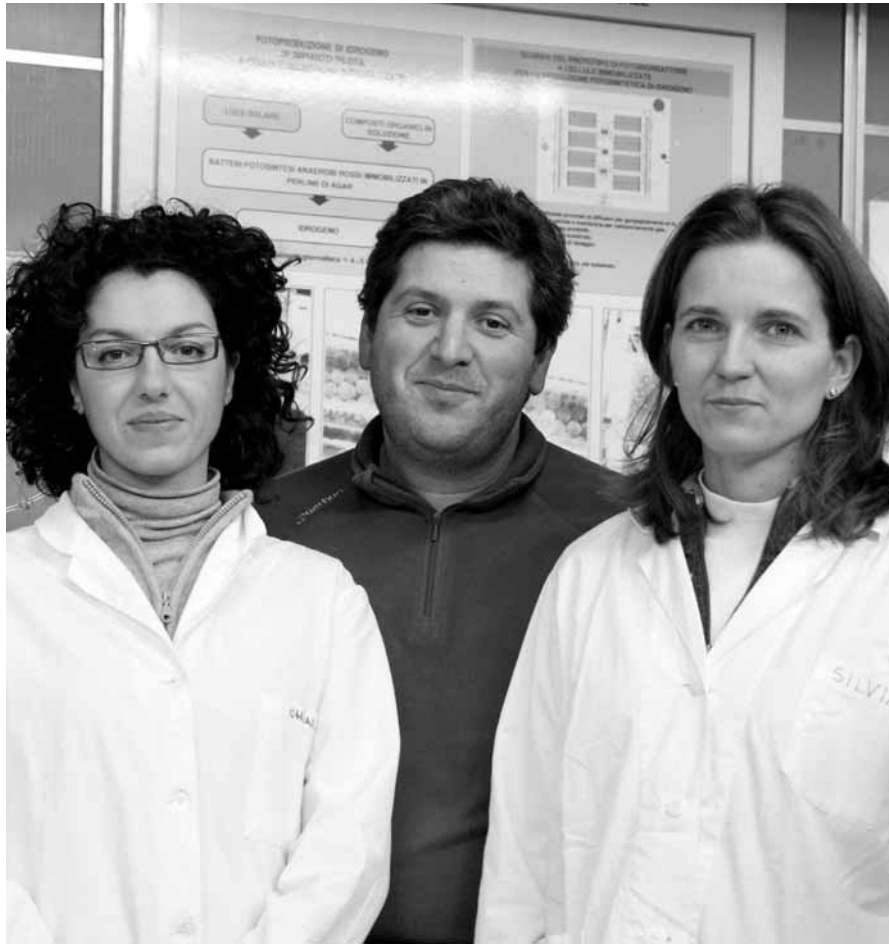


DOCUMENTO
TECNICO

Silvia Mangani
Chiara Favilli
Giacomo Buscioni
Massimo Vincenzini

*Dipartimento di Biotecnologie
Agrarie, Sezione di Microbiologia,
Università degli Studi - Firenze*

*Da sinistra:
C. Favilli
G. Buscioni
S. Mangani*

GLI ANTOCIANI DEI VINI ROSSI: INDICATORI VARIETALI IN PASTO AI MICRORGANISMI

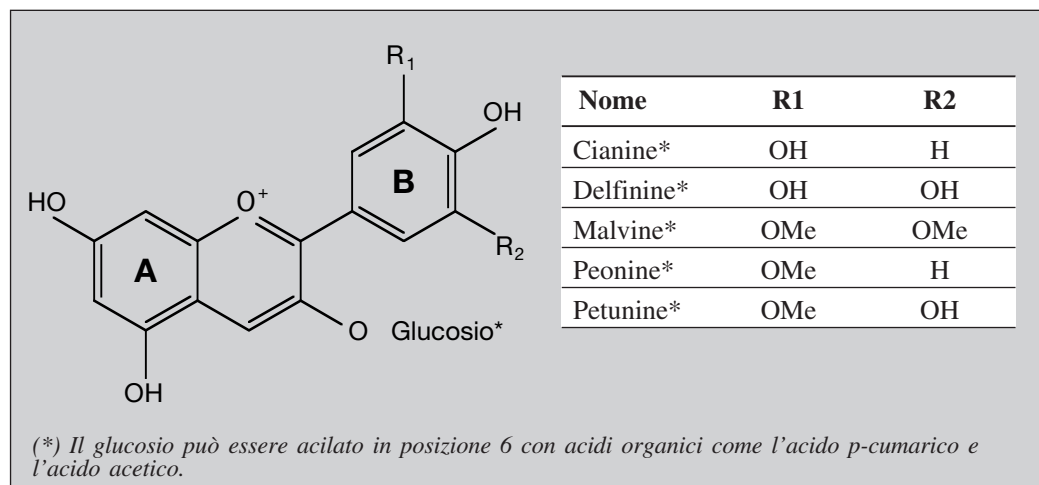
Il monitoraggio del profilo antocianinico nel corso di vinificazioni spontanee di mosti ottenuti da varietà Sangiovese e Merlot ha dimostrato che l'abbondanza relativa delle antocianine non viene significativamente modificata né da lieviti durante la fermentazione alcolica, né da batteri lattici durante la fermentazione malolattica.

Gli antociani del vino

Gli antociani (dal greco anthos=fiore, kyáneos=blu) appartengono alla famiglia dei flavonoidi e sono una delle più importanti classi di pigmenti idrosolubili presenti nei fiori, nei frutti e nelle foglie. In natura, gli antociani si trovano principalmente sotto forma glicosilata, le antocianine, più stabili e più solubili in acqua dei corrispondenti antociani agliconi,

o antocianidine, nei quali le antocianine si trasformano per perdita del residuo zuccherino. La parte principale della molecola delle antocianine è l'aglicone, costituito dal catione flavilio, contenente i doppi legami coniugati responsabili dell'assorbimento della radiazione luminosa che rende questi pigmenti visibili all'occhio umano (assorbimento massimo a lunghezza d'onda di circa 500 nanometri). Il colore delle antocianine può variare dal rosso al blu e di-

pende dalle condizioni del mezzo, dalla struttura molecolare e dalla formazione di addotti con molecole presenti nei tessuti in cui si trovano. Gli antociani sono responsabili della tonalità e dell'intensità di colore dei vini rossi giovani e sono importanti per il loro contributo all'attività antiossidante ed all'effetto vasodilatatore del vino (Burns *et al.*, 2002). La tonalità di colore di un vino rosso risulta strettamente legata alla tipologia di antociani presenti e dipende

Fig. 1 - Principali antocianine presenti nel vino

dall'idrossilazione dell'anello B (Fig. 1): aumentando il numero di sostituenti idrossilici la tonalità si sposta verso il blu, mentre la tonalità rossa si intensifica con il grado di metilazione (Jackson, 2000). L'intensità di colore, invece, rappresenta la quantità di colore di un vino e dipende prevalentemente dalla concentrazione degli antociani presenti. Questi, nella loro forma monomerica, sono oggi facilmente determinabili mediante analisi cromatografica in fase liquida (HPLC dotato di rivelatore UV/DAD), secondo la metodica OIV (Resolution OENO 22/2003). Un modo pratico per rappresentare le antocianine delle uve e del vino può essere quello di raggrupparle, sulla base della posizione dei gruppi ossidrilici e metossilici dell'anello B, in famiglie: cianine, delfinine, malvine, peonine e petunine (Fig. 1).

Nelle uve di *Vitis vinifera*, gli antociani si trovano principalmente nella buccia, dove sono stati identificati antociani monoglucosidi (raramente diglucosidi) ed i loro derivati acilati con acidi organici quali il *p*-cumarico, il caffeico, il ferulico, il malico e l'acetico. L'abbondanza relativa degli antociani è oggi considerata una caratteristica varietale, tanto che sarebbe possibile distinguere *cultivar* diverse di *Vitis vinifera* attraverso la determinazione delle antocianine presenti nelle uve alla vendem-

mia (Revilla *et al.* 2001). In effetti, anche se la concentrazione degli antociani subisce alcune modificazioni durante la maturazione dell'uva, risentendo anche delle condizioni ambientali, quali l'insolazione e la temperatura, le variazioni sono generalmente così piccole da non modificare sostanzialmente il profilo antocianinico delle uve.

Nella vinificazione in rosso, le antocianine vengono estratte nei primi giorni di macerazione e, conseguentemente, la concentrazione degli antociani monomeri nel mosto in fermentazione raggiunge velocemente il valore massimo.

Interazioni lieviti-antociani

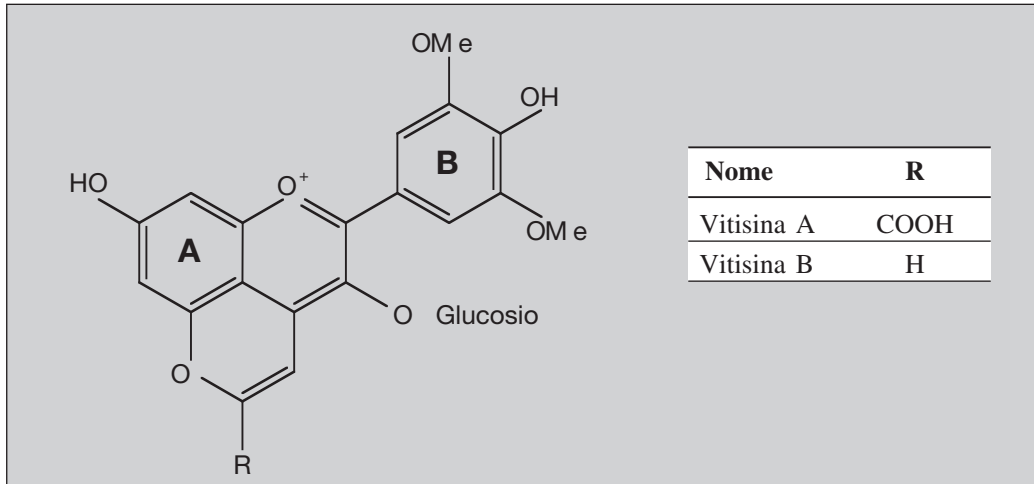
La diffusione degli antociani dalle bucce nel mosto sembrerebbe legata sia alla struttura molecolare degli antociani che a fattori varietali delle uve, anche se alla cinetica di diffusione concorrono altre variabili come ad esempio il contenuto di etanolo, acetaldeide e probabilmente di altri prodotti della fermentazione alcolica che possono portare ad un'alterazione del processo di diffusione (Di Stefano *et al.*, 1994).

Durante la fermentazione alcolica, il profilo antocianinico del mosto può subire delle modificazioni che lo portano dalla composizione

antocianinica delle uve di origine a quella del prodotto finale. Queste variazioni possono essere di natura prettamente chimica, ma possono avere anche un'origine biologica, legata allo sviluppo dei microrganismi che intervengono nel processo di vinificazione.

I lieviti sono gli agenti della fermentazione alcolica degli zuccheri del mosto, trasformazione che avviene in un complesso ecosistema, caratterizzato da crescita interattiva di diverse specie e ceppi di lievito e molteplicità di attività metaboliche. Ne consegue che l'ecologia microbica della fermentazione vinaria svolge un ruolo fondamentale nel determinare la composizione chimica del prodotto finale (Fleet, 1999; Romano *et al.*, 2003). Per quanto riguarda le possibili azioni dei lieviti nei confronti degli antociani, è comunemente accettato che i lieviti possano influenzare la composizione antocianinica di un vino attraverso due distinti processi: idrolisi delle antocianine per azione di specifiche antocianasi e adsorbimento delle antocianine sulla parete cellulare. Inoltre, i lieviti sono coinvolti in maniera indiretta nella sintesi delle vitisine (Fig. 2), pigmenti che si formano per reazione della malvidina con metaboliti microbici, quali l'acido piruvico e l'acetaldeide (Morata *et al.*, 2005).

Le antocianasi sono β -D-glucosidasi capaci di rilasciare da una specifica antocianina l'antocianidina corrispondente, che a sua volta può trasformarsi in composti di colore marrone o incolore (Liu, 2002). Quindi, se per un microrganismo l'attività antocianinica è una proprietà metabolica utile perché rende disponibile per le attività di biosintesi uno zucchero, liberandolo da un composto difficilmente metabolizzabile, la stessa attività è non gradita sotto il profilo enologico perché svolgerebbe un'azione decolorante sul vino. Tuttavia, il possesso di attività β -D-glucosidasica è una proprietà metabolica general-

Fig. 2 - Struttura delle vitisine A e B

mente desiderata nei lieviti in quanto responsabile del rilascio di composti aromatici volatili (monoterpeni, norisoprenoidi alifatici, fenoli volatili, derivati benzenici) da componenti glicconiugati non volatili variamente presenti nei mosti. Questa attività è stata individuata in alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces* nel corso di uno studio condotto allo scopo di selezionare ceppi capaci di liberare sostanze odorose ma con bassa attività antocianinica (Manzanares *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda la capacità delle cellule di lievito di adsorbire le antocianine del vino, questo fenomeno avviene a livello della parete cellulare, probabilmente per un'interazione idrofobica fra i componenti glucidici della parete ed i polifenoli (Chassagne *et al.*, 2005; Morata *et al.*, 2003). I pigmenti adsorbiti più fortemente dalle pareti cellulari di *Saccharomyces cerevisiae* sarebbero i derivati acetilati e cumarilati delle antocianine, mentre le vitisine sarebbero adsorbite solo in maniera trascurabile (Morata *et al.*, 2003).

Da quanto sopra riportato, risulterebbe che i lieviti, in funzione delle specie e dei ceppi di lievito partecipanti al processo di trasformazione ed attraverso la degradazione e/o rimozione preferenziale di alcune antocianine rispetto ad altre, siano in grado di agire efficacemente sul contenuto in antociani monomeri

del mosto in fermentazione e, quindi, di incidere significativamente sul profilo antocianinico del prodotto finale.

Antociani e vinificazione

Per approfondire l'argomento delle possibili interazioni tra lieviti ed antociani monomerici, è stata condotta un'indagine sull'evoluzione delle popolazioni di lieviti e del profilo antocianinico durante la fermentazione alcolica di mosti di due varietà di uva, Sangiovese e Merlot, vinificati in purezza su scala commerciale presso due aziende vitivinicole toscane. In particolare, sono state studiate due vinificazioni spontanee, normalmente caratterizzate da una maggiore biodiversità inter- ed intra-specifica delle popolazioni blastomicetiche partecipanti al processo fermentativo.

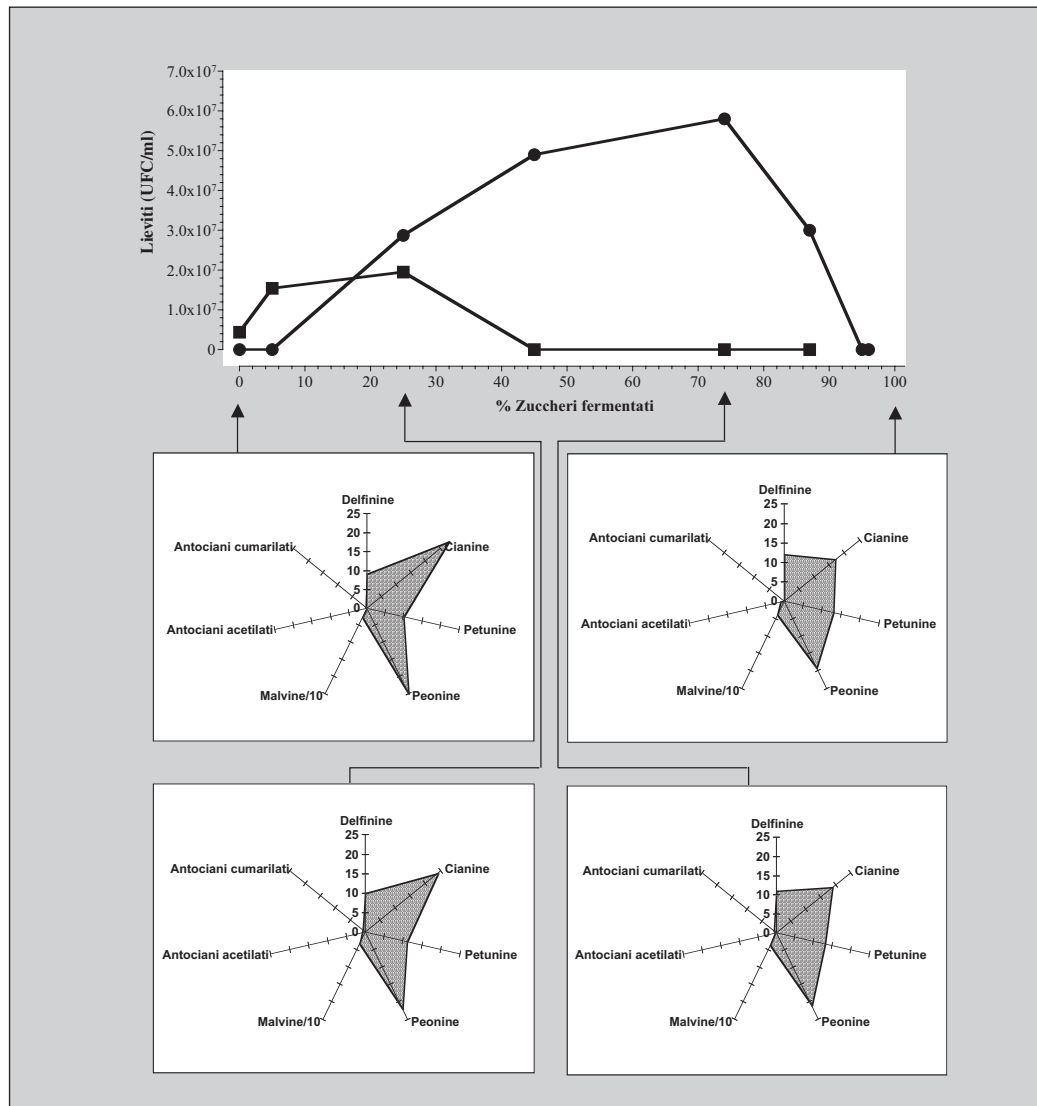
I risultati relativi alla trasformazione fermentativa del mosto di uve Sangiovese, inizialmente caratterizzato da un tenore zuccherino di 260 g/L, un pH di 3,17 e da una concentrazione di solforosa totale pari a 50 mg/L, sono riportati in Fig. 3. Al 25% di zuccheri fermentati, quando la popolazione di lieviti non-*Saccharomyces* aveva raggiunto il massimo del suo sviluppo, il profilo antocianinico, riportato in termini di abbondanza relativa delle diverse famiglie di antocianine (Fig.

3), è risultato del tutto simile a quello del mosto iniziale, con differenze imputabili ad una diversa cinetica di estrazione delle antocianine dalle bucce nel mosto; al 70% degli zuccheri consumati, quando è stato raggiunto il massimo sviluppo della popolazione di *S. cerevisiae*, il profilo antocianinico ha evidenziato una certa evoluzione rispetto alle fasi precedenti, con una riduzione della abbondanza relativa delle cianine e peonine a favore delle petunine e malvine, per poi rimanere sostanzialmente inalterato fino alla fine della fermentazione alcolica, inclusa, quindi, la inevitabile fase di mortalità della popolazione di *S. cerevisiae*.

Alcuni studi di letteratura, come precedentemente accennato, indicano le forme acilate delle antocianine come quelle maggiormente adsorbite dalla parete cellulare dei lieviti (Morata *et al.*, 2003). La vinificazione delle uve Sangiovese considerata in questo studio non ha potuto fornire informazioni in merito dal momento che le antocianine acetilate e cumarilate sono risultate praticamente assenti. La fase successiva della sperimentazione ha quindi previsto il monitoraggio di una fermentazione alcolica di uve Merlot, particolarmente ricche di forme antocianiche acilate, come altre uve utilizzate a livello internazionale quali il Cabernet Sauvignon ed il Cabernet Franc (Revilla *et al.*, 2001; Mazza *et al.*, 1999).

I risultati relativi alla vinificazione del mosto di uve Merlot, inizialmente caratterizzato da un tenore zuccherino di 240 g/L, un pH di 3,30 e da una concentrazione di solforosa totale pari a 45 mg/L, sono riportati in Fig. 4. Come risulta dalla figura, l'evoluzione del profilo antocianinico durante questo processo fermentativo ha avuto un decorso simile a quello osservato per la vinificazione delle uve Sangiovese: al 50% di zuccheri fermentati, quando, in assenza di popolazioni nu-

Fig. 3 - Andamento delle popolazioni di *Saccharomyces cerevisiae* (●) e di lieviti non-*Saccharomyces* (■) ed evoluzione del profilo antocianinico durante una fermentazione alcolica spontanea di uve Sangiovese in purezza



mericamente significative di lieviti non-*Saccharomyces*, la popolazione di *S. cerevisiae* ha raggiunto il suo massimo sviluppo, il profilo antocianinico ha presentato, rispetto alla situazione del mosto iniziale, una minore abbondanza relativa delle cianine e peonine, rimanendo poi stabile fino al termine della fermentazione alcolica.

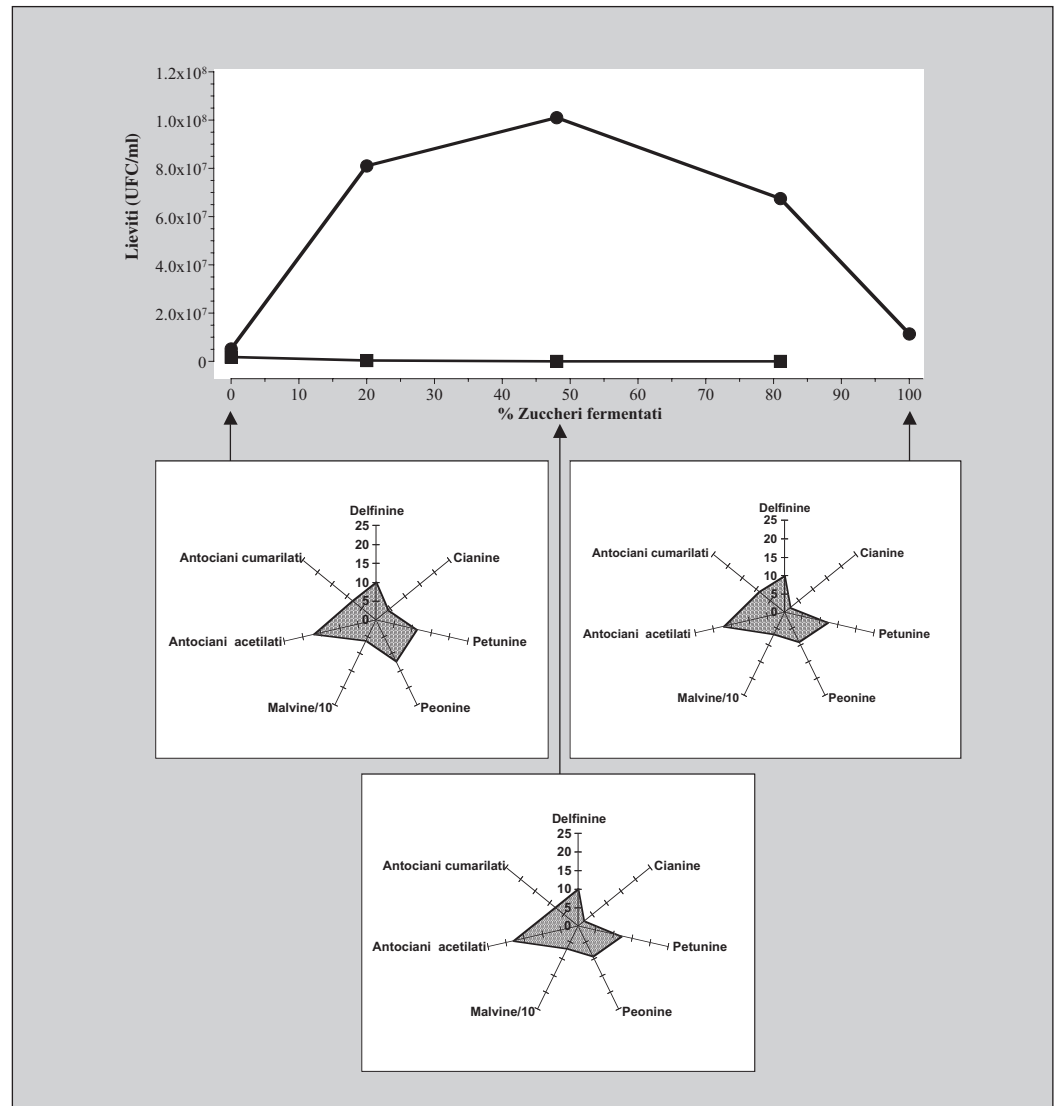
La stabilizzazione del profilo antocianinico nella seconda parte del processo fermentativo, avvenuta anche nel caso della trasformazione di uve ricche di antociani acilati che, come precedentemente ricordato, dovrebbero essere quelli maggiormente suscettibili di adsorbimento sulla parete di *S. cerevisiae*,

risulta di particolare rilievo perché induce a ipotizzare che i lieviti non esercitino un ruolo determinante nella formazione del profilo degli antociani monomerici di un vino. Tuttavia, è opportuno sottolineare che l'ipotesi non esclude che i lieviti siano in grado di ridurre, per attività idrolitica e/o per adsorbimento, la concentrazione dei monomeri antocianinici liberi: l'ipotesi, infatti, escluderebbe un'azione differenziata dei lieviti su specifiche antocianine, un'azione che inevitabilmente porterebbe ad una variabilità del profilo antocianinico, determinato sulla base dell'abbondanza relativa delle diverse famiglie di antocianine.

Interazioni batteri - antociani

In molti casi, la fermentazione alcolica è seguita da una fermentazione secondaria di grande importanza per la stabilità e l'affinamento di molti vini: la trasformazione dell'acido L-malico in acido L-lattico ed anidride carbonica, nota come fermentazione malolattica (FML), operata da alcune specie di batteri lattici. La specie *Oenococcus oeni* viene comunemente indicata come quella più frequentemente implicata nella reazione di decarbossilazione, ma in condizioni meno restrittive per lo sviluppo microbico possono risultare coinvolti anche pediococchi e lattobacilli. Alla FML è tradizionalmente riconosciuto un duplice effetto: una riduzione dell'acidità, grazie alla conversione di un acido dicarbossilico (l'acido malico) in un acido monocarbossilico (l'acido lattico), ed un aumento della stabilità microbiologica, grazie alla eliminazione di un substrato (l'acido malico) in grado di sostenere un indesiderabile sviluppo microbico. Successivamente, alla FML è stata anche attribuita la capacità di modificare profondamente il profilo organolettico del vino in cui essa ha avuto luogo, con un'azione decisamente più complessa di quelle sopra menzionate, potendo intervenire sia sul gusto che sull'aroma e, come più recentemente segnalato, anche sul colore dei vini rossi (Kunkee, 1991; Henick-Kling, 1993; Osborne *et al.*, 2000). In verità, il possibile effetto della FML sul colore del vino in generale e sul profilo antocianinico in particolare è al momento abbastanza controverso: secondo una recente ricerca, *O. oeni* sarebbe in possesso di un'attività β -glucosidasi, variabile da ceppo a ceppo e non associata ad attività antocianasi (Barbagallo *et al.*, 2004), ma, secondo un articolo precedente (Vivas *et al.* 1997), *O. oeni* risulterebbe capace

Fig. 4 - Andamento delle popolazioni di *Saccharomyces cerevisiae* (●) e di lieviti non-*Saccharomyces* (■) ed evoluzione del profilo antocianinico durante una fermentazione alcolica spontanea di uve Merlot in purezza



di rimuovere le antocianine dal mezzo in cui si sviluppa, per effetto di fenomeni di adsorbimento sulla parete batterica e di attività idrolitica diretta, utilizzando come fonte energetica la sub-unità zuccherina liberata.

Al fine di fornire un contributo sull'argomento, le vinificazioni commerciali di mosti di Sangiovese e di Merlot in purezza descritte in precedenza sono state seguite anche durante lo svolgimento della FML. Entrambi i vini hanno presentato, al termine della fermentazione alcolica, un tenore di acido malico pari a circa 1,2 g/L e sono stati lasciati andare incontro ad una FML spontanea, avviata e portata a ter-

mine in circa 25 giorni da una popolazione lattica largamente dominata da ceppi indigeni di *O. oeni* (unica specie isolata nel corso dei diversi campionamenti effettuati). Durante la FML, non è stata evidenziata alcuna significativa variazione del profilo antocianinico rispetto a quanto riscontrato al termine della fermentazione alcolica e riportato nelle Figg. 3 e 4: le abbondanze relative delle diverse famiglie di antocianine sono, infatti, rimaste praticamente immutate sia nel caso del vino Sangiovese sia nel caso del vino Merlot, che, come già osservato, si differenzia dal Sangiovese per la presenza di antociani acilati.

Il risultato suggerisce che *O. oeni*, la specie batterica più frequentemente associata alla FML, non sia capace di modificare le abbondanze relative delle diverse antocianine e, quindi, il profilo antocianinico di un vino, almeno nelle condizioni reali di vinificazione.

Considerazioni conclusive

Quanto osservato nel corso delle fermentazioni alcolica e malolattica in processi di vinificazione commerciale suggerisce che il profilo antocianinico di un vino subisca un'evoluzione solo durante la prima metà della tra-

sformazione degli zuccheri e, pertanto, sia la diretta conseguenza di una diversa velocità di estrazione delle antocianine dalla buccia dell'uva, piuttosto che l'effetto dell'attività dei lieviti e/o dei batteri malolattici. Infatti, se nei due casi descritti in precedenza i lieviti hanno mostrato popolazioni diverse per tipologia, entità numerica e persistenza, l'evoluzione del profilo antocianinico (in termini di abbondanza relativa delle diverse antocianine) ha registrato lo stesso andamento. In effetti, secondo Di Stefano (1994), la diffusione delle antocianine dalla buccia al mosto, per effetto della loro struttura molecolare, seguirebbe una cinetica diversa per ciascuna antocianina, con velocità diffusiva inversamente correlata al numero di sostituenti ed al numero di ossidrili sull'anello B e, quindi, secondo l'ordine decrescente peonina, cianina, malvina, petunina e delfinina. L'evoluzione del profilo antocianinico riscontrato è coerente con i dati dell'Autore sopra ricordato.

In ogni caso, mettendo a confronto i due profili antocianinici al termine dei processi fermentativi studiati, risulta evidente una marcata differenza tra il vino Sangiovese ed il vino Merlot: il profilo del primo è caratterizzato dall'assenza delle antocianine acetilate e cumarilate e da una prevalenza delle malvine sulle altre classi antocianiniche, presenti in quantità tra loro comparabili; il profilo del Merlot risulta invece caratterizzato da una prevalenza delle antocianine trisostituite sull'anello B e dei loro derivati (malvine>petunine>delfinine) e da un'elevata abbondanza relativa di antocianine acetilate e cumarilate, con le prime più abbondanti delle seconde. Queste differenze sono state pienamente confermate analizzando, al termine della fermentazione alcolica e della FML, quattro vini di Sangiovese ed altrettanti di Merlot, prodotti in purezza dalla vendemmia 2006 in diverse aziende vitivinicole toscane

senza l'impiego di preparati *starter*, lieviti o batteri malolattici.

I risultati, in definitiva, suggeriscono che né i lieviti né *O. oeni* siano in grado di modificare significativamente il profilo antocianinico di un vino e, pertanto, questo potrebbe essere utilizzato per una distinzione varietale o, almeno, per distinguere un vino Sangiovese da vini prodotti con altre varietà d'uva in possesso, come il Merlot, di antocianine acetilate e cumarilate. ■

Ringraziamenti. Si ringrazia l'Ente Cassa di Risparmio di Firenze per il finanziamento del Progetto.

Bibliografia

Barbagallo R. N., Spagna G., Palmeri R., Torriani S., 2004, Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation, *Enzyme and Microbial Technol.* 34, 292-296.

Burns J., Mullen W., Landrault N., Teissedre P-L., Lean M. E. J., Crozier A., 2002, Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet-Sauvignon and hybrid grapes, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4096-4102.

Chassagne D., Vernizeau S., Nedjma M., Alexandre H., 2005, Hydrolysis and sorption by *Saccharomyces cerevisiae* strains of Chardonnay grape must glycosides during fermentation, *Enzyme and Microbial Technol.*, 37, 212-217.

Di Stefano R., Borsa D., Gentilini N., 1994, Estrazione degli antociani dalle bucce dell'uva durante la fermentazione, *L'Enotecnico*, 5, 75-83.

Fleet G.H., 1999, Microorganisms in food ecosystems, *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 101-117.

Henick-Kling T., 1993, Malolactic fermentation. In Fleet G.H. (ed). *Wine microbiology and biotechnology*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Press, pp 289-326.

Jackson R. S., 2000, Chemical constituents of grapes and wine: Phenols and related phenol derivatives, *Wine Science, Academic Press*, se-

conda edizione, 242-254.

Kunkee R.E., 1991, Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making, *FEMS Microbiol. Lett.*, 88, 55-71.

Liu S.-Q., 2002, Malolactic fermentation in wine-beyond deacidification, *J. Appl. Microbiol.*, 92, 4, 582.

Manzanares P., Rojas V., Genovés S., Vallés S., 2000, A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*saccharomyces* wine yeasts, *International Journal of Food Science and Technology* 35, 35,95-103.

Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B., Ewert B., 1999, Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4009-4017.

Morata A., Calderón F., González M.C., Gomez-Cordovés M.C., Suarez J.A., 2005, Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisin A e B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde, *Food Chem.*, 100, 1144-1152.

Morata A., Gomez-Cordovés M.C., Suberviola J., Bartolomé B., Colomo B., Suarez J.A., 2003, Adsorption of anthocyanins by yeasts cell walls during the fermentation of red wines, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4084-4088.

Osborne J.P., Mira de Orduña R., Pilon G.J., Liu S.-Q., 2000, Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, 191, 51-55.

Revilla E., Garcia-Beneytez E., Cabello F., Martin-Ortega G., Ryan J-M., 2001, Value of high-performance chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of grape cultivars and red wines made from them, *J. Chromatogr. A*, 915, 53-60.

Romano P., Granchi L., Caruso M., Borra G., Palla G., Fiore C., Ganucci D., Caligiani A., Brandolini V., 2003, The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeasts performance, *Int. J. Food Microbiol.*, 86,169-180.

Vivas N., Lonvaud-Funel A., Glories Y., 1997, Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium, *Food Microbiol.*, 14, 291-300.