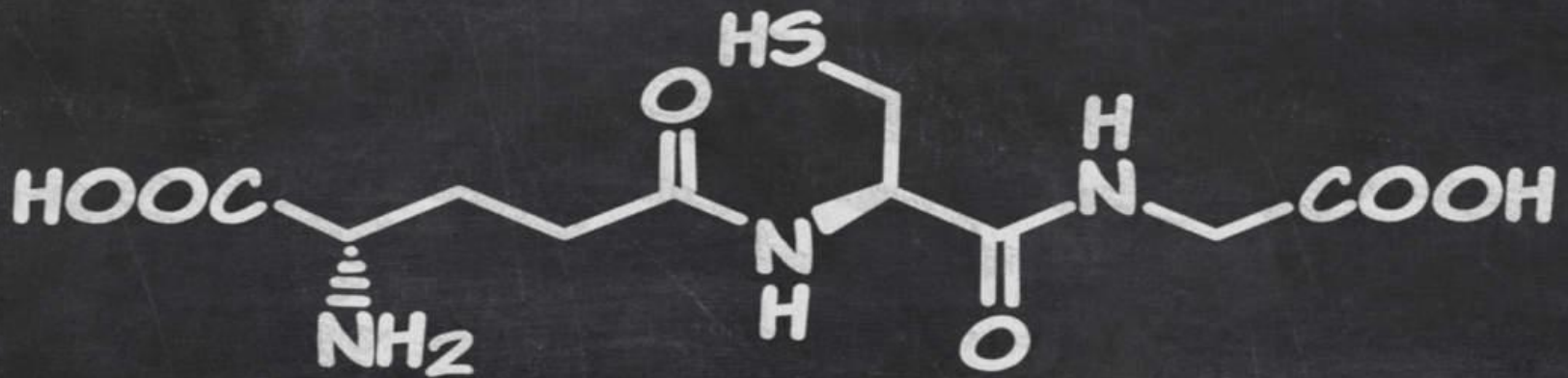
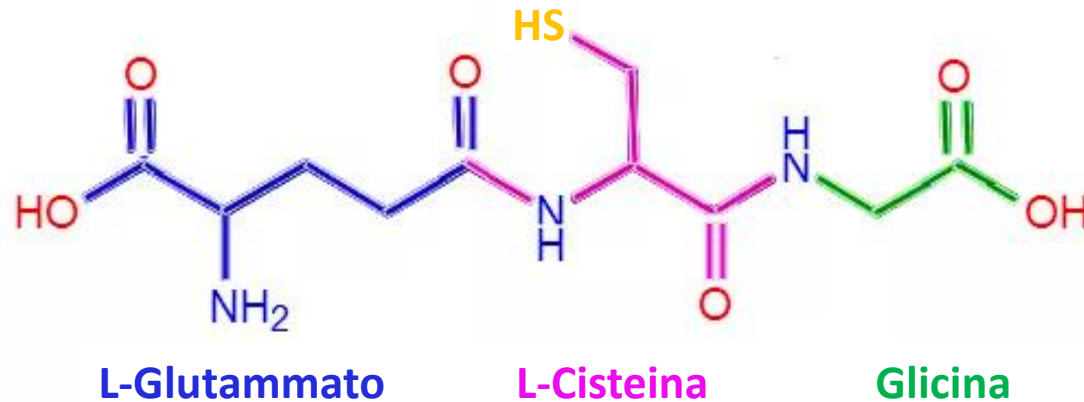


Glutathion



È il tiolo intracellulare non proteico più abbondante presente negli eucarioti e in molti organismi procarioti.

Il glutatione è un tripeptide composto da L-glutammato, L-cisteina e glicina



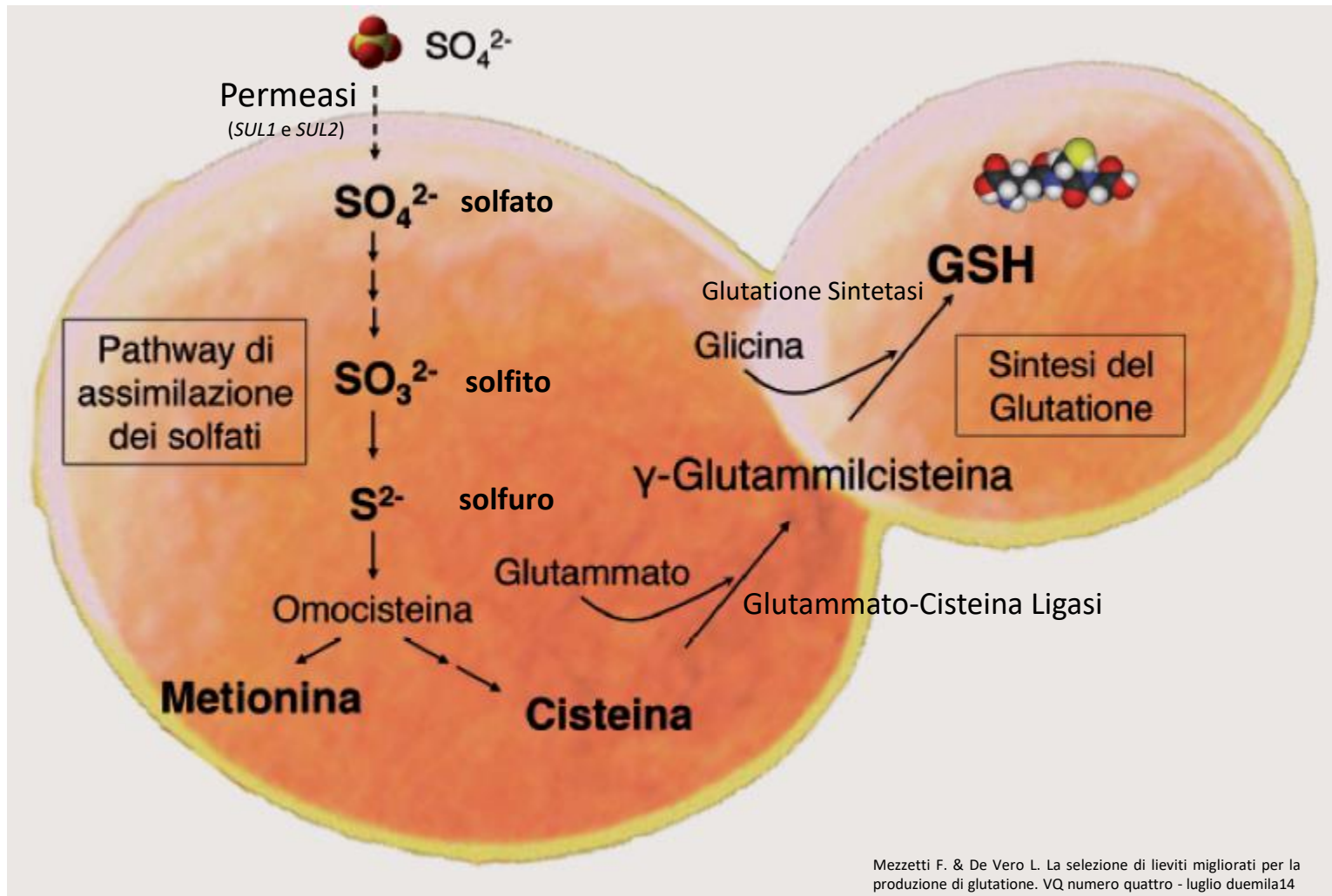
La sua importanza biologica è legata alla presenza del gruppo sulfidrilico sul residuo della cisteina, che gli conferisce potere riducente e proprietà nucleofile.

La concentrazione di glutatione nelle uve è molto variabile di conseguenza, i fattori che influenzano nel mosto la sua presenza sono molti, come:

- la tipologia di raccolta
- la maturazione delle uve
- l'esposizione all'ossigeno
- l'attività polifenolossidasi
- la macerazione pre-fermentativa con le bucce
- la pressatura
- il contenuto di GSH viene modificato dall'azione dei lieviti

In *Saccharomyces cerevisiae*, il GSH è presente naturalmente a concentrazioni elevate, rappresentando più del 90% dei tioli a basso peso molecolare.

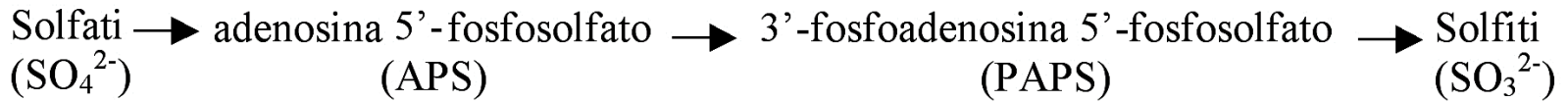
La biosintesi del GSH nei lieviti: metabolismo dello zolfo e degli amminoacidi solforati metionina e cisteina



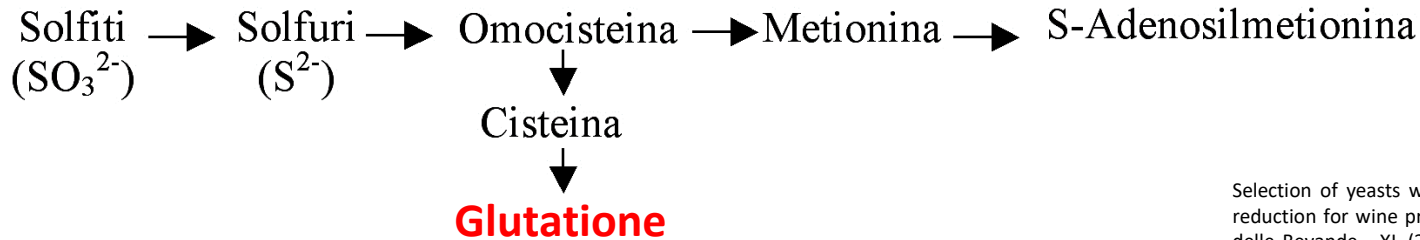
Il solfato entra nelle cellule a traverso un sistema di trasporto attivo, è trasformato in solfito e successivamente è ridotto a solfuro dall'enzima solfito reductasi.

Metabolismo dei solfati in *Saccharomyces cerevisiae*

Attivazione dei solfati e produzione di solfiti:



Riduzione dei solfiti a solfuri e biosintesi di Cisteina e Metionina:



Selection of yeasts with impaired sulfate and sulfite reduction for wine production without SO_2 . *Industrie delle Bevande* - XL (2011) agosto ANNO 40 - N. 234. ISSN 0390-0541

· Schema del metabolismo dei solfati in *Saccharomyces cerevisiae*.

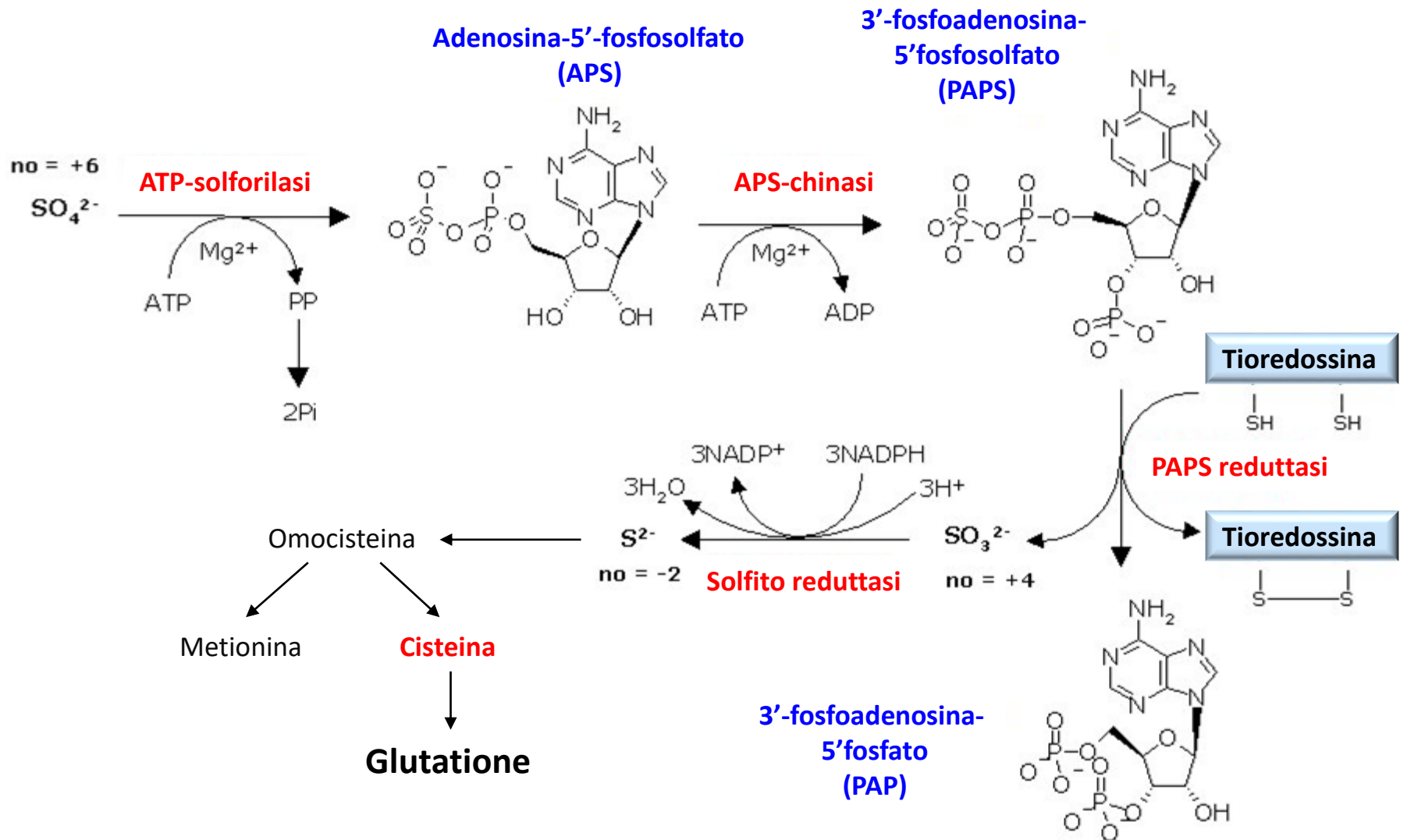
L'attivazione dei solfati avviene attraverso una serie di reazioni sequenziali:

- la prima consiste nella fosforilazione dei solfati con formazione di APS (ATP solforilasi),
- la seconda consiste in un'ulteriore fosforilazione con formazione di PAPS (APS chinasi)
- la terza consiste nella riduzione del PAPS a solfito (PAPS reduttasi che richiede la presenza della tioredossina-SH)
- i solfiti ottenuti vengono successivamente ridotti a solfuri (solfito reduttasi)

Infine, lo zolfo ridotto viene utilizzato per la biosintesi degli aminoacidi solforati.

Il *S. cerevisiae* produce solfiti, in quantità variabili secondo la composizione del mosto, il tipo di ceppo e le condizioni di fermentazione, anche quando non viene aggiunta la solforosa durante la vinificazione, quindi, nel vino finale si ritroverà una quantità di solfiti non esogeni che può arrivare a superare, con alcuni ceppi di lievito, i 100 mg/L.

Reazioni sequenziali necessarie per attivare i solfati



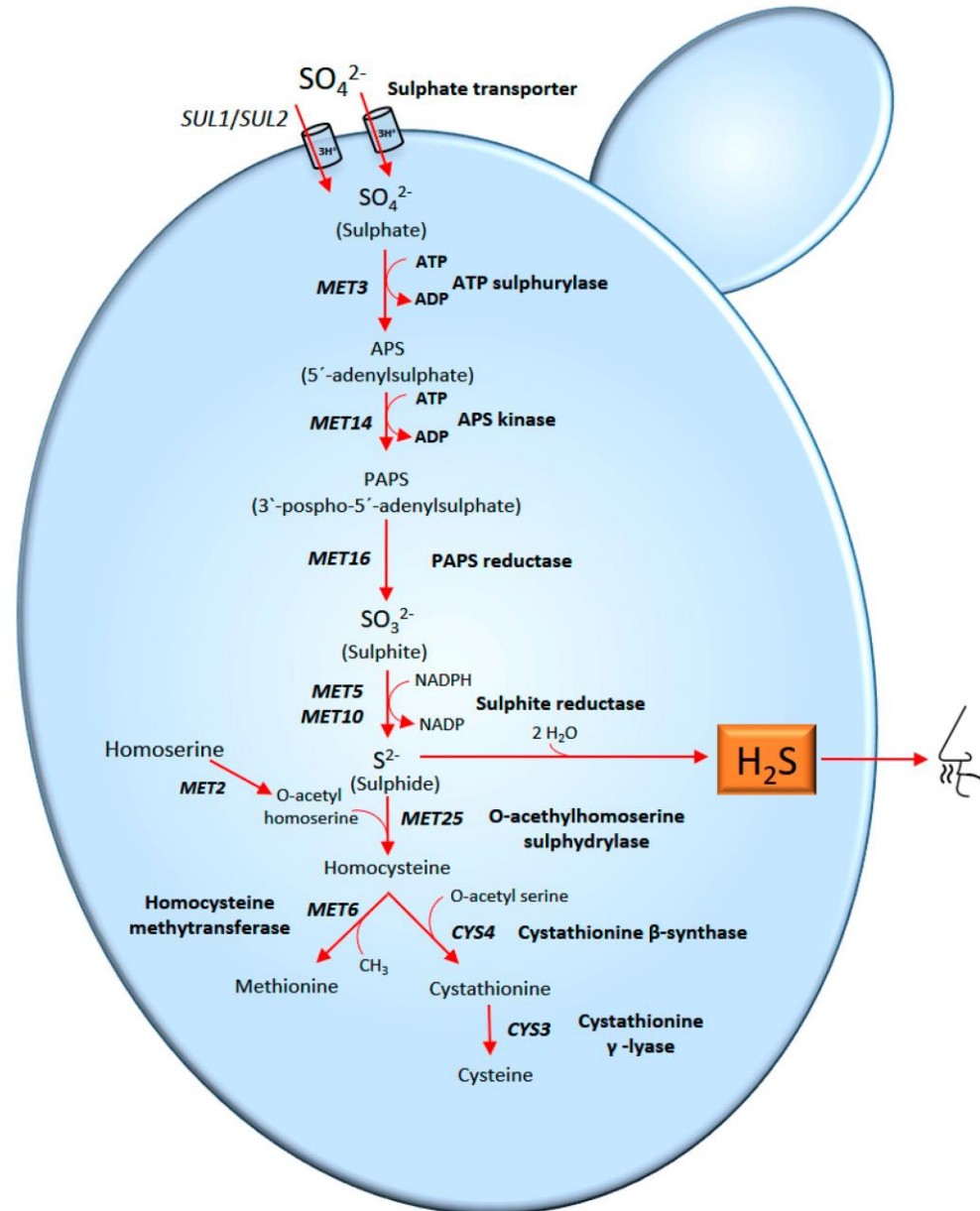
Riassunto del metabolismo dello zolfo e degli aminoacidi solforati metionina e cisteina nel *Saccharomyces*

La prima fase del percorso consiste nell'assorbimento del solfato attraverso due specifiche permeasi in co-trasporto con $3H^+$. Il solfato viene ridotto a solfuro in più passaggi utilizzando gli enzimi ATP solforilasi e solfito reductasi. Successivamente, il solfuro si combina con l'o-acetil omoserina per formare omocisteina che può essere trasformata in metionina. L'omocisteina insieme all'o-acetil serina forma cisteina.

Questa via è indotta quando c'è una richiesta metabolica di cisteina e metionina, che sono solitamente limitate nel mosto. Quando le fonti di azoto sono insufficienti, anche i precursori di questi aminoacidi (o-acetil serina e o-acetil omoserina) saranno limitati.

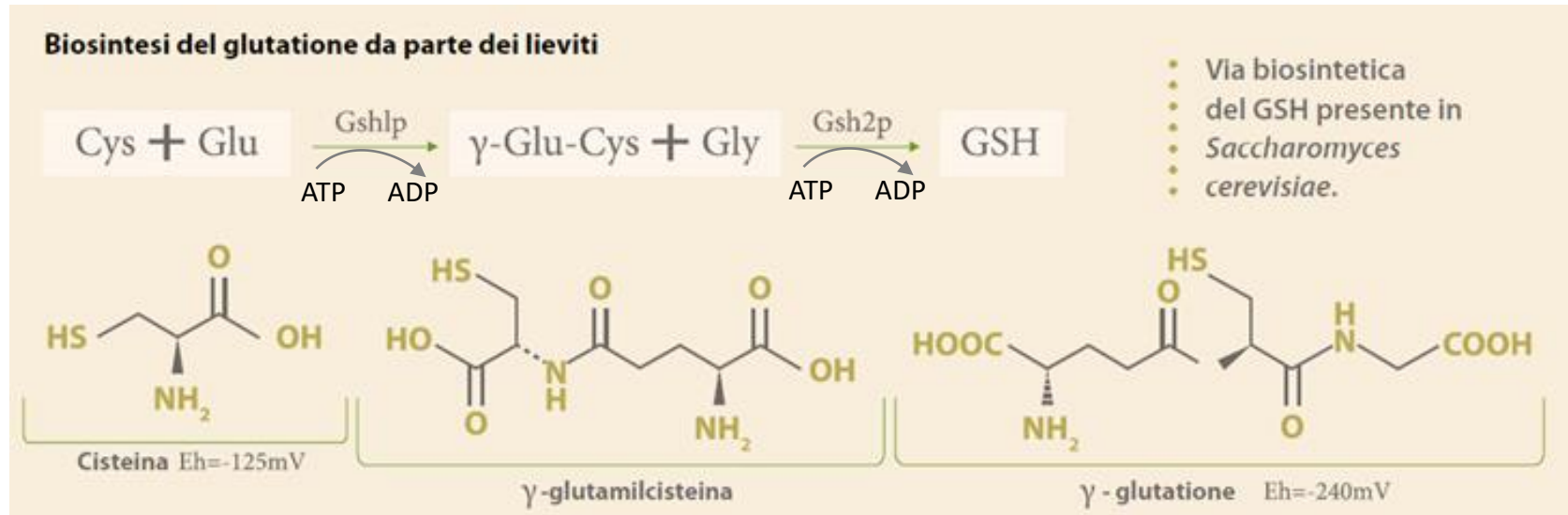
Il solfuro non utilizzato per formare metionina o cisteina produce acido solfidrico (H_2S).

Questo gas volatile può accumularsi e diffondersi nel vino con conseguente odore sgradevole.



Metabolismo dei solfati in *Saccharomyces cerevisiae*

Il glutathione viene sintetizzato da due passaggi ATP dipendenti:



- nel primo, l'intermedio γ -glutamylcisteina (γ -EC) è sintetizzato a partire da glutammato e cisteina attraverso l'enzima **glutamato-cisteina ligasi** (Gsh1p). Questa reazione è il fattore limitante nella sintesi del glutathione.
- Nel secondo, la glicina viene aggiunta al C-terminale della γ -glutamylcisteina tramite l'enzima **glutathione sintetasi** (Gsh2p).

L'attività dell'enzima γ -glutamylcisteina sintetasi è regolata mediante feedback negativo dal glutathione.

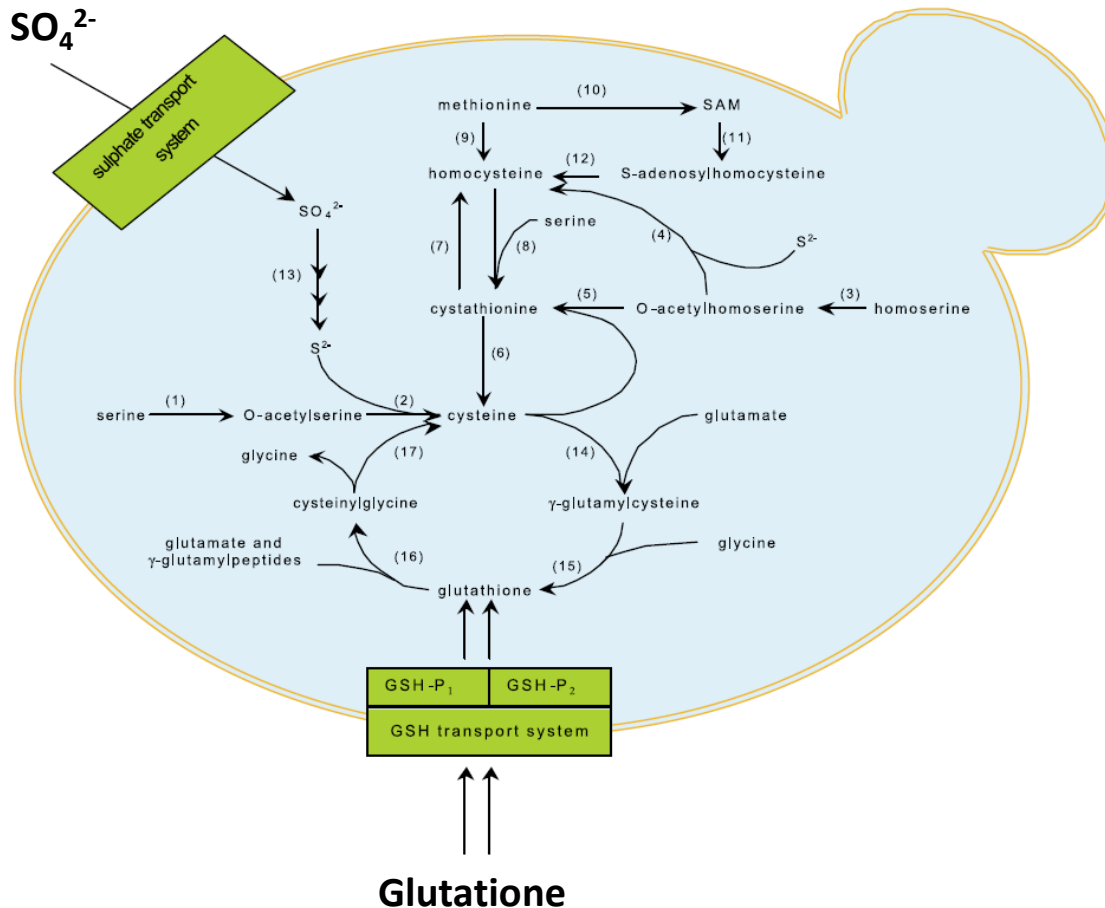
Oltre alla biosintesi endogena, il GSH può anche essere assorbito dall'ambiente extracellulare. Ci sono specifici trasportatori che mediano l'assorbimento di GSH nei microrganismi, piante e tessuti animali.

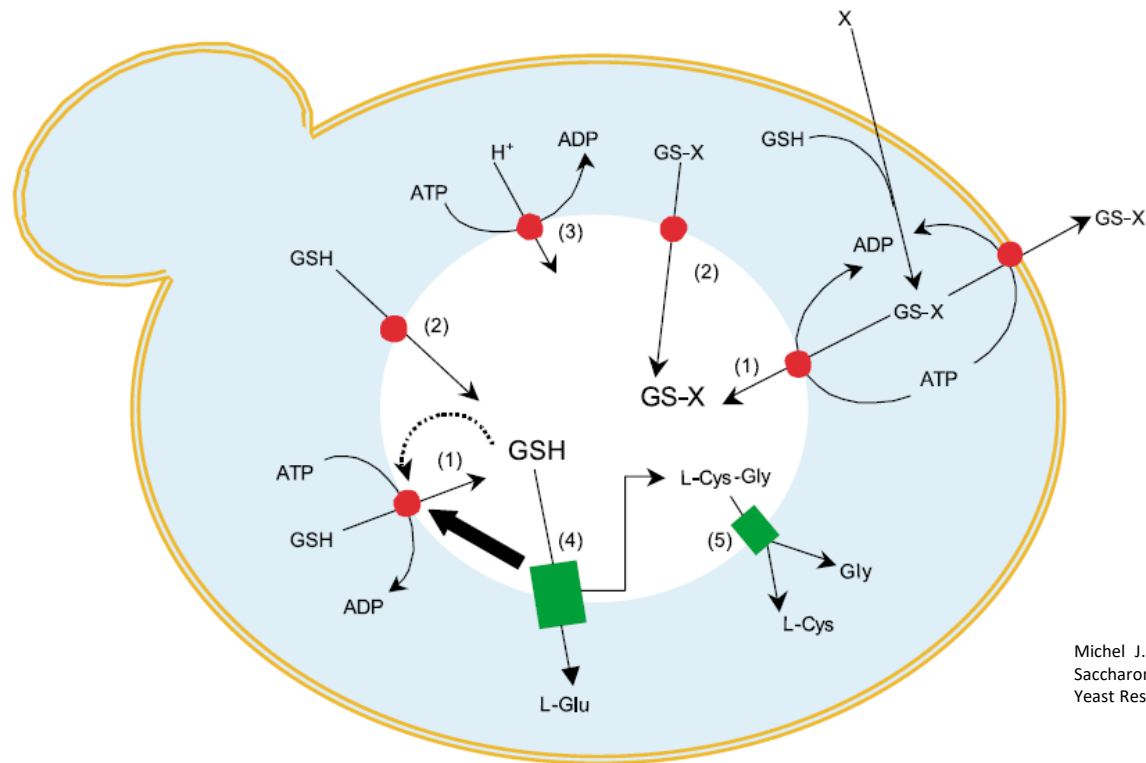
In *Saccharomyces cerevisiae* esistono due sistemi di trasporto GSH cineticamente distinguibili:

Il GSH-P1 (alta affinità) è un sistema regolato e guidato dall'ATP e risponde alla richiesta di zolfo, mentre il GSH-P2 (bassa affinità) non è regolato.

Il *Saccharomyces cerevisiae* può usare metionina, omocisteina, cisteina o GSH come unica fonte di zolfo.

Quando le cellule di *S. cerevisiae* sono totalmente prive di qualsiasi fonte esterna di zolfo, il GSH è utilizzato come fonte endogena di zolfo.





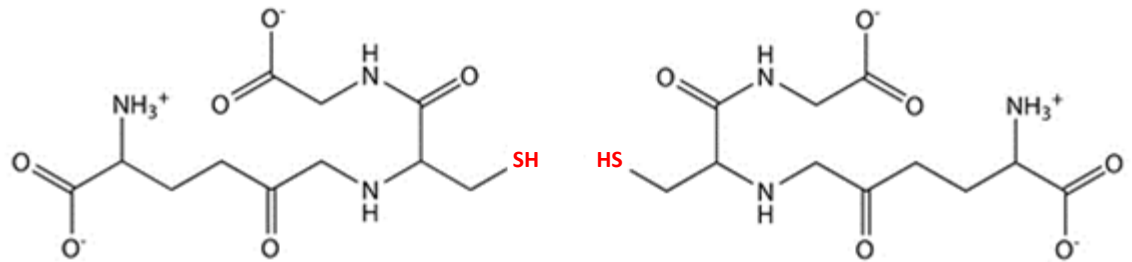
Michel J. Penninckx. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research* 2 (2002) 295-305

Fig. 4. A synthetic model for GSH and GS-X transport and metabolism in *S. cerevisiae* [27,58]. GSH and GS-X are transported into the central vacuole by Ycf1p (1) and a V-ATPase-coupled anion uniporter system (2 and 3). GSH is further degraded by γ -GT (4) and CGase (5). Ycf1p is activated by γ -GT (solid arrow). GSH accumulated in the vacuole exerts a feedback effect on its transport by Ycf1p (dotted arrow). GS-X is also possibly transported out of the cell by an ATP-linked system (6).

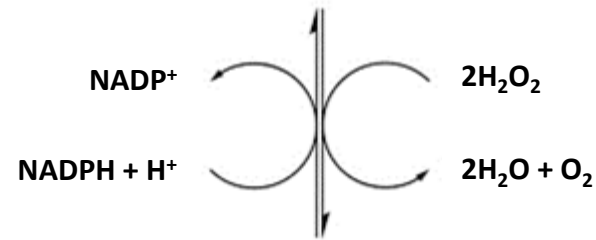
Quando il *S. cerevisiae* ha carenze di azoto, più del 90% del GSH cellulare si sposta verso il vacuolo centrale e si accumula nello spazio vacuolare dove esercita un effetto di feedback sul proprio ingresso nell'organulo. Il GSH immagazzinato viene ulteriormente degradato. Sembra che la γ -glutamiltanspeptidasi (4) e una **L-cisteinil glicina dipeptidasi** (5) catalizzino l'idrolisi completa del GSH prima del rilascio dei suoi aminoacidi costitutivi, L-Glu, Lcys, e Gly, nel citosol. Questo meccanismo può concedere al lievito «affamato» di utilizzare gli aminoacidi costituenti il GSH come fonte di azoto per compire la propria crescita.

Le cellule eucariotiche hanno la capacità di eliminare un'ampia gamma di tossine lipofile dal citosol solo dopo la loro coniugazione con il glutathione (GS-X). Questo processo è mediato da una pompa ATP dipendente che catalizza l'efflusso del GS-X dal citosol attraverso la membrana plasmatica.

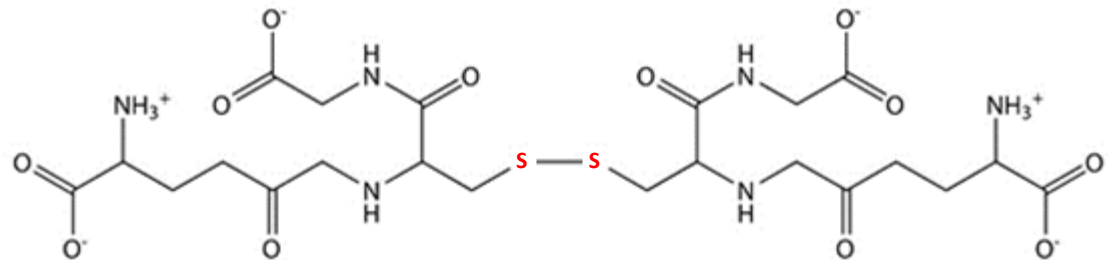
Stato redox del Glutathione



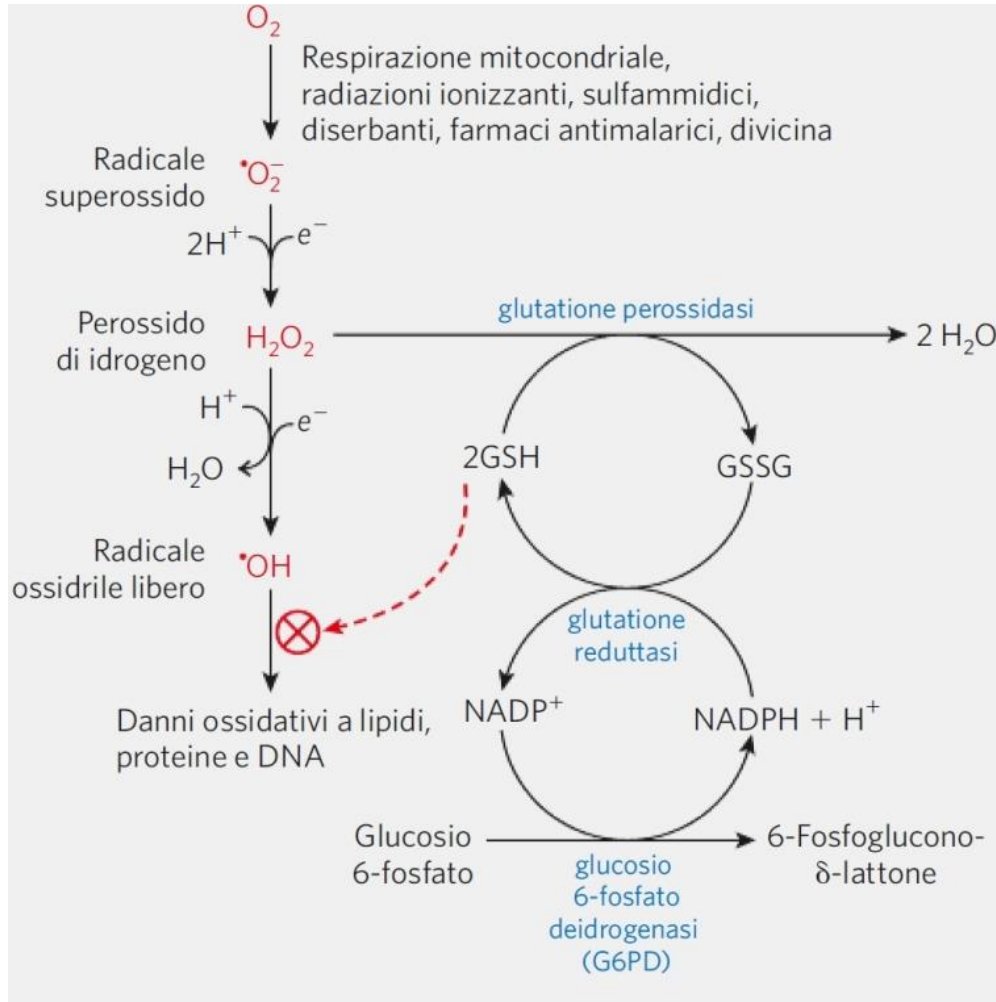
glutathione reduttasi



Lo stato redox del Glutathione, ovvero l'alternarsi della forma ossidata (GS-SG) e di quella ridotta (GSH) è un indicatore per definire lo stato redox della cellula



Ruolo del NADPH e del glutatione nella protezione delle cellule contro i derivati altamente reattivi dell'ossigeno



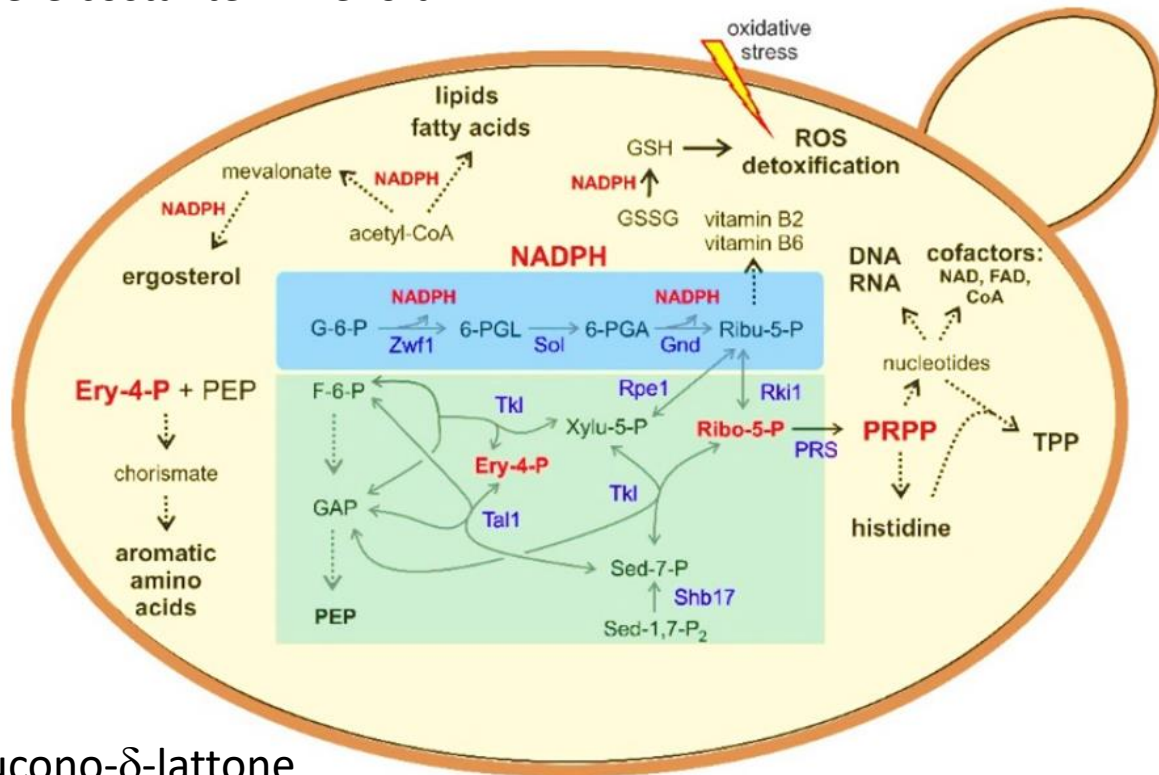
Il glutatione ridotto (GSH) protegge la cellula degradando il perossido di idrogeno e i radicali ossidrilici liberi.

La rigenerazione di GSH dalla sua forma ossidata (GSSG) richiede il NADPH prodotto nella reazione catalizzata dalla glucosio 6-fosfato deidrogenasi.

Per sostenere il ciclo redox del GSH/GSSG, indispensabile per la rimozione dei perossidi, è necessario mantenere costante il livello di NADPH.

Citoplasma: via dei pentosi fosfati

la catalisi dell'enzima G6PDH è la prima reazione che genera il NADPH e fornisce un potere riducente per la sintesi degli acidi grassi e lipidi così come la riduzione del glutatione necessario per la disintossicazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).



Glucosio 6-fosfato → 6-fosfo-D-glucono-δ-lattone

G6PDH



6-fosfogluconato → D-ribulosio 5 fosfato

Fosfogluconato-DH

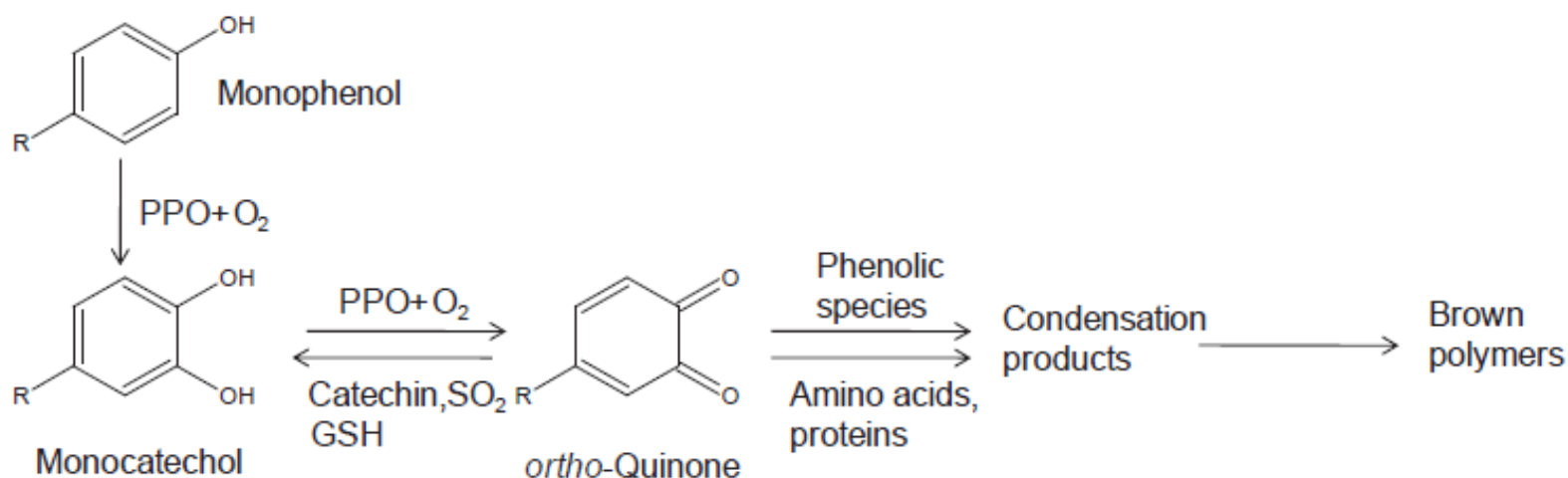
Nel *Saccharomyces cerevisiae*:

- Il deficit genetico di G6PDH si manifesta quando ci sono condizioni di stress ossidativo e si produce poco NADPH per mantenere il glutatione nel suo stato ridotto.
- Lo stress ossidativo si verifica quando le cellule sono esposte ad alti livelli di ROS come i perossidi (H_2O_2), idroperossidi (ROOH) e l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$).
- Il GSH svolge un ruolo importante nella risposta allo stress ossidativo, in particolare per i ROOH derivati dai lipidi insaturi delle membrane biologiche come il cumene idroperossido, t-butil idroperossido o idroperossido lipidico endogeno (LOOH).
- La glutatione perossidasi (GPx) è un enzima chiave nei meccanismi di difesa contro gli idroperossidi:



- In *Saccharomyces cerevisiae* esistono tre GPx, denominate Gpx1p, Gpx2p e Gpx3p
- La Gpx1 è indotta dalla richiesta di glucosio, la Gpx2 è indotta dallo stress ossidativo, mentre la Gpx3 è costitutiva.

L'imbrunimento enzimatico ha inizio con l'ossidazione da parte della PPO dell'acido caftarico con la conseguente produzione di acido caffeoiltartarico o-chinone, questo composto è un forte ossidante capace di ossidare altri composti del vino sia di natura fenolica che non fenolica, portando infine, soprattutto in presenza di valori elevati di pH, alla formazione di pigmenti bruni.



Enzymatic browning process in grape must (Li et al., 2008).

La modalità più diffusa per il controllo dell'imbrunimento enzimatico in mosti e vini è il trattamento con SO_2 , la quale già a basse dosi è in grado di inattivare l'attività catecolasica.

l'interazione di GSH con sistemi biochimici cellulari

È un forte antiossidante, intervenire inibendo l'azione di metaboliti tossici o di scarto che vengono prodotti in continuazione durante i normali processi metabolici.

È implicato in molti meccanismi di difesa contro gli stress ambientali durante la fermentazione alcolica:

- il pH basso
- la carenza di nutrienti
- lo shock da temperatura
- lo stress osmotico dovuto ad una elevata concentrazione zuccherina
- lo stress ossidativo e da prodotti tossici derivanti dalla fermentazione come il metilglossale
- Lo stress da metalli pesanti

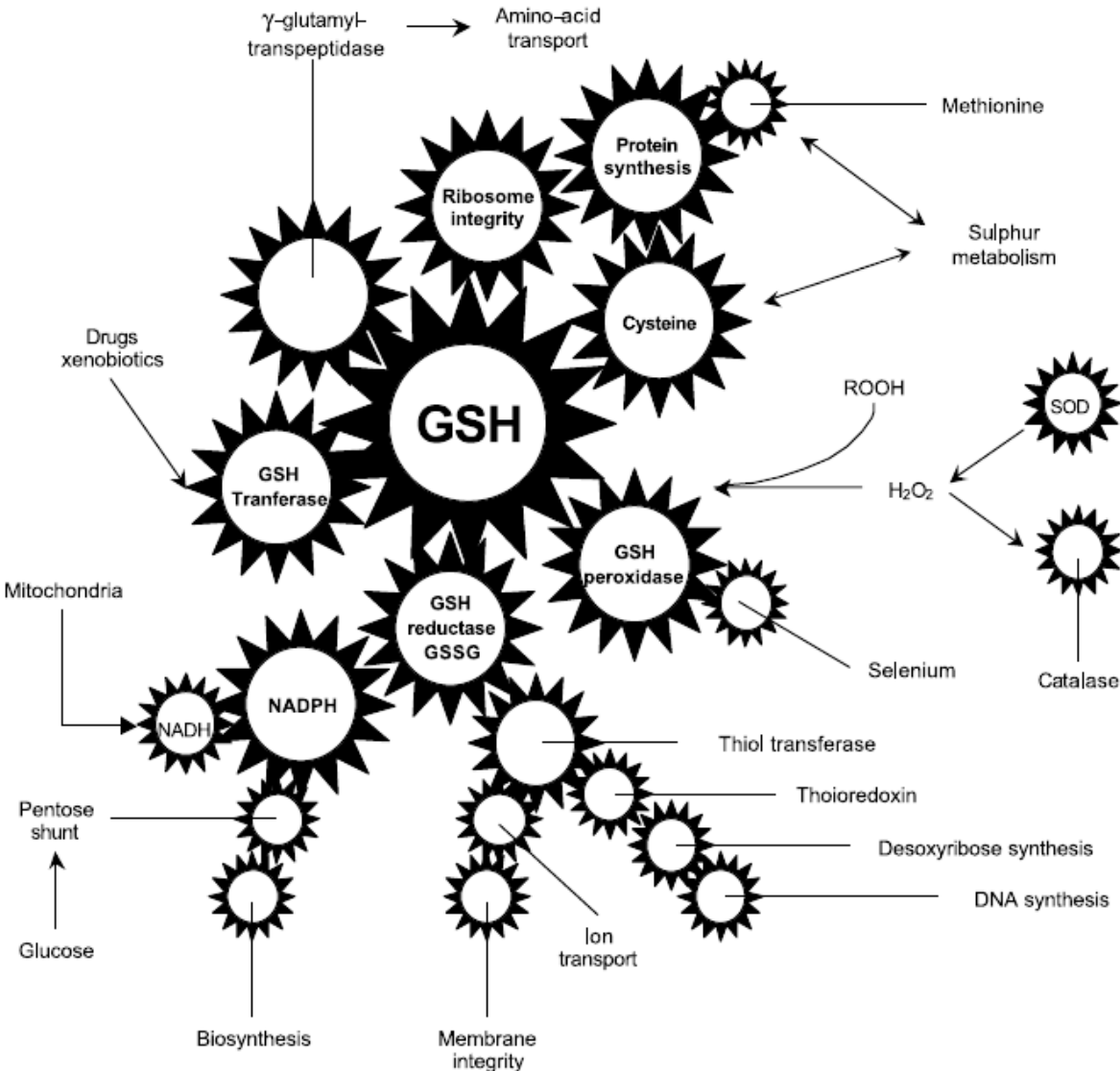


Fig. 1. The interrelationship of GSH with cellular biochemical systems [3].

I composti tiolici, detti anche composti solforati o mercaptani, rientrano nell'aroma tipico di alcune varietà di frutti e di uva.

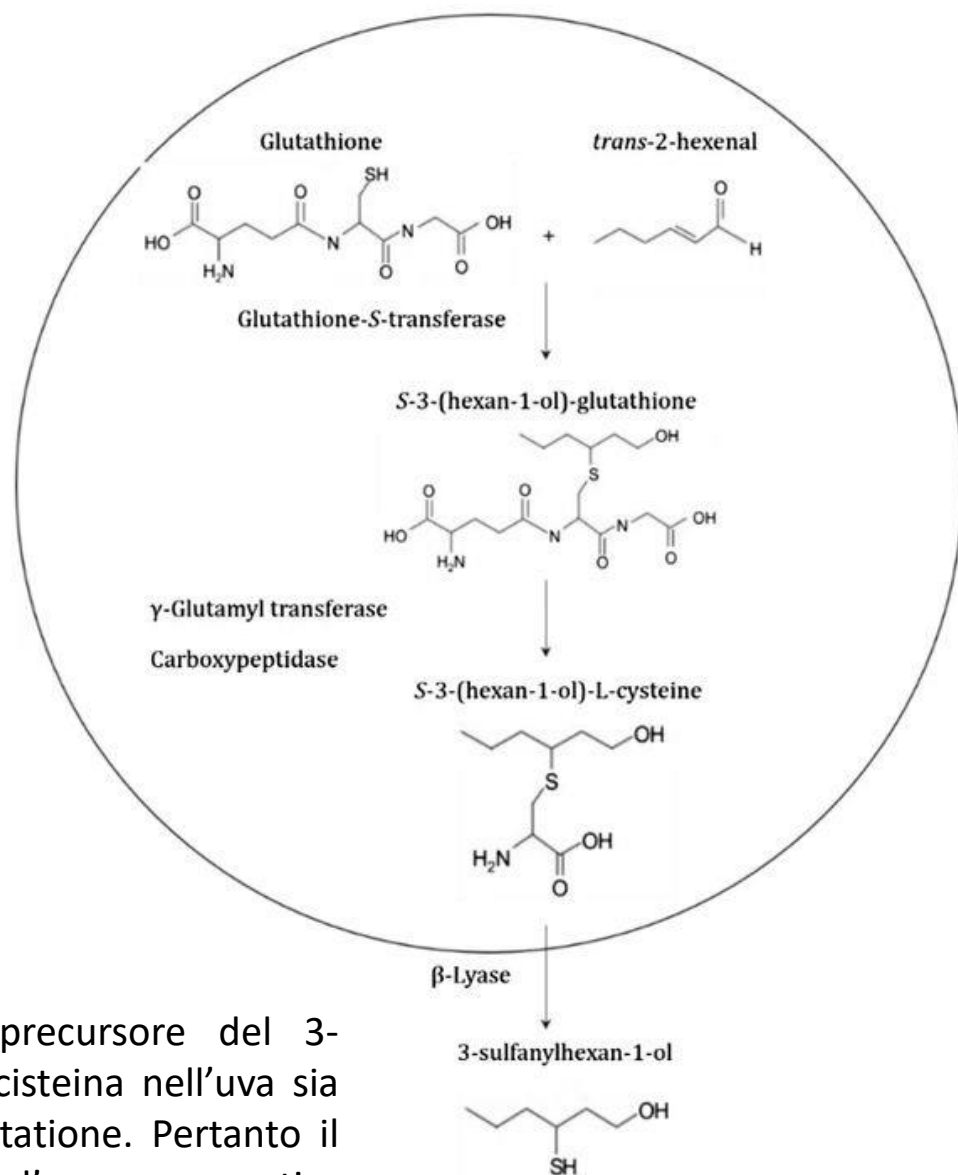
Tra i principali composti tiolici si riscontrano:

il 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (**4MMP**), il 3-mercapto-esan-1-olo (**3MH**) e l'acetato di 3-mercapto-esile (**A3MH**), responsabili delle note di bosso (4MMP, A3MH), di ginestra (4MMP), di pompelmo (3MH) e di frutto della passione (3MH, A3MH).

Le note di tostato e grigliato, sono imputabili alla presenza del 2-mercaptoetilacetato e 3-mercaptopropilacetato.

Altri tioli riscontrabili sono il 4-metil-4-sulfanilpentan-2-one (**4MSP**) e il 3-sulfanilesan-1-olo (**3SH**).

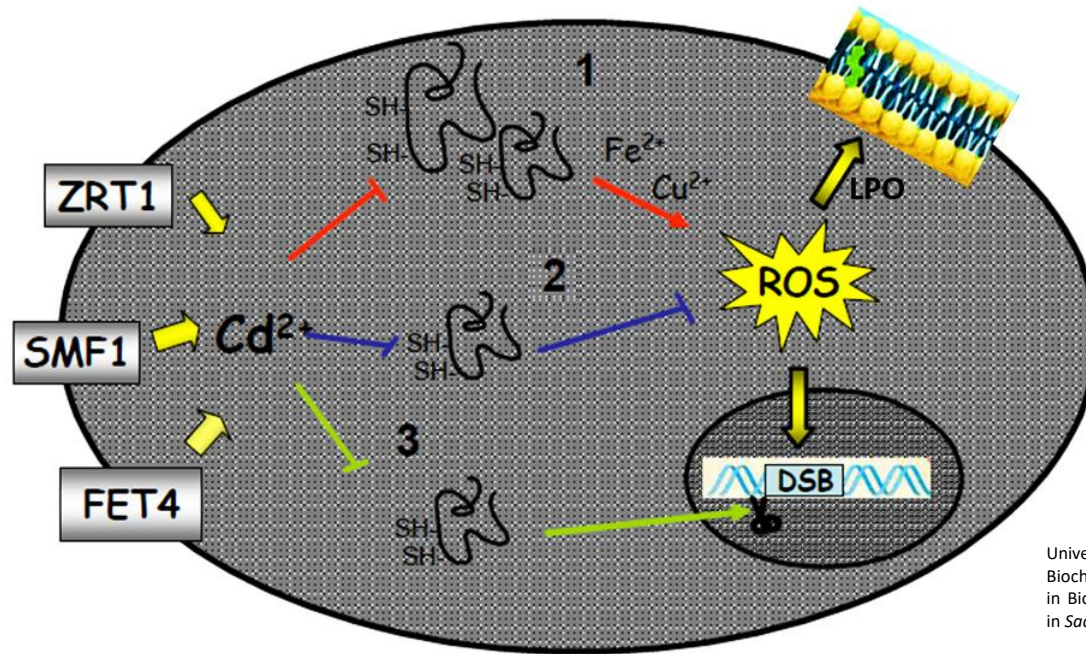
Sembra che S-3-(esan-1-olo)-L-cisteina, sia il precursore del 3-mercaptoesan-1-olo, e che la S-3-(esan-1-olo)-L-cisteina nell'uva sia prodotta dal catabolismo dell'S-3-(esan-1-olo)-glutathione. Pertanto il glutathione svolge un ruolo fondamentale nell'acino d'uva per garantire la formazione S-3-(esan-1-olo)-L-cisteina



Stress da metalli pesanti nei lieviti

- Il GSH è naturalmente presente nel *S. cerevisiae* a concentrazioni elevate che vanno dallo 0,1% all'1% del peso secco cellulare, rappresentando più del 90% dei tioli a basso peso molecolare. Il GSH ha un ruolo fondamentale per i lieviti, è coinvolto in molte funzioni cellulari essenziali come il controllo del potenziale Redox, l'azione antiossidante e la capacità detossificante da metalli pesanti. Grazie all'estrema reattività dei metalli con i gruppi tiolici dei residui di cisteina, la cellula presenta due tipologie diverse di componenti: Il glutatione e la famiglia di proteine metallotioneine (MT) che giocano un ruolo essenziale nel sequestro intracellulare degli ioni metallici.
- Ad esempio gli ioni Cd, As e Hg formano addotti cellulari GSH-Me che vengono incorporati all'interno di compartimenti intracellulari, come il vacuolo, al fine di diminuirne la concentrazione citosolica.
- Le proteine coinvolte nel mantenimento dei livelli di ioni metallici all'interno della cellula del *Saccharomyces cerevisiae*, sono proteine a basso peso molecolare, ricche di gruppi tiolici. L'azione delle MT si esplica grazie alla forza chelante fornita dagli abbondanti residui di cisteina presenti all'interno della struttura proteica ed è considerata essenziale nella detossificazione dei metalli. Le MT hanno grande affinità per gli ioni Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} e sono indotte da un innalzamento delle concentrazioni di questi ioni, mentre non proteggono la cellula dalla tossicità da Ni o Co.
- Oltre al GSH e alle MT, il lievito ha altri composti che fungono da potenziali ligandi nei confronti delle specie metalliche, come ad esempio acidi carbossilici (malico e citrico) e amminoacidi (istidina) che sono in grado di giocare un ruolo nella tolleranza e nella detossificazione nei confronti di queste specie tossiche.

Effetti intracellulare prodotti nel lievito in seguito alla esposizione di ioni Cd^{2+}



Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare. Dottorato di Ricerca in Biotecnologie XX Ciclo. Tossicogenomica dei metalli in *Saccharomyces cerevisiae* di Gessica Marchini.

L'assorbimento degli ioni Cd^{2+} avviene attraverso i trasportatori di membrana (Fet4, Smf1 e Zrt1).

Esercitano un'azione dannosa per la cellula principalmente attraverso tre meccanismi:

- sono in grado di reagire con le macromolecole biologiche alterando la loro funzionalità (1).
- sono in grado di interagire e inibire le difese antiossidanti della cellula (2), portando alla formazione di radicali liberi, in particolare le specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), in grado di catalizzare un deterioramento ossidativo dei principali costituenti cellulari.
- sono in grado di interagire con i componenti deputati al riparo del DNA danneggiato.

Nelle disintossicazioni dai metalli pesanti è coinvolto il GSH.

Il glutazione nell'uva

Il glutatione è presente in quantità importanti già nell'acino d'uva. I suoi meccanismi di accumulo nell'uva sono a tutt'oggi poco conosciuti. Sembra che l'alimentazione azotata ed idrica della pianta intervengano in modo significativo.

I mosti carenti in azoto contengano sistematicamente minor quantità di glutatione.

Il tenore riscontrato nei mosti varia da qualche mg fino ad una ventina di mg/L.

Recenti lavori hanno dimostrato il ruolo nella prevenzione dell'invecchiamento aromatico prematuro dei vini bianchi.

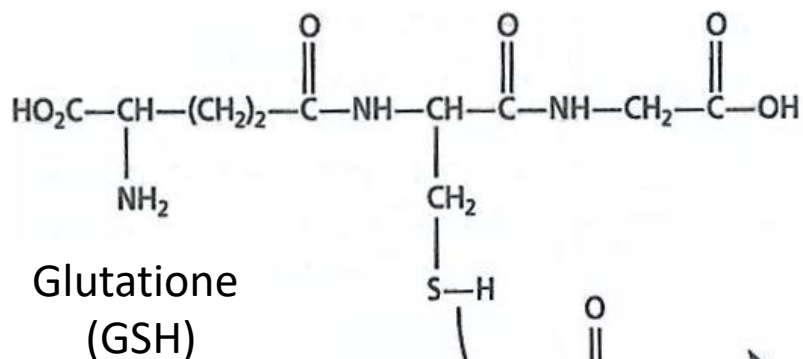
Nell'uva così come nel vino, una parte di GSH può essere presente sotto forma ossidata.



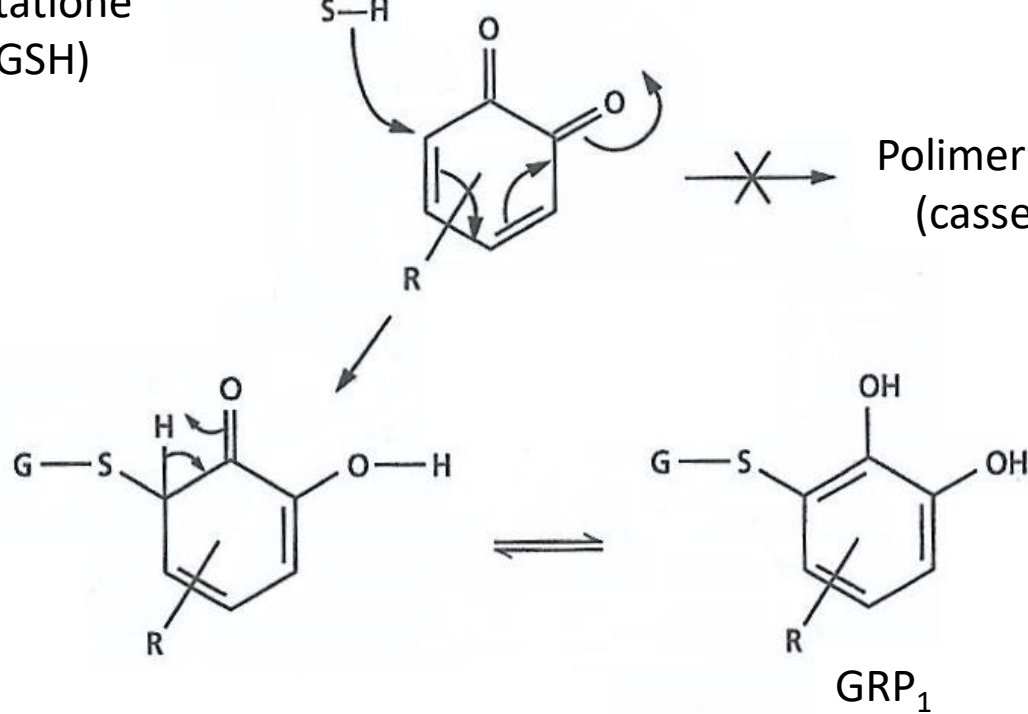
Dubordieu et al. Ruolo del glutatione nell'evoluzione dei vini bianchi secchi. Vinidea. Net, Rivista Internet Tecnica del Vino, 2003, n.7

Incidenza della nutrizione azotata di un vigneto rispetto al tenore in GSH in mosti di uve bianche

	Mosto 1	Mosto 2	Mosto 3	Mosto 4	Mosto 5	Mosto 6	Mosto 7	Mosto 8
Azoto assimilabile (mg/L ⁻¹)	62	244	76	202	224	56	187	42
Glutazione (mg/L ⁻¹)	12	28	17	28	25	6	22	4



Struttura del glutatione e sua reazione con i chinoni (acido caftarico) che derivano dall'ossidazione dei polifenoli.



Dubordieu et al. Ruolo del glutatione nell'evoluzione dei vini bianchi secchi. Vinidea. Net, Rivista Internet Tecnica del Vino, 2003, n.7



Il glutathione ridotto svolge numerose funzioni nel mosto e nel vino

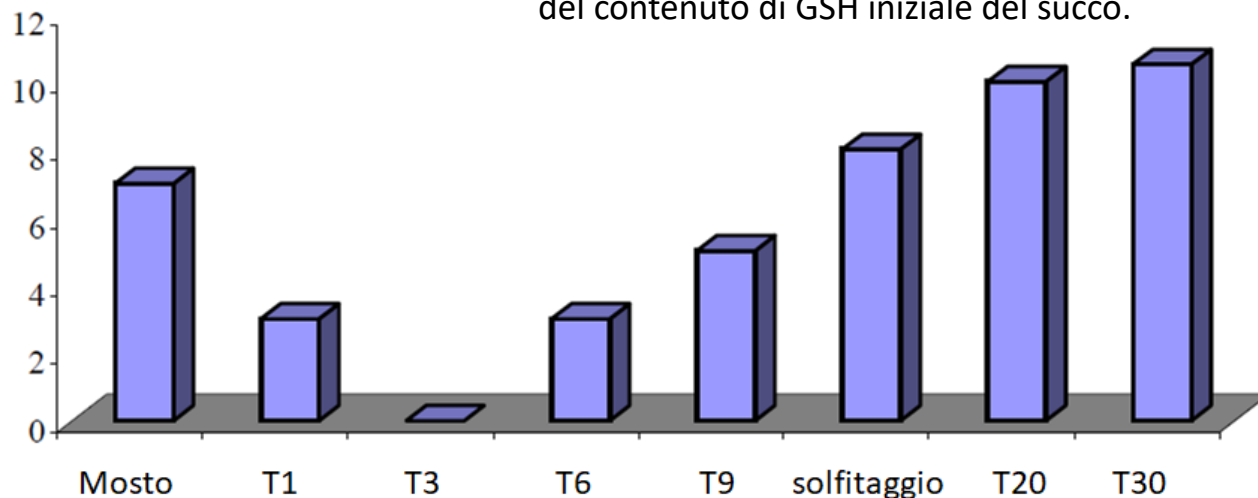
L'uva rappresenta la prima fonte potenziale del GSH la cui concentrazione nel succo può superare 100 mg/kg in relazione alla cultivar, alle condizioni ambientali e alle pratiche di coltivazione.

La quantità di GSH nel mosto è compresa tra 10 e 20 mg/L ed è influenzata dall'esposizione all'ossigeno e dall'attività ossidativa.

- Riduce gli o-chinoni prodotti dall'azione delle polifenolo ossidasi responsabili del colore bruno dei mosti e dei vini bianchi.
- Il GSH esercita un effetto protettivo nei confronti degli aromi tiolici.
- Il GSH rallenta la formazione del (3-idrossi-4,5-dimetil-2(5H) furanone) (sotolone) responsabile del difetto olfattivo caratteristico dell'invecchiamento atipico dei vini bianchi.

Il ruolo del glutatione sull'evoluzione aromatica dei vini bianchi secchi

Concentrazione di glutatione (mg/L)



È stato dimostrato che il contenuto di GSH oscilla durante la fermentazione alcolica a seconda del ceppo di lievito e del contenuto di GSH iniziale del succo.

Evoluzione del glutatione nei mosti durante la fermentazione

Dubordieu, Lavigne-Cruege. Ruolo del Glutatione nell'evoluzione dei vini bianchi secchi. Vinidea. Net. Rivista Internet Tecnica Del Vino, 2003, N.7

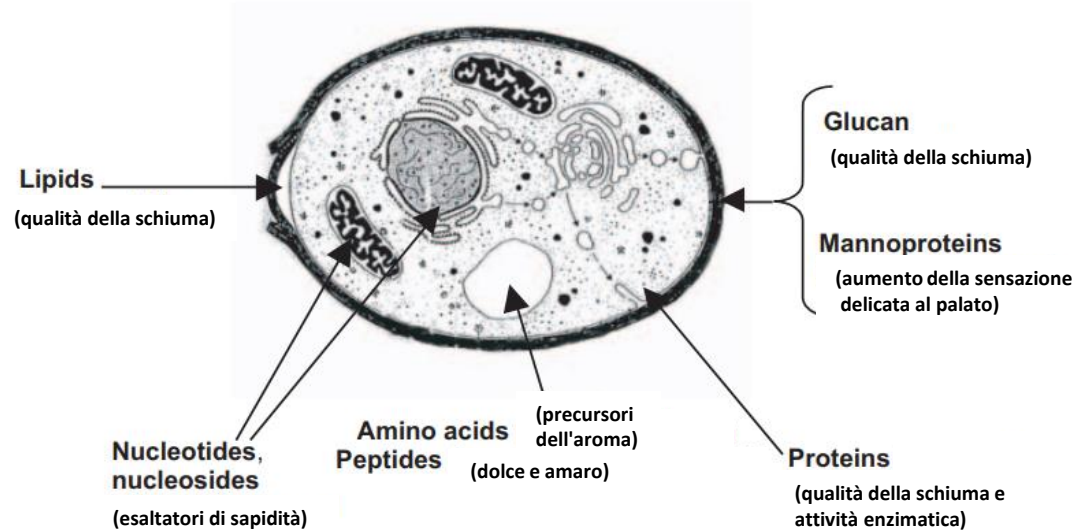
I livelli di glutatione nel vino vanno da valori non rilevabili a 70 mg/L, con una variabilità relativamente alta. Queste concentrazioni diminuiscono durante la conservazione e l'affinamento del vino. Il glutatione che rappresenta più del 95 % del pool intracellulare dei tioli a basso peso molecolare nelle cellule di lievito è indispensabile per la loro moltiplicazione.

la scelta del ceppo adeguato di *Saccharomyces cerevisiae* può influenzare positivamente il livello di GSH

Il rilascio di GSH nel vino è correlato alle condizioni di crescita del lievito in modo particolare alla carenza di azoto nel corso della fermentazione alcolica.

Nei mosti carenti in azoto (concentrazioni inferiori a 160 mg/L) il tenore in GSH risulta più basso.

Composti rilasciati durante l'autolisi



Origin of the different compounds released by yeasts during autolysis and their potential impact on stability and organoleptic properties of wine.

C. Charpentier. 6. Ageing on lees (sur lies) and the use of speciality inactive yeasts during wine fermentation. Université de Bourgogne, France. Woodhead Publishing Limited, 2010