

## MIGLIORAMENTO DELLA SALUBRITÀ DEI VINI MEDIANTE IMPIEGO DI LIEVITI SELEZIONATI PER LA DIVERSA ATTIVITÀ ADSORBENTE

**CARIDI Andrea, SIDARI Rossana**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Forestali ed Ambientali, Facoltà di Agraria, Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, Feo di Vito (RC), Tel/Fax: 0965.312330, E-mail: acaridi@unirc.it.

Poster presentato ad Enoforum 2007, 13-15 marzo, Piacenza

### Premessa

La selezione dei lieviti per la guida del processo di vinificazione ha fornito, nel corso degli anni, numerosi e preziosi contributi all'incremento della qualità e della salubrità dei vini.

Un'interessante caratteristica dei lieviti selezionati, tuttora non pienamente sfruttata, è la differente capacità di adsorbire sullo strato più esterno della parete cellulare, costituito da mannoproteine, differenti sostanze presenti nel mosto e/o nel vino.

Adsorbire o meno tali sostanze appare caratteristica legata a ciascun ceppo e risulta in grado di condizionare la composizione finale di un vino.

### Scopo del lavoro

Obiettivo della presente ricerca è stata la definizione di strategie innovative di selezione dei lieviti vinari, al fine di preservare il prezioso patrimonio polifenolico delle uve e di decontaminare i mosti dall'ocratossina A (OTA) durante la vinificazione.

Si è pertanto deciso di valorizzare le differenze di adsorbimento esistenti tra i vari ceppi, che sono principalmente riconducibili al tipo ed alla quantità di mannoproteine presenti nello strato esterno della parete cellulare.

### Mannoproteine parietali

Lo strato esterno della parete cellulare dei lieviti è prevalentemente (dal 35 al 40%) costituito da mannoproteine, glicoproteine spesso iperglicosilate, connesse ad una matrice interna amorfa di glucani; le mannoproteine sono, in una certa misura, rilasciate nel vino sia durante che dopo la fermentazione alcolica.

Le mannoproteine dei lieviti contengono sia O-glicani che N-glicani.

Mentre gli O-glicani sono generalmente neutri, perché privi di gruppi con cariche elettriche, gli N-glicani possiedono cariche negative, dovute alla presenza di fosfato, acido glucuronico o piruvato.

Nel genere *Saccharomyces* la percentuale di oligosaccaridi contenenti mannosilfosfato varia da ceppo a ceppo.

La percentuale di gruppi mannosilfosfato, che conferiscono cariche negative, modifica le proprietà e l'ambiente della superficie cellulare e, conseguentemente, stabilisce interazioni elettrostatiche ed ioniche con i diversi componenti del vino.

Gli oligosaccaridi di *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis* contengono, rispettivamente, galattosio ed N-acetilglucosammina, ma non mannosilfosfato mentre gli oligosaccaridi di *Kloeckera brevis* e *Candida albicans* contengono molto più mannosilfosfato di *Saccharomyces cerevisiae* (Jigami and Odani 1999).

Si può ipotizzare che, anche per i lieviti vinari, esista una variabilità nel rapporto tra oligosaccaridi neutri ed oligosaccaridi acidi nelle mannoproteine.

Le prevedibili conseguenze enologiche, come adesso vedremo, giustificano ampiamente la selezione dei lieviti vinari verso questo carattere.

### Interazione con i composti fenolici

Alcuni processi di vinificazione prevedono l'affinamento del vino sulle fecce e, per favorire il rilascio di mannoproteine, l'aggiunta di  $\beta$ -1,3 glucanasi; tale tecnica produce un aumento della morbidezza ed una riduzione dell'astringenza dei tannini.

Infatti, l'aggregazione dei tannini è fortemente inibita dalle mannoproteine del lievito; ciò può prevenire la tendenza dei tannini ad intorbidare il vino o a formare dei precipitati durante l'invecchiamento.

I composti fenolici interagiscono con le mannoproteine prodotte dai lieviti; tale attitudine è carattere di ceppo.

Le mannoproteine sono, infatti, capaci di combinarsi con i composti fenolici diminuendo, in tal modo, l'indice di Folin-Ciocalteu.

Ciò avviene con meccanismo esclusivamente fisico, dando luogo ad interazioni elettrostatiche, principalmente tra antociani e pareti cellulari.

Sono stati condotti studi da diversi autori per verificare se la selezione dei lieviti ha effetti significativi sul profilo polifenolico dei vini.

Nel complesso si evince che la scelta del lievito starter può influenzare sia la concentrazione che la composizione fenolica dei vini in quanto i lieviti tendenzialmente riducono la concentrazione dei composti fenolici nei vini, soprattutto adsorbendoli sulle pareti cellulari.

Un recente articolo ha segnalato una notevole correlazione tra il ceppo di lievito usato per la vinificazione e la composizione polifenolica del vino, dimostrando che l'attività del lievito può modificare le proprietà cromatiche, il profilo polifenolico e l'attività antiossidante del vino (Caridi et al. 2004).

### **Interazione con i pigmenti dell'uva**

I lieviti interagiscono in differenti modi con il colore dei vini: mediante attività antocianin- $\beta$ -D-glucosidasi, producendo metaboliti reattivi, come l'acido piruvico e l'acetaldeide, rilasciando mannoproteine nel vino e, soprattutto, adsorbendo i pigmenti dell'uva sulle loro pareti cellulari.

Il processo di adsorbimento parietale del colore durante la vinificazione ha importanti conseguenze sui vini, data la notevole quantità di pigmento rimosso; basti considerare che l'area superficiale delle cellule di lievito durante la fermentazione è maggiore di 10 metri/litro di mosto.

La capacità dei lieviti di trattenere i pigmenti sulle loro pareti cellulari, grazie alle mannoproteine parietali, attualmente viene sfruttata nell'assorbimento biologico dei coloranti e nella correzione del colore dei vini bianchi.

C'è un'ampia variabilità nella capacità dei lieviti vinari di adsorbire il colore del vino.

Conseguentemente, l'adsorbimento degli antociani da parte dei lieviti è stato recentemente proposto come criterio per la selezione specifica di lieviti in grado di interagire con il colore dei vini (Medina et al. 2005; Morata et al. 2005).

### **Adsorbimento dell'ocratossina A (OTA)**

Come è ormai a tutti noto, l'OTA è una potente micotossina, cioè una sostanza tossica prodotta da alcune muffe; essa può contaminare vari alimenti e bevande, tra cui l'uva ed i suoi derivati fermentati.

Il consumo di alimenti o bevande contenenti OTA (vino, birra, cereali, spezie, cacao, caffè) provoca un'intossicazione cronica nel consumatore, causando alterazioni permanenti a carico del fegato, dei reni, dei centri nervosi e della circolazione sanguigna.

Il Comitato Scientifico per gli Alimenti della CEE ha indicato in 0,35 microgrammi la dose massima giornaliera tollerabile da una persona del peso di 70 kg.

Tale dose, sulla scorta di dati recenti tratti dalla letteratura scientifica, si può ingerire, se si è particolarmente sfortunati, semplicemente con:

- 27 grammi di uva (Battilani et al. 2003);
- 36 grammi di succo d'uva (Arici et al. 2004);
- 90 millilitri di vino (Pietri et al. 2001).

Per calcolare i suddetti quantitativi ci si è semplicemente riferiti alla dose massima rilevata dagli Autori nelle uve, nei succhi d'uva e nei vini analizzati.

Tuttavia:

- è altamente probabile che un'uva ammuffita sia scartata dal consumatore;
- è piuttosto probabile che un succo prodotto da uva ammuffite sia riconosciuto e scartato dal consumatore;
- è altamente improbabile che un bicchiere di vino prodotto da uve ammuffite venga riconosciuto e scartato dal consumatore.

In quest'ultimo caso, infatti, il vino è, addirittura, più aromatico e gradevole, grazie all'azione degli enzimi fungini sui precursori aromatici presenti nel mosto d'uva.

Diverse procedure di decontaminazione di alimenti o bevande dalle micotossine in essi presenti fanno uso di lieviti, pareti cellulari di lieviti o estratti parietali di lieviti.

In tutti questi casi le mannoproteine parietali dei lieviti svolgono un ruolo primario nel rimuovere le diverse micotossine mediante fenomeni di adsorbimento.

Le mannoproteine, dunque, possono agire come una spugna nel rimuovere l'OTA.

L'obiettivo della nostra ricerca è, dunque, un ceppo capace di assorbire, come una spugna, l'OTA presente nel mosto d'uva legandola alle mannoproteine che costituiscono lo strato esterno della parete cellulare dei lieviti.

Ciò consentirebbe di ripulire i mosti contaminati da OTA durante la vinificazione, per semplice adsorbimento alle pareti cellulari.

L'OTA, così rimossa, andrebbe via con le fecce ed il vino risulterebbe decontaminato.

I risultati più recenti (Caridi et al. 2006a; 2006b; Cecchini et al. 2006) dimostrano la possibilità di ridurre fortemente il contenuto in OTA utilizzando starter vinari espressamente selezionati verso la capacità di sequestrare la tossina durante la vinificazione.

Sono state segnalate notevoli differenze per questo carattere tra i ceppi testati; tali differenze potrebbero essere dovute principalmente a un differente contenuto in mannosilfosfato da parte delle mannoproteine parietali dei diversi lieviti vinari.

È stata da noi condotta la selezione di lieviti vinari ad alta attività adsorbente verso l'OTA nell'ambito di 20 ceppi di *Saccharomyces sensu stricto* già selezionati per uso enologico.

I lieviti sono stati saggiati in soluzione fisiologica (Caridi et al. 2006a) ed in mosto d'uva (Caridi et al. 2006b), addizionati di OTA.

I risultati sono di notevole interesse, in quanto i migliori ceppi sono stati capaci di adsorbire fino al 90% dell'OTA inizialmente presente, consentendone dunque la successiva rimozione con un semplice travaso (Tabella 1).

Tabella 1

Ceppo	PERCENTUALE DI <b>OCRATOSSINA A</b> RIMOSSA DAI DIVERSI CEPPI		
TT254	53	66	79
TT173	100	86	80
TT77	21	75	78
Sc2717	0	41	73
Sc2659	7	88	82
Sc2640	47	75	75
Sc2621	66	71	79
Sc2489	100	50	81
Sc1864	8	66	80
Sc1766	42	61	78
Sc1661	5	40	76
Sc1483	100	70	80
Sc1304	33	65	76
Sc708	6	72	68
Sc560	51	80	81
Sc254	100	91	82
Sc226	57	45	73
Sc45	100	82	82
12233	86	85	83
1042	18	58	77
	In soluzione fisiologica (1.1 ng/ml) Caridi et al. 2006a	In mosto d'uva (1.58ng/ml) Caridi et al. 2006b	In mosto d'uva (7.63ng/ml) Caridi et al. 2006b

Tendenzialmente, i ceppi che manifestano la massima capacità di adsorbire i pigmenti dell'uva sono gli stessi che producono un maggiore abbassamento della quantità di OTA nel corso della vinificazione; tale rapporto non è, peraltro, totalmente correlato.

La ricerca si orienterà verso ceppi capaci di adsorbire l'OTA rispettando il colore dei vini rossi.

### **Messa a punto di un metodo per lo screening dell'attività adsorbente dei lieviti**

Gran parte dell'attività di ricerca da noi svolta negli ultimi anni ha avuto per obiettivo la messa a punto di un metodo per lo screening dell'attività adsorbente dei lieviti.

Sarebbe, infatti, inappropriato valutare i parametri di colore dei vini fermentati con starter vinari per risalire all'attività adsorbente del lievito utilizzato come starter; ciò per l'assenza di una totale correlazione tra colore del vino ed attività adsorbente dei lieviti.

Infatti, come prima affermato, il colore del vino è influenzato da una varietà di fattori lievito-dipendenti, che possono essere presenti in ciascun ceppo a differente livello ed indipendentemente dalla sua attitudine adsorbente.

Conseguentemente, è possibile trovare due ceppi con attività adsorbente molto simile, ma che producono vini con colore significativamente differente, e viceversa (Caridi et al. 2007).

Perciò, si è cercato di mettere a punto un metodo nuovo, semplice, veloce ed altamente riproducibile per eseguire in piastra Petri uno screening dell'attività adsorbente dei lieviti.

Il metodo qui proposto è basato sulla valutazione del colore della biomassa, che è altamente correlato a quantità e tipo di pigmenti adsorbiti dal lievito.

Per identificare ceppi capaci di esprimere pienamente le potenzialità polifenoliche delle uve è stata impiegata una metodologia di selezione in piastra Petri, utilizzando substrati a base di bucce e di semi d'uva.

L'idea di realizzare un metodo colorimetrico di screening dei lieviti è partita dall'osservazione del colore della biomassa depositata al fondo di vasi vinari contenenti mosto da uve a bacca nera fermentato con lieviti selezionati: alcuni contenitori avevano un deposito quasi bianco, mentre altri un deposito intensamente colorato.

Il metodo consiste nell'esaminare il colore della biomassa - dal bianco al marrone scuro - che riflette l'adsorbimento dei pigmenti dell'uva: più scuro è il colore, maggiore è l'adsorbimento dei pigmenti.

Bucce e semi sono separati manualmente, lavati accuratamente in acqua corrente per eliminare i residui di polpa e succo, asciugati dapprima con carta assorbente e, successivamente, essiccati in stufa a 50°C rimescolando di tanto in tanto.

Bucce e semi sono macinati a secco e conservati in contenitori con tappo a vite fino al momento dell'uso.

A quel punto, bucce e semi sono pesati, uniti in beuta a peptone, estratto di lievito, agar e acqua distillata e trattati in autoclave a vapore fluente a 100°C per 30'.

I substrati vengono quindi filtrati su garza, sottoposti a sterilizzazione a 121°C per 15' e versati in piastre Petri.

Dopo solidificazione, i substrati sono seminati con una piccola quantità di biomassa proveniente da precoltura di 48 ore a 28°C in agar destrosio (4%) Sabouraud.

Le piastre sono incubate a 28°C per 10 giorni e, quindi, esaminate per il colore assunto dalla biomassa.

La lettura delle differenze di colore tra i ceppi può essere effettuata visivamente o con l'ausilio di tecniche computer-assistite (mediante Photoshop); in quest'ultimo caso, il dato è scomponibile nelle tre componenti del colore RGB=rosso, verde e blu ed è elaborabile in chiave numerica e, conseguentemente, statistica.

Ulteriori dettagli sul metodo sono reperibili negli articoli già pubblicati sull'argomento (Caridi et al. 2002; Caridi et al. 2007).

La presente ricerca ha dimostrato che è possibile selezionare i lieviti vinari semplicemente e velocemente in Piastra verso la loro attitudine ad adsorbire i pigmenti dell'uva sulle loro pareti cellulari.

### **Conclusioni**

In generale, è evidente come la selezione dei lieviti vinari basata sull'attività di adsorbimento parietale può contribuire al potenziamento di qualità e stabilità dei vini.

Ulteriori ricerche dovranno essere condotte per studiare la specifica attività adsorbente delle mannoproteine neutre ed acide sui differenti composti presenti nel vino.

Sarebbe interessante studiare la competizione per i siti di legame sulle mannoproteine parietali dei lieviti tra OTA, pigmenti ed altri composti fenolici.

Ciò potrebbe consentire la selezione di ceppi di lievito caratterizzati da:

- protezione del colore durante la vinificazione in rosso;
- rimozione dell'eventuale colore residuo durante la vinificazione in bianco;
- rimozione selettiva dell'OTA;
- protezione dei composti fenolici responsabili dell'attività antiossidante naturale del vino.

Strategie genomiche potrebbero ulteriormente incrementare l'attività adsorbente/non adsorbente.

### **Bibliografia**

- Arici, M., Gümüş, T., Kara, F., 2004. The fate of ochratoxin A during the Pekmez production from mouldy grapes. *Food Control* 15, 597-600.
- Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A., 2003. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology* 109, 715-722.
- Caridi, A., Cufari, A., Ramondino, D., 2002. Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *Journal of General and Applied Microbiology* 48(5), 261-268.
- Caridi, A., Cufari, A., Lovino, R., Palombo, R., Tedesco, I., 2004. Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technology and Biotechnology* 42(1), 37-40.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2006a. In-vitro screening of *Saccharomyces* strains for ochratoxin A removal from liquid medium. *Annals of Microbiology* 56, 135-137.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2006b. Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 122-126.
- Caridi, A., Sidari, R., Solieri, L., Cufari, A., Giudici, P., 2007. Wine colour adsorption phenotype: an inheritable quantitative trait loci of yeasts. *Journal of Applied Microbiology* doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03301.x.
- Cecchini, F., Morassut, M., Garcia Moruno, E., Di Stefano, R., 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23, 411-417.
- Jigami, Y., Odani, T., 1999. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochimica and Biophysica Acta* 1426, 335-345.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2005. Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 104-109.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., Suárez, J.A., 2005. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology* 220, 341-346.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G., 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants* 18, 647-654.