



RELAZIONE PROGETTO

Convenzione CIRVE (Università di Padova)–SIVE (resp. Prof.ssa Viviana Corich): PROBLEMATICHE DI FERMENTAZIONE DEL MOSTO CHARDONNAY

Nell'ambito della ricerca mirata a valutare i fattori coinvolti nelle problematiche di fermentazione del mosto di Chardonnay è stata considerata l'influenza di un eccesso di prolina nel mosto dovuto ad un accumulo dell'aminoacido, in particolare da parte di questo vitigno, quando sottoposto a stress abiotici ⁽¹⁾.

La prova è stata svolta paragonando la cinetica di fermentazione in mosto sintetico (volume di fermentazione 100 ml) di due lieviti a diversa richiesta di azoto: EC1118 (ceppo commerciale notoriamente a bassa richiesta di azoto) ed un *Saccharomyces cerevisiae* isolato naturale da vigneto (K38) che in esperimenti precedenti aveva evidenziato un'elevata richiesta di composti azotati prontamente assimilabili (APA).

I due lieviti sono stati fatti fermentare in condizioni di APA di 300, 150, 75 mg/l, ciascuno con 3 dosi diverse di prolina (0,6; 1,2; 1,8 g/l), ripetendo tre volte ciascuna condizione.

La dose 300 mg/l di APA rappresenta la quantità che assicura la fermentazione di un mosto con 200 g/l di glucosio da parte di lieviti anche con elevate esigenze, mentre 140-150 mg/l di N è considerato un valore limite per la totale fermentazione degli zuccheri ⁽¹⁾; 75 mg/l di APA comporta sempre un forte rallentamento della fermentazione fino all'arresto della stessa quando ancora gli zuccheri non sono ultimati. Le concentrazioni di prolina sono state scelte a partire dalla dose considerata normale per un mosto (MS300)⁽²⁾ e poi raddoppiata e triplicata. Queste dosi di prolina sono state evidenziate in dati di letteratura proprio in mosti di Chardonnay e di altri vitigni che tendono ad accumulare quantità particolarmente elevate di questo aminoacido in seguito a stress abiotici.

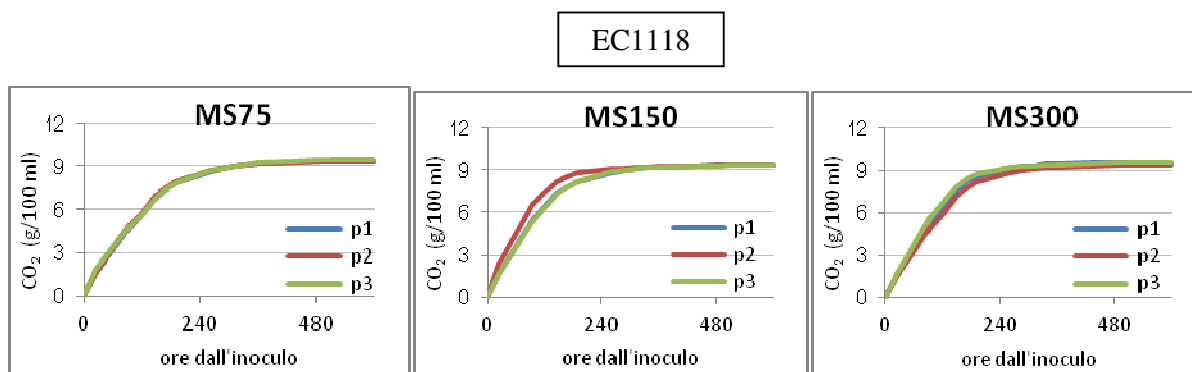
La prolina ha una dinamica di accumulo nel grappolo più elevata rispetto agli altri aminoacidi ⁽³⁾, per cui le sue concentrazioni sono state mantenute le stesse per le tre varianti di APA (la prolina, pur essendo un aminoacido, non è considerata nell'APA in quanto il lievito, in condizioni anaerobiche come quelle della fermentazione, non è in grado di utilizzarla; inoltre, la presenza degli altri aminoacidi, inibisce la specifica permeasi che ne consente l'entrata nella cellula) ⁽⁴⁾.

	APA (mg /L)	Prolina (g/L)		APA (mg /L)	Prolina (g/L)
EC1118 (lievito a bassa esigenza di azoto)	300	0,6	K38 (lievito ad alta esigenza di azoto)	300	0,6
		1,2			1,2
		2,4			2,4
	150	0,6		150	0,6
		1,2			1,2
		2,4			2,4
	75	0,6		75	0,6
		1,2			1,2
		2,4			2,4

Tab. 1 Riassunto delle condizioni testate

L'inoculo dei due ceppi è stato effettuato a partire da colture cresciute 24 ore in mezzo di crescita complesso (estratto di lievito 10 g/l, peptone 20g/l, glucosio 20g/l) e diluito in modo da avere 1-2 milioni di cellule/ml (OD₆₀₀ pari a 0,1). La successiva verifica tramite la conta su piastra dell'inoculo ha confermato un inoculo di $1,3 \cdot 10^6$ CFU/ml per entrambi i ceppi (la deviazione standard era di almeno un log inferiore per entrambi i ceppi).

Il monitoraggio della fermentazione è stato effettuato tramite la misura del calo in peso per 26 giorni. Le tre repliche di ciascuna combinazione di fattori sono state mediate (deviazione standard media=7%) ed il paragone tra le diverse tesi è illustrato nei seguenti grafici:



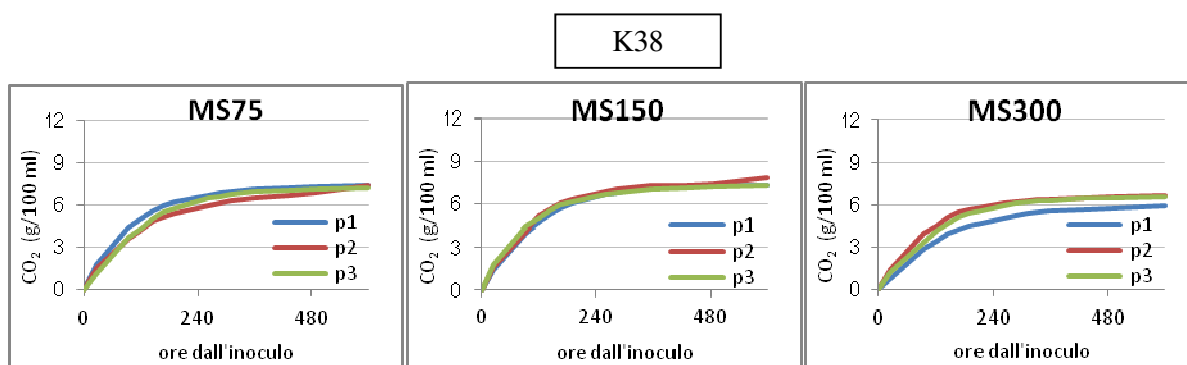


Fig. 1 Cinetiche di fermentazione alle diverse dosi di prolina (p1=0,6 g/l;p2=1,2 g/l; p3=1,8 g/l); nel mosto sintetico (MS).
75-150-300 mg/l è la concentrazione di APA

Per entrambi i ceppi di lievito è evidente che alle diverse dosi di APA non emergono differenze dovute all'incremento di prolina nel mosto sintetico (Fig. 1).

Andando però a confrontare le tre dosi di azoto, sorprendentemente non si vedono differenze nella cinetica di fermentazione, per entrambi i ceppi:

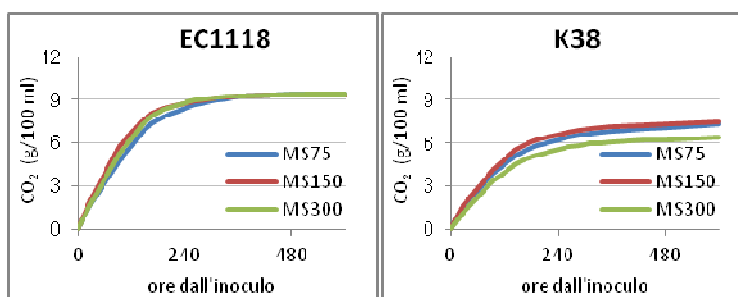


Fig. 2 Cinetiche di fermentazione alle diverse dosi di APA (75-150-300 mg/l)

In questo caso, in carenza di azoto (APA 75 mg/l) non si sono verificati i rallentamenti della fermentazione come documentato in letteratura sui mosti naturali e da precedenti esperimenti in allestiti in questo laboratorio in mosto sintetico, con APA simile e con tenori normali di prolina. Al contrario in questa sperimentazione, indipendentemente dalla dose di azoto, tutti hanno portato a compimento la fermentazione.

Poiché la prolina rappresentava l'unica fonte di azoto presente oltre all'APA, nonostante l'aminoacido possa essere utilizzato solo in condizioni di anaerobiosi ed in assenza di



aminoacidi competitori, l'ipotesi più immediata è che in qualche modo il lievito sia riuscito ad utilizzarla. Nell'intento di verificare questa ipotesi, è stata iniziata la messa a punto di un protocollo affidabile che permetta un'analisi accurata e precisa in modo da identificare gli aminoacidi presenti nel mosto, compresa la prolina. Tra le metodiche più usate in per scopi scientifici nonché per le analisi ufficiali degli aminoacidi c'è la separazione in HPLC previa reazione enzimatica che permette la rivelazione e quantificazione dei singoli aminoacidi (derivatizzazione). Sono stati testati 3 diversi tipi di derivatizzazione con diversi strumenti, ma al momento l'analisi non risulta essere sufficientemente affidabile nel mosto sintetico, in particolare per la prolina. Sono in corso ulteriori prove di messa a punto.

Anche nel caso del ceppo naturale k38, le cinetiche di fermentazione sono state simili tra i mosti con 75 mg/l di N assimilabile rispetto a quelli con maggior contenuto di azoto, anche se l'efficienza di fermentazione è stata decisamente bassa in tutti i casi (i valori di CO₂/ml apparentemente più bassi nel caso del MS300 non risultano essere significativi).

Conclusioni

Nonostante da questa sperimentazione siano emersi risultati sui quali sarà opportuno indagare ulteriormente per avere delle conferme che potrebbero avere notevole interesse enologico, non si sono riscontrati effetti negativi di dosi elevate di prolina sulla cinetica di fermentazione alle dosi testate (fino a 1,2 g/l) ed in mosto sintetico.

Anche se il 2016 non è stata un'annata particolarmente problematica, sono stati conservati alcuni mosti di Chardonnay che potrebbero permettere indagini future su mosto naturale. Si ritiene comunque che avere una metodica affidabile per la determinazione degli aminoacidi nel mosto sia importante sia per la soluzione della problematica dello chardonnay, ma ancor più per l'intero settore enologico.

BIBLIOGRAFIA

- (1) R. Boulton, V. Singleton, L. Bisson, R. Kunkee *Principles and Practices of Winemaking* pgs 46-48, 80-81, 153-167, 256 Springer 1996 New York
- (2) Bely M, Sablayrolles J-M, Barre P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng.* 1990;4:246-252. doi: 10.1016/0922-338X(90)90057-4.
- (3) K. SCHALLER, 2005 *Proline accumulation in grapevine berries during growth and development Is it a quality indicator?* (Bulletin O.I.V., 2005, vol. 78, n° 891-892, pp. 321-333).
- (4) Van Heeswijck et al., 2001 in *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, Kalliopi Apostolos Roubelakis-Angelakis ed., Kluwer Academic Publisher.