



GLUTATIONE: EVOLUZIONE DEL CONTENUTO DI UN ANTIOSSIDANTE NATURALE DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA SPONTANEA DI UVE ROSSE

Durante la fermentazione alcolica spontanea il contenuto di glutazione subisce un'evoluzione diversa a seconda che la fermentazione sia nettamente dominata da *S.cerevisiae* o che siano presenti anche altre specie di lievito. Nelle fermentazioni spontanee prese in esame, la quantità di glutazione rilasciata dal lievito è risultata più rilevante di quella derivante dalle uve e decisiva nel determinare il contenuto finale del vino.



Di
Silvia Mangani^{1,2}
Martina Cerretelli¹
Giacomo Buscioni^{1,2}
Eleonora Mari¹
Simona Guerrini^{1,2}
Lisa Granchi¹
Massimo Vincenzini¹

¹ Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, sezione di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Firenze - Firenze

² FoodMicroTeam, Spin-off Accademico dell'Università di Firenze - Firenze.

(Da sinistra nella foto)

INTRODUZIONE

■ Il glutatione, un tripeptide composto da L-glutammato, L-cisteina e glicina, è il più abbondante composto tiolico non proteico intracellulare presente in tutti gli organismi viventi, nei quali svolge principalmente il ruolo di antiossidante (Anderson 1998). La sua importanza biologica è legata alla presenza del gruppo sulfidrilico sul residuo della cisteina, che gli conferisce potere riducente e proprietà nucleofile (Penninckx 2000). Nelle cellule, più del 90% di glutatione si presenta nella sua forma ridotta (GSH, Li *et al.* 2004), ma esiste anche nella forma ossidata o come disolfuro misto (GSSG, GS-S-Cys e GS-S-CoA, Fahy 2001).

■ La concentrazione di glutatione nelle uve è molto variabile e non dipende solo dalla varietà ma anche dalla maturazione, dalle pratiche agronomiche e dalla differente zona di produzione (Cheynier *et al.* 1989). Di conseguenza, anche il contenuto di glutatione nel mosto è molto variabile, anche se inferiore alla concentrazione presente nell'uva (Du Toit *et al.* 2007). I fattori che influenzano la presenza di glutatione nel mosto sono molti, come la tipologia di raccolta e la maturazione delle uve, l'esposizione all'ossigeno, l'attività tirosinasi, la macerazione pre-fermentativa con le bucce e la pressatura (Maggu *et al.* 2007; Patel, *et al.* 2010).

■ Durante la fermentazione alcolica, il contenuto di glutatione del mosto viene modificato dall'azione dei microrganismi che si sviluppa-

no e partecipano al processo. Nel caso di vinificazioni spontanee, il contenuto di GSH è fortemente dipendente dalle specie di lievito che si succedono e dal ceppo o dai ceppi di lievito dominanti che conducono la fermentazione (Lavigne *et al.* 2007). In effetti, la fermentazione spontanea è un processo complesso che vede la sostituzione sequenziale di molte specie di lievito, complicato ulteriormente dal suc-

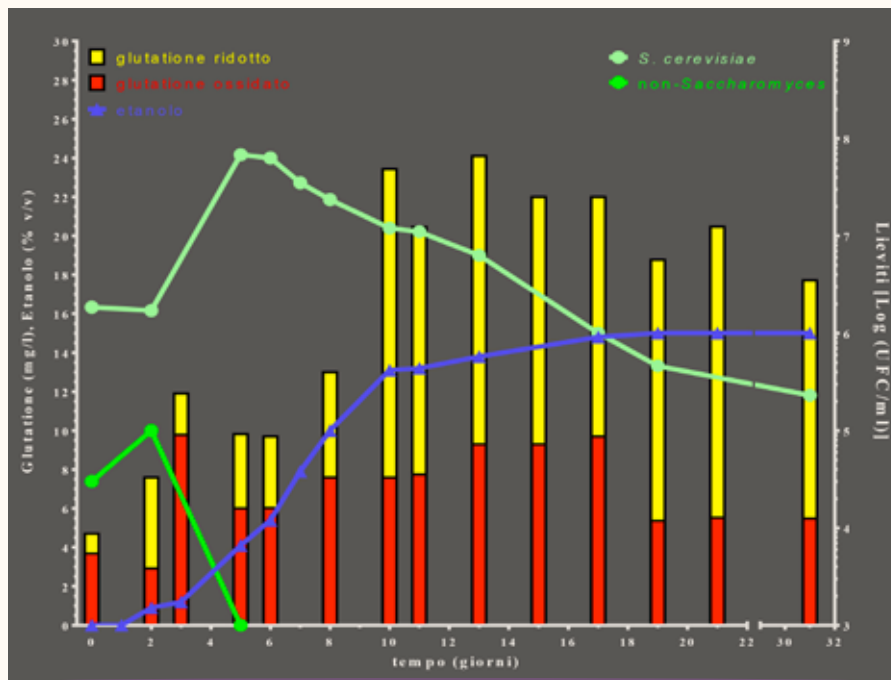


DOCUMENTO TECNICO

Tab. 1 - Caratteristiche dei mosti (note: APA, azoto prontamente assimilabile).

Mosto	Sg1	Sg2	Sg3	CF
Solforosa totale (mg/L)	38	27	35	65
Acidità totale (g/L)	4,9	5,5	5,6	4
pH	3,36	3,35	3,4	3,57
Glucosio + Fruttosio (g/L)	260	240	264	269
APA (mg/L)	94	100	105	88

Fig. 1 - Vinificazione Sg1: evoluzione del contenuto di glutazione ridotto e ossidato, di etanolo, delle popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* [Log (UFC/ml)] durante la fermentazione alcolica.



cedersi di ceppi differenti all'interno di ciascuna specie. Oltretutto, i lieviti che si sviluppano insieme, non coesistono passivamente ma piuttosto interagiscono, influenzando in vario modo la composizione chimica del mosto. ■ In *Saccharomyces cerevisiae*, il GSH è naturalmente presente in concentrazioni elevate, che vanno dallo 0,1 % all' 1 % del peso secco cellulare, rappresentando più del 90% dei tioli a basso peso molecolare (Penninckx e Elskens 1993). Esso è implicato in molti meccanismi di difesa contro gli stress ambientali durante la fermentazione alcolica, quali il pH basso, la carenza di nutrienti, lo shock da temperatura e da stress osmotico dovuto alla presenza di un'elevata concentrazione zuccherina, lo

stress ossidativo e da prodotti tossici derivanti dalla fermentazione stessa (Miyake *et al.* 1998). ■ Nel caso di carenze nutrizionali, il GSH rappresenta per il lievito una fonte importante di zolfo e di azoto e, viceversa, la presenza di zolfo e di azoto in eccesso consente la biosintesi del GSH (Penninckx 2002). Durante i primi giorni fermentativi, il GSH viene assimilato attraverso specifici trasportatori (Bourbouloux *et al.* 2000), ed in seguito può essere rilasciato attraverso specifici trasportatori adibiti al rilascio (Dhaoui *et al.* 2011) oppure durante l'autolisi. Diversi ceppi di *S. cerevisiae* hanno capacità diverse di assimilare e/o rilasciare il GSH, cosicché è stata ipotizzata la possibilità

di scegliere i ceppi da utilizzare per l'inoculo della fermentazione alcolica anche sulla base della quantità di GSH rilasciato in vinificazione (Kritzinger 2012). ■ Lo scopo della ricerca è stato quello di monitorare l'evoluzione del contenuto di glutazione, sia nella forma ridotta che ossidata, durante la fermentazione alcolica spontanea. Per lo studio, sono state prese in considerazione tre vinificazioni commerciali di uve Sangiovese e una di uve Cabernet Franc dell'annata 2015, effettuate presso un'unica Azienda, delle quali è stato monitorato l'andamento del glutazione in relazione a quello dei principali parametri fermentativi, allo sviluppo delle diverse specie di lievito ed alla biodiversità di *S. cerevisiae*.

MATERIALI E METODI

Vinificazioni

■ Le 4 vinificazioni commerciali, indicate nel testo come Sg1, Sg2, Sg3 e CF, sono state condotte in tini di legno di 40 hl di volume, senza controllo di temperatura e senza aggiunta di lieviti starter, nutrienti o altri coadiuvanti enologici. La vinificazione Sg3, a differenza delle altre, è stata condotta con la tecnica del cappello sommerso. Dopo una diraspatura leggera per mantenere gli acini integri, sono state effettuate una o due pigiature podoliche della durata di 45 minuti. Giornalmente sono stati eseguiti rimontaggi o follature la cui frequenza e intensità è stata decisa per ciascuna vinificazione in base a valutazioni chimiche e sensoriali del responsabile di cantina.

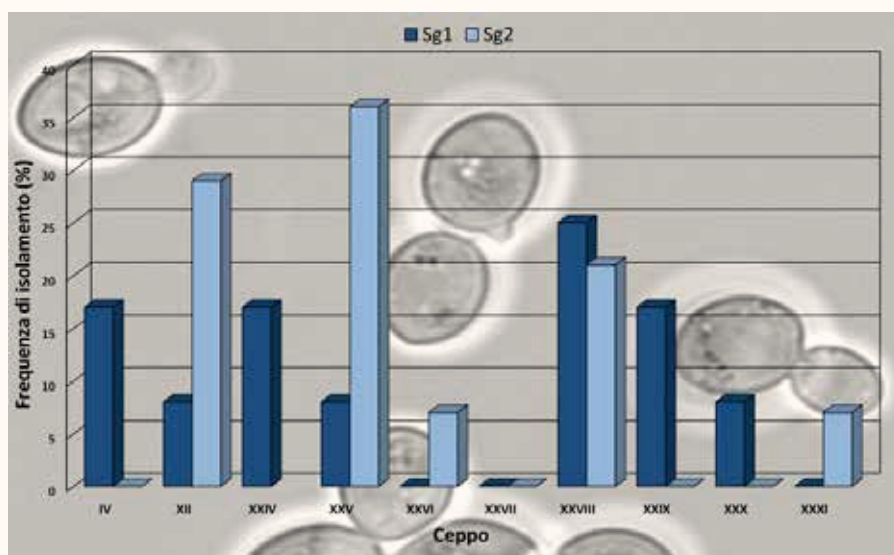
Campionamento dei mosti in fermentazione

■ Per le analisi microbiologiche e chimiche, i campioni di mosto in fermentazione sono stati prelevati presso l'Azienda subito dopo il rimontaggio utilizzando contenitori sterili che sono stati trasportati in refrigerazione (4°C) immediatamente in laboratorio. Le analisi sono state effettuate lo stesso giorno del campionamento. I campioni destinati all'analisi del glutazione (GSH e GSSG) sono stati prelevati in provette contenenti potassio



DOCUMENTO TECNICO

Fig. 2 - Frequenza dei ceppi di *S. cerevisiae* espressa come percentuale dei ceppi dominanti isolati a metà delle fermentazioni alcoliche Sg1 ed Sg2 (i numeri romani indicano i diversi ceppi).



metabisolfito (0.8 g/L) per inibire le polifenolossidasi dell'uva (Fracassetti e Tirelli 2015) e acido ascorbico (0.5 g/L) come antiossidante, immediatamente congelate e trasportate in laboratorio in refrigerazione.

Analisi microbiologiche

Il numero dei lieviti nei campioni di mosto e vino è stato determinato mediante opportuna diluizione seriale del campione e successiva semina superficiale sui seguenti mezzi solidi: WL (Oxoid) per quantificare i lieviti totali, Agar Lisina (AL, Oxoid) per quantificare i non-*Saccharomyces*. Entrambi i mezzi sono stati integrati con 2 g/L di propionato di sodio per inibire le muffe e 30 mg/L di streptomina per inibire i batteri acetici. Le piastre sono state incubate a 30°C per 3-5 giorni.

Identificazione a livello di specie dei lieviti mediante tecniche molecolari

I lieviti presenti sulle piastre di WL e AL sono stati purificati mediante strisci ed identificati attraverso amplificazione dell'ITS rDNA e successiva digestione dell'amplicone con gli enzimi di restrizione HaeIII per *S. cerevisiae*, HinfI per *Kloeckera apiculata*, MboI per *Starmerella bacillaris* ex *Candida zemplinina* (Granchi *et al.*

1999; Sipiszki 2004; Duarte *et al.* 2012). Gli isolati identificati come *S. cerevisiae* sono stati sottoposti anche al test di assimilazione del mannitolo: l'incapacità di assimilare questa sostanza è diagnostica per la distinzione di *S. cerevisiae* dalla specie *Saccharomyces paradoxus*.

Differenziazione intraspecifica degli isolati di *S. cerevisiae*

La differenziazione intraspecifica degli isolati di *S. cerevisiae* è stata effettuata tramite amplificazione delle regioni interdelta utilizzando la coppia di primer δ 12- δ 21 ed il protocollo riportato da Legras e Karst (2003). I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2.0% (w/v) e, al termine della corsa, i profili ottenuti sono stati acquisiti come file d'immagine con il programma UVITEC Gel Documentation System, Cambridge UK.

Analisi chimiche

L'acidità totale ed il pH del mosto sono stati determinati secondo quanto previsto dai metodi ufficiali (Reg. CE 1234/2007); la solforosa totale è stata determinata per titolazione iodometrica (OIV-MA-AS323-04B). La concentrazione degli zuccheri e il tenore in etanolo sono stati determinati mediante analisi HPLC

con detector Indice di rifrazione (Varian Inc. Walnut Creek, CA, USA) secondo il metodo riportato da Granchi *et al.* (1998). La determinazione del contenuto di glutazione nei mosti e nei vini è stato condotto attraverso analisi HPLC con detector fluorimetrico (Varian Inc. Walnut Creek, CA, USA) previa derivatizzazione con dansil-cloruro del campione preventivamente decolorato con polivinilpolipirrolidone (Fracassetti e Tirelli 2015) e sottoposto a reazione con acido iodoacetico per alchilare il gruppo sulfidrilico del GSH (Jones *et al.* 1998). Il contenuto in azoto prontamente assimilabile (APA) è stato valutato sommando il contenuto in azoto ammoniacale (determinato mediante kit enzimatico, Steroglass, Oenological division, Perugia) e il contenuto in azoto α -amminoacidico, determinato con il metodo di Dukes e Butzke (1998). I valori riportati sono la media di due determinazioni.

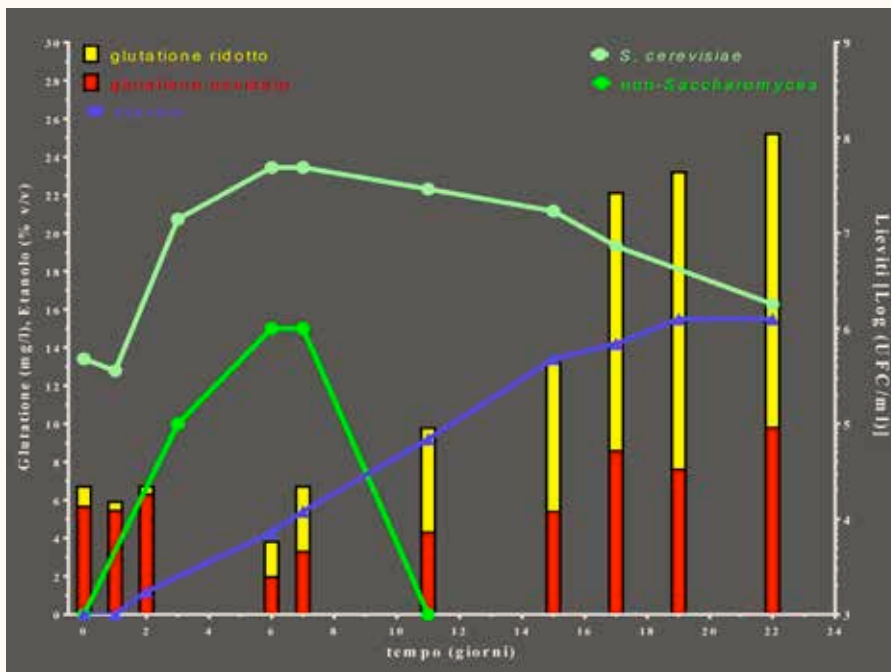
I RISULTATI DELLA RICERCA

La composizione dei mosti delle quattro vinificazioni prese in esame, indicate nel testo come Sg1, Sg2, Sg3 e CF, è riportata in **Tab. 1**. Per quanto riguarda il contenuto di azoto prontamente assimilabile, che rappresenta un parametro di particolare importanza per la biosintesi del glutazione da parte dei lieviti, tutti i mosti presi in considerazione presentavano un contenuto inferiore ai 140mg/L, concentrazione considerata adeguata per la completa fermentazione dei mosti (Bell e Henschke 2005). Da un punto di vista microbiologico, le vinificazioni spontanee di uve Sangiovese indicate come Sg1 e Sg2, sono state caratterizzate da una fermentazione alcolica ampiamente dominata fin dall'inizio da *S. cerevisiae*, con una popolazione di lieviti non-*Saccharomyces*, rappresentata prevalentemente dalla specie *K. apiculata*, numericamente ridotta e poco persistente. Le altre due vinificazioni, Sg3 e CF, al contrario, sono state caratterizzate dalla presenza di una popolazione di lieviti non-*Saccharomyces* (prevalentemente *K. apiculata*) enologicamente significativa nei primi giorni della fermentazione alcolica. Ad una analogia ecologica microbica della fermentazione alcolica è risultato corrispondere anche un analogo andamento della concen-



DOCUMENTO TECNICO

Fig. 3 - Vinificazione Sg3: evoluzione del contenuto di glutazione ridotto e ossidato, di etanolo, delle popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* [Log (UFC/ml)] durante la fermentazione alcolica.



trazione del glutatione del mosto-vino; per questo motivo sono mostrati gli andamenti di due vinificazioni esemplificative delle due tipologie descritte sopra. In particolare, dei due processi fermentativi che hanno visto la netta prevalenza della specie *S. cerevisiae* è mostrato l'andamento relativo al processo Sg1, mentre nell'altro caso quello relativo alla vinificazione Sg3.

■ Andando a vedere in dettaglio la vinificazione dominata fin dalle prime fasi da *S. cerevisiae*, la popolazione di *K. apiculata* ha raggiunto nei primi giorni fermentativi la massima densità cellulare di centomila UFC/ml per poi subire un rapido declino e non essere più rilevabile al quinto giorno del processo (Fig. 1).

■ La popolazione di *S. cerevisiae*, presente all'inizio della fermentazione nell'ordine del milione di UFC/ml, ha raggiunto il valore massimo di circa 70 milioni di UFC/ml il quinto giorno. La fermentazione alcolica ha comportato il completo esaurimento degli zuccheri in ventisette giorni ed ha permesso di ottenere un vino alla svinatura con 14,2 gradi alcolici.

■ Il glutatione, già presente nel mosto appena pigiato sia nella forma ridotta (GSH, circa 1 mg/L) che nella sua forma ossidata (GSSG, 3,7 mg/L), è aumentato fino al terzo giorno di fer-

mentazione (GSH 2,1 mg/L, GSSG 9,8 mg/L), probabilmente grazie ad un continuo rilascio da parte delle uve. In corrispondenza della fase di crescita esponenziale delle cellule di lievito, si è assistito ad una diminuzione del glutatione totale (GST), destinato in parte ad essere assorbito dai lieviti in fase di crescita attiva.

■ Al raggiungimento del massimo della popolazione di *S. cerevisiae*, si è verificato un graduale aumento della concentrazione di GST (soprattutto GSH), fino ad arrivare al tredicesimo giorno di fermentazione, corrispondente al 92% degli zuccheri consumati, quando ha raggiunto la concentrazione massima (24,1 mg/L). Dal tredicesimo giorno fino alla fine della fermentazione alcolica, il contenuto di GST è diminuito ed alla svinatura ha raggiunto i 17,7 mg/L, per il 70% sotto forma di GSH.

■ Considerando in dettaglio le due forme di glutatione, GSH e GSSG, mentre all'inizio della fermentazione prevaleva la forma ossidata (GSSG), dal decimo giorno in poi prevaleva quella ridotta (GSH) che rappresentava nelle ultime fasi della fermentazione più del 60% del GST.

■ Nonostante il fatto che l'andamento della concentrazione di glutatione sia analogo, la concentrazione massima raggiunta durante la fermentazione ed il contenuto finale del vino

alla svinatura sono risultati differire in maniera significativa (t-test per $p < 0.05$) fra le due vinificazioni Sg1 ed Sg2. Infatti, nella vinificazione Sg2 il GST ha raggiunto un valore massimo di $19,0 \pm 0,3$ mg/L (media \pm deviazione standard), contro i $24,1 \pm 0,4$ mg/L della Sg1, ed alla svinatura $16,2 \pm 0,1$ mg/L, contro $17,7 \pm 0,3$ mg/L della Sg1. Queste differenze possono essere imputabili ai diversi ceppi di *S. cerevisiae* responsabili del processo fermentativo (Fig. 2).

■ In effetti, utilizzando tecniche molecolari che permettono la differenziazione di ceppi all'interno della specie di *S. cerevisiae* sono stati individuati sette ceppi nel caso della vinificazione Sg1, e cinque nella vinificazione Sg2; solo 3 ceppi sono risultati comuni a entrambe le vinificazioni. Inoltre, nel caso della vinificazione Sg2, i due ceppi indicati con XII e XXV presentavano una frequenza di isolamento superiore agli altri, mentre nel caso della vinificazione Sg1 nessun ceppo prevaleva nettamente (Fig. 2).

■ Nel caso delle due vinificazioni caratterizzate da una fermentazione alcolica spontanea con una popolazione di lieviti non-*Saccharomyces* enologicamente significativa nei primi giorni della fermentazione alcolica, l'andamento della concentrazione del glutatione è risultato del tutto analogo nonostante le uve di partenza fossero di varietà diversa (Sangiovese e Cabernet Franc). Quindi anche in questo caso è mostrato l'andamento relativo ad una delle due, in particolare quella da uve Sangiovese Sg3, come esemplificazione di entrambe (Fig. 3).

■ La specie prevalente tra i lieviti non-*Saccharomyces* è risultata essere *K. apiculata*, presente con una popolazione iniziale di circa mille UFC/ml; essa ha raggiunto la massima densità cellulare di circa 1 milione di UFC/ml il sesto giorno della fermentazione per poi diminuire e non essere più rilevabile, a causa della concentrazione elevata di etanolo, dall'undicesimo giorno in poi. Parallelamente alla crescita di *K. apiculata* si è sviluppata anche la popolazione di *S. cerevisiae*, che ha raggiunto il massimo di circa 50 milioni di UFC/ml al sesto-settimo giorno. La fermentazione alcolica ha impiegato ventidue giorni per il completo esaurimento degli zuccheri, permettendo di ottenere un vino con 15,5 gradi alcolici.

■ Per quanto riguarda il contenuto di glutatione, analogamente a quanto osservato per



DOCUMENTO TECNICO

le vinificazioni Sg1 e Sg2, nel mosto appena pigiato la forma ossidata prevaleva su quella ridotta (5,7 mg/L e 1 mg/L, rispettivamente), probabilmente a causa dell'azione delle polifenolossidasi che, a partire dagli acidi idrossicinnamici, portano alla formazione di o-chinoni, che agiscono ossidando il glutatione.

■ In concomitanza della fase di crescita esponenziale dei lieviti, si è assistito ad una graduale diminuzione della concentrazione di GST fino al raggiungimento del massimo sviluppo delle popolazioni delle due specie di lievito. Successivamente, la concentrazione di GST ha continuato ad aumentare fino alla fine della fermentazione alcolica, quando è stato raggiunto il livello massimo di 25,2 mg/L (per il 60% GSH). Mentre nelle prime fasi della fermentazione la concentrazione di GSSG prevaleva su quella di GSH, al sesto-settimo giorno in corrispondenza del massimo sviluppo dei lieviti le due concentrazioni erano comparabili e in seguito fino alla svinatura prevaleva sempre il GSH.

■ Il contenuto totale di glutatione (GST) dei due vini, Sg3 e CF (25,2±0,3mg/L e 23,6±0,3mg/L), sebbene significativamente diverso da un punto di vista statistico (t test per $p < 0,05$) era molto simile e significativamente più elevato (t test per $p < 0,05$) rispetto a quello dei vini Sg1 ed Sg2, caratterizzati da una fermentazione alcolica spontanea ampiamente dominata fin dall'inizio da *S. cerevisiae* (17,7±0,3mg/L e

16,2±0,1mg/L). La differenza fra il contenuto dei due svinati Sg3 e CF potrebbe essere ricondotta anche ai diversi ceppi di *S. cerevisiae* responsabili del processo fermentativo (t test per $p < 0,05$). In effetti, dai risultati dell'analisi molecolare nel caso della Sg3 è stato possibile individuare in tutto sei ceppi di *S. cerevisiae*, mentre nel caso della fermentazione CF ne sono stati individuati cinque, di cui solo tre in comune alle due vinificazioni (Fig. 4).

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

■ Durante la fermentazione alcolica il contenuto di glutatione subisce un'evoluzione diversa a seconda che la fermentazione sia esclusivamente condotta da *S. cerevisiae* o che sia presente anche una popolazione di *K. apiculata* significativa nei primi giorni della fermentazione. In effetti l'andamento della concentrazione del glutatione dipende dall'azione di più fenomeni che influenzano da una parte il rilascio del GSH (inizialmente da parte delle uve e in seguito da parte dei lieviti), e dall'altra l'ossidazione del GSH a GSSG. Il diverso contributo di questi fenomeni determina sia l'andamento della concentrazione di GST che il rapporto fra GSH e GSSG. Nelle prime fasi della fermentazione, quando le uve sottoposte ad una leggera pressatura cominciano a

rilasciare le sostanze idrosolubili, si ha la liberazione del glutatione dall'uva. In questa fase, il glutatione nel mosto è prevalentemente in forma ossidata, perché sottoposto all'ambiente fortemente ossidante che si verifica durante la pigiatura delle uve le quali, rompendosi, rilasciano sia le polifenolossidasi, localizzate in appositi compartimenti cellulari all'interno dell'acino, che gli acidi idrossicinnamici, con la conseguente formazione di specie altamente ossidanti quali gli o-chinoni.

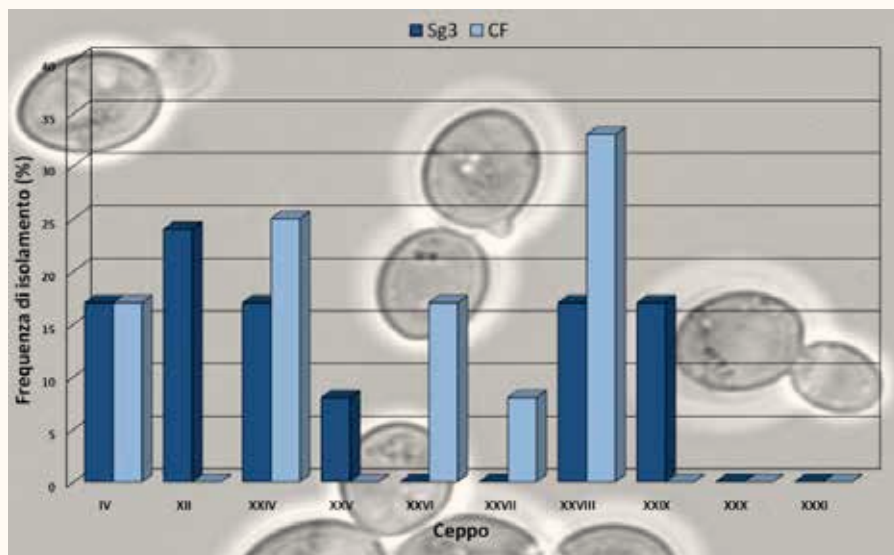
■ In seguito, l'ambiente-mosto perde gradatamente la sua capacità ossidante sia a causa della diminuzione del tenore di ossigeno disciolto, sostituito dall'anidride carbonica di origine fermentativa, sia a causa dell'inibizione delle polifenolossidasi da parte dell'etanolo prodotto dalla fermentazione. Di conseguenza il rapporto fra la forma ridotta e quella ossidata si inverte fino alla netta prevalenza della forma ridotta nelle ultime fasi della fermentazione.

■ In generale nei primi giorni della fermentazione alcolica la concentrazione di GST tende a diminuire. Questo fenomeno può essere ricondotto alla presenza delle cellule di lievito in fase di crescita attiva che utilizzano il GSH presente nell'ambiente circostante come fonte alternativa di azoto e di zolfo, in risposta a stress causati dall'ambiente mosto-vino. Successivamente, in corrispondenza della fase di morte delle cellule di lievito, la concentrazione di GST aumenta. Durante l'autolisi, infatti, le cellule di lievito rilasciano nell'ambiente-vino il contenuto di glutatione accumulato durante il processo fermentativo in risposta a fattori di stress che si verificano durante tale processo.

■ Il glutatione che rimane in soluzione è soggetto a trasformazioni che dipendono dalla sua estrema reattività nei confronti dell'ossigeno e dei polifenoli ossidati. La velocità e la tipologia di queste reazioni dipende sia dalla composizione chimica del mosto, intendendo ad esempio la disponibilità dei polifenoli ossidati, ma anche dalla tecnologia di vinificazione che può favorire i processi di ossidazione consentendo la dissoluzione di più o meno ossigeno all'interno del mosto.

■ La concentrazione massima di GST è riscontrata al termine della fermentazione alcolica quando la maggior parte degli zuccheri sono stati consumati, dopo di che tende a diminuire e a stabilizzarsi. Alla svinatura la concentra-

Fig. 4 - Frequenza dei ceppi di *S. cerevisiae* espressa come percentuale dei ceppi dominanti isolati a metà delle fermentazioni alcoliche Sg3 ed CF (i numeri romani indicano i diversi ceppi).





DOCUMENTO TECNICO

zione di glutazione nei vini studiati è risultata variabile, oscillando fra 16 e 25 mg/L con un contributo medio del GSH al totale del 70%. Benché nelle vinificazioni prese in considerazione nel presente studio il contenuto in azoto prontamente assimilabile sia da considerarsi non ottimale il contenuto finale dei vini è risultato sempre tendenzialmente medio-alto e in alcuni casi superiore rispetto alla concentrazione che l'OIV consiglia di aggiungere nei vini per proteggerli durante la conservazione (OIV-OENO 446-2015).

■ La variabilità nel contenuto di glutazione dei vini può dipendere anche dalla specie di lievito e dai ceppi che hanno dato il loro contributo durante il processo fermentativo. In *S. cerevisiae* ad esempio, la quantità di GSH rilasciata è una caratteristica ceppo-specifica (Kritzinger *et al.* 2012 e 2013). Due delle fermentazioni spontanee oggetto di questo studio sono state dominate da *S. cerevisiae* fin dalle prime fasi, con un contributo dei lieviti non-*Saccharomyces* trascurabile. Esse però, non sono state dominate da un unico ceppo di *S. cerevisiae*, ma piuttosto da 3-4 ceppi con frequenza percentuale prossima o superiore al 20%, mostrando un elevato livello di polimorfismo genotipico all'interno delle popolazioni di *S. cerevisiae* che hanno condotto i processi fermentativi. I vini con un contenuto finale di glutazione più elevato erano invece Sg3 e CF che hanno presentato anche la popolazione di *K. apiculata* più elevata e persistente rispetto agli altri.

■ Alla luce del fatto che la specie *K. apiculata* è nota possedere attività proteolitica anche durante la crescita e la fermentazione del mosto (Dizy e Bisson 2000), contrariamente a *S. cerevisiae* che presenta attività proteolitica solo durante l'autolisi, non è possibile escludere che in questi mosti *S. cerevisiae* abbia avuto a disposizione un più elevato contenuto di aminoacidi durante la fermentazione e questo abbia consentito una maggiore biosintesi di glutazione.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ La variabilità del contenuto di glutazione nei vini è da ascrivere alla complessità metabolica del mosto e alle articolate interazioni che intercorrono tra composizione iniziale del

mosto, componente genetica del ceppo di lievito, pratiche tecnologiche di vinificazione, che influenzano la crescita dei microrganismi.

■ In ultima analisi però, la quantità di glutazione rilasciata dai lieviti contribuisce in maniera molto più rilevante al contenuto finale del vino rispetto a quella già presente nel mosto e derivante dall'uva.

■ La selezione di ceppi capaci di rilasciare quantità elevate di GSH potrebbe rappresentare un'alternativa all'aggiunta del GSH nei mosti e nei vini consigliata in recenti risoluzioni dell'OIV (OIV-OENO 445-2015 e OIV-OENO 446-2015) e che ha l'obiettivo di limitare l'intensità dei fenomeni ossidativi dei mosti grazie alla capacità del glutazione di catturare i chinoni, nonché di proteggere dall'ossidazione le sostanze aromatiche del vino. ■

BIBLIOGRAFIA

- Bell, S.-J., & Henschke, P.A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11:242-295.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., Bachhawat, A. K. (2000). Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13259-13265.
- Cheynier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(4), 320-324.
- Dhaoui, M., Auchère, F., Blaiseau, P. L., Lesuisse, E., Landoulsi, A., Camadro, J. M., ... & Belgareh-Touzé, N. (2011). Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 22(12), 2054-2067.
- Dizy, M., Bisson L. (2000). Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 155-167.
- Du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M., & Prevo, D. (2007). Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2765-2769.
- Duarte FL, Pimentel NH, Teixeira A, Fonseca A (2012) *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102, 653-658.
- Duker B. C., Butzke C. E. (1998) Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthalaldehyde/N-acetyl-cysteine spectrophotometric assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 125-134.
- Fahey, R. C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 333-356.
- Fracassetti, D., & Tirelli, A. (2015). Monitoring of glutathione concentration during winemaking by a reliable high performance liquid chromatography analytical method. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, DOI: 10.1111/ajgw.12139.

■ Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., & Vincenzini M. (1998). Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello di Montalcino wines. *Food Technology and Biotechnology*, 36(4), 313-318.

■ Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., & Vincenzini M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87(6), 949-956.

■ Jones D.P., Carlson, J.L., Samiec, C.P., Sternberg, P., Mody, V.C., Reed, R.L. & Brown, L.A.S. (1998). Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, 275, 175-184.

■ Kritzinger, E. C. (2012). Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

■ Kritzinger, E. C., Stander, M. A., & Du Toit, W. J. (2012). Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(1), 80-92.

■ Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., & Du Toit, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 269-277.

■ Lavigne, V., Pons, A., & Dubourdieu, D. (2007). Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A*, 1139(1), 130-135.

■ Legras, J.L., & Karst, F., (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221 (2), 249-255.

Li, Y., Wei, G., & Chen, J. (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(3), 233-242.

■ Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C., & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10281-10288.

■ Miyake, T., Hazu, T., Yoshida, S., Kanayama, M., Tomochika, K. I., Shinoda, S., & Ono, B. I. (1998). Glutathione transport systems of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(10), 1858-1864.

■ Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Lee, S. A., Gardner, R. C., Weaver, R., Nicolau, L., & Kilmartin, P. A. (2010). Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7280-7288.

■ Penninckx, M. J., & Elskens, M. T. (1993). Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Advanced Microbial Physiology*, 34, 239-301.

■ Penninckx, M. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9), 737-742.

■ Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 295-305.

■ Sipiczki M. - 2004 - Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of Basic Microbiology*, 44: 471-479.