

IMPATTO DI DIVERSE FORME DI AZOTO ASSIMILABILE SULLA FISIOLOGIA DEL LIEVITO E SUL PROFILO ORGANOLETTICO DEI VINI

Anne ORTIZ-JULIEN¹, Françoise RAGINEL¹, Céline RAYNAL¹, Daniel GRANÈS²,
Caroline BONNEFOND²

¹ Lallemand SAS, 19, rue des Briquetiers, Blagnac Cedex 31702 Francia

² Institut Coopératif du Vin, La Jasse de Maurin, 34970 Lattes Francia

Introduzione

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. L'aggiunta di nutrienti azotati è da sempre considerata dai tecnici enologi come uno degli strumenti più importanti da tenere in considerazione in vinificazione.

Numerosi studi hanno messo in evidenza già da molti anni come l'azoto eserciti un effetto positivo sulla crescita e sull'attività fermentativa dei lieviti (Bell *et al.* 1979, Ough e Lee 1981, Bezenger e Navarro 1987). 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 (Sablayrolles *et al.* 2001). All'opposto carenze di azoto prontamente assimilabile (APA) diminuiscono la crescita e la moltiplicazione del lievito e, di conseguenza, la velocità di fermentazione (Bely *et al.* 1990).

La sintesi delle proteine di membrana deputate al trasporto degli zuccheri all'interno della cellula in attiva fermentazione è grandemente influenzata dalla disponibilità e dalla qualità dell'azoto nel mezzo fermentativo (Basturia e Lagunas 1986), 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 ad incrementare la produzione di H₂S (Henschke e Jiranek 1991) ed altre molecole negative con comparsa di problemi di riduzione e deprezzamento del profilo organolettico generale.

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 (Henschke e Jiranek 1993), ma bisogna tenere in considerazione che all'aumentare del grado alcolico potenziale la richieste nutritive dei lieviti crescono in modo più che proporzionale.

Tabella ICV?

Fonti d'Azoto e loro Effetto

Le due fonti di azoto assimilabili da *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni enologiche sono lo ione ammonio (NH₄⁺) 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 specifici sistemi di trasporto, diversi a seconda che si tratti di azoto organico od inorganico.

L'ingresso dello ione ammonio è mediato da almeno due diversi trasportatori di membrana, per gli aminoacidi esistono invece due livelli di assimilazione: una permeasi generica (GAP – *General Aminoacid Permease*) e dei trasportatori ad elevata affinità specifici soltanto per uno o più aminoacidi.

Il GAP è la proteina di trasporto più importante ma è inibita dalla presenza di ammonio e in effetti, comincia ad operare solamente quando il mosto non contiene più azoto ammoniacale.

Per assicurare la sua crescita, il lievito deve comunque sintetizzare tutte le proteine di cui necessita, anche quando non può gestire l'assimilazione di tutte le fonti di azoto presenti nel mosto.

Ne risulta che un eccesso di azoto inorganico nelle prime fasi della fermentazione può ostacolare l'assimilazione degli aminoacidi e il loro accumulo nella cellula portando il lievito a possibili stress da carenza di azoto in fase stazionaria o ad un arresto prematuro della fermentazione.

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 inattivati 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, ed 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 ad elevati picchi di temperatura durante la fermentazione che possono risultare deleteri per la qualità del vino e per la vitalità delle cellule del lievito a fine fermentazione. L'assimilazione lenta e regolare dell'azoto organico può rappresentare un valido strumento per ovviare a questi problemi.

Inoltre l'utilizzo di un nutriente a base di azoto organico può essere visto favorevolmente da aziende e consumatori orientati verso produzioni biologiche che escludano a priori l'utilizzo di prodotti chimici di sintesi lungo la filiera di produzione vitivinicola.

Gli effetti sensoriali dell'integrazione di azoto nei mosti variano considerevolmente in funzione della fonte d'azoto selezionata. I preparati complessi assicurano una nutrizione più completa, essi contengono frazioni di lieviti inattivati ricche in aminoacidi, i quali limitano l'eccessiva produzione di composti indesiderabili (acetato di etile ed esanolo) ed 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 incentrata sulla valutazione comparativa dell'efficacia di fonti di APA differenti sulle cinetiche di fermentazione, quando vengono aggiunte al mosto in quantità equivalenti. Nella seconda parte del lavoro, abbiamo valutato l'effetto sensoriale di queste fonti d'azoto.

1. Effetto di differenti fonti di azoto sulla cinetica di fermentazione e sull'attività fermentativa dei lieviti

1.1. Prove svolte in collaborazione con l'INRA (Istituto Nazionale per la Ricerca Agronomica, Francia) di Pech-Rouge nella vinificazione di mosti bianchi

L'obiettivo di queste prove è comparare l'efficacia delle aggiunte di azoto ammoniacale e di un nuovo nutriente completamente organico ricco in aminoacidi e peptidi facilmente assimilabili.

Nei mosti di partenza sono state effettuate due aggiunte dei nutrienti descritti per apportare ai lieviti la stessa quantità di APA di 16 mg/L. Ciò permetterà di valutare, a parità di APA aggiunto, le differenze qualitative delle due fonti di azoto sulla cinetica di fermentazione.

Mosto da uve Viognier

Analisi della composizione iniziale del mosto:

- Zuccheri: 215 g/L
- Acidità totale: 2,5 g/L in H₂SO₄ (pari a circa 3,8 g/L in acido tartarico)
- pH: 3,65
- APA: 150 mg/L
- Torbidità iniziale: aggiustata a 100 NTU con l'aggiunta dello 0,5% di parti solide di uva Maccabeu

Protocollo

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. I protocolli di aggiunta sono descritti di seguito.

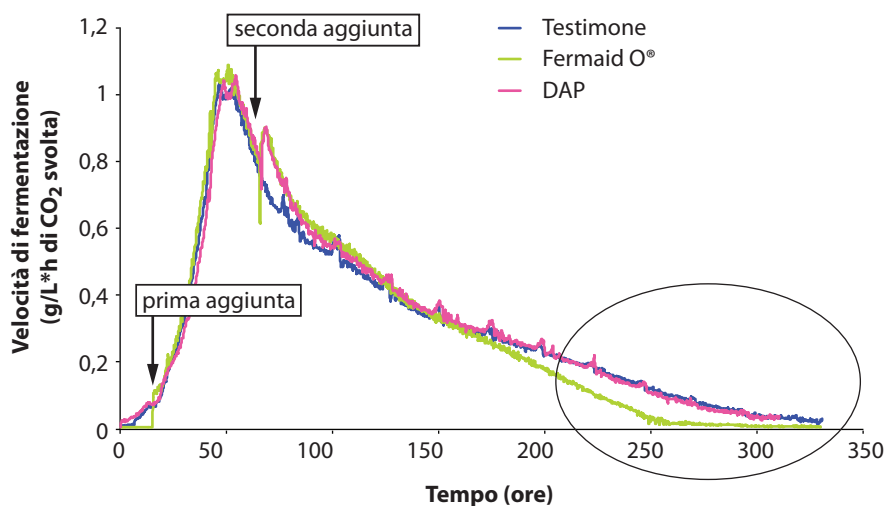
- Fosfato d'ammonio (DAP): 8 g/hL in due aggiunte (4 g/hL all'avvio e ad un terzo della fermentazione).
- Azoto organico (Fermaid O[®], nutriente a base di specifiche frazioni di lievito): 40 g/hL in due aggiunte (20 g/hL all'avvio e ad un terzo della fermentazione).
- Fermentazione di riferimento (testimone)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

TABELLA 1 : Piano sperimentale

	APA apportato al mosto con 30 g/hL	APA da aggiungere nelle prove	Quantità aggiunta	Fonte d'azoto
DAP	69 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	-	-

Le cinetiche di fermentazione in figura 1 sono state ottenute con il monitoraggio in tempo reale della velocità di rilascio della CO₂ dal mezzo in fermentazione (Sablayrolles *et al.*, Unità Sperimentale di Pech-Rouge).

FIGURA 1: attività fermentativa dei lieviti in funzione dei tre protocolli sperimentali. Velocità di fermentazione espressa in g/L*h di CO₂ svolta.



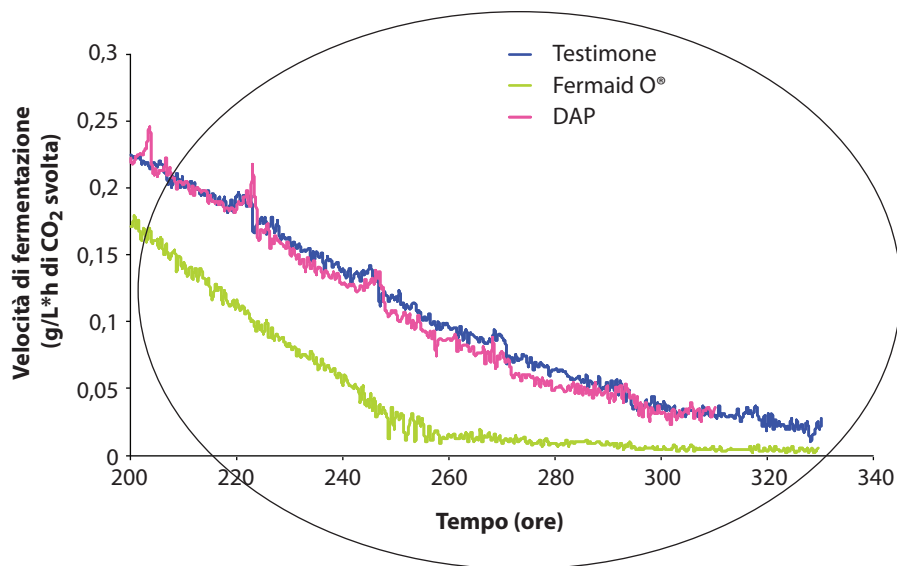
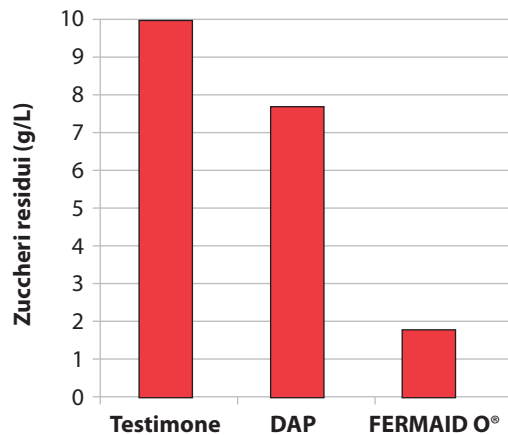


FIGURA 2: residuo zuccherino dopo 240 ore di fermentazione.



Osservando i dati combinati delle figure 1 e 2, emergono delle differenze tra le aggiunte di azoto inorganico (DAP) e organico in termini di efficacia fermentativa, in quanto entrambe le fonti di azoto contengono una quantità di APA equivalente.

Con l'aggiunta di 16 mg/L di APA in forma organica, la fermentazione viene completata 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 lento ed un maggiore residuo zuccherino rispetto alla tesi aggiunta Fermaid O®.

1.2. Prove svolte in collaborazione con l'INRA di Pech-Rouge nella vinificazione di mosti rossi

L'obiettivo della prova è 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.

Mosto da uve Portan (uve diraspate e pigiate)

Analisi della composizione iniziale del mosto:

- Zuccheri: 247 g/L
- Acidità totale: 3,4 g/L in H₂SO₄ (pari a circa 5,2 g/L in acido tartarico)
- pH: 3,38
- APA: 150 mg/L

Protocollo

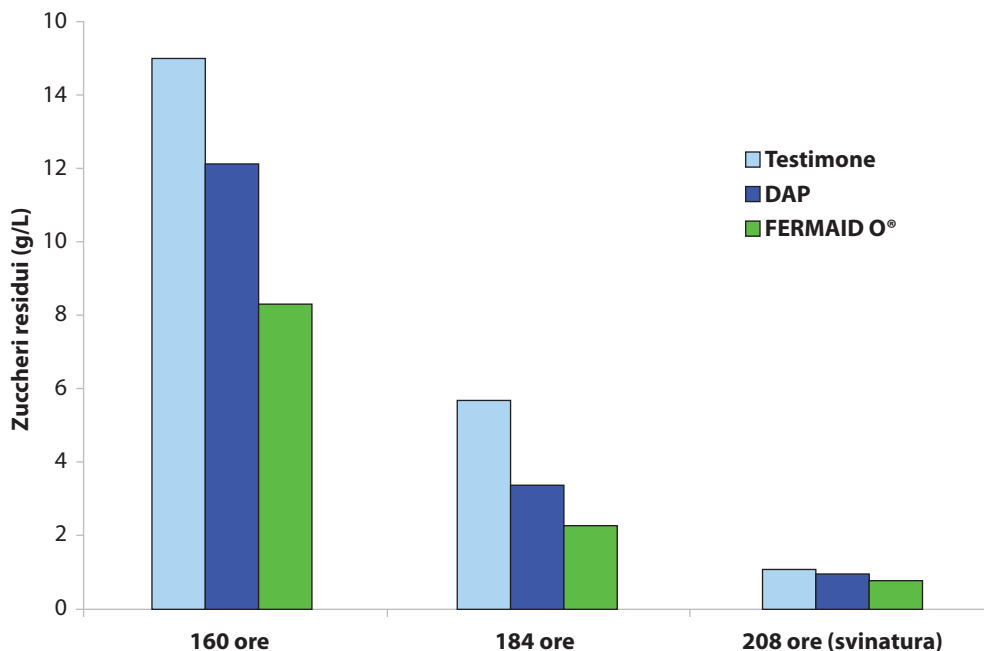
Il mosto è stato solfitato ed inoculato con 25 g/hL di lievito (Lalvin EC1118). La temperatura di fermentazione è stata mantenuta a 24 °C e sono stati prelevati giornalmente dei campioni in occasione della follatura.

A fine fermentazione, le vinacce sono state pressate e una miscela di vino fiore e di torchiato è stata messa in botticelle da 50 L e inocolata successivamente con una coltura malolattica selezionata. A fine fermentazione malolattica, il vino è stato travasato in botticelle da 30 L, solfitato e posto in una stanza fresca in attesa dell'imbottigliamento e delle analisi finali.

Per la nutrizione abbiamo utilizzato i medesimi protocolli della prova svolta su uve Viognier.

- Fosfato d'ammonio (DAP): 8 g/hL in due aggiunte (4 g/hL all'avvio e ad 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 ad un terzo della fermentazione).
- Fermentazione di riferimento (testimone) senza aggiunta di nutrienti azotati.

FIGURA 3: zuccheri residui nelle fasi finali e al termine della fermentazione alcolica.



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

1.3. Prove svolte dall'ICV (Istituto Cooperativo del Vino, Montpellier, Francia) nella sua cantina sperimentale

In un'altra serie di prove svolte in collaborazione con l'ICV di Montpellier i due nutrienti a base di azoto organico ed 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.

Protocollo

- Solfato d'ammonio (DAS): aggiunta di 22 g/hL ad un terzo della fermentazione (seguendo il protocollo descritto da Sablayrolles *et al.* 1996).
- Fermaid O®: aggiunta di 40 g/hL ad un terzo della fermentazione.
- Fermaid E®: aggiunta di 30 g/hL ad un terzo della fermentazione.

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

TABELLA 2: Piano sperimentale

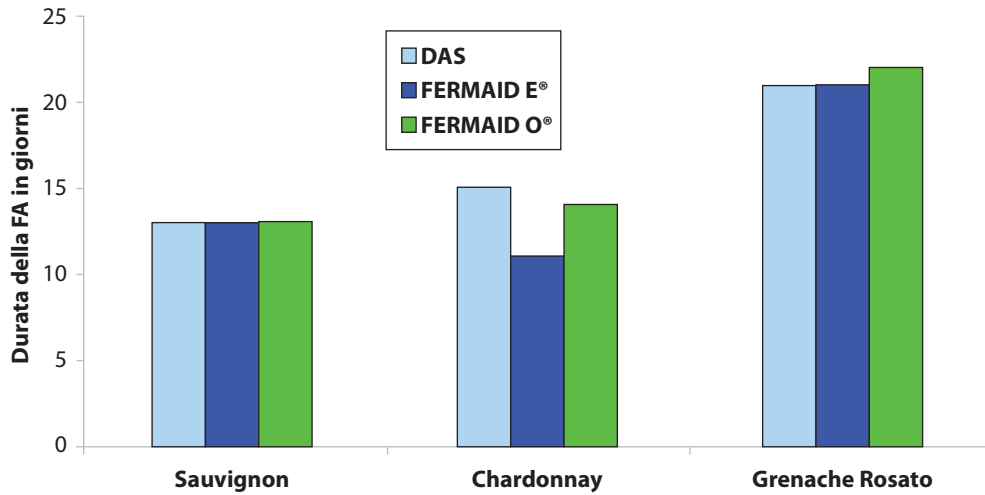
	APA apportato al mosto con 30 g/hL	APA da aggiungere nelle prove ICV	Fonte d'azoto
DAS	69 mg/L	50 mg/L	100% solfato di ammonio
Fermaid E®	42 mg/L	42 mg/L	Aminoacidi del lievito e azoto ammoniacale
Fermaid O®	12 mg/L	15 mg/L	100% aminoacidi del lievito

Le prove sono state svolte su mosti da tre cultivar differenti (vedi tabella 3). Nonostante le carenze nutrizionali di entità variabile 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 15 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 (figura 4).

TABELLA 3. Descrizione dei mosti

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

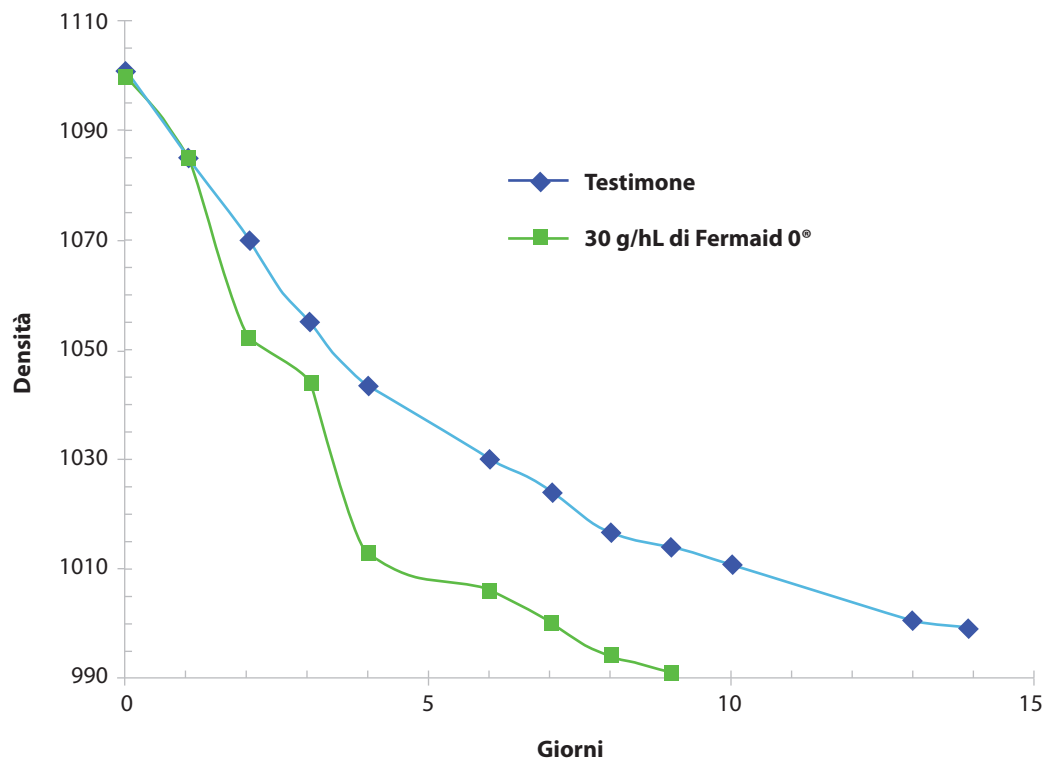
FIGURA 4. durata della fermentazione alcolica associata all'aggiunta di tre diversi nutrienti in tre diversi mosti di partenza.



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 ad un terzo della fermentazione ha aiutato il lievito (Lalvin ICV D80®) a consumare gli zuccheri in condizioni di vinificazione particolarmente difficili.

Il testimone, addizionato con la medesima quantità di una miscela di DAP, DAS ed una fonte di azoto dal lievito ad un terzo della fermentazione, non è riuscito a concludere la fermentazione, e quando questa si è arrestata, il mosto-vino conteneva 5 g/L di zuccheri residui (Figura 5).

FIGURA 5. cinetiche di fermentazione su mosto Grenache aggiunto di due differenti fonti azotate ad un terzo della fermentazione alcolica.



2. L'Effetto di differenti fonti di azoto sui profili sensoriali dei vini

L'analisi sensoriale è stata svolta con una degustazione cieca sul vino tre mesi dopo l'imbottigliamento, da parte di una giuria addestrata tramite standard di riferimento. Il panel ha utilizzato una scala strutturata a quattro valori d'intensità (metodo ASDQ - Analisi Sensoriale Descrittiva Quantificata). I grafici seguenti riportano i punteggi medi dati da ogni degustatore.

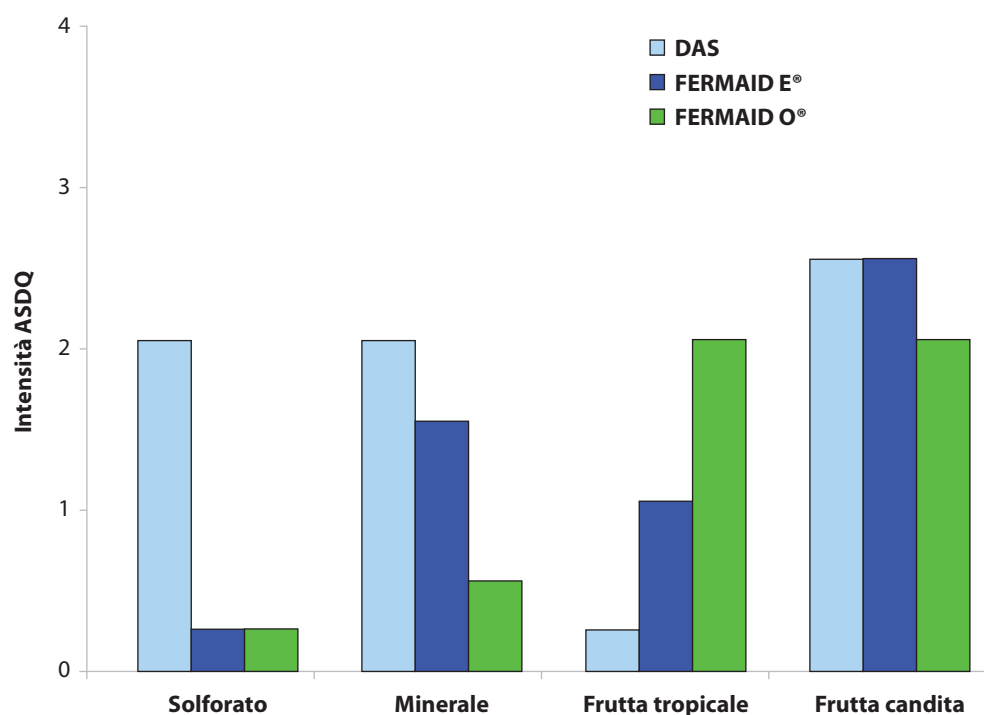
2.1 Vinificazione in bianco

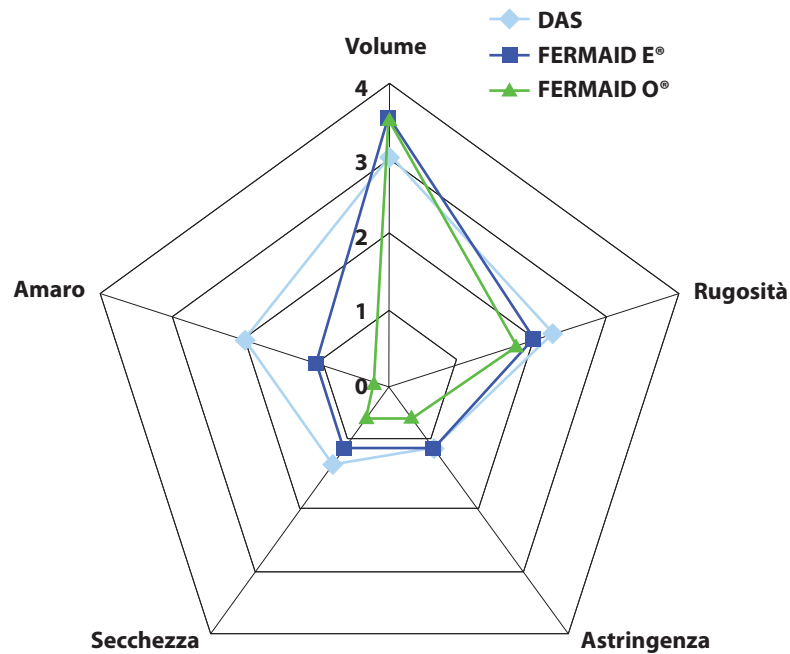
Il primo vino considerato è stato un Sauvignon blanc, fermentato secondo un protocollo standard, ma con differenti aggiunte di nutrienti (lievito Lalvin ICV Opale®).

I risultati mostrano che i profili sensoriali sono descritti come solforati, ma anche frutta candita per il DAS, in confronto ad una nota dominante di frutta esotica per le fonti di azoto organiche (Fig. 6).

Al gusto, l'azoto inorganico enfatizza l'aggressività, con morbidezza e volume inferiore alle altre fonti azotate, e con livelli significativamente maggiori di secchezza e amaro. In termini enologici, si potrebbe dire che il DAS "indurisce" il gusto, mentre l'azoto organico lo "ammorbidisce" (Fig. 7).

FIGURE 6 E 7: Impatto olfattivo e gustativo di diverse aggiunte di nutrienti azotati su vino Sauvignon blanc.





2.2 Prove su vinificazione in rosso

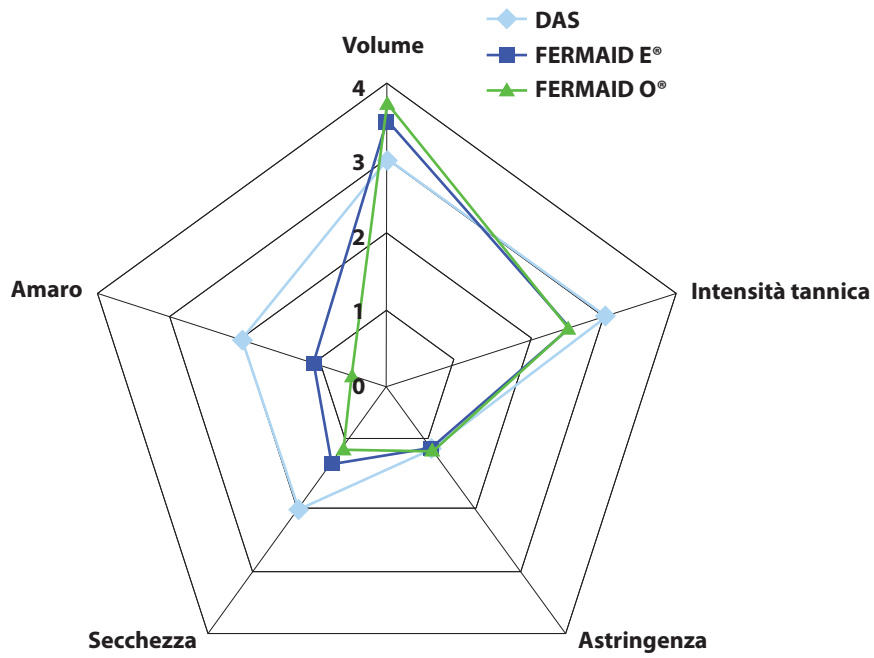
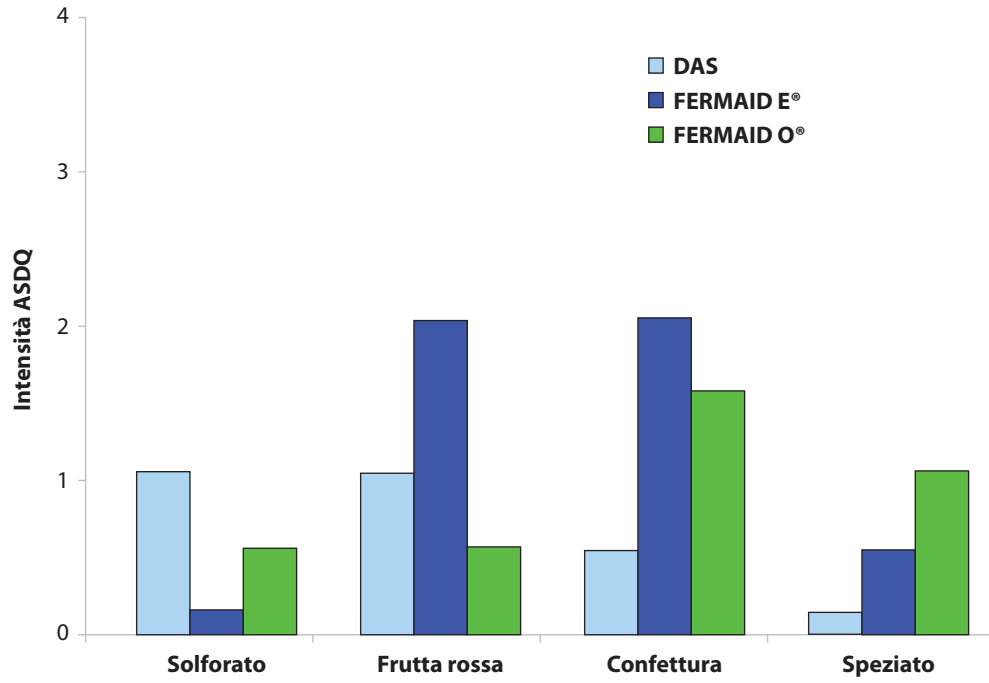
Le prove di vinificazione in rosso sono state svolte su uve Syrah (lievito Lalvin ICV GRE®). L'analisi sensoriale è stata condotta nelle stesse condizioni e col medesimo metodo della prima prova. Tuttavia, i descrittori aromatici sono differenti.

Dai risultati sembra emergere che l'aggiunta di azoto organico o di nutrienti complessi intensifichi le sensazioni aromatiche ritenute generalmente positive: aromi di frutta rossa, confettura e spezie. Nel vino trattato con DAS, dominavano le note solforate e di frutta rossa (Fig. 8).

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 (Fig. 9).

FIGURE 8 E 9: Impatto olfattivo e gustativo di diverse aggiunte di nutrienti azotati su vino Syrah.



Conclusioni

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 derivanti da una precisa scelta della forma di azoto assimilabile aggiunta al lievito.

Per mosti a rischio di carenze azotate, un'integrazione nutrizionale con azoto organico e α -aminoacidi ha permesso di ottenere ottimi risultati fermentativi.

Questa tipologia di nutrienti, assimilati più lentamente ma con maggior regolarità, nelle prove di vinificazione sia in bianco che in rosso, hanno favorito l'espressione aromatica dei vini riducendo contemporaneamente le note aggressive.

L'interesse del mercato per vini biologici, o meglio da uve biologiche (in attesa di una regolamentazione ufficiale) potrà rappresentare un'ulteriore occasione per la diffusione di nutrienti completamente organici tra le aziende ed i tecnici che desiderano limitare le aggiunte di prodotti inorganici di sintesi nel processo di vinificazione.

Referenze Bibliografiche

Agenbach, W.A. *A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. Proc. South African Soc. Enol. Vitic.*, Cape Town, Afrique du Sud. Stellenbosh SA, 66-87; 1977.

Bely, M., Sablayrolles, J.M. et Barre, P. *Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. J. Ferm. Bioeng.* 70: 246-252; 1991.

Bezenger, M., Navarro, J.M. *Influence de l'azote sur la fermentation alcoolique en milieu modèle simulant les conditions de l'oenologie. Sciences des aliments*, 7, 41-60; 1987.

Busturia, A. e Lagunas, R. *Catabolic inactivation of the glucose transport system in Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol.* 132: 379-385; 1986.

Delteil, D. *Exemple de mise au point de méthodes d'analyse sensorielle - 1^{re} partie. Revue des Œnologues.* 97: 36-40. 2000.

Henschke, P. e Jiranek, V. *Yeast metabolism of nitrogen compounds. Wine Microbiology and Biotechnology.* Fleet G.H. (Eds) 77-165; 1993.

Henschke, P. et Jiranek, V. *Int. Symp. On Nitrogen in Grapes and Wines*; 172-184; 1991.

Jiranek, V., Langridge, P. e Henschke, P. *Yeast nitrogen demand: selection criterion for wine yeasts for fermenting low nitrogen musts. Tiré de Proceedings of the international Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* Rantz J. (Ed.), 266-269; 1991.

Julien, A., Roustan, J.L., Dulau, L. e Sablayrolles, J.M. *Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. Am. J. Enol. Vitic.* 51 (3): 215-222; 2000.

Sablayrolles, J.M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L. e Barre, P. *Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. J. Ferm. Bioeng.* 82: 377-381; 1996.