

QUALE AZOTO PER I LIEVITI?

ANNE ORTIZ-JULIEN*, FRANÇOISE RAGINEL*, CÉLINE RAYNAL*, DANIEL GRANÈS**, CAROLINE BONNEFOND**

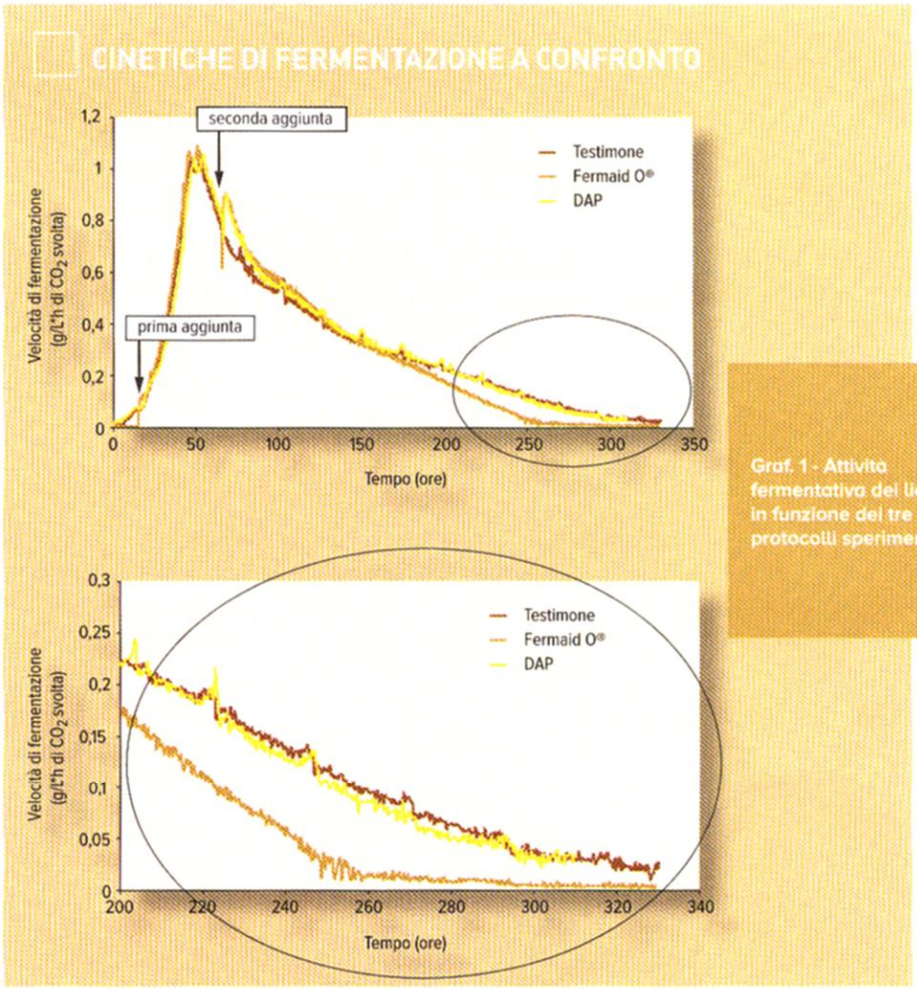
CINETICA FERMENTATIVA, PROFILO ORGANOLETTICO FINALE, NATURALITÀ: I RIFLESSI DELLE DIVERSE STRATEGIE DI NUTRIZIONE AZOTATA DEI LIEVITI

La pianificazione di un corretto programma nutrizionale, in ottemperanza ai fabbisogni nutritivi dei lieviti enologici, è uno dei fattori cruciali per lo svolgimento regolare e sicuro della fermentazione alcolica (FA). Oggiorno, l'aggiunta di nutrienti azotati è una tecnica ampiamente utilizzata dai tecnici enologi per una corretta gestione della vinificazione.
Numerosi studi hanno evidenziato già da molti anni come l'azoto eserciti un effetto positivo sulla crescita e sull'attività fermentativa. È stata dimostrata anche l'esistenza di una correlazione tra la velocità massima di fermentazione, la crescita del lievito e la concentrazione iniziale di azoto nel mosto. All'opposto, carenze di azoto prontamente assimilabile (APA) diminuiscono la crescita, la moltiplicazione del lievito e la velocità di fermentazione.

La sintesi delle proteine di membrana deputate al trasporto degli zuccheri all'interno della cellula del lievito è grandemente influenzata dalla disponibilità e dalla qualità dell'azoto nel mezzo fermentativo, perciò, come noto, carenze nutrizionali incrementano considerevolmente il rischio di fermentazioni stentate o in arresto.
La scarsità di APA nel mosto può anche avere importanti ripercussioni dal punto di vista sensoriale: Il lievito può essere spinto a incrementare la produzione di idrogeno solforato e altre molecole indesiderate in fermentazione, con comparsa di problemi di riduzione e deprezzamento del profilo organolettico generale.

I NUTRIENTI AZOTATI DISPONIBILI

Le fonti di azoto comunemente impiegate per la nutrizione dei mosti sono i sali di ammonio (ammonio fosfato, DAP, e ammonio solfato, DAS), cioè fonti d'azoto inorganiche, oppure nutrienti complessi composti da sali d'ammonio e da frazioni di lieviti ricche in azoto aminoacidico. Ognuna di queste due categorie di nutrienti manifesta un effetto differente sui lieviti e sulla loro fermentazione.
L'ammonio (azoto minerale) è assimilato dal lievito molto rapidamente, e ha un'influenza diretta sulla biomassa, determinando un aumento significativo nella popolazione di lieviti durante la fase di crescita. L'effetto dei nutrienti complessi sulla velocità di fermentazione e di crescita è più moderato, ma tali preparazioni aiutano ad assicurare un andamento più costante della FA, con un risultato cinetico e organolettico ottimale.
Dal punto di vista tecnologico bisogna tenere in considerazione che l'elevata velocità di assimilazione dei sali d'ammonio conduce facilmente a elevati picchi di temperatura, i quali possono risultare deleteri per la qualità del vino e per la vitalità cellulare a fine fermentazione.
L'assimilazione lenta e regolare dell'azoto organico può rappresentare un valido strumento per ovviare a questi problemi.
Non da meno, l'utilizzo di un nutriente totalmente a base di azoto organico può essere visto favorevolmente da aziende e consumatori orientati verso produzioni biologiche, che escludono a priori l'utilizzo di prodotti chimici di sintesi lungo l'intera filiera vitivinicola.
Anche gli effetti sensoriali dell'integrazione di azoto nei mosti variano considerevolmente in funzione della fonte selezionata. I preparati complessi assicurano una nutrizione più completa e contengono frazioni di lieviti inattivati ricche in aminoacidi, i quali limitano l'eccessiva produzione di composti indesiderabili (acetato di etile ed esanolo) e incrementano l'espressione dei composti aromatici positivi (feniletanolo, fenilacetato, terpeni ed esteri), provocando contemporaneamente un'evidente riduzione degli odori solforati nei mosti, indipendentemente dalla varietà.
La prima parte dello studio è stata incentrata sulla valutazione comparativa dell'efficacia di fonti di APA differenti sulle cinetiche di fermentazione. Nella seconda parte del lavoro, si è valutato l'effetto sensoriale dei diversi nutrienti azotati.



Graf. 1 - Attività fermentativa dei lieviti in funzione dei tre protocolli sperimentali.

FONTI DI AZOTO E ATTIVITÀ FERMENTATIVA

Mosti bianchi

Le prove sono state svolte in collaborazione con l'Inra (Istituto Nazionale per la Ricerca Agronomica, Francia) di Pech-Rouge.
L'obiettivo di queste prove era comparare l'efficacia delle aggiunte di azoto ammoniacale e di un nuovo nutriente completamente organico ricco in aminoacidi facilmente assimilabili a elevato valore biologico.



La forma di azoto assimilabile aggiunto al mosto può influenzare sia la cinetica di fermentazione, sia il profilo sensoriale del vino finito.

Nei mosti di partenza sono state effettuate due aggiunte dei nutrienti descritti per apportare ai lieviti la stessa quantità di APA (16 mg/L), al fine di valutare, a parità di APA aggiunto, le differenze qualitative delle due fonti di azoto sulla cinetica di fermentazione.
L'analisi iniziale del mosto da uve Viognier era la seguente:

- zuccheri: 215 g/L;
- acidità totale: 5,3 g/L in acido tartarico;
- pH: 3,65;
- APA: 150 mg/L.

La torbidità iniziale è aggiustata a 100 NTU con l'aggiunta dello 0,5% di parti solide di uva Maccabeu.
Le fermentazioni sono state condotte alla temperatura costante di 20°C in fermentatori della capacità di 1 hL che permettevano il monitoraggio in tempo reale della velocità di fermentazione. Il lievito (Lalvin EC1118) è stato inoculato nel mosto alla dose di 25 g/hL dopo reidratazione in acqua a 37°C.
In entrambi i casi, sono stati aggiunti 16 mg/L di APA, seguendo i protocolli di aggiunta descritti di seguito:

- fosfato d'ammonio (DAP): 8 g/hL in due aggiunte (4 g/hL all'avvio e a un terzo della fermentazione);
- azoto organico (Fermaid O®, nutriente a base di specifiche frazioni di lievito): 40 g/hL in due aggiunte (20 g/hL all'avvio e a un terzo della fermentazione);
- fermentazione di riferimento (testimone) senza aggiunta di nutrienti azotati.

Le esigenze azotate dei lieviti

Le concentrazioni di APA nei mosti possono essere molto variabili e comprese tra gli 80 e i 400 mg/L. Un mosto con un livello iniziale di zuccheri di circa 200 g/L può essere considerato carente di nutrienti quando la concentrazione in azoto prontamente assimilabile è inferiore a 150 mg/L, ma bisogna tenere in considerazione che all'aumentare del grado alcolico potenziale le richieste nutritive dei lieviti crescono in modo più che proporzionale (indicativamente di 30 mg/L di APA ogni grado alcol in più).

Le cinetiche di fermentazione rappresentate nel grafico 1 sono state ottenute mediante il monitoraggio in tempo reale della velocità di rilascio della CO_2 dal mezzo fermentante.
Con l'aggiunta di 16 mg/L di APA in forma organica, la fermentazione viene completata più velocemente, in circa 10 giorni. Non sono state osservate differenze tra la velocità di fermentazione del mosto addizionato con 16 mg/L di APA in forma ammoniacale e quella del mosto senza aggiunta di azoto.
Il mosto aggiunto di azoto inorganico (DAP) ha mostrato un finale di fermentazione stentato e un maggiore residuo zuccherino rispetto alla tesi aggiunta Fermaid O® (grafico 2).

PROVE INRA: IL PIANO SPERIMENTALE

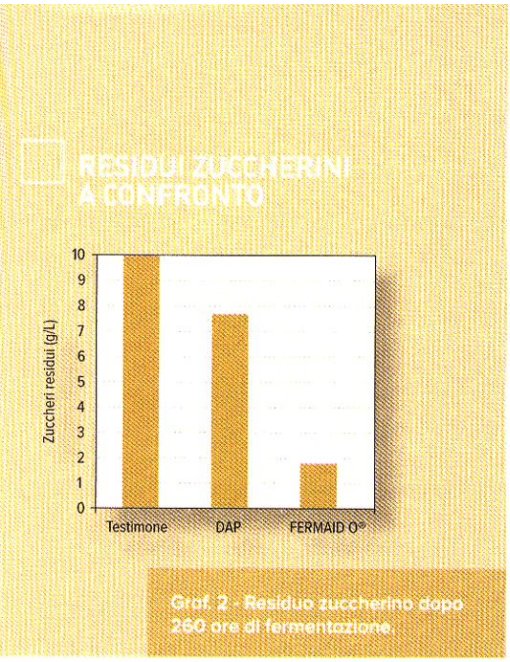
Nutriente azotato	APA apportato al mosto con 30 g/hL	APA aggiunto nelle prove	Quantità aggiunta	Fonte d'azoto
DAP	63 mg/L	16 mg/L	8 g/hL	100% fosfato di ammonio
Fermaid® O	12 mg/L	16 mg/L	40 g/hL	100% aminoacidi del lievito
Testimone	-	0 mg/L	0 g/hL	-

Tab. 1 - Piano sperimentale delle prove condotte in collaborazione con l'Inra di Pech-Rouge su mosti da uve Viognier e Portan.

PROVE ICV: IL PIANO SPERIMENTALE

Nutriente azotato	APA apportato al mosto con 30 g/hL	APA aggiunto nelle prove	Quantità aggiunta	Fonte d'azoto
DAS	63 mg/L	50 mg/L	24 g/hL	100% solfato di ammonio
Fermaid® E	42 mg/L	42 mg/L	30 g/hL	Aminoacidi del lievito e azoto ammoniacale
Fermaid® O	12 mg/L	16 mg/L	40 g/hL	100% aminoacidi del lievito

Tab. 2 - Piano sperimentale delle prove condotte in collaborazione con l'Icv di Montpellier su mosti da uve Sauvignon, Chardonnay e Grenache rosato.



Graf. 2 - Residuo zuccherino dopo 260 ore di fermentazione.

Mosti rossi

Come la precedente, anche questa prova è stata svolta in collaborazione con l'Inra di Pech-Rouge. L'obiettivo della prova era quello di comparare nella vinificazione in rosso l'efficacia delle aggiunte di sali ammoniacali e di azoto organico a parità di APA aggiunto (16 mg/L) con le stesse modalità della prova svolta nella vinificazione in bianco. L'analisi del mosto da uve Portan diraspate e pigiate era la seguente:

- zuccheri: 247 g/L;
- acidità totale: 5,2 g/L in acido tartarico;
- pH: 3,38;
- APA: 150 mg/L.

Il mosto è stato solfitato e inoculato con 25 g/hL di lievito (Lalvin EC1118). La temperatura di fermentazione è stata mantenuta a 24°C e sono stati prelevati giornalmente campioni in occasione della follatura.

Per la nutrizione sono stati utilizzati i medesimi protocolli della prova svolta su Viognier.

Come illustrato nel grafico 3, benché non si osservino differenze significative tra le diverse tesi al momento della svinatura, emerge una tendenza verso una miglior chiusura di fermentazione dove è stato aggiunto azoto in forma totalmente organica.

Ulteriori test

In un'altra serie di prove svolte in collaborazione con l'Icv (Istituto Cooperativo del Vino) di Montepellier, i due nutrienti a base di azoto organico e inorganico sono stati confrontati con un nutriente complesso a base di frazioni selezionate di lieviti inattivati e azoto inorganico (Fermaid E®).

In questo esperimento, a differenza dei precedenti, le quantità di APA apportato dai diversi nutrienti non erano equivalenti.

Il protocollo adottato è stato il seguente:

- solfato d'ammonio (DAS): aggiunta di 22 g/hL a un terzo della fermentazione;
- Fermaid O®: aggiunta di 40 g/hL a un terzo della fermentazione;
- Fermaid E®: aggiunta di 30 g/hL a un terzo della fermentazione.

Le aggiunte sono state effettuate nello stesso momento, però con differenze considerevoli tra i livelli di APA apportato (tabella 2).

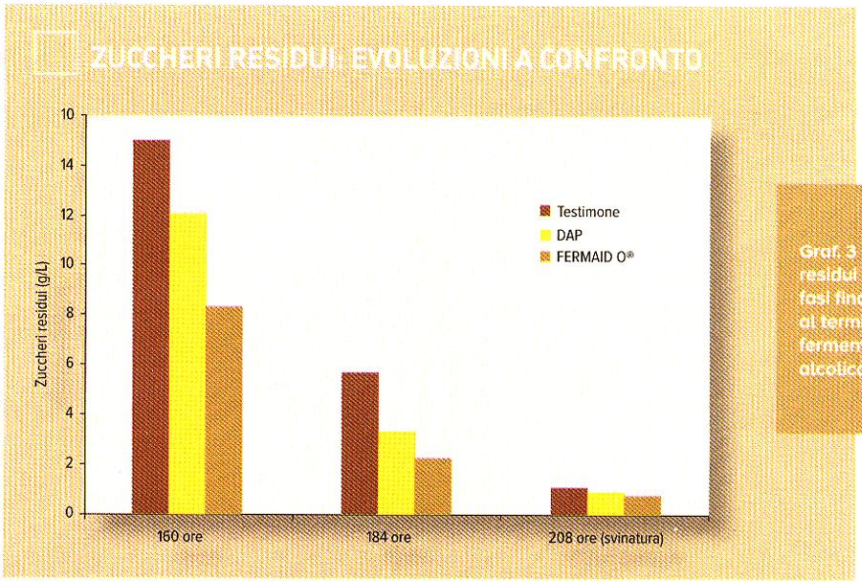
Le prove sono state svolte su mosti di tre cultivar differenti (tabella 3). Nonostante i valori iniziali variabili e le differenze tra le quantità di APA aggiunto, i dati delle cinetiche di fermentazione associati con le differenti fonti di azoto non hanno presentato differenze significative. Con solamente 16 mg/L di APA aggiunto, i 40 g/hL di azoto organico si sono dimostrati altrettanto efficaci dei 50 mg/L di APA del solfato diammonico (grafico 4).

Infine, in una prova di vinificazione in rosso svolta su scala industriale (vasche da 200 hL) in un mosto di Grenache con elevato alcol potenziale (15,5% v/v), l'aggiunta di 30 g/hL di azoto organico a un terzo della fermentazione ha aiutato il lievito (Lalvin ICV D80®) a consumare gli zuccheri in condizioni di vinificazione particolarmente difficili.

Il testimone, addizionato nello stesso momento con la medesima quantità di una miscela di DAP e DAS, non è riuscito a concludere la fermentazione, e quando questa si è arrestata il mosto-vino conteneva 5 g/L di zuccheri residui (dati non riportati).

FONTI DI AZOTO E PROFILI SENSORIALI

L'analisi sensoriale è stata svolta con una degustazione cieca del vino tre mesi dopo l'imbottigliamento da parte di una giuria addestrata tramite standard di riferimento. Il panel ha utilizzato una scala strutturata a quat-



Graf. 3 - Zuccheri residui nelle fasi finali e al termine della fermentazione alcolica.

PROVE ICV: I MOSTI

Parametri	Sauvignon	Chardonnay	Grenache rosato
Gradazione alcolica potenziale	12,4 % Vol.	14,2 % Vol.	12,6 % Vol.
APA iniziale	141 mg/L	225 mg/L	111 mg/L

Tabella 3



Nelle prove condotte su vini bianchi e rossi, l'azoto organico ha *ammorbidito* il profilo gustativo generale.

I sistemi di assimilazione

Le due fonti di azoto assimilabili da *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni enologiche sono lo ione ammonio (NH_4^+) e l'azoto α-amminico (aminoacidi liberi esclusa la prolina, che non può essere assimilata in anaerobiosi). Lo ione ammonio (azoto inorganico) e gli aminoacidi (azoto organico) coesistono naturalmente nei mosti. L'assimilazione dell'azoto da parte di *Saccharomyces cerevisiae* avviene grazie a trasportatori di membrana, diversi a seconda che si tratti di azoto organico o inorganico. Per gli aminoacidi esistono due livelli di assimilazione: una permeasi generica (GAP – *General Aminoacid Permease*) e trasportatori a elevata affinità, specifici soltanto per uno o più aminoacidi. Il GAP è la proteina di trasporto più importante, ma è inibita dalla presenza di NH_4^+, e in effetti comincia a operare solamente quando il mosto non contiene più azoto ammoniacale. Per assicurare la sua crescita, il lievito deve in ogni caso sintetizzare tutte le proteine di cui ha bisogno, anche quando non può gestire l'assimilazione di tutte le fonti di azoto presenti nel mosto. Perciò, un eccesso di azoto inorganico nelle prime fasi della fermentazione può ostacolare l'assimilazione degli aminoacidi e il loro accumulo nella cellula; ciò può portare il lievito a possibili stress da carenza di azoto in fase stazionaria o a un arresto prematuro della fermentazione.

tro valori d'intensità (metodo ASDQ – Analisi Sensoriale Descrittiva Quantificata).

Vinificazione in bianco

Il primo vino considerato è stato un Sauvignon Blanc, fermentato secondo un protocollo standard, ma con differenti aggiunte di nutrienti (lievito Lalvin ICV Opale®).

I risultati mostrano che i profili sensoriali sono descritti come solforati, ma anche di frutta candita per il DAS, in confronto a una nota dominante di frutta esotica per le fonti di azoto organiche.

Al gusto, l'azoto inorganico enfatizza l'aggressività, con morbidezza e volume inferiori alle altre prove, e con livelli significativamente maggiori di secchezza e amaro. In termini enologici, si potrebbe affermare che il DAS *indurisce* il gusto, mentre l'azoto organico lo *ammorbidisce* (grafico 5).

Vinificazione in rosso

Le prove di vinificazione in rosso sono state svolte su uve Syrah (lievito Lalvin ICV GRE®). L'analisi sensoriale è stata condotta nelle stesse condizioni e col medesimo metodo della prima prova. Tuttavia, i descrittori aromatici sono differenti.

Dai risultati sembra emergere che l'aggiunta di azoto organico o di nutrienti complessi intensifichi le sensazioni aromatiche ritenute generalmente positive: aromi di frutta a bacca rossa, confettura e spezie. Nel vino trattato con DAS dominavano invece le note solforate e di frutta a bacca rossa.

Al gusto, le differenze sono ancora più evidenti. Il volume del campione aggiunto di azoto organico è correlato all'attenuazione delle sensazioni aggressive finali.

I vini derivati dai mosti aggiunti di DAS hanno ottenuto punteggi non conformi per un vino rosso del segmento *Premium*: odori solforati, amaro e secchezza in finale di degustazione (grafico 6).

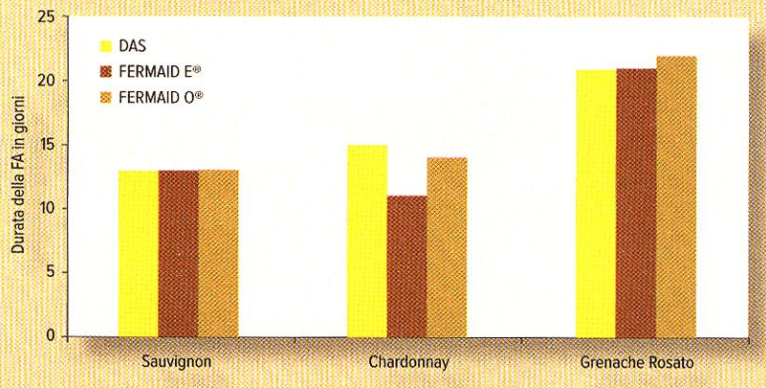
I molteplici vantaggi dell'azoto organico

I risultati dello studio confermano l'importanza di una corretta gestione della nutrizione del lievito in vinificazione e mettono in luce gli effetti cinetici e organolettici derivati da una precisa scelta della forma di azoto assimilabile aggiunta.

In prove sperimentali su mosti a rischio di carenze azotate, un'integrazione con un attivante a base di azoto organico e α-aminoacidi ha permesso di ottenere risultati fermentativi migliori rispetto alla stessa quantità di azoto assimilabile di origine inorganica, a testimonianza dell'elevato valore intrinseco di questa fonte nutrizionale.

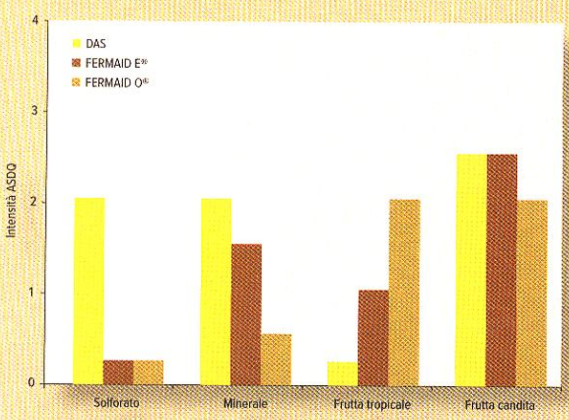
Questi nutrienti naturali, assimilati più lentamen-

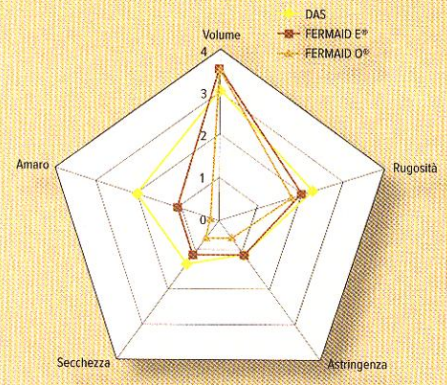
Nutrienti azotati e durata della fermentazione



Graf. 4 Durata della fermentazione alcolica associata all'aggiunta di tre diversi nutrienti in tre diversi mosti di partenza.

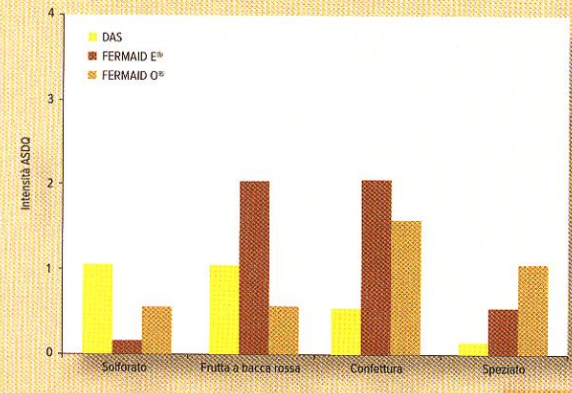
NUTRIENTI AZOTATI E IMPATTO OLFATTIVO: SAUVIGNON BLANC

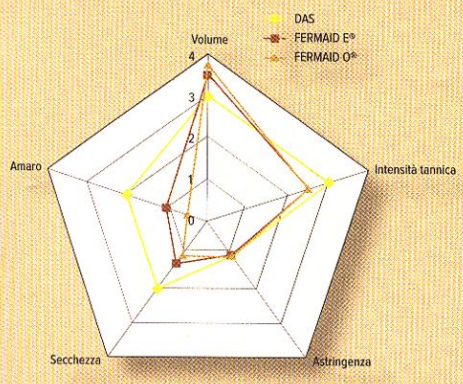




Graf. 5 Impatto olfattivo e gustativo di diverse aggiunte di nutrienti azotati su vino Sauvignon Blanc.

NUTRIENTI AZOTATI E IMPATTO OLFATTIVO: SYRAH





Graf. 6 Impatto olfattivo e gustativo di diverse aggiunte di nutrienti azotati su vino Syrah.



Le prove descritte n questo artcolo mettono a confronto fonti azotate inorganiche e organiche testate su mosti da varietà di uve diverse.

te ma con maggior regolarità, nelle prove di vinificazione in bianco e in rosso, hanno favorito l'espressione aromatica dei vini, riducendo contemporaneamente le note aggressive e arricchendo il profilo organolettico complessivo. L'interesse del mercato per vini biologici, o meglio da uve biologiche (in attesa di una regolamentazione ufficiale) potrà rappresentare un'ulteriore opportunità per la diffusione di nutrienti organici ricavati unicamente dal lievito.

La Bibliografia può essere richiesta a costanza.fregoni@tecnichenuove.com

*Lallemand SAS - Blagnac Cedex (Francia)
**Institut Coopératif du Vin - Lattes (Francia)