lieviti.

L'azoto è secondo solo al carbonio, si trova in un complesso di aminoacidi, ioni ammonio, peptidi e proteine.

La composizione qualitativa e quantitativa di azoto nel mosto condiziona la fermentazione, gli aromi ed i prodotti metabolici.

FONTI DI AZOTO

Mosto d'uva

Il mosto d'uva contiene l'intero supporto di nutrienti necessari per la crescita dei lieviti durante la fermentazione. Il contenuto di azoto totale (N) nel mosto è compreso tra 60 e 2400 mg N.l⁻¹, fattore limitante per la crescita.

Recentemente si è sviluppato l'interesse per la composizione in azoto di uve e mosti.

L'azoto nel mosto può essere lontano dalla concentrazione ottimale con il risultato di errori nella fermentazione e vini di scarsa qualità. Conoscendo la composizione in azoto si può regolare l'eventuale aggiunta di fertilizzanti di azoto nelle vigne per ottenere un buon prodotto.

Aggiunte di azoto

Il mosto è frequentemente addizionato con azoto assimilabile, per lo più come misura preventiva contro l'insorgenza di eventuali problemi della fermentazione.

Forme di azoto aggiunte: salì di ammonio come bifosfato di ammonio (DAP) (300 mg.l⁻¹ in Europa).

Generalmente 200 mg.l⁻¹ di DAP sono aggiunti prime dell'inoculo e l'ulteriore aggiunta di 100 mg.l⁻¹ in risposta alla formazione di solfuri.

L'urea ed alcuni "nutrienti per lieviti" presentano alcuni problemi; anche la parete cellulare dei lieviti è utilizzata e si ritiene che favorisca la fermentazione fornendo tracce di azoto assimilabile ed adsorbendo gli acidi grassi con catene medie con proprietà di tossicità.

METABOLISMO DELL'AZOTO

L'accumulo ed il metabolismo dei composti dell'azoto in *Saccharomyces cerevisiae* dipende dal ceppo e dalle sue condizioni fisiologiche, ma anche dalle proprietà fisiche e chimiche del suo ambiente. I composti dell'azoto sono:

ammonio, urea, aminoacidi, piccoli peptidi, composti con purina e pirimidina.

Trasporto all'interno delle cellule:

(i) Senza modifiche, e.g. un aminoacido è direttamente incorporato nelle proteine;

(ii) Come fonte di azoto, e.g. un aminoacido è degradato per liberare azoto per la biosintesi di altri costituenti cellulari azotati;

(iii) Come fonte di carbonio, e.g. la componente carboniosa di un aminoacido viene rilasciata ed utilizzata per la biosintesi di altri costituenti carboniosi cellulari.

L'efficienza metabolica di una fonte di azoto dipende dalla espressione, regolazione ed efficienza dei sistemi di trasporto come pure dalla regolazione dei processi energetici e da quelli catabolici ed anabolici.

Quindi la crescita, la velocità di fermentazione e la resa in biomassa dipenderanno sia dalla quantità sia dalla natura della fonte/i di azoto disponibili.

Fonti di azoto assimilabili

La maggior parte dei composti dell'azoto presenti nel mosto di uva vengono utilizzati dai lieviti come uniche fonti di azoto.

Tra gli aminoacidi: lisina, cisteina, prolina, istidina e glicina rappresentano delle eccezioni: per incorporazione diretta svolgono un ruolo nella biosintesi di proteine.

Grandi peptidi e proteine non permettono la crescita di *S. cerevisiae* che non può né idrolizzarli né accumularli, mentre possono essere utilizzati da altri lieviti che producono enzimi proteolitici esocellulari.

Ordine di accumulo degli aminoacidi e dell'ammonio

Gli aminoacidi importanti, il cui accumulo coincide con la crescita cellulare sono: arginina, glutamato, valina, isoleucina, leucina, istidina, aspartato, triptofano, fenilalanina e metionina.

ASPETTI ENOLOGICI DEL METABOLISMO DELL'AZOTO

Gli arresti di fermentazione, ad eccezione di quelli causati da eccessi di temperatura e da una concentrazione troppo alta degli zuccheri, costituiscono un fenomeno relativamente recente dovuto ai cambiamenti nell'utilizzo dei fertilizzanti per le vigne e le tecnologie del vino riguardo le basse temperature, i pochi solidi e la bassa tensione dell'ossigeno in fermentazione.

Aspetti quantitativi della fermentazione

Il contenuto in azoto dei lieviti è circa il 6,0% del peso. Il metabolismo dell'azoto promuove la crescita essenzialmente fornendo i precursori per la sintesi delle proteine e degli acidi nucleici. Il ruolo quantitativo dell'azoto assimilabile nella fermentazione delle uve deve essere considerato in termini di richiesta dei lieviti, e di cinetiche di crescita e di fermentazione.

Richieste di azoto nei lieviti

Crescite dei lieviti

Velocità di fermentazione

"Rallentamenti" e "arresti" delle fermentazioni

Approcci predittivi (Prevenzione) (Selezione del ceppo)

TABLE 4.13 Suggested causes of sluggish and stuck fermentations.

Condition	Reference
Nutritional deficiency	
Amino acids (especially deficiency)	Bauer (1982), Apetriach (1977), Vos et al. (1978), Meisel and Detrich (1978), Vos and Gray (1979), Meak (1982), van Rossum and Trapp (1982), Trapp (1984), Ingelbrecht and Kandler (1985), Bacteria and Lagarias (1982), Tronconi and Rodriguez (1982), Kohn (1984), Ruy et al. (1991), N. B. B. et al. (1991), Kandler (1991), Speckhard (1991).
Deficiency of oxygen or unsaturated fatty acids	Arts and Kuyper (1977), Larner et al. (1978), Houtman and de Ploos (1980), Meurich et al. (1981).
Vitamin deficiency	Mink and Corradi (1984)
Mineral deficiency	Meurich and Bauer (1981).
Inhibitory substances	
Sugar	Ingelbrecht and Kandler (1985)
Ethanol	Thoma and Rose (1976), Lahn and van Uden (1981, 1984), van Uden (1985).
Fatty acids	Lahn, Labrousse et al. (1984), Larner and Labrousse (1985)
Acetic acid accumulation	Panopalis and Lencob (1985), Pito et al. (1989)
Killer toxins	van Veen and Wagheld (1986)
High SO_2 concentrations	Lahmann (1987)
Inhibitors	Lorenz (1985)
Penicillin residues	Lorenz (1985)
Physiological condition	
Poorly propagated yeast strains	Mink and Bauer (1984), Larner and Lahn-Labrousse (1985), Meurich et al. (1981)
Technological practices	
High clarifications	Wachterschmid and Brestbauer (1978), Kellner-Corn, Lahn-Labrousse and Brestbauer (1978), Gray and Ough (1979), Vos and Gray (1979), Houtman et al. (1984), Houtman and de Ploos (1981), van Rossum and Trapp (1982)
Low solids	
Excessive temperature	Amstein et al. (1985), Bacteria et al. (1982), Bauer et al. (1982), van Uden (1985)
Temperature fluctuation	Rosin et al. (1986)
Inadequate aeration/insufficient flocculation	Gray and Ough (1979), Ingelbrecht and Kandler (1985)

Componenti aromatiche dai lieviti

I metaboliti secondari delle uve sono responsabili delle principali componenti aromatiche nel mosto d'uva e forniscono le basi dei "caratteri varietali".

La fermentazione aumenta la complessità chimica e aromatica del vino, determinando l'estrazione dei composti dai solidi presenti nel mosto, modificando alcuni composti derivati dalle uve e producendo metaboliti dei lieviti.

Aspetti generali della formazione dei metaboliti dei lieviti

Keto-acidi e alcoli superiori

Acidi grassi ed esteri

Composti carbonilici

IL METABOLISMO DEGLI ACIDI ORGANICI NEI LIEVITI

Gli acidi formati o metabolizzati dai lieviti durante la fermentazione dei mosti non sono mai i prodotti maggiori.

L'uva ed il vino contengono una varietà di acidi organici, le cui concentrazioni variano al variare delle condizioni di maturazione e delle condizioni di fermentazione.

Gli acidi organici contribuiscono significativamente al gusto del vino.

Sebbene i batteri siano determinanti, anche i lieviti ne influenzano il contenuto. Molti acidi sono formati durante la fermentazione ed alcuni vengono degradati come l'acido malico.

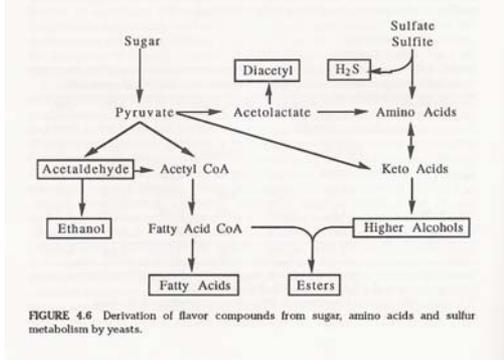


FIGURE 4.6 Derivation of flavor compounds from sugar, amino acids and sulfur metabolism by yeasts.

TABLE 5.1 The acids of grape must and wine and their relation to yeast metabolism.

Acid	Concentration in must or wine (g/l)	Action of yeast during fermentation	
		Decomposition fermentation, or uptake	Formation
Major constituents			
Tartaric	1-4	-	-
L-Malic	0-8	+	+
Succinic	0.5-2	-	+
Acetic	0-3	(-)	-
L-Lactic	0.1-6	-	-
Amino acids	1-6	+	+
Gluconic acid*	0-3	-	-
Some minor constituents			
Citric	0-0.5	-	-
D-Lactic	0.1-0.5	-	+
Pyruvic	0-0.5	(-)	-
3-Oxoglutaric	0-0.2	-	+
Dimethyl glyceric	0.1-0.2	-	+
Citramalic	0.1-0.2	-	+
Galactaronic	0.1	-	-
Glucuronic	0.06	-	-
Mucic	0.05	-	-

* in moldy grapes.

PRODUZIONE DEI COMPOSTI DELLO ZOLFO NEI LIEVITI

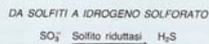
I composti che contengono zolfo (S) sono diffusi in natura, lo S è presente in vitamine, coenzimi ed aminoacidi come metionina e cisteina. I gruppi tiolici hanno un ruolo importante nei siti attivi di alcuni enzimi, nel trasporto di elettroni, in processi di crescita e di divisione cellulare.

I lieviti svolgono un metabolismo dei solfati e la biosintesi di composti contenenti aminoacidi ed altri composti importanti contenenti zolfo.

Inoltre i lieviti producono composti volatili dello zolfo durante la vinificazione. Queste sostanze contribuiscono in modo significativo al sapore dei vini a causa dei loro valori soglia estremamente bassi. In alcuni casi sono responsabili della presenza di sapori non desiderati.

In questo contesto rimangono aperte alcune questioni, in particolare riguardo la produzione di queste sostanze dal metabolismo dei lieviti:

- idrogeno solforato;
- anidride solforosa;



DA IDROGENO SOLFORATO A METIONINA

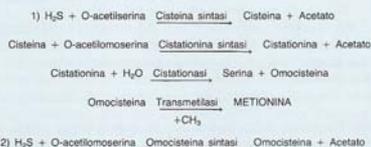


Fig. 45 - Riduzione assimilatoria dei solfati nei lieviti e biosintesi degli aminoacidi solforati. I solfati sono ridotti prima a solfiti poi a idrogeno solforato. Da idrogeno solforato si arriva a metionina via cisteina e cistationina (1) oppure, più direttamente, via omocisteina (2).

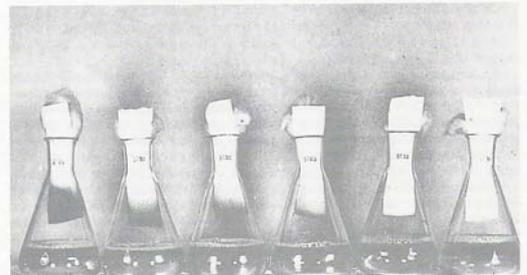


Fig. 46 - Differente capacità di produzione di idrogeno solforato da parte di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sviluppati in mezzo liquido sintetico di Wickerham. L'intensità di produzione di H_2S è evidenziata dall'annerimento della cartina all'acetato di piombo.

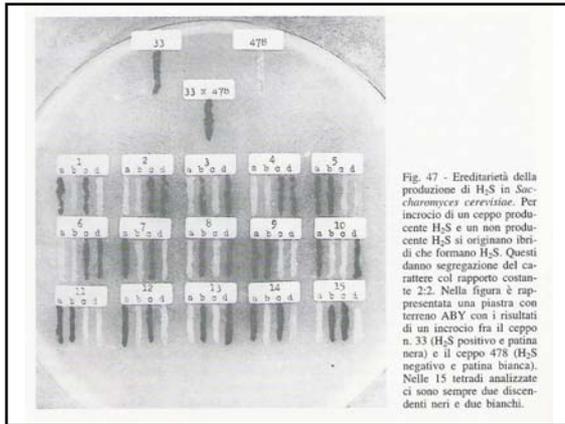


Fig. 47 - Ereditarietà della produzione di H₂S in *Saccharomyces cerevisiae*. Per incrocio di un ceppo produttore H₂S e un non produttore H₂S si originano ibridi che formano H₂S. Questi danno segregazione del carattere col rapporto costante 2:2. Nella figura è rappresentata una piastra con terreno ABY con i risultati di un incrocio fra il ceppo n. 33 (H₂S positivo e patina nera) e il ceppo 478 (H₂S negativo e patina bianca). Nelle 15 tetradi analizzate ci sono sempre due discendenti neri e due bianchi.

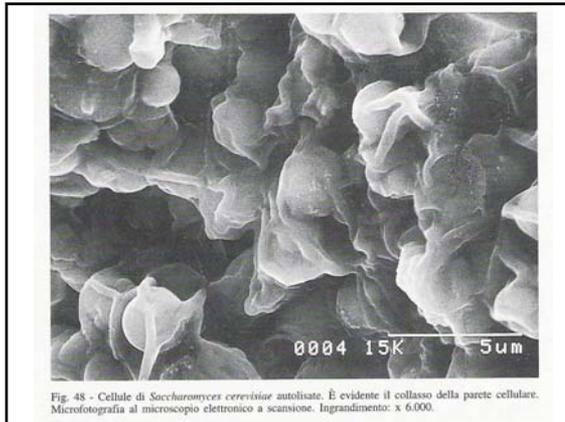


Fig. 48 - Cellule di *Saccharomyces cerevisiae* autolizzate. È evidente il collasso della parete cellulare. Microfotografia al microscopio elettronico a scansione. Ingrandimento: x 6.000.

AUTOLISI DEI LIEVITI

Il termine autolisi fu introdotto in letteratura da Salkowsky nel 1875 e rappresenta una auto-degradazione enzimatica dei costituenti cellulari che si verifica immediatamente dopo la morte della cellula.

L'autolisi è stata il soggetto di numerosi studi per la sua applicazione nella estrazione e purificazione di enzimi e nella produzione di estratto di lievito.

In enologia si verifica in vini, rilasciando negli stessi dei costituenti che possono influenzarne le proprietà e la crescita dei batteri malolattici o di quelli che causano malattie.

Le cellule eseguono una parziale degradazione da parte di β -(1,3)-glucanasi durante l'autolisi, rilasciando macromolecole come mannoproteine all'esterno.

Effetto significativo dell'autolisi dei lieviti e sulla carattere sensoriale dei vini, dovuto ai cambiamenti nella composizione degli aminoacidi liberi,

i costituenti volatili ed i colloidi delle mannoproteine.

L'autolisato dei lieviti può accelerare il processo di maturazione se aggiunto a vini frizzanti e ad alcuni vini bianchi.

LIEVITI KILLER

L'azione killer è dovuta alle tossine che sono prodotte e secrete dai ceppi di lievito.

Le tossine killer sono sia proteine o glicoproteine che sono letali per i lieviti sensibili.

Essi sono tuttavia immuni alle tossine che producono. Il fenomeno killer è stato osservato in molti generi di lievito da varie fonti, inclusi lieviti industriali e di laboratorio e lieviti isolati da habitat clinici o naturali. La proprietà killer in *Saccharomyces cerevisiae* è associata con l'eredità citoplasmatica di plasmidi con doppio filamento di RNA che sono incapsulati in particelle simili ai virus e che codificano per i precursori delle tossine.

La tossina K2 è la più stabile tra quelle di uve e vini, ma l'attività non è mantenuta nell'invecchiamento del vino. La ricerca di nuove tossine killer può dare importanti informazioni.

TABLE 8.1 Comparison of characteristics of killer toxins from different yeast strains.

Killer strain	Nature	Molecular mass (kD) ^a	Optimum pH	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K1)	Protein	20	4.6-4.8	Bostian <i>et al.</i> (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K2)	Glycoprotein	16	4.2	Pfeiffer and Radler (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KT28)	Glycoprotein	16	5.8	Pfeiffer and Radler (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K1HR)	Protein	20	5.7	Goto <i>et al.</i> (1990)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Glycoprotein	180	4.0-8.0	Stark <i>et al.</i> (1990)
<i>Pichia kluyveri</i>	Glycoprotein	19	3.8-4.0	Middelbeek <i>et al.</i> (1970)
<i>Hansenula mrakii</i>	Protein	10.7	4.0-9.0	Ashida <i>et al.</i> (1983)
<i>Hansenula saturnus</i>	Protein	11-12	3.5-7.0	Henschke (1979)
<i>Candida</i> sp. SW-55	Glycoprotein	>200	3.8-5.8	Yokomori <i>et al.</i> (1988a)
<i>Pichia farinosa</i>	Protein	25	2.0-4.0	Suzuki and Niskani (1989)
<i>Hansenula anomala</i>	Glycoprotein	300	-	Kagiyama <i>et al.</i> (1988)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Protein	18	4.0-4.5	Radler <i>et al.</i> (1990)

^amonomer

BACILLUS ED ALTRE SPECIE BATTERICHE

Batteri del genere *Bacillus* sono stati isolati su piastre con agar di brodo nutriente in presenza di cicloeximide per prevenire la crescita di lieviti. Specie del genere *Clostridium* sono state isolate, come anche di *Actinomyces* e di *Streptomyces*.

FUNGHI

La contaminazione e la crescita di funghi sulle uve è ben nota, la "muffa nobile" e la muffa grisse" causate da *Botrytis cinerea* sono ampiamente discusse in letteratura, ma l'uva può essere attaccata da altri funghi alterando la composizione chimica e le proprietà del succo come *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*.

Le contaminazioni fungine dei tappi e delle botti può generare prodotti metabolici finali che sono inevitabilmente rilasciati nel vino.

Isolamento per piastramento su terreno agar dicloran-rosa bengala- cloramfenicolo (DRBC).

VINI BOTRITIZZATI

Botrytis cinerea o *Plasmopara viticola*, agenti di malattie.
Botrytis cinerea fungo Ascomicete.

Relazione tra modificazioni chimiche del grappolo e il metabolismo del fungo.

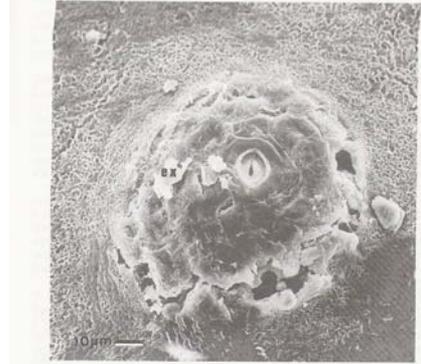


FIGURE 11.1 Scanning electron micrograph of a peristomal crack showing dehydrated exudates on grape skin. ex: exudates.

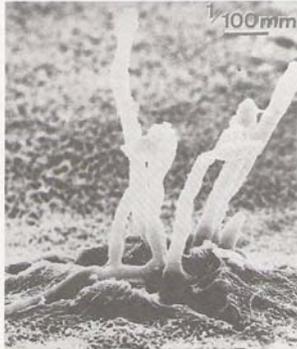


FIGURE 11.3 Scanning electron micrograph of fungal hyphae (*Botrytis cinerea*) raising outside the grape berry.

Tecniche di laboratorio di Microbiologia

Isolamento e conta

Il piastramento dei campioni su terreno solidificato con agar è la procedura standardizzata per l'isolamento e per la conta di lieviti da uva, succo d'uva, vino e dagli ambienti in cui si produce vino.

Tecniche di pour plate e di spread plate

Per la conta dei lieviti si utilizza inoltre: 1. la filtrazione su membrana, 2. MPN, 3. Esame microscopico.

Terreni di coltura non selettivi:

- (i) agar con succo d'uva;
- (ii) agar con estratto di malto;
- (iii) agar con malto-estratto di lievito (YM);
- (iv) altri agar nutrienti.

Le limitazioni che si presentano utilizzando tali terreni vengono superate attraverso l'impiego di terreni che sopprimono selettivamente la crescita delle specie dominanti, senza inibire quelle presenti in numero più basso.

Terreni di coltura selettivi:

- (i) agar-ferina, per l'isolamento selettivo e la conta di popolazioni di specie non-Saccharomyces (e.g. *Kluyveria apiculata*, *Candida zeylanoides*);
- (ii) terreno nutriente contenente etanolo (12%) e sodio metabisolfito (0,015%) per la conta selettiva di specie di *Zaccharomyces* durante la fermentazione del vino;
- (iii) terreno contenente elevate concentrazioni di sorbitolo o di benzato per l'isolamento selettivo di *Zygosaccharomyces bailii*, specie spesso associate con il deterioramento del vino;
- (iv) Biggy agar può essere usato per monitorare la presenza di lieviti che producono idrogeno solforato (H₂S), questo terreno contiene sulfuro di bismuto che reagisce con la coltura che produce H₂S che scolorisce i punti microscopici.

