



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie viticole ed enologiche

INFLUENZA DEL LIEVITO NELLA DETERMINAZIONE  
DEL COLORE NEI VINI ROSSI: L'EFFETTO DI STARTER  
TRADIZIONALI ED INNOVATIVI

Relatore  
Prof. Viviana Corich

Laureando  
Carmelo Scuderi  
Matricola n.  
1220868

ANNO ACCADEMICO  
2021/2022

# INDICE

## 1 OBIETTIVI DELL'ELABORATO

## 2 IL COLORE DEI VINI ROSSI

### 2.1 INTRODUZIONE

### 2.2 GLI ANTOCIANI: FORME DI EQUILIBRIO IN SOLUZIONE

### 2.3 L'EFFETTO DEL PH, DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA E DELLA TEMPERATURA

### 2.4 LA COPIGMENTAZIONE

### 2.5 LA CONDENSAZIONE ANTOCIANI-TANNINI: LA FORMAZIONE DI COMPLESSI

## 3 INFLUENZA DEL LIEVITO SUL COLORE DI UN VINO ROSSO

### 3.1 LA FORMAZIONE DI PIGMENTI

#### 3.1.1 LE PIRANOANTOCIANINE

#### 3.1.2 LE VINILFENOL-PIRANOANTOCIANINE

### 3.2 LA CONFORMAZIONE DELLA PARETE CELLULARE DEI LIEVITI

### 3.3 CASO STUDIO: GLI ANTOCIANI ADSORBITI DA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

### 3.4 CASO STUDIO: L'ADSORBIMENTO DI PROANTOCIANIDINE E POLIFENOLI DEL VINO DA PARTE DI LIEVITI VIVI, LIEVITI INATTIVI E PARETI CELLULARI

### 3.5 CASO STUDIO: GLI EFFETTI DELL'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA ANTOCIANIN- $\beta$ -GLUCOSIDASI DI LIEVITI NON-*SACCHAROMYCES* SUL COLORE DEL VINO ROSSO

### 3.6 CASO STUDIO: L'UTILIZZO DI LIEVITI NON-*SACCHAROMYCES* E TANNINI ENOLOGICI NELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO

## CONCLUSIONI

## BIBLIOGRAFIA

# 1 OBIETTIVI DELL'ELABORATO

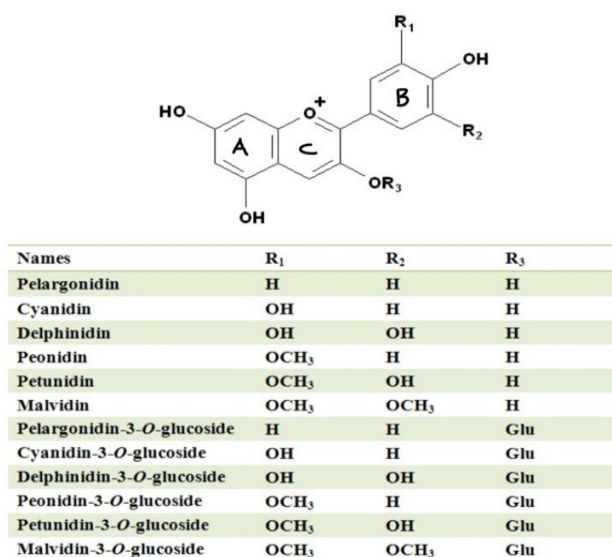
In letteratura un cospicuo numero di pubblicazioni riguarda gli antociani e il loro impatto sulla qualità del vino. Infatti, queste molecole, influenzano un aspetto fondamentale ossia il colore. Poiché è una caratteristica immediatamente riscontrabile, il colore di un vino è il principale criterio qualitativo utilizzato dal consumatore. Infatti, grazie alla sola vista è possibile ottenere informazioni sul prodotto già prima della fase di assaggio. La colorazione di un vino crea aspettative sul consumatore e ne influenza direttamente la percezione soggettiva sulle altre proprietà in fase di assaggio. L'evoluzione degli antociani nel vino rappresenta in enologia un fattore caratterizzato da grande dinamismo, e sicuramente non di facile gestione. In questo elaborato verranno fornite nozioni sulla conformazione chimica degli antociani, i principali fattori che ne influenzano l'evoluzione e le reazioni che avvengono in soluzione a carico di questi pigmenti che portano alla stabilizzazione del colore di un vino rosso appena prodotto. Successivamente viene discusso l'effetto sulla stabilizzazione del colore da parte di diversi ceppi convenzionali *Saccharomyces* e *non-Saccharomyces* ancora oggetto di studio da parte della comunità scientifica. L'obiettivo è quello di considerare l'utilizzo di lieviti in cantina non soltanto dal punto di vista delle capacità fermentative ma come strumento che può rappresentare in un prossimo futuro, un metodo biotecnologico efficace utilizzato per modulare aspetti quali il colore del vino e la sua evoluzione nel tempo.

## 2 IL COLORE DEI VINI ROSSI

### 2.1 INTRODUZIONE

Le antocianine, o antociani, sono dei pigmenti colorati idrosolubili appartenenti alla classe dei flavonoidi. Sono largamente diffusi nel mondo vegetale non solo all'interno dei frutti, ma in numerosi organi di piante superiori come radici e fiori. In *Vitis Vinifera* sono presenti come costituenti degli acini delle sole varietà a bacca rossa e localizzati nelle bucce, precisamente nei vacuoli delle cellule dell'ipoderma, principalmente in forma mono glicosilata. La concentrazione tipica di antociani in un vino rosso è di circa 500 mg/L, ma può arrivare anche a concentrazioni di 2000 mg/L, in relazione alla varietà utilizzata ed ai metodi di estrazione (macerazione) e trasformazione del prodotto impiegati. La quantità di antocianine in un vino finito può essere direttamente attribuibile a tre fattori che sinergizzano tra di loro: il fattore biologico, il fattore ecologico e il fattore antropico. Il fattore biologico rappresenta la diversa espressione genica che caratterizza le varietà di *Vitis vinifera*. Varietà differenti esprimono un diverso profilo in termini quantitativi e qualitativi delle antocianine. Un esempio rappresentativo è dato dal *Pinot Nero*. Questa varietà in particolare è sprovvista di geni che determinano la formazione di antocianine acilate. Questo porta alle tipiche tonalità scariche di un vino prodotto da uve della varietà *Pinot Nero*. Il fattore ecologico rappresenta le caratteristiche pedoclimatiche della zona. Si parla quindi di un effetto di zonazione sulla varietà utilizzata, in relazione a caratteristiche pedoclimatiche come quantità di acqua disponibile, tipologia di suolo, altitudine, esposizione al sole, che caratterizzano e definiscono anche mesoclima e microclima tipico della regione. Il fattore antropico rappresenta non solo le diverse pratiche enologiche atte al preservare e ottimizzare l'estrazione degli antociani dalle bucce, ma soprattutto le pratiche di gestione del vigneto. Le tecniche colturali, la scelta dell'epoca di vendemmia, la gestione della chioma determinano fortemente l'aspetto quantitativo degli antociani nell'uva. Chimicamente la struttura degli antociani è rappresentata dallo ione flavilio (**Fig. 2.1.1**), costituito da due anelli benzenici (anello A ed anello B) uniti tra loro da un eterociclo ossigenato insaturo a carattere cationico (anello C). L'anello C dei rispettivi antociani è definito cromoforo, in quanto è la parte di molecola maggiormente responsabile della colorazione che ne definisce le caratteristiche spettrofotometriche. Il differente grado di sostituzione dell'anello B viene considerato nella classificazione dei diversi antociani riscontrati nelle uve. In questo modo

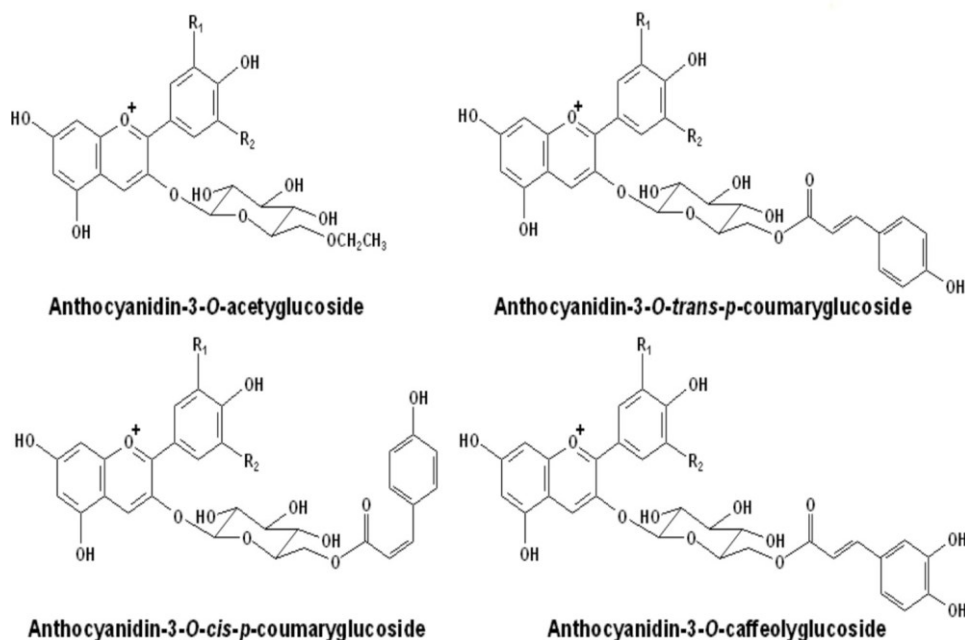
sono state denominate le singole antocianine, tra cui le principali sono: pelargonidina (non rappresentativa in quanto presente in scarse quantità) cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. Queste molecole possono essere presenti anche nelle rispettive forme non legate ad uno zucchero, ossia gli agliconi (definiti antocianidine). Tuttavia, le forme glicosilate (antocianine) risultano chimicamente più stabili, quindi più abbondanti nell'uva e successivamente nel vino.



**Figura 2.1.1: principali antociani e struttura chimica generale. (Fei He et al. 2012)**

Il grado di sostituzione dell'anello B determina in primo luogo, un maggior effetto di delocalizzazione della carica lungo tutta la molecola, rendendola più stabile in soluzione. In secondo luogo ne determina la tonalità della colorazione. In relazione al colore possiamo distinguere antociani trisostituiti (malvidina, petunidina e delphinidina) che assorbono lunghezze d'onda maggiori e conferiscono già nel mosto una colorazione tendente al viola, e disostituiti (cianidina, peonidina) che assorbono lunghezze d'onda minori conferendo una colorazione più rossa-aranciata. L'antocianina maggiormente rappresentata nel vino è la malvidina ed i suoi derivati, che costituiscono mediamente dal 50% al 90% degli antociani totali, in relazione alla varietà di *V. vinifera* presa in considerazione. Gli antociani nella loro forma glicosilata possono essere acilati. Questo processo avviene già durante la fase di ottenimento del mosto. Questa reazione chimica spontanea determina la formazione di un legame estere: il gruppo idrossilico sul C6 dello zucchero legato all'antocianina reagisce con acido acetico o acidi idrossicinnamici come acido caffeico e p-cumarico (**Fig. 2.1.2**). Questa reazione comporta un aumento di stabilità della molecola, determinando inoltre un aumento di tonalità. Nel vino finito, però, già dopo pochi mesi di sosta in bottiglia o affinamento non

si trovano più quantità rilevanti di antociani acilati, ma esclusivamente in forma glicosilata. Questo si riscontra a causa della formazione di alcol etilico che, già durante le prime fasi di fermentazione alcolica, determina una rottura del legame tra lo zucchero ed il rispettivo acido. Le antocianine estratte dall'uva in forma monomeric (o libera) sono la principale fonte di colore di un mosto e successivamente di un vino, ma risultano particolarmente instabili in presenza di ossigeno, SO<sub>2</sub> e valori di pH elevati. L'instabilità delle antocianine viene principalmente contrastata da fenomeni spontanei di complessazione tra antocianine monomeriche e altri composti presenti in soluzione che portano alla formazione di pigmenti stabili colorati. Infatti, durante la fase di vinificazione e nella successiva fase di affinamento, la concentrazione di antociani liberi diminuisce progressivamente mentre la concentrazione di pigmenti colorati aumenta.

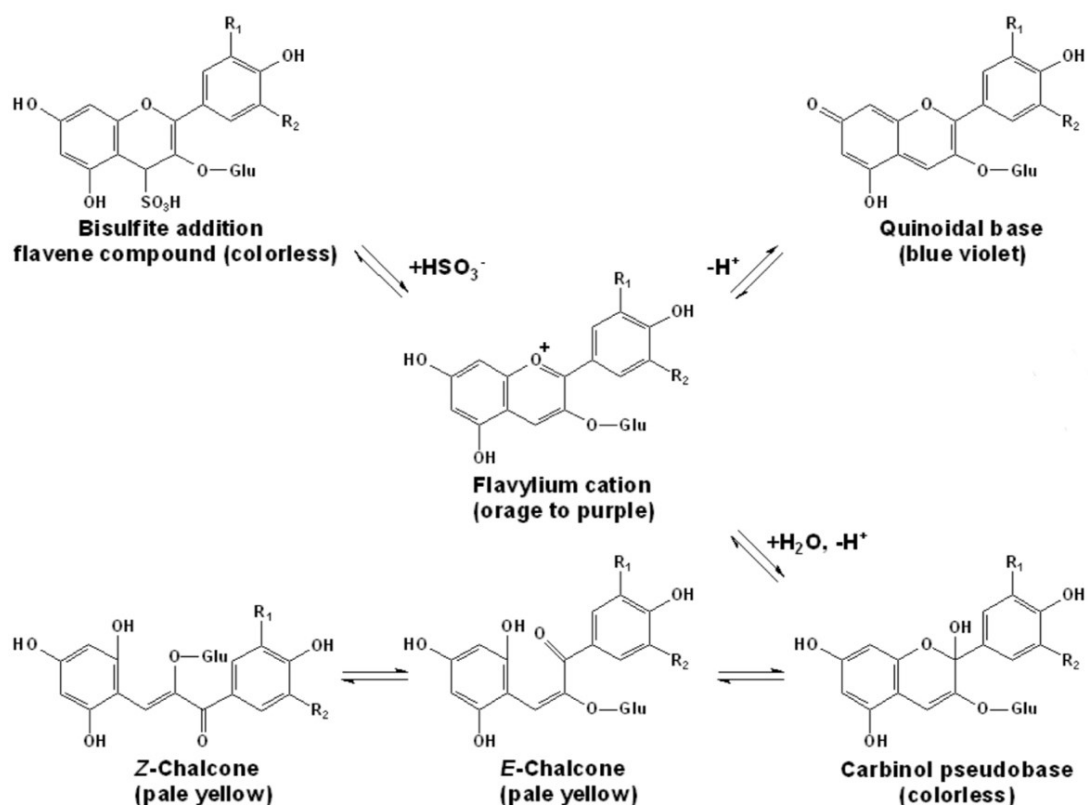


**Figura 2.1.2: struttura chimica delle antocianine acetilate. (Fei He et al. 2012).**

## 2.2 GLI ANTOCIANI: FORME DI EQUILIBRIO IN SOLUZIONE

L'instabilità delle antocianine monomeriche o libere in soluzione è dovuta alla loro caratteristica di essere dei composti fortemente pH dipendenti e facilmente ossidabili. In soluzione si instaura un equilibrio dinamico caratterizzato da cinque diverse forme che le antocianine assumono in relazione al pH della soluzione: ione flavilio responsabile della

colorazione rossa, addotto antociano-ione bisolfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) incolore, base chinoidale responsabile della colorazione blu, forma emichetalica o pseudobase carbinolo incolore, calcone (nelle rispettive forme E-Z) responsabile delle colorazioni che virano verso il giallo (**Fig. 2.2.1**). La distribuzione nelle diverse forme è particolarmente dipendente dal pH, ma anche da quantità di  $\text{SO}_2$  presente e temperatura della soluzione. Le reazioni che interessano il passaggio delle antocianine dalla forma di ione flavilio verso le altre forme vengono classificate in: reazioni acido-base e di idratazione, che interessano il passaggio dalla forma di ione flavilio a base chinoidale e pseudobase carbinolo rispettivamente. Entrambe sono caratterizzate dall'essere reazioni che avvengono molto velocemente.



**Figura 2.2.1: forme di equilibrio degli antociani in soluzione. (Fei He et al. 2012)**

L'apertura e il riarrangiamento dell'eterociclo invece, che interessa il passaggio dalla forma di pseudobase carbinolo alla forma di calcone, avviene su lunghi periodi di tempo.

L'addotto antociano-ione bisolfito o flavene incolore, è l'unico composto tra quelli citati che si forma attraverso un legame diretto tra antociano ed un'altra molecola presente nel vino.

## 2.3 L'EFFETTO DI PH, ANIDRIDE SOLFOROSA E TEMPERATURA

Dallo studio pubblicato da Fei He e collaboratori nel 2012, si evince come pH bassi ( $\text{pH} < 2$ ) favoriscono lo spostamento dell'equilibrio verso la forma di ione flavilio che in queste condizioni sarebbe maggiormente rappresentata, sfavorendo l'idrolisi e la riduzione degli antociani. Aumentando il pH a valori di 3,4-3,6 (in linea con i valori di un vino rosso giovane), solo 20-25% degli antociani risultano essere presenti sotto forma di ione flavilio, mentre a valori di pH 4,0 solo il 10%. L'aumento di pH favorisce sia il passaggio dalla forma di ione flavilio rosso a base chinonica blu, per effetto dell'aggiunta di protoni, sia l'addizione di una molecola d'acqua (idratazione) sull'anello C dello ione flavilio, determinando una perdita di colorazione. La forma favorita che assumono le antocianine in soluzione nel vino è la forma idratata. Difatti la forma emichetolica (pseudobase incolore idratata) in equilibrio tra le due forme di calcole cis e trans della malvidin-3-glucoside risulta essere l'antocianina maggiormente presente nel range di pH tra 3 e 6. La reazione chiave quindi, che determina la perdita di colorazione è proprio l'idratazione degli antociani, favorita da valori di pH superiori a 2. Il secondo fattore che influisce sull'equilibrio dinamico è la quantità di  $\text{SO}_2$  libera. Tra i numerosi effetti dell'anidride solforosa sul vino, c'è la capacità dello ione bisolfito di legare direttamente gli antociani. Il legame avviene attraverso sostituzione nucleofila sul C4 dell'anello C dell'antocianina, provocando una perdita di colorazione oltre che a sottrazione di  $\text{SO}_2$  libera nel mosto/vino. La reazione risulta comunque reversibile quando ci si avvicina nuovamente a valori di pH 2. Questo è un aspetto molto importante da considerare in quanto, a valori di pH di 3.2, l'anidride solforosa nel vino risulta presente in soluzione per il 96% sotto forma di ione bisolfito. Questo sottolinea come la scelta del corretto dosaggio di solforosa post travaso di un vino rosso appena prodotto, non influenzerà soltanto in termini di stabilità microbiologica e quindi di conservazione del prodotto, ma anche la quantità di antociani liberi sottratti che non potranno quindi prendere parte alle reazioni di evoluzione di colore del prodotto in questione, salvo cambiamenti di equilibrio nella soluzione che risultano comunque limitati su vino finito rispetto ad un mosto. Considerando infine la temperatura, un trattamento termico spinto ad esempio una termovinificazione<sup>1</sup> aumenta certamente la quantità di composti polifenolici estratti dalle bucce, ma determina anche una degradazione di una parte variabile degli antociani presenti

---

<sup>1</sup> Termovinificazione: tipologia di estrazione a caldo: tecnica utilizzata per la produzione di vini molto colorati adatti ai tagli. Consiste nel riscaldamento del mosto in presenza delle parti solide a temperature di 50-70° C per circa 30 minuti.



in forma emichetolica, verso la forma di calcone incolore a causa della rottura forzata dell'anello C per effetto dello shock termico.

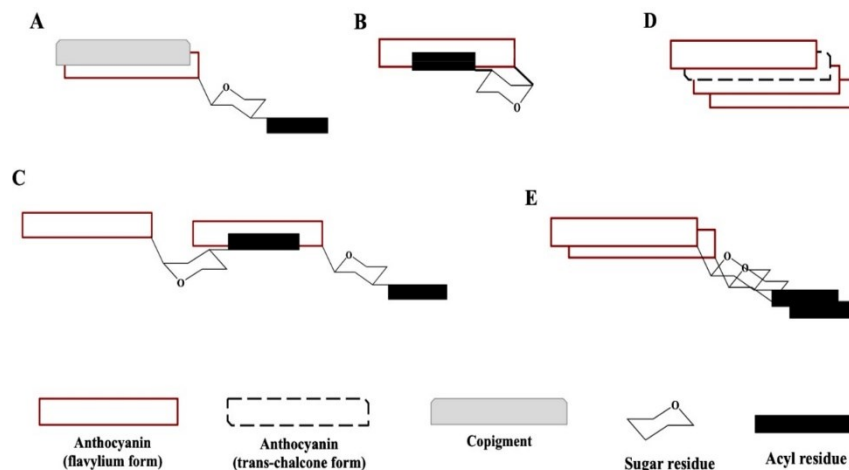
## 2.4 LA COPIGMENTAZIONE

La copigmentazione è uno dei fenomeni più importanti che partecipa alla colorazione finale di un vino rosso. È definita come una serie di meccanismi chimico-fisici che portano alla formazione di aggregati molecolari attraverso legami deboli non covalenti. Si tratta principalmente di forze di van der Waals che si instaurano tra una antociana monomericata sotto forma di ione flavilio responsabile della colorazione rossa ed una molecola organica incolore (definita copigmento). L'effetto della copigmentazione sul colore di un vino risulta massimo durante le fasi prefermentative e sfavorito in fase di fermentazione, dove la presenza di alcol etilico ostacola la formazione di nuovi aggregati attraverso legami deboli. La formazione di complessi antociano-copigmento già sul mosto, permette di preservare da idratazione e da ossidazione una quantità maggiore di antocianine sotto forma di ione flavilio. Nuovamente si avrà un incremento contenuto della copigmentazione alla fine della fermentazione alcolica e in fase di affinamento. Avvengono due fenomeni distinti di copigmentazione: intermolecolare ed intramolecolare. È osservabile un ulteriore fenomeno in competizione con la copigmentazione definito auto-associazione. In letteratura è considerato un particolare caso di copigmentazione in cui gli anelli aromatici di due antocianine differenti si legano attraverso legami covalenti  $\pi$ - $\pi$  e vengono stabilizzati attraverso legami di tipo idrofobico (**Fig. 2.4.1 D**). Gli studi confermano come il grado di auto-associazione presenta una correlazione positiva col grado di metilazione dell'anello B oltre che essere influenzato dalla concentrazione delle stesse antocianine e copigmenti presenti. Una maggior concentrazione di copigmenti in soluzione si pensa favorisca i fenomeni di copigmentazione rispetto all'auto associazione (Dongbao Cai e collaboratori, 2022). Oltretutto le antocianine che presentano residui acilati sembrano avere maggior affinità per il fenomeno dell'auto-associazione rispetto alla copigmentazione (Dongbao Cai e collaboratori, 2022) (**Fig. 2.4.1 E**).

### Copigmentazione intermolecolare ed intramolecolare

Dalle informazioni contenute nello studio di Ana Fernandes e collaboratori del 2017, la copigmentazione intermolecolare si origina dall'interazione tra una molecola di antociano

sotto forma di ione flavilio ed una molecola organica incolore diversa che si trova in soluzione, mentre la copigmentazione intramolecolare avviene quando prende parte alla reazione solo l'antocianina. Questo viene spiegato dalla possibilità che il residuo acilato legato allo zucchero possa fungere da copigmento incolore nei confronti della stessa antocianina a cui è legato. In entrambi i casi il complesso che si forma assume una struttura definibile a "sandwich", che permette di stabilizzare il cromoforo dell'antociano e proteggerlo parzialmente da idratazione, che porterebbe una perdita di colore (**Fig. 2.4.1, A,B,C**).



**Figura 2.4.1: Formazione di complessi attraverso legami non-covalenti. Copigmentazione intermolecolare: tra antocianina e pigmento incolore (A), tra una antocianina e il residuo acilato di un'altra antocianina (C); Copigmentazione intramolecolare tra una antocianina ed il rispettivo residuo acilato (B); Auto-associazione tra due antocianine sotto forma di ione flavilio oppure tra un'antocianina sotto forma di ione flavilio ed un'altra antocianina sotto forma di trans-calcone (D); Auto-associazione tra antocianine acetilate (E). (Ana Fernandes et al. 2017)**

Il vino rosso contiene numerosi composti capaci di fungere da copigmento (**Fig. 2.4.2**). I complessi antociano-copigmento formati, oltre ad essere meno soggetti ad idratazione pur mantenendo la colorazione, presentano caratteristiche spettrofotometriche differenti dai rispettivi antociani sotto forma di ione flavilio. La formazione di nuovi complessi colorati causa un effetto ipercromico, con aumento di assorbanza, ed un effetto batocromico, che determina uno spostamento del picco di adsorbimento verso lunghezze d'onda maggiori. Nel dettaglio, l'effetto ipercromico è dovuta alla formazione di complessi tra antociani in soluzione sotto forma di ione flavilio e copigmento mentre l'effetto batocromico è dovuto a fenomeni di copigmentazione tra antociani sotto forma di base chinoidale blu e copigmento. L'effetto complessivo della copigmentazione è quindi un incremento dell'intensità colorante

che avviene già sul mosto.

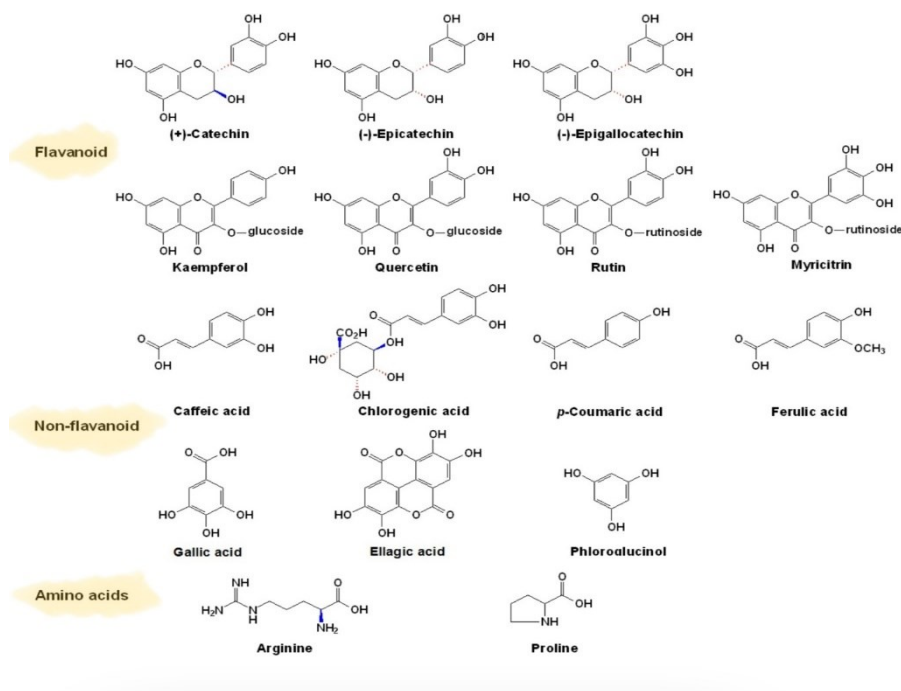


Figura 2.4.2: copigmenti presenti nel mosto/vino (Fei He et al. 2012)

## 2.5 I COMPLESSI ANTOCIANI-TANNINI CONDENSATI

I tannini condensati o proantocianidine sono composti flavonoidi. Chimicamente sono le forme polimerizzate dei flavan-3-oli monomerici rappresentati da catechina (+) ed epicatechina (-) e dai loro isomeri: gallo catechina, epigallocatechina ed epicatechina gallato. Sono localizzati nell'uva in tutte le parti solide (bucce, vinaccioli, raspi) e riscontrabili nei vini rossi in quantità variabili da 1g/L a 5g/L. Nel vino le proantocianidine sono presenti maggiormente sotto forma di dimeri (2 unità), trimeri (3 unità), oligomeri (da 3-10 unità). Vengono estratti nella fase di contatto (fase di macerazione) tra le componenti solide degli acini (vinacce) e la frazione liquida del mosto durante tutta la fase di fermentazione alcolica, fino alla svinatura dove la frazione liquida e solida vengono separate. L'effetto dei tannini condensati sul colore è dovuto a due fattori principali. Il primo aspetto riguarda la loro forte azione antiossidante, in grado di preservare i pigmenti colorati dall'ossidazione. La seconda caratteristica è quella di prendere parte direttamente alla formazione di complessi stabili attraverso legami covalenti con gli antociani, sia sotto forma di ione flavilio sia sotto forma emichetale incolora. I complessi che si formano risulteranno oltre che colorati, più stabili

alle variazioni di pH, temperatura e all'azione decolorante dell'anidride solforosa. Le reazioni di polimerizzazione che interessano tannini e antociani sono classificabili in: formazione di complessi mediata da acetaldeide attraverso ponte etilenico e reazioni non mediate, che avvengono attraverso fenomeni di condensazione. Questi ultimi sono dovuti alla capacità, sia degli antociani sia dei tannini, di esprimere un carattere elettrofilo e/o nucleofilo a seconda della loro conformazione strutturale e delle condizioni del mezzo (pH). L'aggettivo elettrofilo si associa ad una molecola o un complesso molecolare con un difetto di elettroni, nucleofilo ad una molecola o un complesso molecolare con un eccesso di elettroni. Le antocianine presentano un carattere elettrofilo quando si trovano sotto forma di ione flavilio. La natura elettrofila è dovuta alla morfologia dell'anello C che presenta carattere carbocationico, quindi con carica positiva (**Fig. 2.1.1**). La forma emichetolica, che risulta nettamente predominante nei vini, rappresenta l'antocianina sotto forma di molecola nucleofila essendo stata addizionata una molecola d'acqua saturando la carica positiva dell'anello C sul rispettivo C2 (**Fig. 2.1.2**). Normalmente i tannini in soluzione nel vino assumono un carattere nucleofilo. Il carattere elettrofilo della componente tannica è dovuto a fenomeni di idrolisi acida che avvengono principalmente nel vino finto, per effetto del pH. Questa reazione non necessita di ossigeno, risultando quindi favorita in fase di affinamento in bottiglia. Vengono descritte due tipologie di reazioni che portano alla formazione di complessi antociano-tannino: le reazioni di tipo (A<sup>+</sup>)—(T<sup>-</sup>) e le reazioni di tipo (T<sup>+</sup>)—(A<sup>-</sup>) dove con A viene indicata l'antocianina e con T il tannino condensato, nelle rispettive forme di elettrofilo (+) e nucleofilo (-). I complessi (A<sup>+</sup>)—(T<sup>-</sup>) si formano per reazioni tra antociani sotto forma di ione flavilio (elettrofilo) e tannini condensati (nucleofilo) portando inizialmente alla formazione di un complesso incolore (flavene). In condizioni ossidanti, il complesso riacquista la carica positiva sull'anello dell'antocianina presentano nuovamente una colorazione rossa. Questa reazione spiega l'aumento di intensità colorante di un vino successivamente ad un travaso, ossia lo spostamento del vino dalla vasca di fermentazione ad una vasca di stoccaggio o tra vasche di stoccaggio, in cui avviene l'ossigenazione del vino. I complessi (T<sup>+</sup>)—(A<sup>-</sup>) si originano a seguito di reazioni tra tannini in forma di elettrofilo, ossia il carbocatione precedentemente rilasciato a seguito di fenomeni di idrolisi acida dei polimeri di catechina, e l'antocianina in forma emichetolica o pseudobase incolore. È una reazione nettamente più lenta rispetto alla precedente e sfavorita dalle eccessive temperature di conservazione del vino imbottigliato. Porta inizialmente alla formazione di complessi incolore che, a seguito di deidratazione, riacquistano colorazione con tonalità che virano verso il rosso/aranciato tipiche dell'evoluzione del colore di un vino imbottigliato.

Un'ulteriore tipologia di complessi antociano-tannino si formano a seguito del ruolo chiave dell'acetaldeide che risulta maggiormente rappresentata nel vino, ma possono prendere parte alle reazioni anche altre aldeidi come gliceraldeide o butanaldeide. L'acetaldeide risulta fortemente presente in un vino principalmente perché è uno dei prodotti secondari della fermentazione alcolica svolta dai lieviti. Un'ulteriore quantità di acetaldeide viene prodotta a seguito dell'ossidazione dell'etanolo durante la fase di affinamento in botte di legno. L'acetaldeide presenta un carattere elettrofilo in grado di mediare la polimerizzazione attraverso ponte etilenico tra antociani e proantocianidine entrambi in forma nucleofila. L'effetto complessivo sulla colorazione dato dalle tre possibili interazioni, è fortemente dipendente dal rapporto tannini/antociani in soluzione. Considerando la possibilità che uno dei due composti non sia presente nel vino in quantità adeguate, la carenza di tannini in soluzione porterebbe alla rapida degradazione degli antociani liberi in mancanza di forme polimerizzate maggiormente resistenti alle condizioni di pH, temperatura, SO<sub>2</sub>. Di contro una mancanza di antocianine in soluzione porterebbe ad una rapida formazione di tannini altamente polimerizzati, con successiva precipitazione.

### **3. INFLUENZA DEI LIEVITI SUL COLORE DI UN VINO ROSSO**

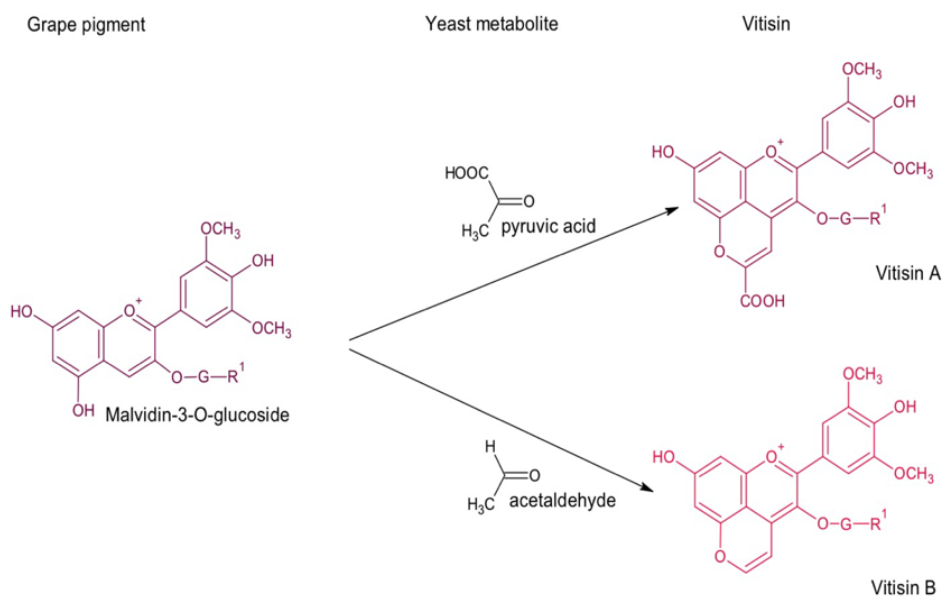
#### **3.1 LA FORMAZIONE DI NUOVI PIGMENTI**

Dalle informazioni contenute nello studio di Antonio Morata e collaboratori del 2019 e da quello di Jelena Topić Božič e collaboratori svolto nel 2020 che verrà trattato in seguito, le antocianine durante la fermentazione prendono progressivamente parte a fenomeni di complessazione non solo coi tannini, ma anche con metaboliti prodotti dai lieviti concorrendo alla formazione di nuovi pigmenti colorati stabili. Entrambi gli studi non si focalizzano esclusivamente sull'effetto dei lieviti enologici convenzionali *Saccharomyces cerevisiae* ma prendono in considerazione l'utilizzo di lieviti non convenzionali del mondo enologico che presentano basse capacità fermentative ma notevoli capacità di influire sulla colorazione di un vino rosso e che per questo vengono proposti come starter innovativi. I complessi colorati che si formano per effetto dell'attività dei lieviti sono le piranoantocianine e le vinilfenol-piranoantocianine, ritenuti responsabili del viraggio di colorazione che avviene in un vino rosso in fase di maturazione. Inoltre, la formazione di nuovi pigmenti, come anche quelli formati attraverso le interazioni con tannini, permette di preservare una maggior quantità di

antocianine dalla decolorazione a seguito di idratazione e di legami con anidride solforosa.

### 3.1.1 LE PIRANOANTOCIANINE

Le piranoantocianine presentano una colorazione rosso-mattonata o rossa-aranciata in relazione alla lunghezza massima di assorbimento nell'intervallo 495-540 nm identificata mediante analisi spettrofotometriche. Vengono descritte due tipologie principali di piranoantocianine in relazione al loro picco di assorbimento: vitisina B (495 nm) e vitisina A (515 nm). Un'altra tipologia di piranoantocianine sono le portisine (qualificate per la prima volta nel vino Porto) con valori tipici nel range 538-583 nm, che presentano colorazione rosso-bluastro. Tutte risultano resistenti a variazioni di temperatura, pH, e presenza di SO<sub>2</sub>. La formazione di vitisina A e B avviene già durante la fase fermentativa quando i rispettivi precursori quali piruvato ed acetaldeide rispettivamente, vengono prodotti dai lieviti (**Fig. 3.1.1**).

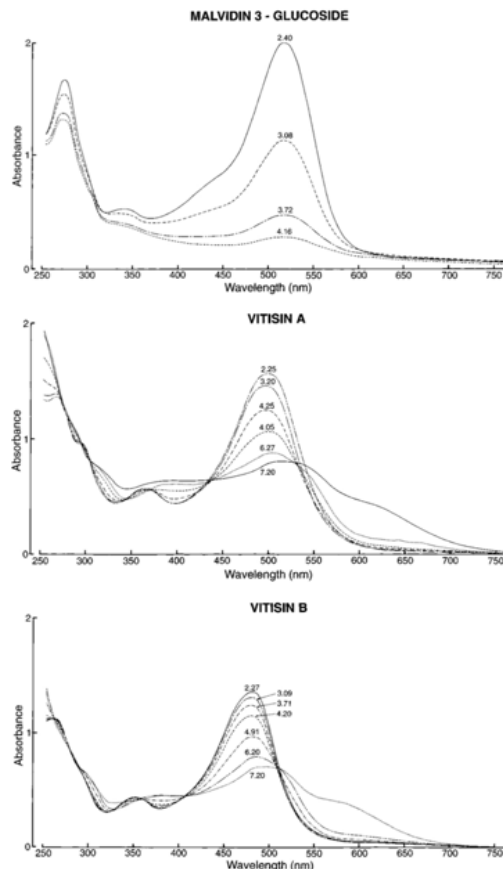


**Figura 3.1.1: formazione di vitisina a partire dai metaboliti del lievito. Principali derivati: vitisina A e B quando l'antociano è la malvidina R<sup>1</sup>: -OH; acetil vitisina quando R<sup>1</sup>: acido acetico; p-cumaril vitisina quando R<sup>1</sup>: acido p-cumarico. Queste reazioni avvengono anche quando prendono parte alla reazione altri antociani quali delphinidina, cianidina, petunidina o peonidina. (Antonio Morata et al. 2019)**

Per quanto riguarda la vitisina A, la produzione massima avviene durante le prime fasi di fermentazione (terzo/quarto giorno) caratterizzate dalla presenza di elevate quantità di piruvato in soluzione. I lieviti, inoltre, nella fase finale di fermentazione caratterizzata da carenza di zuccheri fermentescibili, sembra siano in grado di riutilizzare il piruvato che costituisce la vitisina A per i propri processi metabolici, riducendone progressivamente la concentrazione. La produzione di vitisina A e la presenza di questa nel vino finito risulta quindi direttamente correlata al grado zuccherino iniziale del mosto. Utilizzando un mosto con una concentrazione in zuccheri iniziale insufficiente, il lievito tende a riutilizzare una maggior quantità di vitisina A per riottenere piruvato in modo da sostenere i propri processi metabolici.

Dallo studio di A. Morata, la produzione di vitisina A, valutata durante il monitoraggio di una fermentazione condotta utilizzando *Saccharomyces cerevisiae*, inizia quando il lievito ha già utilizzato il 20% del glucosio iniziale fino all' 85%. Oltre l'85% del glucosio iniziale consumato, non si assiste ad ulteriore produzione di vitisina A. Il picco massimo di produzione è stato individuato nel momento in cui il 57% del glucosio iniziale risulta metabolizzato. La sintesi di vitisina A continua, seppur in ridotte quantità, anche dopo svariati mesi dalla fine della fermentazione in presenza dei precursori quali Malvidina-3-O-glucoside e piruvato. Per quanto riguarda la vitisina B, si riscontra un picco massimo durante le prime fasi di fermentazione parallelamente alla massima produzione di acetaldeide da parte dei lieviti. La produzione prosegue, seppur a concentrazioni inferiori, durante tutta la fase fermentativa. A differenza della vitisina A, la vitisina B non può essere riutilizzata dai lieviti. Se l'obiettivo è quello di favorire la formazione di questi pigmenti, il primo aspetto da considerare è evitare l'utilizzo di dosi elevate di anidride solforosa. In particolare, l'anidride solforosa libera in soluzione, avendo carattere nucleofilo, reagisce e lega facilmente sia le antocianine monomeriche sotto forma di ione flavilio, sia piruvato e acetaldeide che presentano tutti carattere elettrofilo. Questo ostacola le reazioni implicate nella produzione di nuovi pigmenti. Il secondo fattore che influisce sulla produzione di vitisine è il pH nonostante le piranoantocianine, in termini di colorazione, presentano elevata resistenza alle variazioni di quest'ultimo rispetto alle antocianine libere (**Fig. 3.1.2**).

Elevate concentrazioni di vitisina sono state identificate nei vini con valori di pH nell'intorno di 3,7. Di contro, i risultati delle analisi effettuate su vini rossi con valori di pH che si discostano da 3,7, dimostrano come la concentrazione di vitisine risulta progressivamente minore. Anche la temperatura presenta un effetto non trascurabile sulla produzione di questi pigmenti. In particolare, influisce sulla produzione di vitisina B in quanto la volatilità dell'acetaldeide, quindi il suo progressivo allontanamento, risulta proporzionale all'incremento di temperatura del vino.

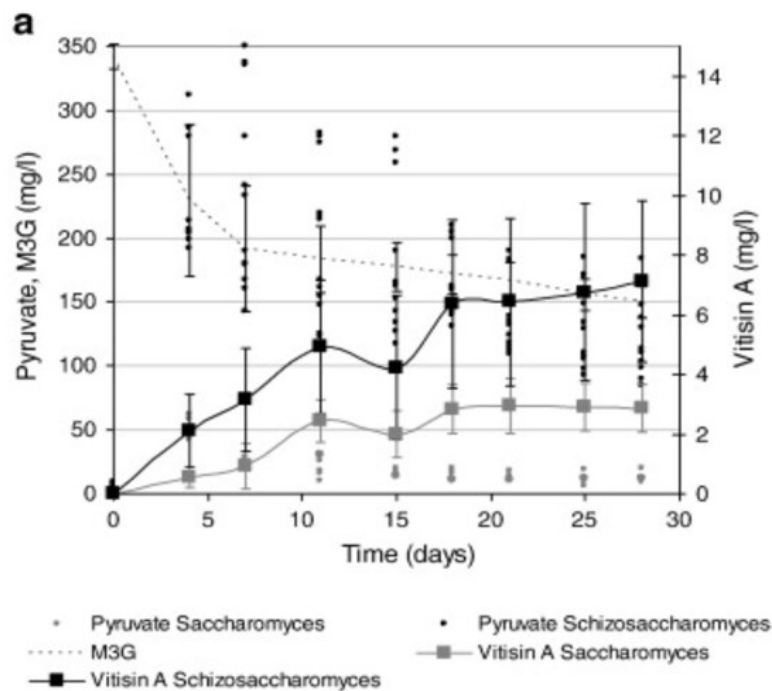


**Figura 3.1.2: effetto delle variazioni di pH sullo spettro di assorbimento da 250 nm a 700nm di malvidin-3-glucoside, vitisina A e vitisina B in una soluzione acquosa contenente 0,1 M di acido citrico. (Johanna Bakker et al. 1997)**

Per promuovere la formazione di piranoantocianine si stanno valutando le capacità dei lieviti *non-Saccharomyces*. Alcuni, infatti, utilizzati in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae* producono concentrazioni maggiori di piruvato ed acetaldeide (Juan Manuel Del Fresno et al. 2017). Tra i più interessanti troviamo *Schizosaccharomyces pombe* che presenta un *pathway* metabolico particolare in quanto è in grado di degradare l'acido malico in piruvato che entra nella fermentazione alcolica per produrre etanolo. Questo processo viene

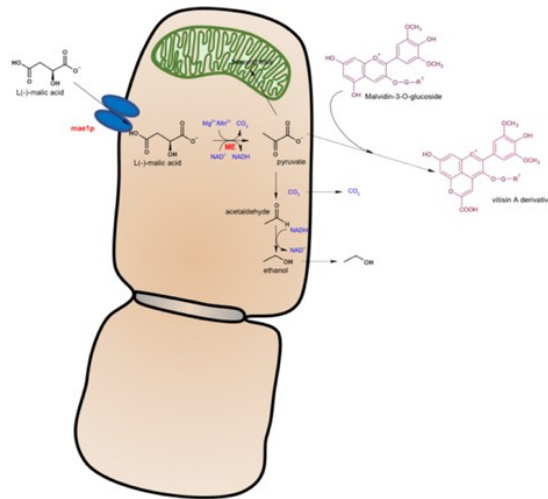


identificato come fermentazione malo-alcolica e può essere sfruttata sia come strumento per ridurre l'acidità di un vino evitando l'aggiunta di additivi, sia come strumento per promuovere la formazione di piranoantocianine. La quantità totale di vitisina A prodotta grazie all'impiego di *S. pombe* risulta, da studi precedenti condotti da A. Morata e collaboratori nel 2012, maggiore rispetto alla quantità prodotta impiegando *S. cerevisiae* (Fig. 3.1.3).



**Figura 3.1.3:** andamento della concentrazione di malvidina e della produzione di piruvato e vitisina A durante la fermentazione condotta con ceppi di *S. pombe* e *S. cerevisiae*. (Antonio Morata et al. 2012)

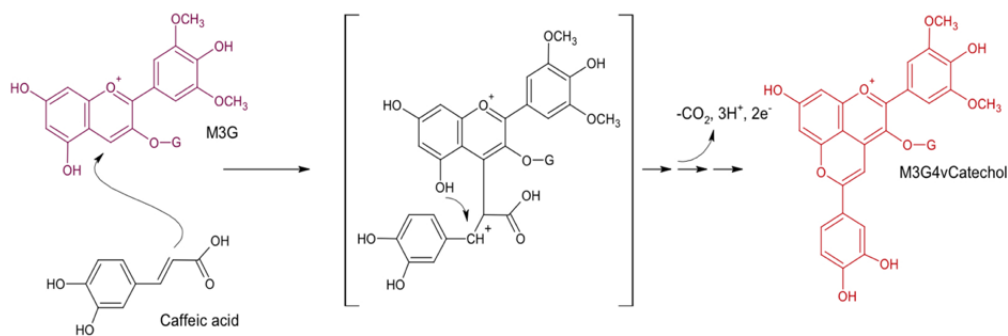
L'enzima malico di *S. pombe* ha un'affinità per l'acido malico circa quindici volte superiore a quella di *S. cerevisiae* e opera direttamente nel citosol a differenza di *S. cerevisiae* dove risulta associato alla membrana mitocondriale (e quindi non è in grado di produrre etanolo). Inoltre, è dotato di una malato permeasi specifica (*mae1p*) che facilita l'ingresso del malato nel citosol rendendo questo microrganismo molto più efficiente nella trasformazione dell'acido malico. La fermentazione malo-alcolica aumenta il rilascio di piruvato extra cellulare facilitando la formazione di vitisina A (Fig. 3.1.4). Altri lieviti non convenzionali nel mondo enologico ma in fase di studio che presentano alte produzioni di piruvato sono *Torulasporea delbrueckii*, *Saccharomyces ludwigii*, *Lachancea thermotolerans* e *Metschnikowia pulcherrima*.



**Figura 3.1.4: fermentazione malo-alcolica condotta da *S. pombe* con formazione di vitisina A. (A. Morata et al. 2019)**

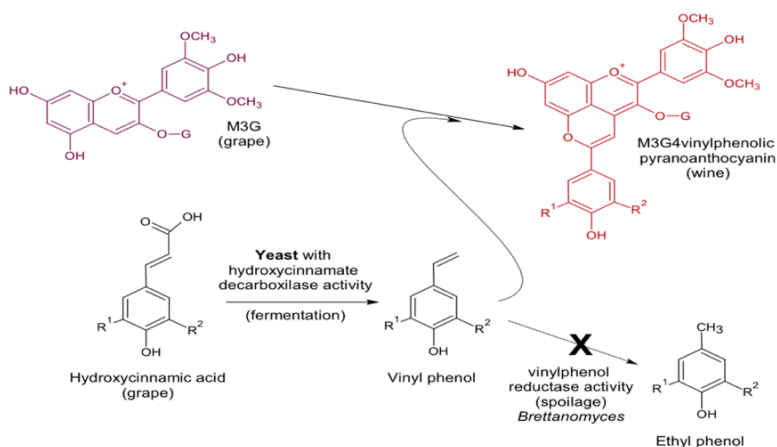
### 3.1.2 LE VINILFENOL-PIRANOANTOCIANINE

Le vinilfenol-piranoantocianine sono dei pigmenti stabili formati durante le fasi di fermentazione e affinamento attraverso reazioni che interessano antociani e acidi idrossicinnamici, in particolare i loro rispettivi derivati. Si tratta di lente reazioni di condensazione a cui seguono fenomeni di riarrangiamento a seguito di condizioni moderatamente ossidanti. La quantità di questi addotti aumenta proporzionalmente al periodo di affinamento. Nei primi studi relativi alla formazione di questi nuovi pigmenti, si è ampiamente dimostrato come le antocianine siano in grado di interagire sia direttamente con gli acidi idrossicinnamici dell'uva sia con i loro derivati sotto forma di vinilfenoli. Dalle reazioni tra antocianine (l'antociano maggiormente rappresentato nei vini è la malvidina ed i suoi derivati) ed acidi idrossicinnammici avviene la formazione di composti differenti a seconda dell'acido idrossicinnamico interessato nella reazione: malvidina-3-O-glucoside-4-vinilcatecolo (malvidina-acido caffeico), malvidina-3-O-glucoside-4-vinilfenolo (malvidina-acido p-cumarico) e malvidina-3-O-glucoside-4-vinilguaiacolo (malvidina-acido ferulico) (**Fig. 3.1.5**). Le reazioni che interessano invece antocianine e vinilfenoli sono promosse dal frequente utilizzo in cantina di ceppi di lievito che esprimono in modo marcato l'attività dell'enzima idrossicinnamato decarbossilasi (HCDC) durante la fase di fermentazione.



**Figura 3.1.5: reazioni chimiche che portano alla formazione di malvidin-3-O-glucoside-4-vinilcatecolo a partire da malvidin-3-O-glucoside e acido caffeico. (Antonio Morato et al. 2019)**

Questo enzima porta alla trasformazione degli acidi idrossicinnamici nei rispettivi vinilfenoli a seguito di decarbossilazione. Le reazioni di complessazione tra vinilfenoli e antocianine portano alla formazione delle vinilfenol-piranoantocianine (**Fig. 3.1.6**). I vinilfenoli contribuiscono quindi positivamente alla colorazione di un vino rosso. Questi possono essere coinvolti anche in un'altra reazione molto nota e che avviene in fase di affinamento in legno. In presenza di lieviti *Brettanomyces*, contaminanti delle botti, infatti, i vinilfenoli vengono convertiti in etilfenoli a seguito di reazioni di riduzione. Gli etilfenoli vengono considerati delle molecole "off flavour", ossia composti che provocano sentori sgradevoli tipici come sudore di cavallo, cuoio, svanito con una soglia di percezione molto bassa di 500 ppb (parti per miliardo corrispondenti a 500  $\mu\text{g/L}$ ).



**Figura 3.1.6: meccanismo di formazione della malvidin-3-O-glucoside-4-vinilfenolo dalla malvidin-3-O-glucoside durante la fermentazione. Acido caffeico/M3G4vinilcatecolo—R<sup>1</sup>: -H and R<sup>2</sup>: -OH; Acido p-cumarico/M3G4vinilfenolo—R<sup>1</sup>: -H and R<sup>2</sup>: -H; Acido ferulico/M3G4vinilguaiaicolo—R : -H and R : -OCH<sub>3</sub>. (Antonio Morata et al. 2019)**

Tuttavia, quando i vinilfenoli reagiscono con le antocianine, non prendono più parte alle reazioni che portano alla formazione di etilfenoli preservando l'integrità del prodotto anche in presenza di botti contaminate. La capacità dei lieviti di modulare la formazione di vinilfenol-piranoantocianine ha suscitato notevole interesse nella comunità scientifica soprattutto negli ultimi anni.

### **CASO STUDIO: L'IMPATTO DI LIEVITI *SACCHAROMYCES* E NON-*SACCHAROMYCES* SUL COLORE DEL VINO. FORMAZIONE DI VINILFENOL-PIRANOANTOCIANINE**

Jelena Topić Božiča, Lorena Butinarb, Alen Albrehtc, Irena Vovk, Dorota Korte, Branka Mozetič Vodopivec 2020

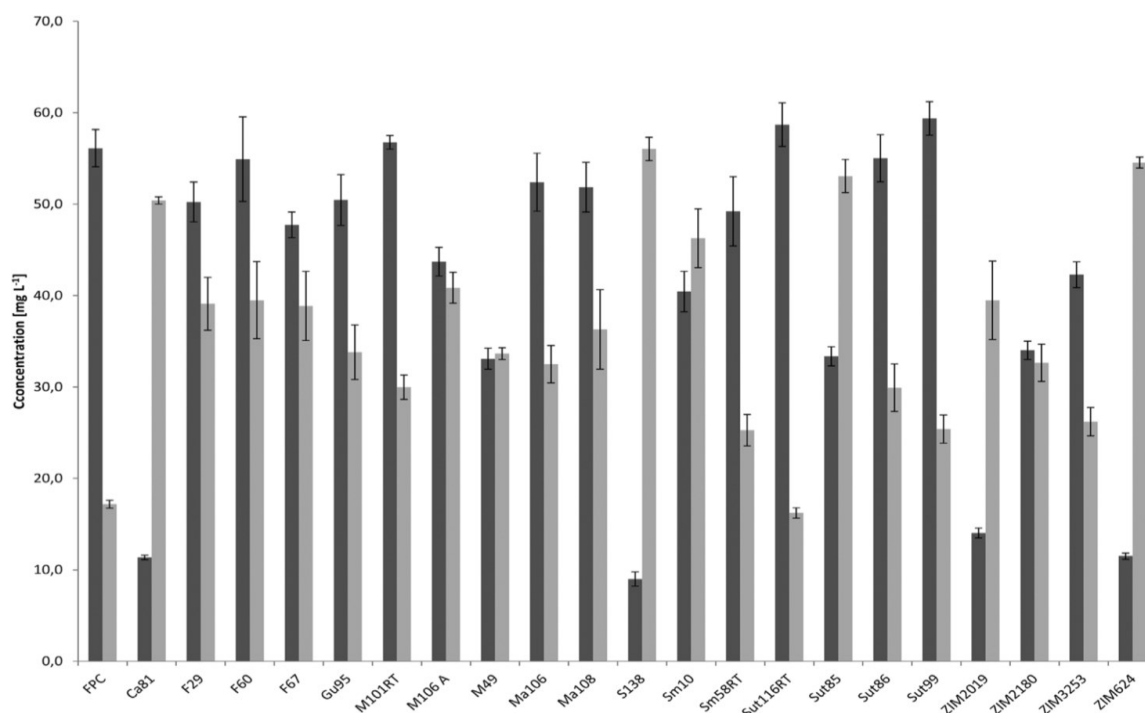
A tale riguardo lo studio condotto da Jelena Topić Božič e collaboratori nel 2020 testa 95 ceppi appartenenti a 29 specie dei generi *Saccharomyces* e *non-Saccharomyces* (**Fig. 3.1.7**). L'obiettivo è quello di determinare durante la prima fase del lavoro l'attività dell'enzima HCDC, che porta alla formazione di vinilfenoli dai rispettivi acidi idrossicinnamici. Successivamente vengono selezionati soltanto i ceppi con elevata attività enzimatica con lo scopo di utilizzarli per condurre prove di micro-fermentazione avviate con vari metodi e tipologie di inoculo. Questo ha permesso di quantificare la concentrazione di vinilfenol-piranoantocianine prodotte al termine delle varie prove. Per il calcolo dell'attività enzimatica vengono preparate delle precolture di lievito inoculando le singole colonie in 3 mL di terreno YPD all'interno di provette da centrifuga sterilizzate. Il terreno sterile utilizzato è composto da 0,67% (p/v) di lievito azotato (YNB) con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% di glucosio (p/v) e 100 mg L<sup>-1</sup> di acido p-cumarico (precursore) disciolto in acqua bidistillata. Segue un breve periodo di incubazione per 24h a 25° C. Al termine dell'incubazione il terreno di crescita inoculato viene collocato in piastre "microtiter". Vengono condotte per ogni ceppo quattro repliche di incubazione in piastra della durata di 10 giorni. L'attività dell'enzima HCDC viene espressa in percentuale come rapporto tra la quantità di acido p-cumarico al termine del periodo di incubazione e la quantità presente nel campione di controllo. Un maggior consumo di acido p-cumarico da parte dei lieviti corrisponde ad un'attività maggiore dell'enzima. Il range di attività enzimatica calcolato su tutti i ceppi varia dallo 0 al 91,1%. Il 73,7% dei ceppi totali presenta un consumo di acido p-cumarico superiore al 10%, condizione minima necessaria

per considerarli capaci di esprimere un'attività enzimatica quantomeno rilevante.

Genus	Species	N°strains tested	HCDC activity [%] (average) <sup>a</sup>
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. anomalus</i>	1	91.1
<i>Torulaspota</i>	<i>T. delbrueckii</i>	7	0.8–29.9 (12.1)
<i>Starmerella</i>	<i>S. bacillaris</i>	3	7.2–16.0 (12.1)
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. servazii</i>	1	0.7
	<i>S. paradoxus</i>	11	40.6–66.6 (49.8)
	<i>S. kudriavzevii</i>	6	2.6–9.1 (6.8)
	<i>S. cerevisiae</i>	18	5.1–66.0 (33.0)
	<i>S. bayanus</i>	2	27.0–30.9 (28.9)
<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i> sp.	1	8.4
	<i>P. membranifaciens</i>	2	10.0–20.6 (15.3)
	<i>P. manshurica</i>	4	0–66.9 (26.0)
	<i>P. kudriavzevii</i>	2	0–19.4 (9.7)
	<i>P. kluyveri</i>	3	1.0–18.1 (10.3)
	<i>P. guilliermondii</i>	2	88.5–88.7 (88.6)
	<i>P. anomala</i>	1	9.9
<i>Metschnikowia</i>	<i>M. pulcherrima</i>	5	12.9–23.9 (18.7)
	<i>M. fructicola</i>	1	1.7
	<i>M. reukaufii</i>	1	86
<i>Lachancea</i>	<i>L. thermotolerans</i>	4	0–16.2 (9.8)
<i>Kregervanrija</i>	<i>K. fluxuum</i>	1	29.1
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. dobzhanskii</i>	1	0
<i>Kodamaea</i>	<i>K. ohmeri</i>	1	21.5
<i>Issatchenkia</i>	<i>I. terricola</i>	1	11.8–22.6 (17.2)
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. uvarum</i>	9	0–18.6 (10.8)
	<i>H. osmophila</i>	1	3.1
<i>Debaromyces</i>	<i>D. hansenii</i>	3	16.8–41.3 (27.3)
<i>Candida</i>	<i>C. sake</i>	1	1.6
	<i>C. rugosa</i>	1	18.2
	<i>C. diversa</i>	1	17.2

**Figura 3.1.7: ceppi di lievito utilizzati nello studio e attività dell'enzima HCDC corrispondente. (Jelena Topić Božič et al. 2020)**

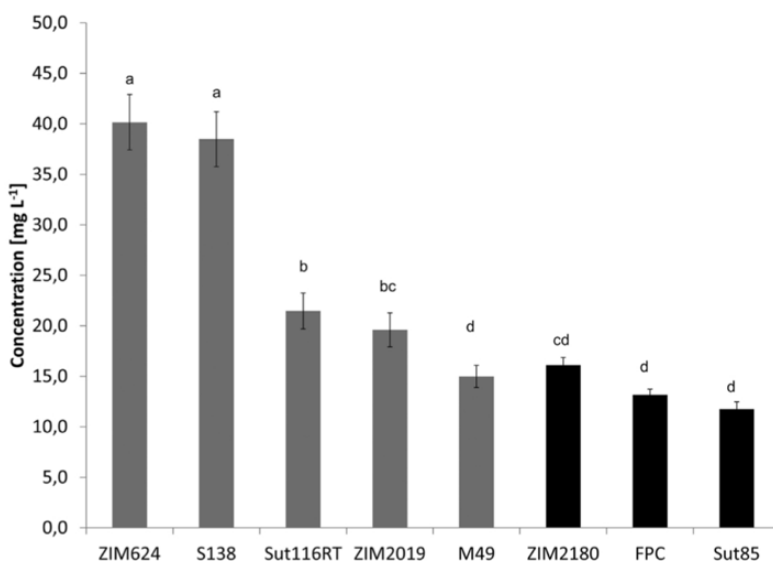
Con percentuali dell'enzima superiori al 40%, il ceppo viene considerato altamente performante nella produzione di vinilfenoli. Si nota poi che tra i diciotto ceppi testati di *Saccharomyces cerevisiae* che risultano tra più utilizzati per la produzione di vino, l'attività enzimatica varia dal 5,1 al 66,1% con soltanto sette ceppi che esprimono percentuali dell'enzima superiori al 40%. Una volta determinata l'attività dell'enzima, viene calcolata la concentrazione di vinilfenoli prodotta da ventidue ceppi scelti tra i più performanti in termini di attività enzimatica (**Fig. 3.1.8**). La più alta concentrazione di vinilfenoli, corrispondente a più di 50 mg L<sup>-1</sup>, è stata prodotta da ceppi di lievito non convenzionali, alcuni appartenenti al gruppo dei non *Saccharomyces*, come *Pichia guilliermondii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomyces paradoxus*. Per la seconda fase dello studio vengono selezionati solo otto ceppi di lievito tra *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* che presentano attività dell'enzima HCDC superiore al 40% con lo scopo di valutare la concentrazione di vinilfenol-piranoantocianine prodotte al termine delle prove di micro-fermentazione. I ceppi selezionati sono: S138 (*W. anomalus*), Sut116RT (*Debaromyces hansenii*), ZIM624 (*P. guilliermondii*), M49 (*Pichia manshurica*), ZIM 2019 (*Metschnikowia reufakii*), Sut85 (*S. paradoxus*), ZIM 2180 e FPC (*S. cerevisiae*).



**Figura 3.1.8: concentrazione media di acido p-cumarico (grigio scuro) e di vinilfenoli (grigio chiaro) dopo 10 giorni di incubazione. *S. cerevisiae* (FPC, ZIM2180, ZIM3253, Sm58RT, M106); *S. paradoxus* (F29, M101RT, Ma106, Gu95, Sut85, Sut86, Sm10, Ma108, F67, F60, Sut99); *P. manshurica* (M49); *M. reukafii* (ZIM2019); *P. guilliermondii* (Ca81, ZIM624); *W. anomalus*(S138) *D. hansenii* (Sut116RT). (Jelena Topić Božič et al. 2020)**

Per ognuno dei ceppi scelti sono previste tre differenti prove di micro-fermentazione condotte in piastre “*microtiter*” utilizzando mosto sintetico addizionato con estratto di bucce della varietà *Pinot Nero* e acido p-cumarico. Le prove si differenziano in relazione alla modalità di inoculo utilizzata. Nella prima serie di prove si procede avviando la fermentazione utilizzando un inoculo in mono-coltura. Nella seconda e terza prova invece le fermentazioni vengono avviate utilizzando colture miste tra ceppi *Saccharomyces* e *non-Saccharomyces* procedendo sia col metodo dell’inoculo sequenziale sia utilizzando il metodo del co-inoculo. In tutte le prove di inoculo sequenziale, i ceppi *Saccharomyces* vengono inoculati al terzo giorno di fermentazione precedentemente condotta fino a quel momento dal solo ceppo *non-Saccharomyces*. Al termine della prime serie di prove di fermentazione avviate in mono-coltura, tutti i lieviti *non-Saccharomyces* ad eccezione del ceppo M49 (*P. manshurica*), producono concentrazioni di vinilfenol-piranoantocianine comparabili o superiori ai ceppi *Saccharomyces*. Nelle prove svolte utilizzando i ceppi ZIM624 (*P. guilliermondii*) ed S138 (*W. anomalus*) la concentrazione di vinilfenol-piranoantocianine corrisponde a 40,2 mg L<sup>-1</sup> e 38,5 mg L<sup>-1</sup> rispettivamente.

Questi valori rappresentano circa il doppio della concentrazione media prodotta dai restanti ceppi (**Fig. 3.1.9**)



**Figura 3.1.9: concentrazione media di vinilfenoli-piranoantocianine prodotte dopo 10 giorni di fermentazione avviata con inoculo in mono-coltura. (Jelena Topić Božič et al. 2020)**

Tra le vinilfenol-piranoantocianine prodotte, la malvidina-3-O-glucoside-4-vinilfenolo (mvd-3-glc-4-VP) risulta essere quella più presente. Pur producendo concentrazioni maggior di vinilfenol-piranoantocianine, i ceppi *non-Saccharomyces* risultano comunque inefficaci in mono-coltura nel portare a termine la fermentazione rispetto ai *Saccharomyces*, a causa delle scarse capacità di metabolizzare alte concentrazioni di zuccheri e della scarsa tolleranza a SO<sub>2</sub> ed etanolo. L'uso combinato di *Saccharomyces* e *non-Saccharomyces* risulta l'opzione migliore per promuovere la formazione di pigmenti colorati stabili ma soprattutto per ultimare la fermentazione nel modo corretto limitando la produzione di acido acetico, acetoino, etil acetato. Lo studio procede quindi con la seconda e la terza serie di prove di fermentazione atte a valutare quale dei due metodi di inoculo in coltura mista risulta più efficace per promuovere la formazione di pigmenti. Per gli otto ceppi precedentemente selezionati vengono svolte 15 prove con inoculo sequenziale e 15 prove di co-inoculo. Tra le 15 prove di co-inoculo, il 46,7% di queste presenta una concentrazione di vinilfenol-piranoantocianine superiore ai 14 mg L<sup>-1</sup>, mentre tra le 15 prove di inoculo sequenziale effettuate, nell'87,7% di queste è presente una concentrazione di vinilfenoli-piranoantocianine superiore ai 20 mg L<sup>-1</sup> (**Fig. 3.1.10**). Un inoculo sequenziale sembrerebbe quindi la scelta più adatta per promuovere nelle prime fasi fermentative elevate

concentrazioni di pigmenti utilizzando ceppi non convenzionali e conseguentemente ultimare il processo fermentativo mediante l'utilizzo di ceppi di lievito performanti e resistenti.

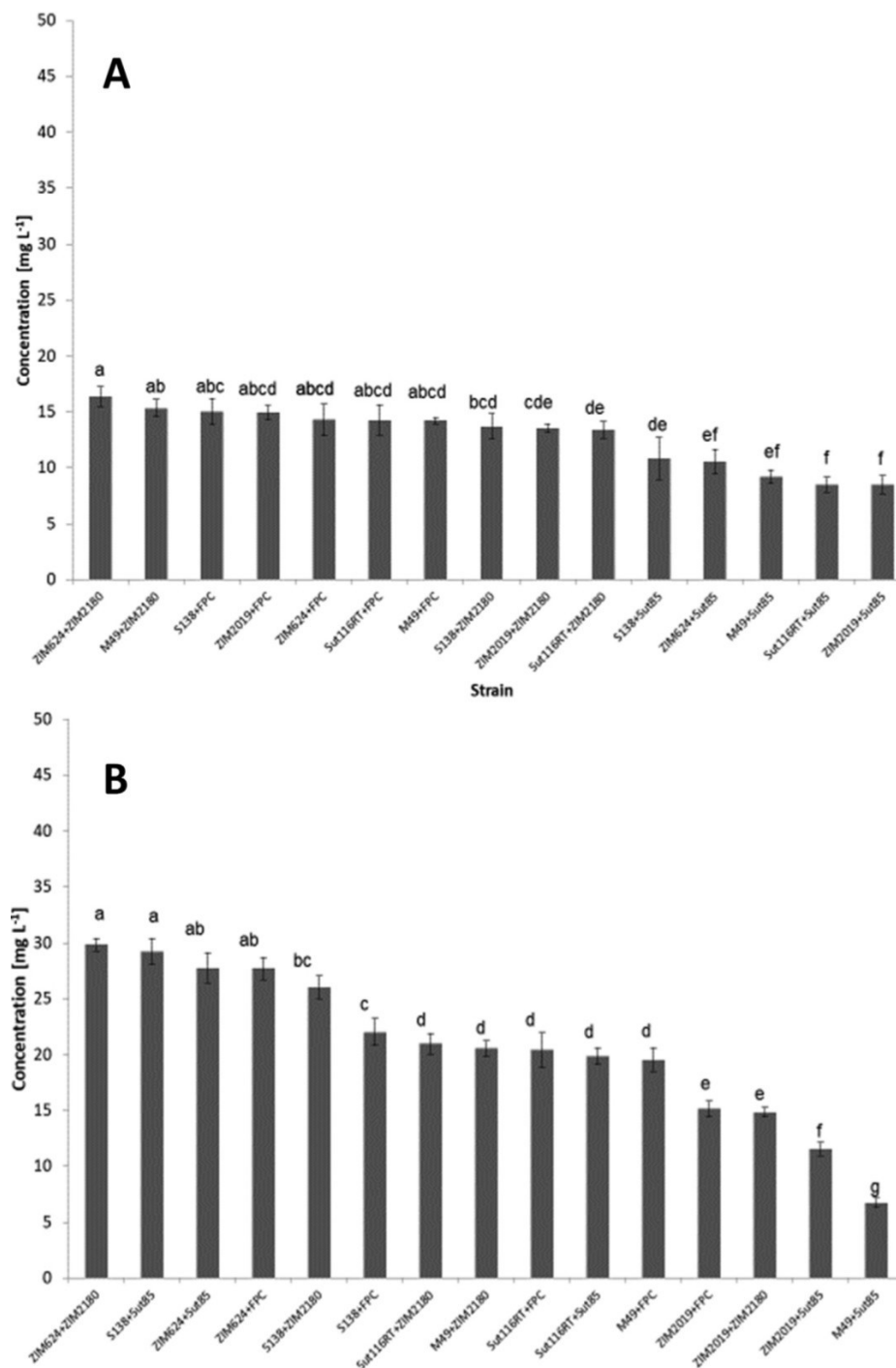


Figura 3.1.10: concentrazione media di vinilfenoli-piranoantocianine prodotte dopo 10 giorni di fermentazione avviata con co-inoculo (A) ed inoculo sequenziale (B). (Jelena Topić Božič et al. 2020)



### 3.2 LA CONFORMAZIONE DELLA PARETE CELLULARE DEI LIEVITI

La parete dei lieviti è un rivestimento rigido ma dotato anche di una certa elasticità di natura polisaccaridica che rappresenta dal 15% al 25% del peso secco della cellula. La parete non solo esplica una funzione di protezione nei confronti della cellula ma è da considerarsi come un organo dinamico multifunzionale evolvendo in funzioni e composizione nel corso della vita della cellula stessa. Oltre al ruolo di protezione, la parete permette alle cellule di mantenere la propria forma ed è sede sia di specifiche molecole che prendono parte a interazioni cellulari quali l'unione sessuale, la flocculazione e il fattore killer, sia di numerosi enzimi. La composizione della parete che risulta ad oggi tra quelle più ampiamente descritte è quella di *Saccharomyces cerevisiae*, formata da due componenti principali: i  $\beta$ -glucani e le mannoproteine. È presente anche chitina in minor quantità. I glucani rappresentano circa il 60% del peso secco della parete di *S. cerevisiae* suddivisi in tre categorie:

- 1)  $\beta$ -glucano 1-3 fibroso: insolubile in acqua, alcoli e acido acetico. Si presenta come lunghe catene di glucani legati linearmente tra loro attraverso legami  $\beta$  1-3 debolmente ramificate con legami  $\beta$  1-6. Si trova sempre associato alla chitina ed è responsabile della forma e della rigidità della parete;
- 2)  $\beta$ -glucano 1-3 amorfo: insolubile in acqua, solubile in alcoli. Si presenta poco ramificato come il precedente oltre che a poche ramificazioni in cui sono presenti legami  $\beta$  1-6 glucosidici. Ad esso si attribuisce l'elasticità della parete oltre che a fungere come ancoraggio per le mannoproteine;
- 3)  $\beta$ -glucano 1-6 ramificato: si presenta altamente ramificato con legami  $\beta$  1-3 glucosidici e funge da unione tra i due strati di glucano precedenti.

Le mannoproteine costituiscono dal 25% al 50% del peso secco della parete formate generalmente dal 90% di mannosio e dal 10% di peptidi. La struttura molecolare delle mannoproteine (legami idrogeno, ponti disolfuro) determina sia la porosità della parete alle macromolecole, sia la permeabilità della stessa alla micromolecole. La chitina è un polimero lineare di residui dell'N-acetil-glucosammina legati tra loro da legami  $\beta$  1-4. Costituisce dall'1% al 2% del peso secco della parete. Come è già stato accennato la parete è sede di diversi enzimi quali ad esempio invertasi ma anche endo- ed eso-  $\beta$  glucanasi del tipo 1-3 ed 1-6 implicati nelle modificazioni della parete durante crescita e gemmazione. Dall'esterno si presenta come un primo strato formato da mannoproteine associate al  $\beta$  glucano amorfo che permette alla parete una certa elasticità. Questo ricopre uno strato interno di  $\beta$  glucano fibroso associato a piccole quantità di chitina che dona rigidità alla parete. Il tutto viene

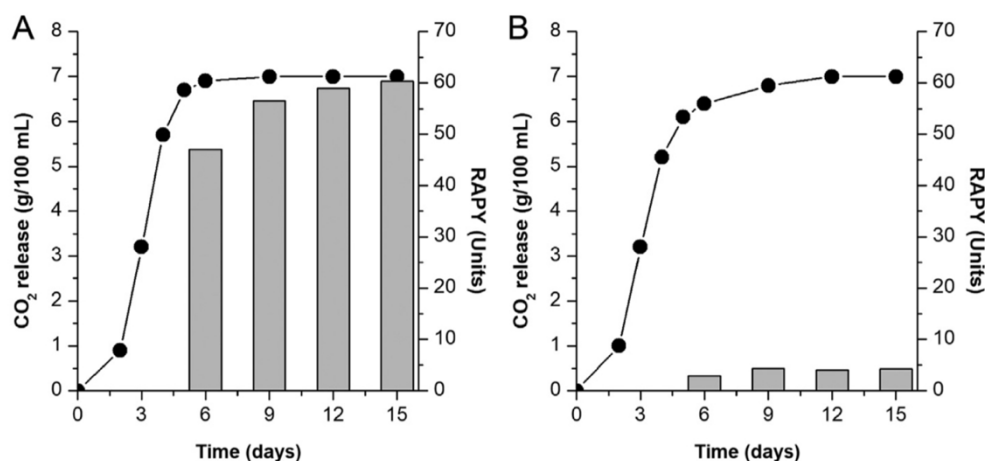
tenuto insieme dal  $\beta$  glucano ramificato. La composizione della parete risulta comunque fortemente influenzata dalle condizioni nutritive e dall'età delle cellule. Ad esempio la proporzione tra i tipi di glucano varia in relazione al tenore in zuccheri iniziale del mezzo. In relazione all'età cellulare, le cellule più vecchie si presentano con pareti ricche in glucano e chitina e povere in mannoproteine comportando un aumento della resistenza nei confronti di fenomeni fisici ed enzimatici rispetto alle pareti di cellule giovani (Ribereau-Gayon, 2017).

### **3.3 CASO STUDIO: GLI ANTOCIANI ADSORBITI DA SACCHAROMYCES CEREVISIAE DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA**

Sergio Echeverrigaray, Fernando Joel Scariot, Morgana Menegotto, Ana Paula Longaray Delamare 2020

Lo studio condotto da Sergio Echeverrigaray e collaboratori del 2020 ha come obiettivo quello di valutare le interazioni che avvengono tra i lieviti che conducono una fermentazione in rosso, e gli antociani presenti in soluzione. In particolare, approfondisce i fenomeni di adsorbimento degli antociani da parte della parete dei lieviti definendone le dinamiche e possibili cause, con lo scopo di valutare l'impatto sulla colorazione che può avere la scelta del ceppo di lievito. Vengono effettuate una serie di prove di fermentazione utilizzando diversi ceppi di *S. cerevisiae* considerati come ad alto, medio, e basso adsorbimento di antocianine. I parametri utilizzati per la valutazione del fenomeno sono due: l'RYPA (relative yeast pigment absorption), espresso come valore adimensionale da 0 a 100 attribuito ai rispettivi ceppi che quantifica la capacità di adsorbimento di pigmenti complessiva dei ceppi, e metodi di citometria a flusso (flow cytometry, FC) combinati a rilevamenti al microscopio a fluorescenza. Questi ultimi permettono, inducendo fenomeni di fluorescenza dei pigmenti, di quantificare gli antociani adsorbiti dalle singole cellule. I dati raccolti dalle analisi di citometria a flusso riportano sia la percentuale di cellule (popolazione) che esprime valori al di sopra della soglia minima di fluorescenza dei pigmenti, sia la fluorescenza emessa dalla popolazione quantificata in termini di unità di fluorescenza relativa (*relative fluorescence units, RFU*). I parametri precedentemente descritti vengono infine associati sia ad analisi dell'andamento fermentativo sia a parametri utilizzati solitamente per la valutazione della curva di crescita quali vitalità cellulare, integrità di parete/membrana. I ceppi utilizzati nel lavoro sono cinque: ceppo "Red Fruit (alto adsorbimento), ceppi "Cross Evolution" — "Maurivin" — "Y904" (medio adsorbimento), ceppo "Rouge" (basso adsorbimento) con i seguenti valori di RYPA calcolati da lavori condotti precedentemente: >75, da 30 a 55, <15 rispettivamente. Per l'avvio delle prove di micro-fermentazione la popolazione iniziale dei

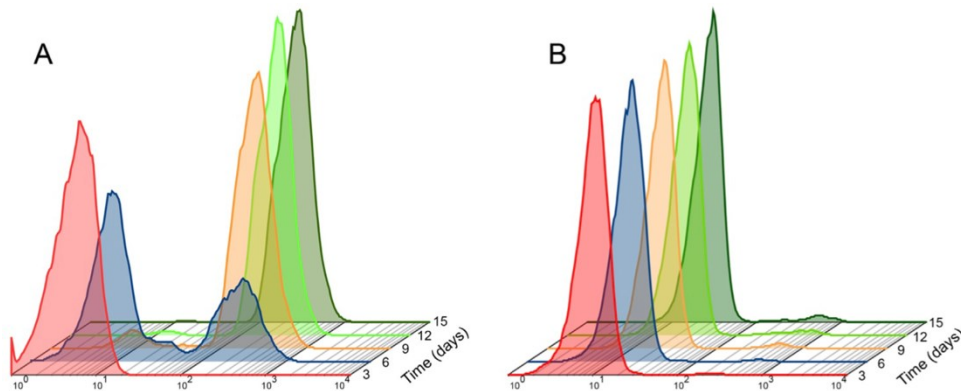
singoli ceppi, corrispondente a  $1-2 \times 10^7$  cellule/mL, viene inoculata in mono-coltura. Questa è ottenuta lasciando moltiplicare i lieviti per 48h in un substrato di crescita in YEPD, mantenuto ad una temperatura costante di 25°C. Le fermentazioni vengono condotte in contenitori da 500 mL, utilizzando mosto di *Merlot/Tannat* (rapporto 1:1) precedentemente termovinificato con lo scopo di utilizzare un mosto di partenza altamente colorato. Durante la prima fase dello studio vengono comparati i dati ottenuti dalle prove di fermentazione dei ceppi “Red Fruit” e “Rouge” che esprimono il massimo e il minimo valore di RYPA rispettivamente. L’andamento fermentativo viene monitorato sulla base della quantità di CO<sub>2</sub> prodotta mentre i dati relativi all’adsorbimento di pigmenti vengono ottenuti da campioni raccolti ad ogni intervallo corrispondente a tre giorni (Fig. 3.3.1). Viene monitorata anche la crescita microbica, mediante la conta delle cellule vitali dopo colorazione con blu di metilene.



**Figura 3.3.1: andamento fermentativo (linee) espresso come quantità di CO<sub>2</sub> rilasciata e adsorbimento di pigmenti (barre) espresso come valori di RYPA dei ceppi “Red Fruit” (A) e “Rouge” (B). (Sergio Echeverrigaray et al. 2020)**

Il ceppo “Red Fruit” presenta un veloce andamento fermentativo, raggiungendo la fase stazionaria al giorno 6 e producendo fino a quel momento circa 7 g CO<sub>2</sub>/100 mL. Il ceppo “Rouge” invece raggiunge la fase stazionaria soltanto tra il giorno 9 e il giorno 12. Comunque, alla fine della prova, fissata per entrambi i ceppi al giorno 15, si riscontrano concentrazioni equiparabili di etanolo (9,2% v/v) e di zuccheri residui (1,3 mg/L). Le differenze riscontrate tra i ceppi sorgono in termini di pigmenti adsorbiti. Considerando i valori di RYPA, il ceppo “Red Fruit” inizia l’adsorbimento di pigmenti alla fine della fase stazionaria (giorno 6) con valori di  $45 \pm 2$  unità, presentando un picco massimo di adsorbimento dopo il giorno 12 con valori di  $59,3 \pm 3,9$  unità. Il ceppo “Rouge” presenta invece un ridotto adsorbimento durante tutto il processo fermentativo con valori finali di

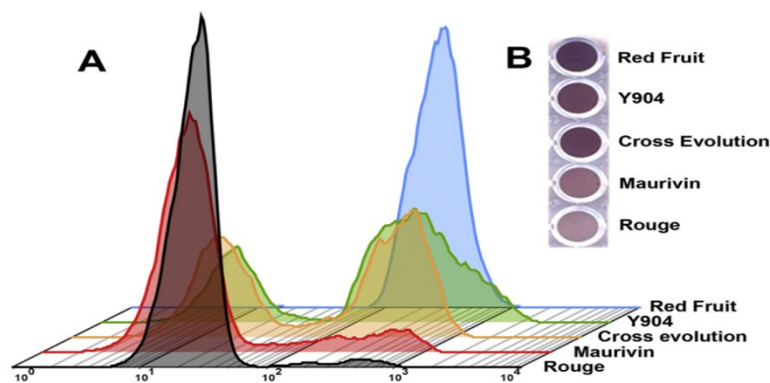
RYPAs di  $5,1 \pm 2,2$  unità. Dalle analisi condotte coi metodi di citometria di flusso combinati all'utilizzo del microscopio a fluorescenza, le cellule del ceppo "Red Fruit" all'inizio della fase fermentativa (giorno 3) si presentano per il 90% associate a quantità non rilevanti di antociani, con valori di  $15,3 \pm 0,8$  RFU (*relative fluorescence units*). Dopo il giorno 6, il 65,1% delle cellule presentava valori di fluorescenza simili a quelli del giorno 3 mentre la restante parte, corrispondente al 34,9%, presentava valori di  $336,5 \pm 26,7$  RFU. Nei campioni raccolti dal giorno 9 al giorno 15, la percentuale di cellule con valori di RFU elevati è aumentata ulteriormente fino al 99,5%, rappresentando quindi la quasi totalità delle cellule presenti. Di contro nelle analisi svolte sul ceppo "Rouge", i fenomeni di fluorescenza ed i relativi valori in RFU non subiscono sostanziali incrementi durante tutto il corso della fermentazione. Soltanto dopo il giorno 15 si assiste ad un aumento seppur modesto di cellule altamente fluorescenti, corrispondenti al 4,2% del totale con valori di RFU di  $387 \pm 42,8$  (**Fig. 3.3.2**).



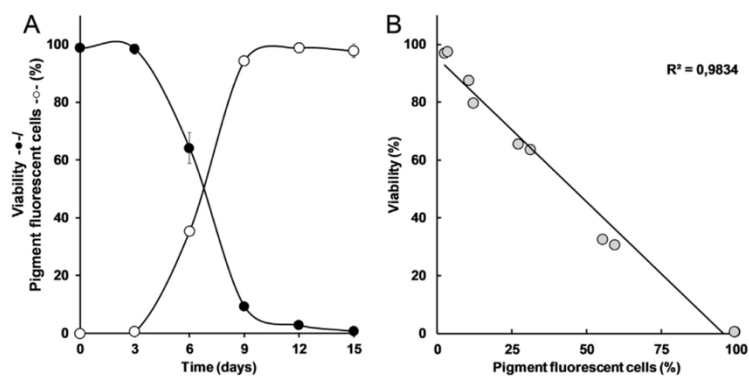
**Figura 3.3.2: fluorescenza (adsorbimento di antociani) emessa dalle cellule di lievito durante le fermentazioni condotte utilizzando i ceppi "Red Fruit" (A) e "Rouge" (B). (Sergio Echeverrigaray et al. 2020)**

Una volta valutate singolarmente le capacità dei ceppi "Red Fruit" e "Rouge" con massimo e minimo adsorbimento di pigmenti, lo studio replica nuovamente le prove di micro vinificazione procedendo alla valutazione sia nuovamente dei ceppi ad alto e basso adsorbimento, sia dei ceppi considerati a medio adsorbimento. I ceppi "Red Fruit" e "Rouge" confermano i risultati ottenuti nelle prove precedenti. Tra i ceppi a medio adsorbimento, il "Maurivin B" presenta i valori di RYPAs più bassi corrispondenti a 31,7 unità mentre i ceppi "Cross Evolution" e "Y904" presentano valori di RYPAs di 49,7 unità e 55,4 unità rispettivamente. Le analisi di citometria a flusso svolte al termine del processo fermentativo evidenziano anche in questo caso la presenza di due popolazioni differenti, rispettivamente ad alto e basso adsorbimento di pigmenti (elevata o scarsa fluorescenza). Per il ceppo

“Maurivin B” l’88,2 % delle cellule presentava bassa fluorescenza e l’11,8 % alti livelli di fluorescenza, per il ceppo “Cross Evolution” i valori sono di 43,2% a bassa fluorescenza e 56,8% ad alta fluorescenza, per il ceppo “Y904” la popolazione a basso adsorbimento corrispondeva al 28% e la popolazione ad alto adsorbimento al 72% (Fig. 3.3.3). Oltre alla valutazione di RYPA ed analisi di citometria, anche in questo caso è stata monitorata la vitalità cellulare attraverso la colorazione con blu di metilene. I dati raccolti una volta elaborati riportano come ci sia una forte correlazione negativa ( $R = -0,998$ ) tra la vitalità cellulare e la popolazione di cellule ad alta fluorescenza, entrambi espressi in percentuale (Fig. 3.3.4).



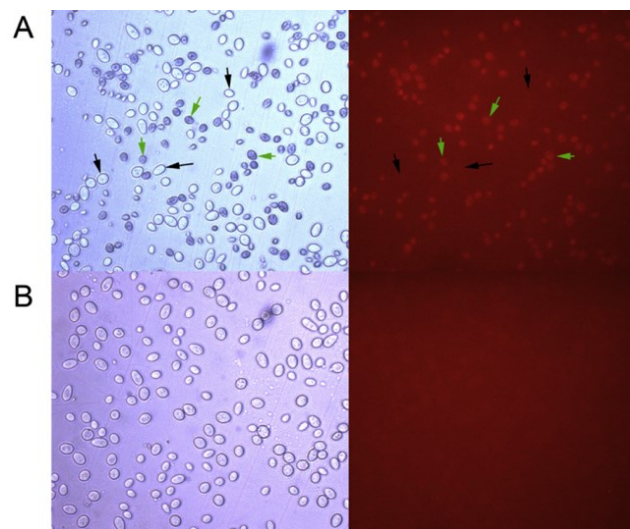
**Figura 3.3.3: pigmenti adsorbiti (A) e colore riscontrato (B) dalle rispettive cellule dei cinque ceppi oggetto di studio al termine del processo fermentativo. (Sergio Echeverrigaray et al. 2020)**



**Figura 3.3.4: relazione tra la percentuale di pigmenti adsorbiti (cellule ad elevata fluorescenza) e la vitalità cellulare percentuale relativa al ceppo “Red Fruit” (A) e globale considerando tutti i ceppi testati (correlazione)(B) alla fine della fermentazione alcolica. (Sergio Echeverrigaray et al. 2020)**

Un ulteriore test per confermare la correlazione tra l’adsorbimento di pigmenti e la vitalità cellulare/integrità di parete e membrana, è stato svolto utilizzando soltanto i ceppi “Red Fruit” e “Rouge”. Nella prova le cellule dei due ceppi, precedentemente prelevate al giorno

7 di fermentazione, vengono sottoposte ad un trattamento col colorante Trypan blu e valutate al microscopio a fluorescenza. (Fig. 3.3.5). Nel campione in cui è presente il ceppo “Red Fruit”, sono presenti sia cellule fluorescenti, corrispondenti a quelle che reagiscono positivamente al trattamento con Trypan blu, sia cellule non fluorescenti. Il ceppo “Rouge” invece non presenta cellule fluorescenti/colorate, confermando una minore morte cellulare come osservato nelle precedenti analisi di citometria a flusso. La capacità di adsorbimento dei pigmenti da parte dei lieviti, quindi, sembra direttamente correlata alle modificazioni dell’integrità della parete/membrana cellulare. Nella fase finale dello studio si è voluto confermare ulteriormente quanto precedentemente riscontrato, sottoponendo i ceppi “Red Fruit”, “Y904” e “Rouge” a prove di fermentazione questa volta condotte in presenza di condizioni critiche che normalmente inducono modificazioni conformazionali delle pareti/membrane. Inizialmente, per ogni ceppo, viene condotta una fermentazione in bianco a partire da uve della varietà *Chardonnay*, evitando perciò il contatto con le antocianine, ed i campioni di cellule vengono prelevati alla fine della fase stazionaria. In questa fase le cellule esprimono valori di vitalità di  $97,9 \pm 0,5\%$ .



**Figura 3.3.5: cellule dei ceppi “Red Fruit” (A) e “Rouge” (B) al giorno 7 di fermentazione. Ciascun vetrino è stato sottoposto a due colorazioni successive: Trypan blue (sinistra) e fluorescenza (destra). Frecche verdi: cellule fluorescenti/colorate con Trypan blu; frecche nere: cellule non fluorescenti/non colorate con Trypan blu. (Sergio Echeverrigaray et al. 2020)**

A questo punto, per ogni ceppo, si procede suddividendo in quattro aliquote la quantità di cellule prelevata con lo scopo di sottoporli a quattro diversi trattamenti: un campione di controllo, un campione sottoposto a stress termico, un campione sottoposto ad elevate

concentrazioni di etanolo ed un campione addizionato con sodio lauril sarcosinato, in grado di danneggiare la membrana plasmatica. Inoltre, per valutare i fenomeni di adsorbimento di pigmenti, un'ulteriore aliquota di ogni campione viene lasciata in incubazione in una soluzione a pH 3.6 con 10% di etanolo e 120 mg/L di antocianine estratte da bucce (**Fig. 3.3.6**). Dai risultati si nota come le popolazioni di lievito con elevata vitalità cellulare e membrane integre, adsorbono concentrazioni di pigmenti nettamente inferiori rispetto alle cellule rese permeabili da stress esterni o a seguito di morte cellulare.

Parameter	Treatment	Red fruit	Strains	
			Rouge	Y904
Viability (%)	Control cells	97.5 ± 1.3 <sup>Aa</sup>	98.4 ± 2.2 <sup>Aa</sup>	97.7 ± 1.9 <sup>Aa</sup>
	Heat treated cells	1.5 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	0.8 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	1.1 ± 1.3 <sup>Ba</sup>
	Ethanol treated cells	1.6 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	2.2 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	1.8 ± 1.3 <sup>Ba</sup>
	LSS treated cells	1.8 ± 0.8 <sup>Ba</sup>	1.3 ± 1.4 <sup>Ba</sup>	2.2 ± 1.8 <sup>Ba</sup>
RYPA (units)	Control cells	0.3 ± 0.6 <sup>Ba</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>Ba</sup>	0.3 ± 0.3 <sup>Ba</sup>
	Heat treated cells	56.4 ± 3.3 <sup>Aa</sup>	57.6 ± 4.1 <sup>Aa</sup>	55.4 ± 2.8 <sup>Aa</sup>
	Ethanol treated cells	54.5 ± 2.3 <sup>Aa</sup>	53.6 ± 1.6 <sup>Aa</sup>	54.6 ± 2.0 <sup>Aa</sup>
	LSS treated cells	48.3 ± 8.0 <sup>Aa</sup>	56.4 ± 3.6 <sup>Aa</sup>	53.2 ± 4.3 <sup>Aa</sup>
Adsorbed anthocyanins (mg/g)	Control cells	0.14 ± 0.02 <sup>Ba</sup>	0.18 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>Ba</sup>
	Heat treated cells	5.56 ± 0.23 <sup>Aa</sup>	5.67 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	5.72 ± 0.32 <sup>Aa</sup>
	Ethanol treated cells	5.43 ± 0.26 <sup>Aa</sup>	5.17 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	5.26 ± 0.41 <sup>Aa</sup>
	LSS treated cells	5.83 ± 0.34 <sup>Aa</sup>	6.03 ± 1.6 <sup>Aa</sup>	5.36 ± 0.82 <sup>Aa</sup>

**Figura 3.3.6: vitalità cellulare, RYPA e pigmenti adsorbiti nelle quattro prove svolte. (Sergio Echeverrigaray et al. 2020)**

Le differenze tra i ceppi in termini di adsorbimento vengono quindi attribuite alla presenza di popolazioni con livelli di vitalità differente riscontrate durante la fase fermentativa. In particolare, il maggior effetto di adsorbimento si rileva quando sono presenti popolazioni di lievito ad elevate capacità di adsorbimento ovvero composte da cellule morte/rese permeabili, frazione che aumenta proporzionalmente all'aumentare di effetti stressanti durante la fermentazione. La capacità di adsorbimento dei ceppi, quindi, risulta strettamente correlata alla loro capacità di resistere ai fattori esterni durante il processo fermentativo, e dipende sia dalle caratteristiche genetiche intrinseco sia dalle condizioni di crescita.

### 3.4: CASO STUDIO: L'ADSORBIMENTO DI PROANTOCIANIDINE E POLIFENOLI DEL VINO DA PARTE DI LIEVITI, LIEVITI INATTIVI E PARETI CELLULARI

J. Mekoue Nguela, N. Sieczkowski, S. Roi, and A. Vernhet 2015

Un ulteriore lavoro che evidenzia l'azione diretta dei lieviti sulle componenti del vino è quello condotto da Julie Mekoue Nguela e collaboratori del 2015. Lo studio valuta i fenomeni di adsorbimento di tannini ad opera sia di lieviti attivi con vitalità cellulare vicina allo zero (yeast biomass, Y), sia di prodotti a base di lievito quali lieviti inattivi (inactivated yeasts, IY), autolisati (inactivated yeast after autolysis, A-IY) e prodotti a base di pareti cellulari (cell walls, CW). Il lievito oggetto di studio è un ceppo commerciale, normalmente utilizzato in cantina, di *Saccharomyces cerevisiae*. Le interazioni tannini-lievito vengono studiate effettuando rilevamenti al microscopio elettronico a scansione (TEM) e mediante studi della cinetica di adsorbimento, determinata in una soluzione di vino modello (12% v/v etanolo, 2 g/L acido tartarico, 25 mg/L SO<sub>2</sub>, pH 3,5). Per lo studio dei fenomeni di adsorbimento, vengono utilizzati sia composti polifenolici purificati, precedentemente estratti da un vino rosso, sia proantocianidine estratte direttamente dalle uve in particolare da semi e da bucce. Queste ultime si differenziano in relazione al grado di polimerizzazione. Troviamo due frazioni estratte da semi: la prima ottenuta da varietà *Carignan* con un grado di polimerizzazione medio di 3 unità (denominata *Seed3*), la seconda ottenuta da varietà *Moscato* con mediamente 12 unità polimerizzate (denominata *Seed12*). La frazione estratta da bucce proviene sempre da uve *Moscato* con grado di polimerizzazione medio di 21 unità (denominata *Skin21*). Lo studio evidenzia come l'adsorbimento dei tannini, oltre che dalle modificazioni conformazionali della struttura dei lieviti stessi, dipenda sia dal differente grado di polimerizzazione sia dalle modificazioni chimiche che avvengono a carico dei composti polifenolici durante la fase fermentativa. Anche se dalle osservazioni al TEM (**Fig. 3.4.1**) nelle cellule di lievito non si notano modifiche sostanziali (pareti danneggiate, rilascio di materiale intracellulare, collasso delle membrane), i processi di disidratazione-reidratazione/autolisi causano cambiamenti nella struttura superficiale delle cellule, alterandone le caratteristiche chimico-fisiche. Per la determinazione della cinetica di adsorbimento, gli esperimenti sono condotti inizialmente utilizzando soltanto lieviti attivi (10<sup>8</sup> cellule/ml) in contatto con polifenoli del vino purificati addizionati a concentrazioni crescenti. I dati vengono monitorati per le successive 64h misurando l'indice di polifenoli totali e i parametri relativi al colore (**Fig. 3.4.2**).



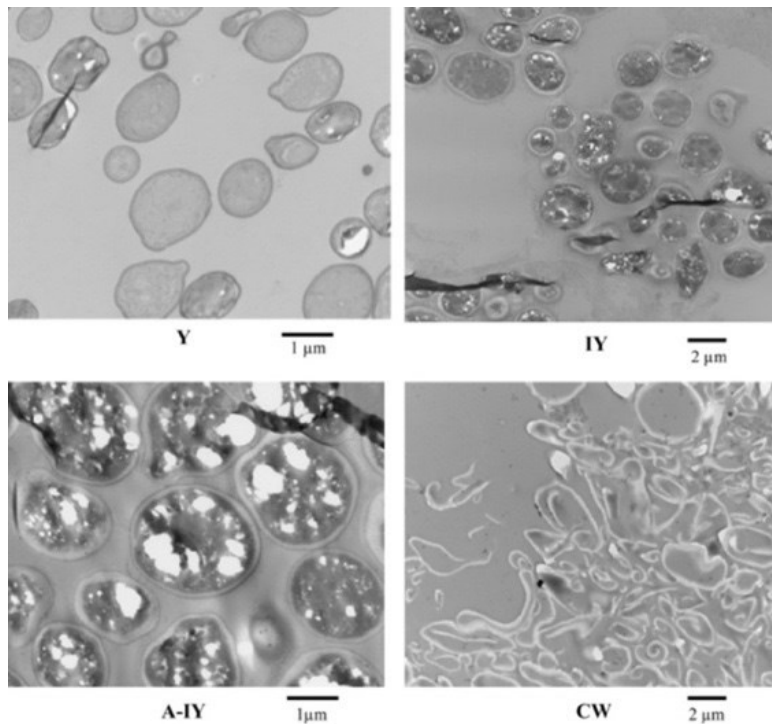


Figura 3.4.1: immagini al TEM di biomassa di lievito (Y), lieviti inattivi (IY), lieviti inattivi autolisati (A-IY), pareti cellulari (CW). (J. Mekoue Nguela et al. 2015)

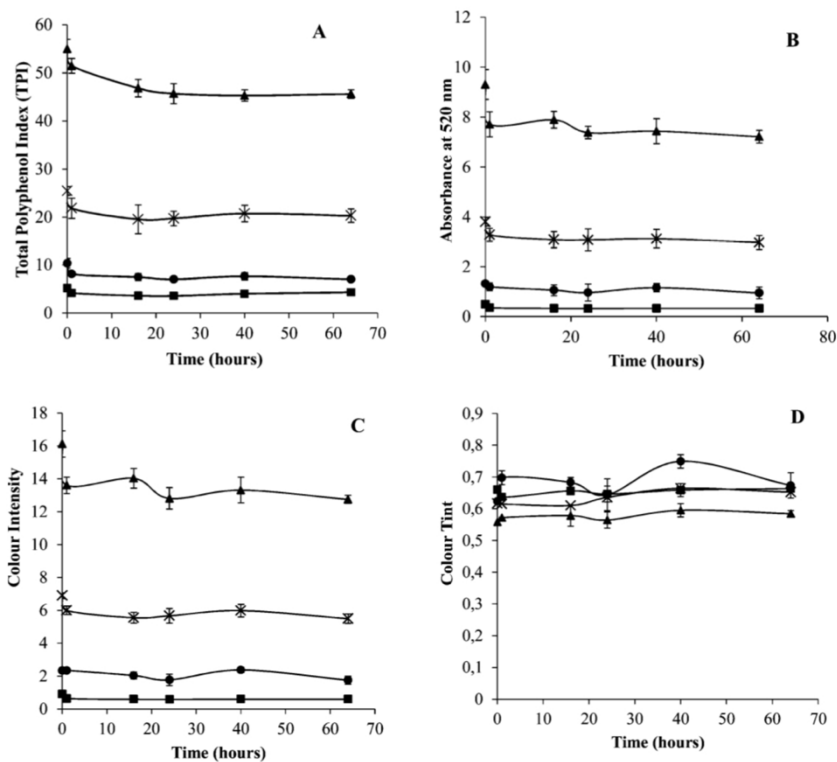
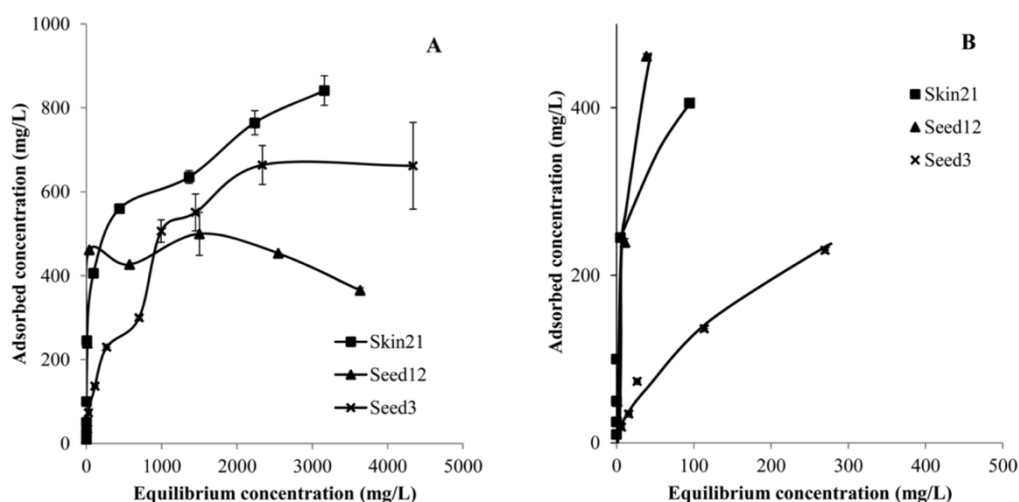


Figura 3.4.2: cinetica di adsorbimento dei polifenoli sulla biomassa di lievito in una soluzione di vino modello. La concentrazione di polifenoli utilizzata è rispettivamente: 5 gL<sup>-1</sup> (triangoli pieni), 2,5 gL<sup>-1</sup> (stelle piene), 1 gL<sup>-1</sup> (cerchi pieni) e 0,5 gL<sup>-1</sup> (quadrati pieni). L'adsorbimento di polifenoli viene monitorato misurando l'indice di polifenoli totali (A), l'assorbanza a 520 nm (B), intensità colorante (C), tinta (D). (J. Mekoue Nguela et al. 2015)

La cinetica di adsorbimento evidenzia, dopo un rapido calo dell'indice di polifenoli totali (Total polyphenolic index, TPI) nella prima ora, un *plateau* di valori per quanto riguarda le prove effettuate con le concentrazioni di 0,5 gL<sup>-1</sup> e 1 gL<sup>-1</sup>. Questo *plateau* indica che in entrambi i casi è stata raggiunta una condizione di equilibrio tra i polifenoli in soluzione e quelli adsorbiti. Per quanto riguarda invece le prove effettuate con concentrazioni di 2,5 e 5 gL<sup>-1</sup>, il *plateau* si osserva dopo 16h e 24h rispettivamente. Per quanto concerne l'intensità colorante, i valori si riducono progressivamente con la riduzione della concentrazione di polifenoli aggiunta. I fenomeni di adsorbimento risultano quindi guidati da un complesso gioco di equilibri tra soluto/solvente, soluto/superficie, superficie/solvente.

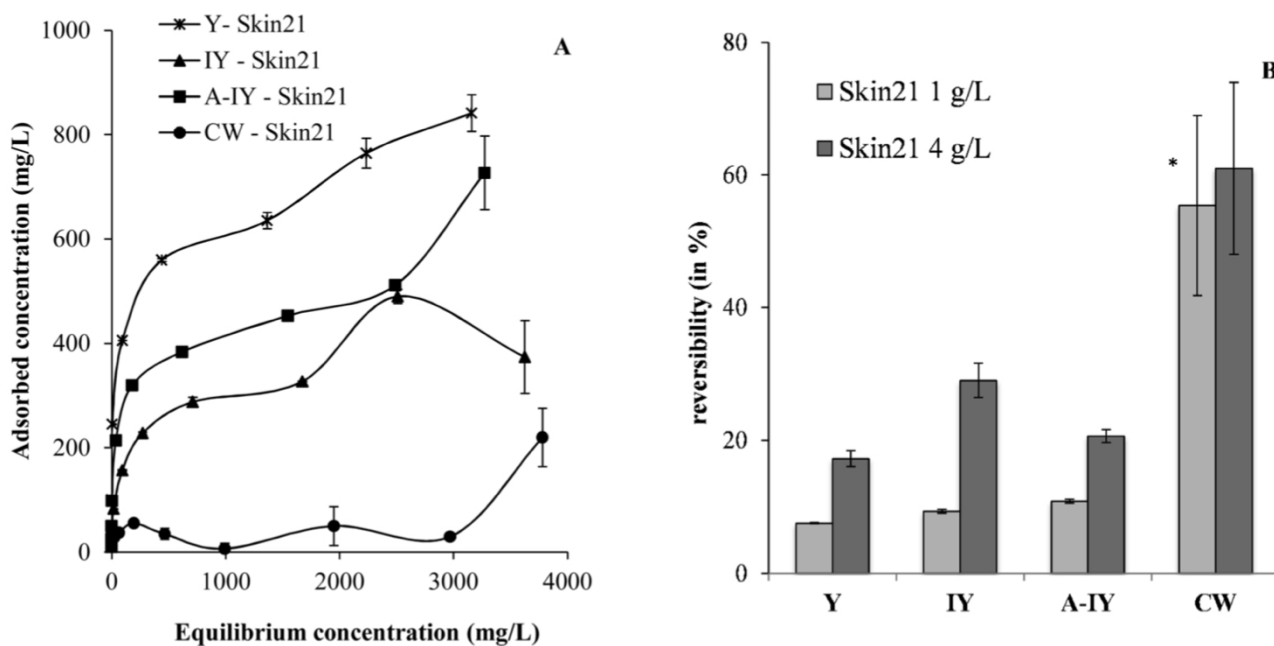
Lo studio prosegue valutando possibili variazioni, in termini di affinità, dei diversi campioni di tannini per la superficie dei lieviti. Si ipotizza che le interazioni lieviti-tannini non dipendano solo dalla quantità di siti di legami presenti sulle pareti dei lieviti e dalla loro accessibilità, ma anche dai possibili riarrangiamenti conformazionali delle molecole polifenoliche in relazione al grado di polimerizzazione. Per valutare le due ipotesi, si è voluto costruire, oltre alla cinetica di adsorbimento, un modello matematico corrispondente alla isoterma di adsorbimento (rapporto tra la concentrazione di tannini adsorbita e la concentrazione di equilibrio determinata sperimentalmente per ogni concentrazione di polifenoli utilizzata) utilizzando in un primo momento sempre la biomassa di lievito (Y) in contatto questa volta con le proantocianidine estratte dall'uva: *Seed3*, *Seed12*, *Skin21* (Fig. 3.4.3).



**Figura 3.4.3: isoterma di adsorbimento della biomassa di lievito (Y) riferita ai campioni di proantocianidine: *Seed3*, *Seed12*, *Skin21* (A); visuale ingrandita del primo tratto della curva A (B). (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

I campioni *Skin21* e *Skin12* esprimono elevata affinità, con un completo adsorbimento di entrambi a basse concentrazioni (nel range che va da 0 g L<sup>-1</sup> a 0,5 g L<sup>-1</sup>) ma con isoterme

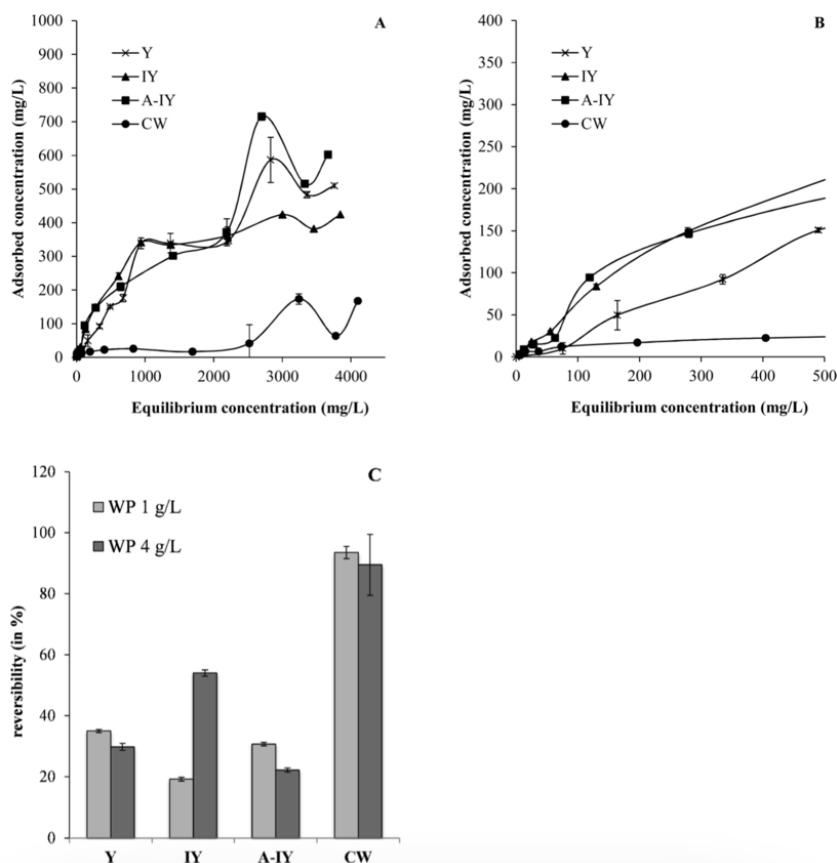
di adsorbimento differenti. Come si vede dalla figura (**Fig. 3.4.3 B**), il campione *Skin21* presenta i valori di adsorbimento iniziale più elevati tra tutti i campioni utilizzati, con un progressivo e continuo aumento della concentrazione adsorbita. Il campione di *Seed12* presenta dei buoni valori di adsorbimento iniziale fino a  $0,5 \text{ g/L}^{-1}$  seguiti da un andamento altalenante della concentrazione adsorbita fino ai valori di  $1,5 \text{ g/L}^{-1}$  dove si registra un picco (**Fig. 3.4.3 A**). A concentrazioni superiori si nota invece una progressiva riduzione della concentrazione adsorbita. L'unico campione in cui si evidenziano valori ridotti di adsorbimento è il *Seed3*, con un sostanziale aumento in termini di adsorbimento soltanto a seguito dell'aggiunta di proantocianidine ad una concentrazione più elevata rispetto ai campioni precedenti. A partire da  $3 \text{ g L}^{-1}$  di proantocianidine aggiunte si registra un *plateau*. La ridotta affinità del campione *Seed3* e i fenomeni di completo adsorbimento a basse concentrazioni dei campioni *Seed12* e al *Skin21*, suggeriscono che nel fenomeno entrano in gioco molteplici legami nell'interazione con le cellule. Nella letteratura scientifica si attribuisce il ruolo chiave nei fenomeni di adsorbimento ai diversi componenti delle pareti, in particolare alle mannoproteine. Inoltre, si discute delle possibili capacità che i polifenoli poco polimerizzati, passino attraverso la parete ed interagiscano coi lipidi di membrana. L'ipotesi è stata proposta per spiegare l'effetto protettivo dei lieviti nei confronti dei polifenoli che ne limita l'ossidazione, in particolare nei vini bianchi. Le prove in vitro hanno dimostrato che è possibile un'interazione tra catechine-piccoli dimeri ed ergosteroli anche se restano ancora solo ipotesi. Le differenze riscontrate in termini di adsorbimento tra i vari campioni nel seguente studio, non sembrano correlate al diverso grado di polimerizzazione né al diverso peso molecolare delle proantocianidine utilizzate. Si prosegue con le prove valutando i fenomeni di adsorbimento utilizzando i prodotti a base di lievito normalmente impiegati in cantina: lieviti inattivi (IY), autolisati (A-IY) e pareti cellulari di lievito (CW) a contatto con la sola frazione di polifenoli *Skin21*. I risultati vengono comparati con i dati della prova svolta precedentemente utilizzando la biomassa di lievito (Y) e *Skin21*. Lo scopo è di definire l'impatto dei diversi trattamenti, necessari per l'ottenimento dei prodotti a base di lievito, sull'adsorbimento di proantocianidine comparando i risultati con quelli ottenuti utilizzando cellule vive (**Fig. 3.4.4**).



**Figura 3.4.4: impatto dei diversi trattamenti sull'adsorbimento di proantocianidine *Skin21*: biomassa di lievito (Y), lieviti inattivi (IY), lieviti inattivi autolisati (A-IY), pareti cellulari purificate (CW) (A); percentuale di reversibilità dell'adsorbimento (B). (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

I risultati evidenziano inaspettatamente notevoli differenze in termini di adsorbimento tra i campioni che contengono cellule intere, anche se inattive o morte, e le sole pareti cellulari. A concentrazioni di *Skin21* sotto i  $3 \text{ g L}^{-1}$  il campione di pareti cellulari presenta capacità di adsorbimento dalle dieci alle venti volte inferiore rispetto agli altri tre campioni, oltre che alla reversibilità di adsorbimento più elevata. Il risultato è sicuramente inatteso in quanto si è sempre attribuito il ruolo principale nell'adsorbimento di polifenoli alle pareti dei lieviti, i dati in questo caso sembrano dimostrare il contrario. Il ridotto adsorbimento da parte delle pareti può essere dovuto a perdita di costituenti e/o alterazioni della struttura tridimensionale che causa fenomeni di inaccessibilità dei polifenoli sui siti di legame. Le isoterme di adsorbimento evidenziano un altro importante aspetto: viene confermato, infatti, come i campioni sottoposti a trattamenti di disidratazione, autolisi, inattivazione presentino tutti adsorbimento ridotto rispetto alla biomassa di lievito, probabilmente a causa di degradazione della struttura della parete, perdita di polarità, porosità ridotta. La composizione, la struttura tridimensionale delle cellule e la loro permeabilità, quindi, sembrano i fattori principali responsabili delle differenze tra i campioni testati. Non si esclude che il fenomeno dell'adsorbimento avvenga in altre forme oltre che sulla superficie esterna della parete. È possibile che l'adsorbimento interessi tutto lo spessore della parete o, come già accennato, che avvengano fenomeni di attraversamento della parete da parte delle

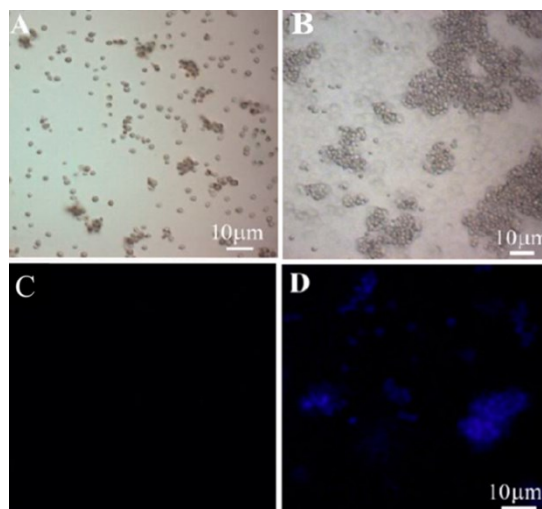
componenti polifenoliche. L'ultima fase dello studio ripete l'esperimento precedente utilizzando gli stessi campioni, questa volta posti a contatto con i polifenoli estratti dal vino rosso (Fig. 3.4.5).



**Figura 3.4.5: impatto dei diversi trattamenti sull'adsorbimento di polifenoli (A); ingrandimento del tratto iniziale della curva A; reversibilità del fenomeno dell'adsorbimento (C). (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

I polifenoli estratti dal vino sembrano esprimere minor affinità delle proantocianidine per tutti i campioni di lievito utilizzati nello studio. Anche in questo caso le pareti cellulari con concentrazioni di polifenoli sotto i  $3 \text{ g L}^{-1}$ , esprimono valori di adsorbimento circa quindici volte inferiori rispetto alle cellule intere vive o inattive/morte a contatto con le medesime concentrazioni. In conclusione, lo studio evidenzia come si conosce ancora poco su questi fenomeni soprattutto per quanto riguarda le strutture della cellula maggiormente coinvolte e le modalità. I dati tendono inoltre a rivedere l'efficacia ed effettivo contributo delle pareti cellulari sulla stabilizzazione del colore dei vini rossi. Per provare a far luce sui risultati ottenuti riguardo l'inefficacia delle pareti rispetto alle cellule intere in termini di adsorbimento, J. Mekoue Nguela e collaboratori continuano lo studio e nello stesso anno pubblicano un nuovo lavoro, riproponendo le stesse condizioni del precedente lavoro, ma effettuando

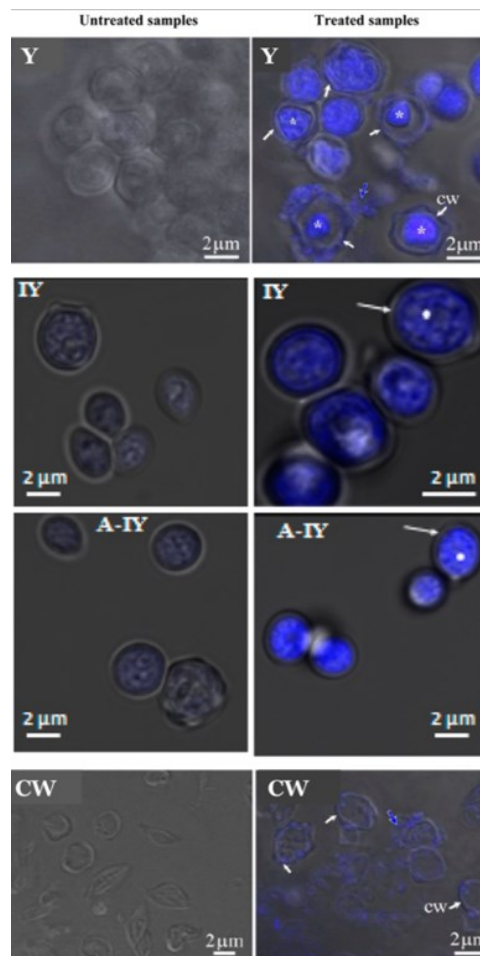
rilevamenti al microscopio elettronico a scansione (TEM), ad epifluorescenza e al microscopio confocale. L'obiettivo è di identificare l'esatta posizione dei polifenoli adsorbiti nella cellula e quali strutture cellulari risultano più implicate nel fenomeno. Dai rilevamenti al microscopio (**Fig. 3.4.6**) la biomassa di lievito (Y), a seguito di trattamento di una porzione con proantocianidine, non mostra differenze strutturali rispetto alla frazione non trattata. In questo caso l'unica differenza riscontrata è la fluorescenza dovuta alla componente polifenolica, che la rende altamente visibile nella struttura cellulare.



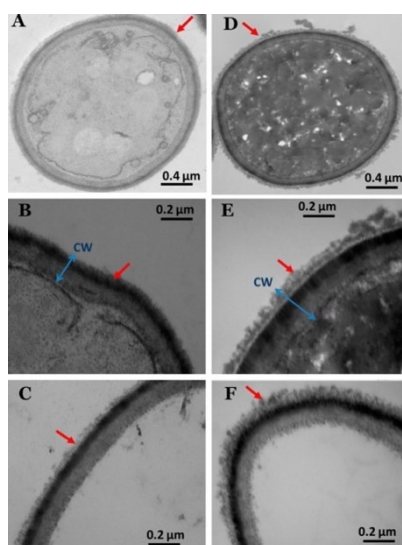
**Figura 3.4.6: immagini di cellule non trattate (A, C) e trattate (B, D) con proantocianidine. Immagini ottenute con microscopio ottico (A-B) e in fluorescenza (C-D). (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

L'utilizzo del microscopio confocale (**Fig.3.4.7**) conferma il risultato. Si può osservare come le cellule non trattate esprimono una luce fluorescenze di colore blu quasi impercettibile mentre, a seguito di trattamento con proantocianidine (*Skin21*), nella cellula si evidenzia elevata fluorescenza. Durante le prove relative alla biomassa di lievito (Y), lieviti inattivi (IY) e autolisati(A-IY) si confermano fenomeni di fluorescenza anche all'interno della cellula. I rilevamenti al microscopio elettronico a scansione (TEM) vengono effettuati sulla biomassa (Y) e sulle pareti cellulari (CW) prima e dopo l'aggiunta di proantocianidine (**Fig. 3.4.8**) e di polifenoli estratti da vino rosso (**Fig. 3.4.9**). A seguito di trattamento con la componente polifenolica, i campioni rilevati al TEM mostrano evidenti differenze a livello di parete e di citoplasma. Lo strato esterno della parete nelle cellule trattate appare come una spazzola con elementi aggregati ricchi di elettroni (**Fig. 3.4.8 D-F e 3.4.9 D-F**). Un'altra importante differenza riguarda il citoplasma delle cellule trattate con polifenoli del vino (**Fig. 3.4.9**). Si osserva come a seguito del contatto con la componente polifenolica l'intero citoplasma appare denso di elettroni, cosa che non si riscontra nei campioni non trattati. Infine, nello

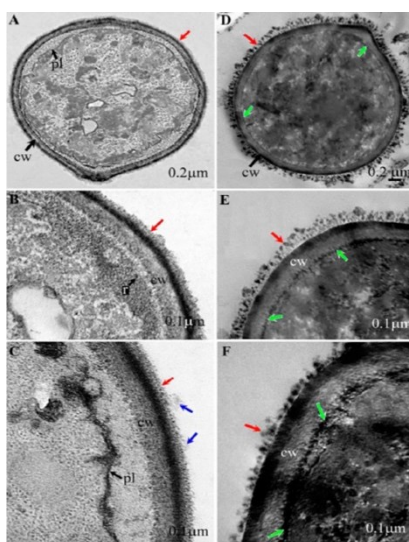
spazio che divide citoplasma e parete cellulare, si distingue chiaramente uno strato con elevata presenza di elettroni (**Fig. 3.4.9 D-F**).



**Figura 3.4.7: immagini al microscopio confocale dei campioni trattati e non trattati; gli asterischi (\*) evidenziano i fenomeni di fluorescenza nel citoplasma; frecce bianche: pareti, frecce blu: resti di citoplasma all'esterno della cellula. (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**



**Figura 3.4.8: immagini al microscopio TEM della biomassa di lievito (Y) e delle pareti cellulari (CW) non trattate (A-C) e trattate (D-F) con proantocianidine; frecce rosse: mannoproteine, frecce blu: spessore della parete cellulare. (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

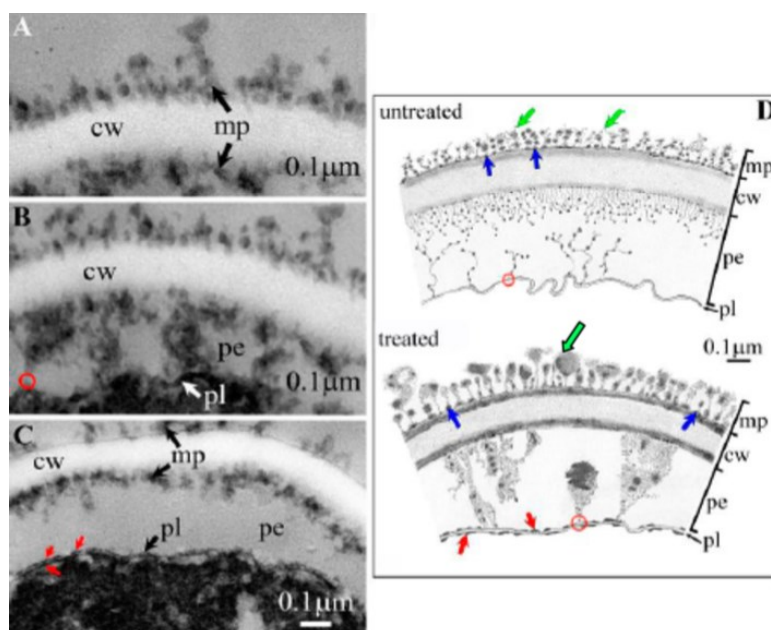


**Figura 3.4.9: immagini al microscopio TEM della biomassa di lievito (Y) e delle pareti cellulari (CW) non trattate (A-C) e trattate (D-F) con polifenoli del vino; frecce rosse: mannoproteine, frecce blu: oligosaccaridi, pl: membrana plasmatica. (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

Le differenze in termini di densità elettronica sono attribuibili alla presenza dei tannini e suggeriscono che le interazioni non si limitano ad avvenire solo sulla parete ma anche nel citoplasma cellulare. Durante i rilevamenti, la plasmolisi avvenuta casualmente di alcune cellule di lievito è stata utile per descrivere le interazioni tra mannoproteine e tannini. In una cellula intatta normalmente non si vedrebbero le mannoproteine legate alla faccia esterna della membrana essendo incollata alla parete. I rilevamenti su cellule intatte, infatti,



permettono di rendere visibile solo un sottile strato osmofilo tra la parete e la membrana plasmatica (**Fig. 3.4.9 D-F**). A seguito di plasmolisi è stato possibile rilevare mannoproteine ancora attaccate al complesso di ancoraggio *GP1* (Glicosil-fosfatidilinositolo) che le lega stabilmente alla superficie esterna della membrana plasmatica. La plasmolisi ha permesso sia di rilevare interazioni tannini-mannoproteine (**Fig 3.4.10 A-C**) sia di verificare come viene mantenuta una grande percentuale di mannoproteine ancora attaccata alla superficie interna della parete cellulare, a seguito del distacco con la membrana (**Fig 3.4.10 C**).



**Figura 3.4.10: Immagini al microscopio elettronico TEM di (A) parete cellulare di lievito trattata con polifenoli del vino, che mostra mannoproteine esterne ed interne aggregate, (B, C) una cellula trattata che mostra il plasmalemma e (D) disegno di regione esterna di cellule di lievito dopo plasmolisi non trattate e trattate. cw, parete cellulare polisaccaridica; mp, mannoproteine; pe, periplasma; per favore, plasmalemma; cerchi rossi, il complesso di ancoraggio GPI; frecce blu, interazioni con polifenoli nello strato interno di mannoproteine; frecce verdi, interazioni con polifenoli nello strato esterno di mannoproteine; frecce rosse, aggregati di proteine e polifenoli sulla membrana plasmatica. (J. Mekoue Nguela et al. 2015)**

I rilevamenti effettuati nella fase di plasmolisi delle cellule confermano quindi che anche la membrana plasmatica e il citoplasma sono in grado di prendere parte alle interazioni con la componente polifenolica. Queste osservazioni sono sufficienti per spiegare i ridotti fenomeni di adsorbimento, riscontrati nel precedente studio, da parte delle sole pareti cellulari rispetto a cellule intere, anche se morte/inattive. I risultati dei due studi forniscono dati importanti per quanto concerne possibili implicazioni ed utilizzi della componente polifenolica sul colore e sull'invecchiamento dei vini rossi. Inoltre, lo studio ha contribuito a definire ulteriormente il ruolo dei prodotti a base di lievito e le loro potenzialità rispetto alla biomassa vitale

nell'adsorbimento di polifenoli, nonostante non si conosca ancora nel dettaglio il meccanismo di azione. Il fenomeno verrà sicuramente approfondito in futuro, soprattutto per la produzione di vini bianchi e rosati dove si cercherà di comprendere a pieno l'impatto dei lieviti e dei prodotti a base di lievito sulla qualità del vino.

### **3.5 CASO STUDIO: GLI EFFETTI DELL'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA ANTOCIANIN- $\beta$ -GLUCOSIDASI DI CEPPI NON-SACCHAROMYCES SUL COLORE DEL VINO ROSSO**

Paloma Manzanares, Virginia Rojas, Salvador Genovés & Salvador Vallés 2000

Un ulteriore fenomeno di particolare rilevanza riguarda l'attività enzimatica dei lieviti capace di influire negativamente sulla colorazione di un vino. In particolare, ci si riferisce all'attività di un enzima  $\beta$ -glucosidasi legato alla parete dei lieviti, in grado di convertire le antocianine nei rispettivi agliconi. Questo comporta la trasformazione in una struttura chimica più instabile maggiormente sensibile a variazioni di pH, concentrazione di ossigeno e anidride solforosa. Inoltre, si verifica una riduzione complessiva della concentrazione delle antocianine monomeriche in soluzione e quindi una riduzione complessiva della colorazione, che sfocia in una ridotta evoluzione del colore durante l'affinamento del vino. Tuttavia, questa attività ha anche un aspetto positivo. Infatti, l'enzima  $\beta$ -glucosidasi è in grado di liberare il glucosio dai precursori aromatici, quali terpeni o norisoprenoidi, ed è perciò in grado di incrementare l'aroma varietale dei vini. Nello studio di Paloma Manzanares e collaboratori (2000) vengono presi in esame 53 ceppi di lievito non-*Saccharomyces* isolati da uva e da vino con lo scopo di descrivere il fenomeno. Questi appartengono ad otto generi: *Candida*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* and *Zygosaccharomyces*. Di tutti i ceppi viene inizialmente valutata l'espressione dell'attività enzimatica in piastra utilizzando il mezzo YNB, che contiene solo una base di vitamine e sali a cui sono stati aggiunti 5 g di ammonio solfato (fonte di azoto) e 5 g di glucosio (fonte di carbonio). Il valore di pH è fissato a 5,5 e l'attività dell'enzima viene calcolata utilizzando 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucoside (MUG) come substrato. L'attività dell'enzima è stata rilevata dopo 24h di incubazione a 25° C sulla base di aloni fluorescenti che circondano le colonie di lievito, rilevati grazie alla luce UV. La natura di questi aloni deriva dalla liberazione del 4-metilumbelliferone dal MUG. In questa fase la determinazione dell'attività enzimatica espressa dai singoli ceppi è solo qualitativa mentre nelle successive fasi del lavoro l'attività enzimatica viene quantificata. Tra

tutti i ceppi testati, solo 26 esprimono l'attività enzimatica, tutti appartenenti ai generi *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (Fig. 3.5.1).

Species	CECT number	Isolation source	$\beta$ -D-glucosidase activity
<i>Candida cantarelli</i>	11150	grape must	+
<i>Candida cantarelli</i>	11170	grape must	+
<i>Candida dattila</i>	10559	white wine	+
<i>Candida dattila</i>	10652	unknown	-
<i>Candida dattila</i>	1962	grapes	+
<i>Candida dattila</i>	10387	grapes	+
<i>Candida domerquia</i>	10650	unknown	+
<i>Candida stellata</i>	11108	wine grape	-
<i>Candida stellata</i>	11109	wine	-
<i>Candida vinaria</i>	11177	grape must	+
<i>Candida vini</i>	10053	red wine	+
<i>Dekkera bruxellensis</i>	11045	Bordeaux wine	-
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	11027	grape must	-
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	11104	grape juice	+
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	11206	ripe of Riesling grape	+
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	11207	grapes	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1444	muscat grape	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	10389	grape juice	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11105	grape must	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11106	grape must	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11107	grape must	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11156	fruit must	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11026	sugar cane	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	10388	grapes	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	10408	orange	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	10546	white wine	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	11202	Concord grapes	-
<i>Pichia anomala</i>	10320	white wine	+
<i>Pichia anomala</i>	10410	white wine	+
<i>Pichia anomala</i>	10590	grape juice	+
<i>Pichia anomala</i>	10591	grape juice	+
<i>Pichia fermentans</i>	10064	red wine	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	10037	red wine	+
<i>Pichia membranaefaciens</i>	10113	grapes	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	10568	white grapes	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	10570	white wine	+
<i>Rhodotorula acuta</i>	11175	grape must	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	10145	unknown	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> var. <i>pombe</i>	11197	grape juice	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1375	unknown	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1376	unknown	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1377	unknown	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11040	wine	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11041	wine	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11042	grapes	-
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	11149	wine grape	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1231	syrup	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	10137	raisin	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	11136	wine grape	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	11189	Portuguese white wine	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	10381	sugar cane molasses	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	10425	sugar cane molasses	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	10445	sugar cane molasses	+

**Figura 3.5.1: attività dell'enzima espressa per tutti i ceppi oggetto di studio. (Paloma Manzanares et al. 2000)**

I ceppi che mostrano attività enzimatica positiva vengono utilizzati nella seconda fase dello studio che ha lo scopo di testarla in termini quantitativi in condizioni più simili a quelle di vinificazione, in particolare stabilendo valori di pH di 3,5 e con la presenza di etanolo (10% v/v). Per ogni ceppo è prevista inoltre una prova di controllo in assenza di etanolo, con lo scopo di valutare nello specifico l'impatto di quest'ultimo sull'attività dell'enzima (Fig. 3.5.2). Per quantificare l'attività enzimatica dei ceppi nelle condizioni descritte, viene utilizzato il p-

nitrofenil- $\beta$ -D-glucoside (pNPG) come substrato. La quantità di p-nitrofenolo rilasciata al termine della fase di incubazione viene calcolata con analisi spettrofotometriche (405nm). L'attività enzimatica (U) viene espressa come quantità di enzima necessaria a rilasciare 1  $\mu$ mol/min di p-nitrofenolo a 30° C e pH 3,5. Entrambi i generi *Hanseniaspora* e *Pichia* presentano alti livelli di attività enzimatica, con *P. anomala* che presenta tra tutti l'attività più elevata corrispondente a 487,4 mU mL<sup>-1</sup>. Con l'eccezione di *C. vinaria* 11177 (14,1 mU mL<sup>-1</sup>), i generi *Candida*, *Metschnikowia* e *Zygosaccharomyces* esprimono livelli di attività enzimatica inferiori ai 10 mU mL<sup>-1</sup>. L'etanolo in generale determina un effetto negativo sull'attività dell'enzima. Questo non si verifica nel caso di *H. osmophila* ceppo 11206 e *S. anomala* ceppi 10590 e 10591 in cui avviene un incremento del 48,21, e 10% rispettivamente. Nella successiva fase dello studio vengono selezionati nove tra i migliori lieviti in termini di attività enzimatica con lo scopo di determinare la posizione dell'enzima nella cellula, in particolare da quale struttura della cellula opera.

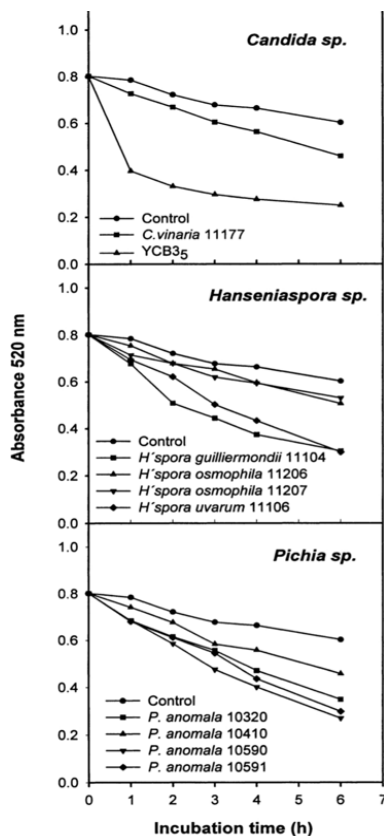
Strain	Without ethanol (mU mL <sup>-1</sup> )	With 10% ethanol (mU mL <sup>-1</sup> )	Remaining activity (%)
<i>Candida cantarelli</i> 11150	3.3	1.5	45.5
<i>Candida cantarelli</i> 11170	3.6	3.3	91.7
<i>Candida dattila</i> 10559	4.0	2.9	72.5
<i>Candida dattila</i> 1962	3.9	2.0	51.3
<i>Candida dattila</i> 10387	6.3	2.1	33.3
<i>Candida domerquiae</i> 10650	4.4	2.8	63.6
<b><i>Candida vinaria</i> 11177</b>	<b>14.1</b>	<b>9.7</b>	<b>68.8</b>
<i>Candida vini</i> 10053	3.6	2.4	66.7
<b><i>Hanseniaspora guilliermondii</i> 11104</b>	<b>57.5</b>	<b>17.4</b>	<b>30.3</b>
<b><i>Hanseniaspora osmophila</i> 11206</b>	<b>21.7</b>	<b>32.2</b>	<b>148.4</b>
<b><i>Hanseniaspora osmophila</i> 11207</b>	<b>61.8</b>	<b>36.1</b>	<b>58.4</b>
<b><i>Hanseniaspora uvarum</i> 11106</b>	<b>58.9</b>	<b>18.5</b>	<b>31.4</b>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 10546	5.0	n.d.	0
<b><i>Pichia anomala</i> 10320</b>	<b>44.9</b>	<b>35.4</b>	<b>78.8</b>
<b><i>Pichia anomala</i> 10410</b>	<b>38.7</b>	<b>9.6</b>	<b>24.8</b>
<b><i>Pichia anomala</i> 10590</b>	<b>487.4</b>	<b>590.5</b>	<b>121.2</b>
<b><i>Pichia anomala</i> 10591</b>	<b>51.0</b>	<b>56.1</b>	<b>110</b>
<i>Pichia membranaefaciens</i> 10037	5.8	n.d.	0
<i>Pichia membranaefaciens</i> 10570	5.7	n.d.	0
<i>Zygosaccharomyces baillii</i> 11040	2.8	2.2	78.6
<i>Zygosaccharomyces mellis</i> 11149	2.0	1.6	80.0
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 10137	5.1	2.8	54.9
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 11136	3.8	1.1	28.9
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 11189	3.5	3.1	88.6
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 10381	3.4	2.6	76.5
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 10445	3.0	3.1	100

**Figura 3.5.2: effetto dell'etanolo sull'attività enzimatica a pH 3,5. (Paloma Manzanares et al. 2000)**

Dopo un periodo di incubazione in un mezzo di crescita, l'attività enzimatica dei singoli ceppi viene valutata in condizioni standard ed espressa come percentuale suddivisa rispettivamente in: attività enzimatica extra-cellulare, attività enzimatica connessa alla parete, attività enzimatica intra-cellulare (**Fig. 3.5.3**). Il lievito *C. vinaria* 11177 mostra i valori più elevati di attività enzimatica extra-cellulare mentre nei restanti ceppo studiati viene riscontrata una percentuale maggiore dell'attività enzimatica connessa alla parete cellulare rispetto ad attività extra-cellulari e intra-cellulari. I dati raccolti confermano quindi che, ad eccezione di *C. vinaria*, l'enzima è principalmente associato alle pareti cellulari dei lieviti. Nell'ultima fase dello studio vengono utilizzati nuovamente i nove lieviti precedentemente selezionati e il ceppo ricombinante di *S.cerevisiae* YCB3<sub>5</sub>. In genere *S. cerevisiae* non è dotato di rilevante attività  $\beta$ -glucosidasica in quanto non possiede gli enzimi specifici. Per tale motivo in questo ceppo è stato inserito il gene (gene BGNL) di *Candida molischiana* che codifica per una  $\beta$ -glucosidasi particolarmente attiva. I ceppi vengono cresciuti in terreno liquido a contatto per 48h con un estratto di antocianine (1650 mg L<sup>-1</sup>) a 25° C. Questa fase ha lo scopo di valutare l'attività dell'enzima nei confronti delle antocianine (**Fig. 3.5.4**).

Strain	% activity			
	Total activity (mU mL <sup>-1</sup> )	Extra cellular	Cell wall bound	Intracellular
<i>Candida vinaria</i> 11177	15.0	36.3	57.2	6.5
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> 11104	57.5	1.9	98.1	n.d.
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 11206	21.7	5.2	94.8	n.d.
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 11207	62.0	1.6	98.0	0.4
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 11106	59.1	1.9	97.7	0.4
<i>Pichia anomala</i> 10320	46.3	4.0	93.0	3.0
<i>Pichia anomala</i> 10410	39.7	5.9	91.5	2.6
<i>Pichia anomala</i> 10590	693.7	1.8	68.5	29.7
<i>Pichia anomala</i> 10591	59.0	3.9	82.6	13.6

**Figura 3.5.3: posizione dell'enzima  $\beta$ -D-glucosidasi nei nove lieviti selezionati. (Paloma Manzanares et al. 2000)**



**Figura 3.5.4: decolorazione delle antocianine per effetto dei lieviti selezionati. (Paloma Manzanares et al. 2000)**

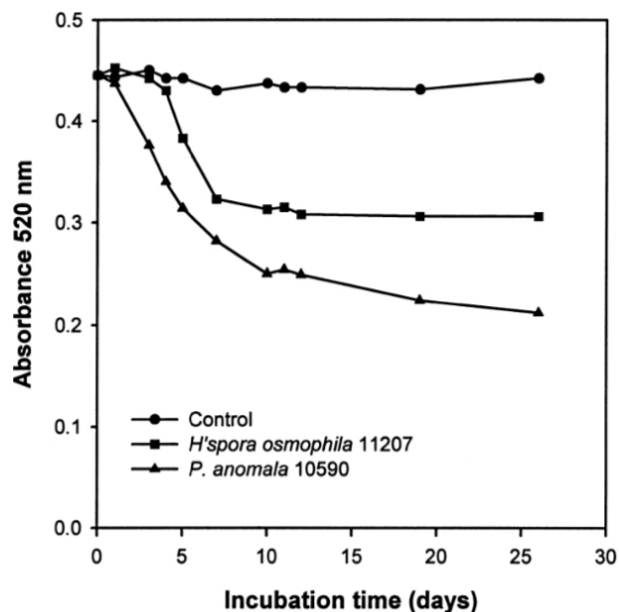
I valori ridotti di assorbanza a 520nm rispetto ai campioni di controllo, indicano un effetto di decolorazione da parte dei lieviti che si verifica sempre, ma con valori differenti in relazione al ceppo. Un ulteriore parametro che varia in relazione alla tipologia di lievito utilizzata è la riduzione di assorbanza in relazione al tempo di incubazione.

Ad esempio, il ceppo *S. cerevisiae* YCB3<sub>5</sub> provoca in 1h una riduzione del valore di assorbanza del 50%, mentre i ceppi *H. guilliermondii* 11104, *H. uvarum* 11106 e *P. anomala* (10320, 10590 and 10591) impiegano 4-5 h per riscontrare la stessa riduzione. Imponendo per tutti i ceppi un tempo di incubazione di 6h, per la valutazione dei ceppi viene utilizzato il rapporto tra la perdita di assorbanza a 520nm e le unità di attività dell'enzima  $\beta$ -D-glucosidasi espresse (U) (**Fig. 3.5.5**). Gli effetti di decolorazione più marcati si riscontrano utilizzando *C. vinaria* 11177, seguita da *H. uvarum* 11106 e *H. osmophila* 11206. I lieviti *H. osmophila* 11207 e *P. anomala* 10590 presentano invece i valori più bassi in termini di perdita di assorbanza in relazione all'attività enzimatica espressa.

Strain	Loss <sup>a</sup> in A <sub>520</sub>	R
<i>Candida vinaria</i> 11177	0.143	30.40
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> 11104	0.299	1.83
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 11206	0.096	8.57
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 11207	0.072	0.36
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 11106	0.304	13.80
<i>Pichia anomala</i> 10320	0.253	2.51
<i>Pichia anomala</i> 10410	0.145	4.90
<i>Pichia anomala</i> 10590	0.332	0.68
<i>Pichia anomala</i> 10591	0.304	3.04
Recombinant <sup>b</sup> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YCB3 <sub>5</sub>	0.353	1.30

**Figura 3.5.5: rapporto (R) tra la perdita di assorbanza a 520nm dopo 6h di incubazione e le unità di attività enzimatica espresse dai singoli ceppi. (Paloma Manzanares et al. 2000)**

Per questo motivo entrambi i ceppi vengono selezionati nella successiva fase dello studio con lo scopo di valutare l'attività dell'enzima sul colore del vino. In questa fase è stato monitorato e studiato il processo di decolorazione di un vino rosso (**Fig. 3.5.6**). Per entrambi i lieviti, dopo i primi giorni di incubazione si assiste ad una riduzione drastica dell'assorbanza a 520nm rispetto al campione di controllo. Dopo il giorno 26 i valori di assorbanza rilevati nei campioni a contatto con *H. osmophila* e *P. anomala* si riducono del 30 e del 50% rispettivamente.



**Figura 3.5.6: decolorazione del vino rosso ad opera di *H. osmophila* 11207 e *P. anomala* 10590. (Paloma Manzanares et al. 2000)**

I ceppi *H. osmophila* 11207 e *P. anomala* 10590 vengono quindi considerati quelli con le migliori potenzialità per il miglioramento della qualità del vino soprattutto dal punto di vista aromatico e del colore.

### **3.6 CASO STUDIO: L'UTILIZZO DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES E TANNINI ENOLOGICI NELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO**

Kai Chen, Carlos Escott, Iris Loira, Juan Manuel del Fresno, Antonio Morata, Wendu Tesfaye, Fernando Calderon, Jose Antonio Suarez-Lepe, Shunyu Han, Santiago Benito 2018

I tannini enologici vengono comunemente utilizzati in cantina per la loro capacità di intervenire su aspetti del vino quali aroma, colore ed effetti gustativi. In tempi recenti, data l'attenzione costante della comunità scientifica sull'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* come strumento per il miglioramento della qualità dei vini, gli effetti dati dall'aggiunta di tannini enologici necessitano di un ulteriore approfondimento. Il lavoro pubblicato da Kai Chen e collaboratori nel 2018 ha lo scopo di studiare le interazioni che avvengono tra lieviti *non-Saccharomyces* selezionati e tannini enologici, aggiunti all'inizio delle varie prove di fermentazione. In particolare, vengono studiate, a seguito dell'aggiunta, eventuali variazioni sia dell'andamento fermentativo dei singoli ceppi e di composizione finale del vino sia variazioni in termini di colore, aroma e proprietà sensoriali. I ceppi utilizzati nello studio sono: *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* e due ceppi di *S. pombe* (938, V1). Viene inoltre utilizzato un ceppo di *S. cerevisiae* (7A) sia come campione di confronto, sia come lievito supplementare per sostenere la fermentazione con inoculo sequenziale (aggiunto al giorno quattro di fermentazione) quando vengono impiegati i lieviti non-*Saccharomyces* *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*. Per i ceppi citati l'inoculo sequenziale è necessario in quanto risultano incapaci nel portare a termine la fermentazione in modo autonomo, a differenza invece di *S. pombe*. Tutte le prove fermentative vengono condotte utilizzando mosto della varietà *Merlot* ottenuto sottoponendo le uve al trattamento *'flash-detente'*. Si tratta di una tipologia di estrazione che prevede un brusco trattamento termico nell'arco di pochi secondi a cui segue un brusco raffreddamento sfruttando il vuoto. Questo permette di massimizzare l'estrazione della componente polifenolica, in particolare antociani, ma anche di una buona parte della componente tannica. Il mosto iniziale presenta i seguenti valori riscontrati a seguito di analisi preliminari: zuccheri 213 g/L, pH 3,2, acido lattico ed acido acetico inferiore a 0,1 g/L. I tannini enologici estratti da vinaccioli vengono



aggiunti alla concentrazione di 40 g/hl prima dell'avvio delle rispettive prove fermentative. Inoltre, per ogni prova effettuata, è prevista una fermentazione di controllo con le medesime condizioni in assenza di tannini aggiunti, con lo scopo di comparare i risultati ottenuti. Le fermentazioni vengono condotte in contenitori da 150 ml alla temperatura costante di 25° C. Per i parametri relativi al colore vengono utilizzati quattro indici: indice di gelatina per la determinazione dell'astringenza che indica la percentuale di tannini capace di combinarsi con le proteine, indice HCL che indica la percentuale di tannini combinata con polisaccaridi e sali, indice di etanolo che indica la percentuale di tannini combinata con polisaccaridi, indice di vanillina che esprime il grado di polimerizzazione dei polifenoli presenti nel campione. Oltre ai parametri precedentemente descritti, vengono svolte analisi HPLC/ESI-MS per la valutazione completa delle antocianine presenti. Per la determinazione dei parametri relativi al colore viene utilizzata la scala CIELAB composta da tre valori: L\*, a\*, b\*. È una scala dei colori basata sulla teoria dei colori opposti con valori del parametro L\* espresso da 0 a 100 ed i parametri a\* e b\* espressi come valori positivi o negativi. La teoria sostiene che l'occhio umano percepisce i colori come coppie di opposti. Il parametro L\* esprime in relazione al valore che assume, l'opposto buio (0-50) / luce (51-100), il parametro a\* esprime l'opposto rosso (valori positivi) / verde (valori negativi), infine il parametro b\* esprime l'opposto blu (valori negativi) / giallo (valori positivi) (**Fig.3.6.1**).

Parameters	<i>M. pulcherrima</i>		<i>L. thermotolerans</i>		<i>T. delbrueckii</i>		<i>S. pombe V1</i>		<i>S. pombe 938</i>		<i>S. cerevisiae 7VA</i>	
		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40
Ethanol (g/L)	12.6 ± 0.00 <sup>abc</sup>	12.5 ± 0.06 <sup>bcd</sup>	12.6 ± 0.06 <sup>ab</sup>	12.6 ± 0.06 <sup>ab</sup>	12.6 ± 0.09 <sup>abc</sup>	12.6 ± 0.00 <sup>abc</sup>	12.7 ± 0.00 <sup>a</sup>	12.7 ± 0.00 <sup>a</sup>	12.5 ± 0.00 <sup>cd</sup>	12.5 ± 0.06 <sup>bcd</sup>	12.5 ± 0.06 <sup>d</sup>	12.5 ± 0.12 <sup>d</sup>
Total acidity (g/L)	5.2 ± 0.10 <sup>f</sup>	6.1 ± 0.25 <sup>ab</sup>	6.4 ± 0.10 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.67 <sup>ab</sup>	5.3 ± 0.06 <sup>de</sup>	5.3 ± 0.00 <sup>de</sup>	3.9 ± 0.21 <sup>e</sup>	3.8 ± 0.12 <sup>e</sup>	4.3 ± 0.17 <sup>f</sup>	4.4 ± 0.17 <sup>f</sup>	5.6 ± 0.12 <sup>cd</sup>	5.9 ± 0.06 <sup>bc</sup>
pH	3.6 ± 0.01 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.02 <sup>d</sup>	3.4 ± 0.03 <sup>f</sup>	3.4 ± 0.02 <sup>f</sup>	3.6 ± 0.02 <sup>c</sup>	3.7 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.01 <sup>e</sup>	3.5 ± 0.01 <sup>e</sup>
l-Malic acid (g/L)	1.7 ± 0.15 <sup>bc</sup>	2.1 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.17 <sup>c</sup>	1.8 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.6 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.15 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>d</sup>	2.0 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.06 <sup>a</sup>
l-Lactic acid (g/L)	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.03 <sup>b</sup>
Glucose (g/L)	1.2 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.55 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.26 <sup>b</sup>
Fructose (g/L)	1.0 ± 0.15 <sup>cde</sup>	0.7 ± 0.10 <sup>de</sup>	0.4 ± 0.20 <sup>e</sup>	0.5 ± 0.17 <sup>de</sup>	1.3 ± 0.10 <sup>cde</sup>	1.3 ± 0.06 <sup>bcd</sup>	1.6 ± 0.45 <sup>bc</sup>	1.6 ± 0.25 <sup>bc</sup>	3.4 ± 1.26 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.80 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.15 <sup>cde</sup>	0.8 ± 0.06 <sup>cde</sup>
Acetic acid (g/L)	0.17 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>cd</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.73 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>c</sup>

Different letters show significant difference at  $p < 0.05$ .

TV40: Tanielo Vintage 40 g/hL.

**Figura 3.6.1: parametri fisico-chimici dei campioni di vino ottenuti utilizzando ceppi differenti. (Kai Chen et al. 2018)**

I valori più elevati di pH vengono attribuiti alla maggior quantità di acidi organici, in particolare acido malico, degradata dal ceppo. Le prove condotte utilizzando *T. delbrueckii* mostrano invece il minor contenuto tra tutte di acido acetico. Considerando invece *M. pulcherrima*, vi è un incremento del 24% dell'acidità totale nella prova svolta con l'aggiunta di tannini enologici rispetto al campione di controllo. Un effetto simile è stato riscontrato in *L. thermotolerans* con un incremento di produzione di acido malico corrispondente al 13% rispetto alla fermentazione di controllo condotta in assenza di tannini enologici. In entrambe

le prove svolte utilizzando i ceppi di *S. pombe* 938 e V1 non vi sono tracce significative di acido malico, tuttavia, si riscontrano i valori più elevati di acido acetico, in grado di compromettere la qualità del vino. Inoltre, i valori di glucosio e fruttosio residuo sembrano essersi ridotti a seguito dell'aggiunta di tannini del 42% e del 35% rispettivamente rispetto alla prova di controllo. Nelle prove svolte con altri ceppi, l'aggiunta di tannini non sembra influenzare in modo significativo il consumo di glucosio e fruttosio. Per quanto riguarda la determinazione dei composti polifenolici e del colore (**Fig.3.6.2**), in tutte le prove il contenuto di tannini totale non viene influenzato in modo significativo dall'aggiunta di tannini enologici. I tannini enologici non sembrano influenzare neanche il contenuto di antocianine totali dei ceppi *non-Saccharomyces*. Al contrario, nelle prove svolte utilizzando *S. cerevisiae*, vi è un incremento significativo di antociani totali a seguito dell'aggiunta di tannini. Considerando i quattro indici precedentemente descritti per la determinazione della componente polifenolica (**Fig 3.6.2**), l'indice di gelatina presenta delle variazioni nelle prove svolte con aggiunta di tannini. I lieviti *S. cerevisiae* e *M. pulcherrima* mostrano risultati simili con un incremento dell'indice del 63% e 83% rispettivamente a seguito di aggiunta. In queste condizioni entrambi i ceppi sono in grado quindi di aumentare l'astringenza del vino prodotto. Tra i risultati più significativi riscontrati, i valori dell'indice di etanolo di *S. pombe* e *S. cerevisiae* risultano tra i più elevati, indicando che è presente un'elevata percentuale di tannini combinata con polisaccaridi.

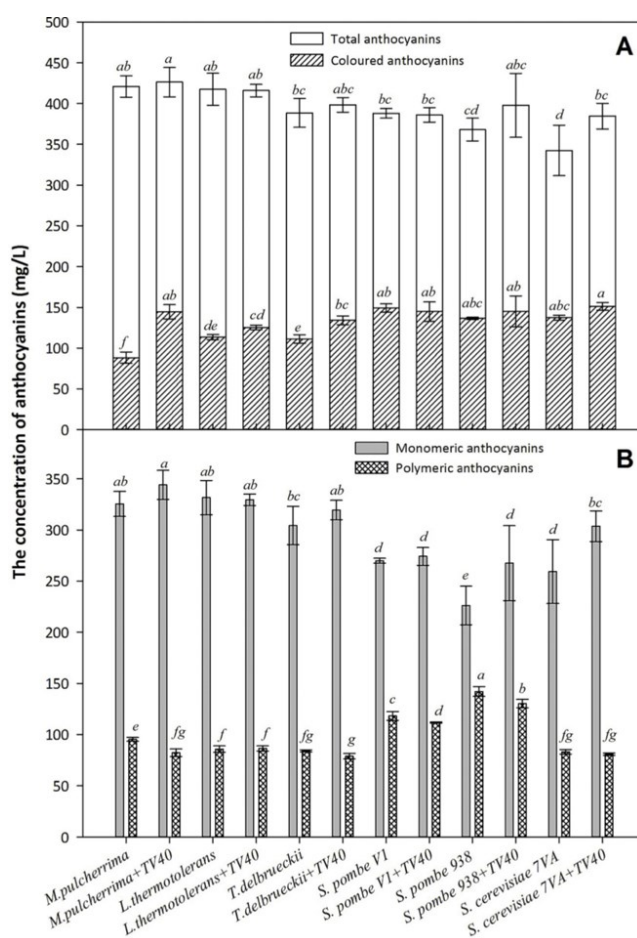
Parameters	<i>M. pulcherrima</i>		<i>L. thermotolerans</i>		<i>T. delbrueckii</i>		<i>S. pombe</i> V1		<i>S. pombe</i> 938		<i>S. cerevisiae</i> 7VA	
		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40
<b>Phenolic indexes</b>												
Total polyphenol index	98.77 ± 5.97 <sup>d</sup>	119.97 ± 5.54 <sup>a</sup>	98.70 ± 7.53 <sup>d</sup>	98.77 ± 7.26 <sup>d</sup>	100.63 ± 0.47 <sup>cd</sup>	108.60 ± 2.65 <sup>bcd</sup>	112.70 ± 3.87 <sup>ab</sup>	118.07 ± 5.58 <sup>ab</sup>	112.53 ± 5.33 <sup>ab</sup>	120.30 ± 11.35 <sup>a</sup>	109.77 ± 3.89 <sup>abc</sup>	118.73 ± 0.46 <sup>ab</sup>
Total tannin (g/L)	1.52 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.88 ± 0.18 <sup>ab</sup>	2.06 ± 0.28 <sup>ab</sup>	2.09 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.04 <sup>ab</sup>	1.78 ± 0.39 <sup>ab</sup>	1.87 ± 0.31 <sup>ab</sup>	2.01 ± 0.44 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.16 <sup>ab</sup>	2.04 ± 0.45 <sup>ab</sup>	1.91 ± 0.02 <sup>ab</sup>
Total anthocyanin (mg/L)	420.9 ± 13.1 <sup>ab</sup>	426.3 ± 18.0 <sup>a</sup>	417.4 ± 19.7 <sup>ab</sup>	415.9 ± 7.5 <sup>ab</sup>	388.5 ± 17.7 <sup>bc</sup>	398.4 ± 8.9 <sup>abc</sup>	388.1 ± 5.8 <sup>bc</sup>	386.1 ± 8.10 <sup>bc</sup>	368.2 ± 14.1 <sup>cd</sup>	397.9 ± 39.1 <sup>abc</sup>	342.5 ± 31.0 <sup>d</sup>	384.5 ± 15.8 <sup>bc</sup>
Gelatine index	21.15 ± 0.49 <sup>ef</sup>	34.75 ± 5.36 <sup>bcdde</sup>	39.08 ± 8.90 <sup>abcd</sup>	44.24 ± 10.73 <sup>abc</sup>	47.33 ± 8.43 <sup>ab</sup>	34.74 ± 6.41 <sup>bcdde</sup>	38.48 ± 7.86 <sup>abcd</sup>	32.68 ± 8.44 <sup>cde</sup>	52.13 ± 6.20 <sup>a</sup>	28.06 ± 6.59 <sup>def</sup>	16.95 ± 2.37 <sup>f</sup>	31.10 ± 9.86 <sup>cde</sup>
Ethanol index	4.01 ± 0.16 <sup>f</sup>	17.37 ± 11.72 <sup>def</sup>	9.16 ± 4.16 <sup>ef</sup>	25.82 ± 12.18 <sup>cde</sup>	12.80 ± 7.74 <sup>def</sup>	10.06 ± 5.92 <sup>ef</sup>	48.47 ± 10.83 <sup>b</sup>	44.09 ± 6.45 <sup>b</sup>	27.26 ± 11.63 <sup>cd</sup>	40.26 ± 10.18 <sup>bc</sup>	65.17 ± 11.52 <sup>a</sup>	65.91 ± 8.41 <sup>a</sup>
HCL index	32.03 ± 2.36 <sup>cd</sup>	30.76 ± 4.58 <sup>cd</sup>	31.60 ± 1.88 <sup>cd</sup>	26.52 ± 4.87 <sup>d</sup>	33.17 ± 1.29 <sup>c</sup>	29.80 ± 2.54 <sup>cd</sup>	41.47 ± 2.06 <sup>b</sup>	41.59 ± 1.50 <sup>b</sup>	50.50 ± 8.06 <sup>a</sup>	47.87 ± 0.42 <sup>a</sup>	31.90 ± 1.30 <sup>cd</sup>	32.49 ± 1.53 <sup>cd</sup>
Vanillin index (Catechin g/L)	0.92 ± 0.02 <sup>de</sup>	0.95 ± 0.04 <sup>bcd</sup>	0.89 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>cde</sup>	0.89 ± 0.03 <sup>de</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>cde</sup>	1.01 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.06 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.99 ± 0.06 <sup>bc</sup>	1.00 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.89 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.01 ± 0.02 <sup>ab</sup>
<b>Colour indexes</b>												
Colour intensity	14.5 ± 0.6 <sup>d</sup>	19.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	15.2 ± 0.2 <sup>d</sup>	16.7 ± 0.3 <sup>c</sup>	15.7 ± 0.5 <sup>cd</sup>	18.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	21.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	21.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	21.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	22.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	18.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	19.1 ± 0.7 <sup>b</sup>
Hue	0.63 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.56 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.59 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.64 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.00 <sup>de</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.01 <sup>cd</sup>
L*	61.60 ± 1.25 <sup>a</sup>	53.94 ± 1.13 <sup>c</sup>	60.06 ± 0.40 <sup>ab</sup>	57.75 ± 0.56 <sup>b</sup>	59.01 ± 0.86 <sup>b</sup>	55.00 ± 0.63 <sup>c</sup>	48.08 ± 1.48 <sup>d</sup>	48.45 ± 1.80 <sup>d</sup>	49.28 ± 0.91 <sup>d</sup>	48.54 ± 3.37 <sup>d</sup>	55.15 ± 0.43 <sup>c</sup>	53.81 ± 0.97 <sup>c</sup>
a*	41.88 ± 0.69 <sup>f</sup>	48.74 ± 1.01 <sup>e</sup>	48.55 ± 0.73 <sup>c</sup>	49.07 ± 0.77 <sup>cde</sup>	45.62 ± 0.75 <sup>f</sup>	46.30 ± 0.69 <sup>f</sup>	50.12 ± 0.18 <sup>bcd</sup>	48.29 ± 1.37 <sup>f</sup>	51.99 ± 0.16 <sup>a</sup>	50.34 ± 0.52 <sup>bc</sup>	48.86 ± 0.63 <sup>de</sup>	51.32 ± 0.53 <sup>ab</sup>
b*	-0.32 ± 0.08 <sup>de</sup>	2.25 ± 0.34 <sup>ab</sup>	-0.98 ± 0.12 <sup>f</sup>	0.40 ± 0.12 <sup>d</sup>	-0.45 ± 0.13 <sup>ef</sup>	2.03 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.37 <sup>c</sup>	1.23 ± 0.58 <sup>c</sup>	2.52 ± 0.35 <sup>ab</sup>	2.73 ± 0.31 <sup>ab</sup>	2.29 ± 0.36 <sup>ab</sup>	1.95 ± 0.70 <sup>b</sup>

Different letters show significant difference at  $p < 0.05$ .  
TV40: Tanicol Vintage 40 g/hL.

**Figura 3.6.2: parametri dei composti polifenolici e del colore dei campioni di vino ottenuti utilizzando ceppi differenti. (Kai Chen et al. 2018)**

Per quanto riguarda l'indice HCL, il valore più elevato è stato espresso da *S. pombe*. Dai risultati relativi all'intensità colorante, *S. pombe* V1 mostra i valori più elevati tra tutte le fermentazioni di controllo. Considerando invece le fermentazioni svolte in presenza di tannini aggiunti, questi ultimi sembrano avere un effetto positivo sull'intensità colorante nelle fermentazioni svolte utilizzando *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans* e *T. delbrueckii*. Per quanto riguarda i valori di tinta i tannini enologici aggiunti sembrano avere un effetto positivo riscontrato in tutte le prove svolte con ceppi non-*Saccharomyces*, a differenza del ceppo di *S. cerevisiae* dove a seguito di aggiunta si riscontrano valori di tinta ridotti. La scala CIELAB precedentemente descritta indica specifiche differenze riscontrate tra i ceppi. A seguito del trattamento con tannini vi è una riduzione dei valori del parametro L\* nelle prove svolte utilizzando *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, *S. pombe* 938 e *S. cerevisiae* 7A. Per quanto riguarda i valori del parametro b\*, in tutte le prove svolte l'aggiunta di tannini causa una variazione del parametro da positivo a negativo (e viceversa). Questo suggerisce come il colore rosso originale del vino venga modificato dall'aggiunta dei tannini, variando anche in minima parte verso colorazioni nell'ordine del giallo/blu, con un effetto complessivo sulla colorazione differente rispetto al campione di controllo. L'aggiunta di tannini enologici sembra avere comunque un effetto complessivo positivo sulla colorazione utilizzando lieviti non-*Saccharomyces*. Dalle analisi delle antocianine (**Fig. 3.6.3**), nelle prove svolte utilizzando *S. cerevisiae* si riscontra il minor contenuto tra tutte di antociani totali. Nelle prove di controllo svolte in inoculo sequenziale con *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans* e *T. delbrueckii*, si riscontrano concentrazioni inferiori di antocianine colorate rispetto alle prove svolte utilizzando *S. pombe* e *S. cerevisiae*. L'aggiunta di tannini provoca un aumento di antocianine colorate riscontrato in tutte le prove effettuate. Considerando invece il contenuto di antocianine monomeriche e polimerizzate, i valori più bassi in termini di antocianine monomeriche sono osservati nella prova svolta utilizzando *S. pombe* 938, nonostante nella stessa prova presenti il più alto contenuto in antocianine polimerizzate.

Questo indica che probabilmente la colorazione del vino ottenuto dalla fermentazione con *S. pombe* 938 risulterà più stabile nel tempo, a causa della maggior presenza di antociani polimerizzati più resistenti alle condizioni di pH, SO<sub>2</sub> e temperatura. L'utilizzo di tannini nelle prove svolte utilizzando *S. pombe* 938 riduce la concentrazione di antocianine polimerizzate e causa un lieve incremento di antocianine monomeriche, suggerendo in questo caso un peggioramento, rispetto al campione di controllo, riguardo alla possibile evoluzione del colore nel tempo. A questo punto lo studio analizza se sorgono differenze in termini di composizione delle antocianine tra le varie prove, valutando l'effetto sia del ceppo utilizzato che dell'aggiunta di tannini (**Fig 3.6.4**).



**Figura 3.6.3: concentrazione (mg/L) delle antocianine riscontrate nelle varie prove: totali e colorate (A), polimeriche e monomeriche (B). (Kai Chen et al. 2018)**

Anthocyanins (mg/L)	<i>M. pulcherrima</i>		<i>L. thermotolerans</i>		<i>T. delbrueckii</i>		<i>S. pombe V1</i>		<i>S. pombe 938</i>		<i>S. cerevisiae 7VA</i>	
		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40		+ TV40
D3G	11.95 ± 0.19 <sup>e</sup>	22.95 ± 0.90 <sup>b</sup>	21.29 ± 1.11 <sup>b</sup>	22.83 ± 0.84 <sup>b</sup>	14.60 ± 0.68 <sup>de</sup>	16.27 ± 0.15 <sup>cd</sup>	27.86 ± 2.28 <sup>a</sup>	23.29 ± 4.30 <sup>b</sup>	27.47 ± 1.17 <sup>a</sup>	26.50 ± 1.11 <sup>a</sup>	17.87 ± 0.93 <sup>c</sup>	23.77 ± 0.43 <sup>b</sup>
C3G	0.22 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.84 ± 0.98 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.69 <sup>b</sup>	3.00 ± 0.49 <sup>a</sup>	2.49 ± 1.10 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.04 <sup>b</sup>
Pt3G	18.59 ± 0.78 <sup>e</sup>	26.37 ± 0.72 <sup>a</sup>	23.33 ± 0.52 <sup>bc</sup>	23.85 ± 0.90 <sup>b</sup>	21.47 ± 0.34 <sup>d</sup>	23.03 ± 0.44 <sup>bcd</sup>	24.64 ± 1.31 <sup>b</sup>	24.05 ± 1.38 <sup>b</sup>	23.22 ± 0.84 <sup>bc</sup>	23.79 ± 0.89 <sup>b</sup>	22.04 ± 0.55 <sup>cd</sup>	26.97 ± 1.35 <sup>a</sup>
Pn3G	4.58 ± 0.43 <sup>c</sup>	8.65 ± 0.40 <sup>bc</sup>	8.25 ± 0.73 <sup>bc</sup>	9.57 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.82 ± 0.56 <sup>de</sup>	7.55 ± 0.37 <sup>bcd</sup>	14.04 ± 1.89 <sup>a</sup>	9.31 ± 3.00 <sup>b</sup>	14.48 ± 1.03 <sup>a</sup>	13.57 ± 2.00 <sup>a</sup>	6.44 ± 0.18 <sup>cde</sup>	8.99 ± 0.23 <sup>b</sup>
M3G	102.75 ± 1.70 <sup>e</sup>	125.47 ± 1.30 <sup>a</sup>	110.27 ± 2.14 <sup>cd</sup>	112.82 ± 1.39 <sup>cd</sup>	113.09 ± 0.80 <sup>f</sup>	119.43 ± 1.77 <sup>b</sup>	101.83 ± 3.63 <sup>e</sup>	107.61 ± 0.63 <sup>d</sup>	92.47 ± 4.32 <sup>e</sup>	96.77 ± 2.77 <sup>f</sup>	114.11 ± 3.36 <sup>c</sup>	128.95 ± 0.37 <sup>a</sup>
VitA + VitB	4.20 ± 0.61 <sup>f</sup>	6.09 ± 0.77 <sup>cd</sup>	5.11 ± 0.74 <sup>def</sup>	5.32 ± 0.81 <sup>def</sup>	4.64 ± 0.26 <sup>ef</sup>	4.63 ± 0.06 <sup>ef</sup>	6.82 ± 0.49 <sup>c</sup>	5.98 ± 0.43 <sup>cd</sup>	11.43 ± 0.67 <sup>a</sup>	10.01 ± 1.12 <sup>b</sup>	5.02 ± 0.34 <sup>def</sup>	5.65 ± 0.09 <sup>de</sup>
VitA-Ac	0.55 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.75 ± 0.10 <sup>ef</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>ef</sup>	0.67 ± 0.01 <sup>ef</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>ef</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>ef</sup>	1.36 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.04 ± 0.13 <sup>d</sup>	2.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.31 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.76 ± 1.10 <sup>ef</sup>
C3GAc	1.08 ± 0.02 <sup>e</sup>	1.23 ± 0.03 <sup>ef</sup>	1.40 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.33 ± 0.06 <sup>cd</sup>	1.29 ± 0.03 <sup>de</sup>	1.28 ± 0.02 <sup>de</sup>	1.51 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.31 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.76 ± 0.10 <sup>ef</sup>
Pt3GAc	4.14 ± 0.18 <sup>f</sup>	4.73 ± 0.11 <sup>de</sup>	4.90 ± 0.11 <sup>cd</sup>	4.74 ± 0.13 <sup>de</sup>	4.65 ± 0.18 <sup>de</sup>	5.00 ± 0.11 <sup>bc</sup>	5.21 ± 0.00 <sup>b</sup>	5.53 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.02 ± 0.09 <sup>bc</sup>	5.03 ± 0.18 <sup>bc</sup>	4.63 ± 0.27 <sup>e</sup>	5.15 ± 0.06 <sup>bc</sup>
Pn3GAc	3.04 ± 0.18 <sup>d</sup>	3.80 ± 0.43 <sup>ab</sup>	3.55 ± 0.18 <sup>abc</sup>	3.34 ± 0.04 <sup>cd</sup>	3.29 ± 0.11 <sup>cd</sup>	3.17 ± 0.15 <sup>cd</sup>	3.39 ± 0.26 <sup>bcd</sup>	3.19 ± 0.13 <sup>cd</sup>	3.92 ± 0.30 <sup>a</sup>	3.78 ± 0.40 <sup>ab</sup>	3.22 ± 0.08 <sup>cd</sup>	3.52 ± 0.07 <sup>abc</sup>
M3GAc	24.77 ± 0.49 <sup>ef</sup>	29.92 ± 0.19 <sup>b</sup>	26.74 ± 0.62 <sup>d</sup>	27.46 ± 0.36 <sup>d</sup>	27.09 ± 0.26 <sup>d</sup>	28.68 ± 0.68 <sup>f</sup>	25.39 ± 0.71 <sup>e</sup>	26.84 ± 0.14 <sup>d</sup>	23.11 ± 0.76 <sup>f</sup>	24.00 ± 0.45 <sup>f</sup>	27.48 ± 0.77 <sup>d</sup>	31.04 ± 0.16 <sup>a</sup>
C3Gcm	0.73 ± 0.02 <sup>def</sup>	0.84 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.88 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.01 <sup>abc</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>bcd</sup>	0.79 ± 0.03 <sup>bcd</sup>	0.71 ± 0.01 <sup>efg</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>cdef</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>fg</sup>	0.73 ± 0.04 <sup>def</sup>	0.87 ± 0.12 <sup>a</sup>
Pt3Gcm	2.32 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.34 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.02 ± 0.03 <sup>d</sup>	2.22 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.86 ± 0.09 <sup>e</sup>	1.94 ± 0.07 <sup>e</sup>	1.92 ± 0.05 <sup>e</sup>	2.32 ± 0.02 <sup>b</sup>
Pn3Gcm	0.26 ± 0.01 <sup>de</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>cde</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>bcd</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>de</sup>	0.23 ± 0.00 <sup>e</sup>
M3Gcm	19.94 ± 0.47 <sup>a</sup>	19.34 ± 0.84 <sup>ab</sup>	19.75 ± 0.15 <sup>a</sup>	19.77 ± 0.43 <sup>a</sup>	18.64 ± 0.16 <sup>bc</sup>	18.41 ± 0.27 <sup>c</sup>	15.98 ± 0.31 <sup>c</sup>	17.37 ± 0.13 <sup>d</sup>	14.93 ± 0.39 <sup>f</sup>	15.71 ± 0.88 <sup>ff</sup>	15.55 ± 0.20 <sup>ef</sup>	18.52 ± 0.21 <sup>c</sup>
M3G4Vp	0.26 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.00 <sup>b</sup>
M3G4Vg	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.02 <sup>cd</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>bc</sup>
M3GAc4Vp	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>d</sup>
M3Gcm4Vp	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.11 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.11 ± 0.00 <sup>ab</sup>

**Figura 3.6.4: composizione delle antocianine nelle diverse prove fermentative**  
**Abbreviazioni: D3G: delphinidina-3-O-glucoside, C3G: cianidina-3-O-glucoside, Pt3G: petunidina-3-glucoside, Pn3G: peonidina-3-O-glucoside, M3G: malvidina-3-O-glucoside, Vit A/ Vit B: vitisina A/vitisina B, Vit A-Ac: vitisina A-(6 -acetilglucoside), C3GAc: cianidina-3-O-(6 -acetilglucoside), Pt3GAc: petunidina-3-O-(6 -acetilglucoside), Pn3GAc: peonidina-3-O-(6 -acetilglucoside), M3GAc: malvidina-3-O-(6 -acetilglucoside), C3Gcm: cianidina-3-O-(6 -p-cumarilglucoside), Pt3Gcm: petunidina-3-O-(6 -p-cumarilglucoside), Pn3Gcm: peonidina-3-O-(6 -p-cumarilglucoside), M3Gcm: malvidina-3-O-(6 -p-cumarilglucoside), M3G4Vp: malvidina-3-glucoside-4-vinilfenolo, M3G4Vg: malvidina-3-4-vinilguaiacolo, M3GAc4Vp: malvidin-3-(6 -acetilglucoside)-4-vinilfenolo, M3Gcm4Vp: malvidin-3-(6 -p-cumarilglucoside)-4-vinilfenolo. (Kai Chen et al. 2018)**

I tannini aggiunti sembrano contribuire positivamente alla presenza di antocianine monomeriche e piranoantocianine nelle prove svolte utilizzando *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*. Per quanto riguarda invece *S. pombe V1*, viene registrata una riduzione del 65% in cianidina-3-glucoside e vitisine prodotte. Parallelamente l'aggiunta di tannini nelle prove svolte con gli altri ceppi sembra contribuire positivamente all'aumento di concentrazione di malvidina-3-glucoside e derivati. In conclusione, l'aggiunta di tannini enologici in fase pre-fermentativa ha scarsa influenza sulla cinetica di fermentazione dei ceppi oggetto di studio. Gli effetti positivi riscontrati riguardano incrementi di colorazione, tonalità ed un aumento della concentrazione di piranoantocianine prodotte nelle prove svolte utilizzando lieviti non-*Saccharomyces*. Questo risultato suggerisce quindi che i lieviti non convenzionali rispondono positivamente al trattamento con tannini enologici, adottato ormai comunemente nel mondo enologico.

## CONCLUSIONI

Gli aspetti che riguardano il colore dei vini, in particolare di un vino rosso, risultano essere tra i più complessi in enologia. La complessità non scaturisce solo dalla grande varietà di molecole altamente reattive coinvolte, ma riguarda anche il ruolo diretto dei lieviti, capaci di modulare aspetti importanti del colore. Nel seguente elaborato è stato ampiamente discusso il significato degli antociani dal punto di vista della struttura chimica e le reazioni chiave che portano alla colorazione finale di un vino rosso e alla successiva evoluzione del colore nel tempo. Gli antociani in soluzione sono soggetti a complessi equilibri chimici, dipendenti dal pH, capaci di influire direttamente sulla colorazione. Infatti, già durante la fase di ottenimento del mosto, gli antociani prendono parte a reazioni di copigmentazione, che li sottraggono alla decolorazione dovuta a reazioni di idratazione e di legame con l'anidride solforosa. Durante la fase fermentativa la stabilizzazione degli antociani continua mediante la formazione di legami covalenti con i tannini. I complessi formati durante questa fase determineranno poi non solo la colorazione finale del vino, ma anche la successiva evoluzione del colore a seguito dell'affinamento. Il ruolo degli starter convenzionali e di quelli costituiti da lieviti innovativi non-*Saccharomyces* nel modulare la colorazione di un vino rosso è l'obiettivo cardine di questo elaborato. Dagli studi analizzati emerge che l'effetto complessivo sulla colorazione da parte dei lieviti è frutto della combinazione di tre principali fattori: la formazione di piranoantocianine e vinilfenol-piranoantocianine, pigmenti che si aggiungono a quelli già presenti nel vino, la capacità di adsorbimento di antociani e polifenoli e la presenza sulla parete dei soli lieviti non-*Saccharomyces* di enzimi  $\beta$ -glucosidasi che portano a fenomeni di decolorazione. Inoltre, è stato proposto uno studio in cui si valutano gli effetti sulla colorazione dati dall'aggiunta di tannini enologici in presenza di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*. Il primo aspetto analizzato è la capacità dei lieviti di modulare la formazione di nuovi pigmenti colorati, piranoantocianine e vinilfenol-piranoantocianine. Questi si formano rispettivamente dal rilascio di metaboliti da parte dei lieviti che reagiscono direttamente con gli antociani in soluzione durante la fase fermentativa, e dall'azione dell'enzima HCDC, che converte gli acidi idrossicinnamici presenti in soluzione in vinilfenoli altamente reattivi in grado di interagire con le antocianine presenti. Questo permette non solo di portare alla formazione di vinilfenol-piranoantocianine stabili in soluzione ma anche di ridurre la quantità di etilfenoli, *off-flavour* prodotti da lieviti contaminanti in botte durante la fase di affinamento. I risultati degli studi a riguardo evidenziano differenze significative tra i generi di lievito analizzati. In merito alla specie, i

lieviti convenzionali presentano una buona capacità di modulare la formazione di pigmenti, che risulta comunque inferiore rispetto ai non-*Saccharomyces*. Riguardo al fenomeno dell'adsorbimento di antociani e polifenoli, gli studi riportati prendono in considerazione solo i lieviti *Saccharomyces* e le conclusioni sottolineano una destabilizzazione del colore legata alla presenza del lievito. Infatti, l'adsorbimento sulle pareti cellulari di antociani durante la fase fermentativa causa una riduzione di antociani liberi in soluzione. La quantità di antociani adsorbiti varia in relazione alle caratteristiche del ceppo, in particolare alla vitalità cellulare. Nello studio è stata dimostrata una forte correlazione negativa tra la vitalità cellulare e l'adsorbimento di pigmenti. Nel caso invece dell'adsorbimento di polifenoli, la maggior quantità di tannini sottratta dai lieviti, comporta una minor formazione di complessi stabili con gli antociani, esponendo maggiormente il vino agli effetti negativi causati da pH, ossigeno e SO<sub>2</sub>. Questi studi sottolineano l'importanza di scegliere il ceppo di lievito non solo per le performance fermentative o l'effetto aromatico, ma anche in base agli effetti sul colore. Esistono infatti lieviti ad alto, medio e basso adsorbimento di pigmenti colorati che possono avere impatti diversi a seconda della varietà d'uva impiegata. L'ultimo aspetto analizzato, ossia la presenza di  $\beta$ -glucosidasi di parete, riguarda esclusivamente i lieviti non-*Saccharomyces*, in quanto questa attività enzimatica è molto meno presente nei lieviti convenzionali. Questo risulta essere uno degli aspetti più rilevanti nell'utilizzo in cantina di lieviti non convenzionali. Infatti, l'attività  $\beta$ -glucosidasi di parete permette di aumentare l'intensità aromatica dei vini, trasformando i precursori varietali in molecole odorose. Per contro, questa stessa classe di enzimi partecipa alla decolorazione del vino trasformando le antocianine glicosilate. L'utilizzo di lieviti non convenzionali rappresenta un passo in avanti nel settore enologico ma, è importante tenere in considerazione il loro impatto sul colore. E' infatti consigliabile il loro utilizzo solo durante la vinificazione di mosti che presentano già una buona concentrazione di antociani e precursori aromatici. In questo modo viene favorita la produzione di pigmenti colorati, mitigando allo stesso tempo l'impatto negativo della decolorazione enzimatica. Inoltre, i lieviti non-*Saccharomyces* sembrano rispondere positivamente all'aggiunta di tannini enologici, come si è visto nell'ultimo caso di studio proposto. Durante la produzione di vini rossi, l'aggiunta di tannini risulta essere uno strumento molto impiegato, capace di influenzare positivamente aspetti legati alla qualità del vino. Sono in grado, infatti, di migliorare le caratteristiche organolettiche, proteggere dall'ossidazione e formare complessi colorati gli antociani. E' stato osservato che l'impiego dei tannini incrementa l'effetto positivo dei lieviti non *Saccharomyces* evidenziando la

vinificazione in rosso come il processo ideale per esaltare il ruolo di questi nuovi starter enologici.



## BIBLIOGRAFIA

Ana Fernandes, Joana Oliveira, Natércia Teixeira, Nuno Mateus, Victor de Freitas; A review of the current knowledge of red wine colour. 2017

Antonio Morata \* , Carlos Escott , Iris Loira , Juan Manuel Del Fresno, Carmen González and Jose Antonio Suárez-Lepe; Influence of Saccharomyces and non-Saccharomyces Yeasts in the Formation of Pyranoanthocyanins and Polymeric Pigments during Red Wine Making. 2019

A. Morata, S. Benito, I. Loira, F. Palomero, M.C. González, J.A. Suárez-Lepe; Formation of pyranoanthocyanins by Schizosaccharomyces pombe during the fermentation of red must. 2012

Fei He, Na-Na Liang, Lin Mu, Qiu-Hong Pan, Jun Wang, Malcolm J. Reeves, Chang-Qing Duan; Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. 2012

Dongbao Cai,, Xusheng Li, Jiali Chen, Xinwei Jiang, Xiaoqiang Ma, Jianxia Sun, Lingmin Tian, Sriram K. Vidyarthi, Jingwen Xu, Zhongli Pan, Weibin; A comprehensive review on innovative and advanced stabilization approaches of anthocyanin by modifying structure and controlling environmental factors. 2021

Johanna Bakker, Colin F. Timberlake; Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. 1997

Jelena Topić Božiča, Lorena Butinarb, Alen Albrehtc, Irena Vovkc, Dorota Kortea, Branka Mozetič Vodopivec; The impact of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts on wine colour: T A laboratory study of vinylphenolic pyranoanthocyanin formation and anthocyanin cell wall adsorption. 2020

Juan Manuel Del Fresno, Antonio Morata, Iris Loira, María Antonia Bañuelos, Carlos Escott, Santiago Benito, Carmen González Chamorro, José Antonio Suárez Lepe; Use of non-Saccharomyces in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. 2017

Julie Mekoue Nguela, Aude Vernhet, Nathalie Sieczkowski, Jean-Marc Brillouet ; Interactions of Condensed Tannins with Saccharomyces cerevisiae Yeast Cells and Cell Walls: Tannin Location by Microscopy. 2015

J. Mekoue Nguela, N. Sieczkowski, S. Roi, A. Vernhet; Sorption of Grape Proanthocyanidins and Wine Polyphenols by Yeasts, Inactivated Yeasts, and Yeast Cell Walls. 2015

Kai Chen,, Carlos Escott, Iris Loira, Juan Manuel del Fresno, Antonio Morata, Wendu Tesfaye, Fernando Calderon, Jose Antonio Suarez-Lepe, Shunyu Han, Santiago Benito; Use of non-Saccharomyces yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. 2017

Nuno Mateus, Joana Oliveira, Mafalda Haettich-Motta, Victor de Freitas; New Family of Bluish Pyranoanthocyanins. 2004

Ribereau-Gayon Pascal, Dubourdieu Denis, Doneche Bernard, Lonvaud Aline; Trattato di enologia 1 : Microbiologia del vino e vinificazione; Edagricole-New Business Media; 4° edizione; 2017

Sergio Echeverrigaray\*, Fernando Joel Scariot, Morgana Menegotto, Ana Paula Longaray Delamare; Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine T fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity. 2019