

EVOLUZIONE DEL GLUTATIONE DURANTE LA VINIFICAZIONE

D. FRACASSETTI, A. TIRELLI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria 2, 20133 Milano, Italy.

Lavoro presentato alla 7^a edizione di Enoforum, Arezzo, 3-5 maggio 2011

Il glutatione ridotto (GSH) svolge numerose funzioni in mosto e vino. Ben nota è la sua capacità di ridurre gli *o*-chinoni prodotti dall'azione delle polifenolo ossidasi (PPO) sugli acidi idrossi-cinnamil tartarici. In questo modo si previene la formazione di polimeri fenolici responsabili del colore bruno di mosti e vini bianchi (Salgues, Cheynier, Gunata & Wylde, 1986). Il GSH può ridurre il chinone dell'acido caftarico ad acido 2-S-glutationil caftarico, noto anche come Grape Reaction Product (GRP) (Singleton, Zaya, Trousdale & Salgues, 1984) che può essere ossidato a chinone sia dall'enzima laccasi di *Botrytis cinerea* che per via chimica, producendo polimeri bruni quando la concentrazione del GSH è stechiometricamente inferiore rispetto alla quantità dei chinoni (Cheynier & Ricardo da Silva, 1991).

Il GSH esercita un effetto protettivo nei confronti degli aromi tiolici, comportandosi da competitore per la riduzione dei chinoni; la concentrazione dell'ordine di pochi milligrammi per litro è circa mille volte superiore rispetto a quella dei tioli aromatici (Lavigne & Dubourdieu).

Il GSH rallenta la formazione del sotolone (3-idrossi-4,5-dimetil-2(5H)furanone), un importante responsabile del difetto olfattivo caratteristico dell'invecchiamento atipico dei vini bianchi (Lavigne & Dubourdieu, 2004). Il contatto del vino con l'ossigeno può favorire la formazione del sotolone e degli off-flavour derivanti dalle ossidazioni aventi una bassa soglia di percezione, come ad esempio il 2-amminoacetofenone (Lavigne, Pons, Darriet & Dubourdieu, 2008).

Un ulteriore effetto del GSH sulle proprietà sensoriali dei vini deriva dalla sua proprietà di rallentare l'imbrunimento dei vini bianchi durante l'invecchiamento e la conservazione in bottiglia (Lavigne & Dubourdieu, 2004).

L'uva rappresenta la prima fonte potenziale di GSH, la cui concentrazione nel succo può superare 100 mg kg⁻¹ in relazione alla cultivar, alle condizioni ambientali e alle pratiche di allevamento (Cheynier, Souquet & Moutounet, 1989). Il contenuto di GSH nell'uva è influenzato dalle condizioni climatiche e dai trattamenti agronomici che agiscono aumentando il contenuto di azoto prontamente assimilabile nel suolo e, di conseguenza, la concentrazione di GSH nel mosto e nel vino (Lavigne & Dubourdieu, 2004).

La quantità di GSH nel mosto è potenzialmente compresa tra 10 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ (Cheynier et al., 1989) ed è influenzata dall'esposizione all'ossigeno, dall'attività ossidasica e dalle pratiche di macerazione pellicolare pre-fermentative (duToit, Lisjak, Stander & Prevoo, 2007; Maggu, Winz, Kilmartin, Trought & Nicolau, 2007). In letteratura scientifica è anche riportato che il GSH viene inizialmente consumato dal lievito nel corso della fermentazione alcolica per essere rilasciato successivamente e in seguito alla lisi cellulare (Lavigne & Dubourdieu, 2004; Lavigne, Pons & Dubourdieu, 2007).

La concentrazione di GSH nel vino è inferiore rispetto a uva e mosto (3-20 mg L⁻¹) (Cassol & Adams, 1995; du Toit et al., 2007). La scelta di un ceppo adeguato di *Saccharomyces cerevisiae* può influenzare positivamente il livello di GSH che costituisce da 0.5% a 1% del peso secco della cellula. 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 (Lavigne & Dubourdieu, 2004).

Ad oggi non sono ancora stati adeguatamente descritti i fattori che influenzano il contenuto di GSH nella vinificazione condotta su scala industriale.

Numerosi metodi analitici sono stati proposti in letteratura per la quantificazione del GSH in uva, mosto e vino che prevedono l'impiego di differenti approcci ed apparecchiature (Cassol & Adams, 1995; Adams & Liyanage, 1993; Park, Boulton & Noble, 2000a; duToit et al., 2007; Lavigne et al., 2007; Bramanti, Cavallaro, Onor, Zamboni, & D'Ulivo, 2008; Janeš, Lisjak & Vanzo, 2010; Marchand & de Revel 2010). Questi metodi analitici sono difficilmente applicabili per l'analisi di routine in laboratori enologici o direttamente in cantina sia per la disponibilità che il costo degli strumenti necessari.

Scopi di questa ricerca sono stati lo sviluppo di un affidabile metodo analitico per la determinazione del GSH in uva, mosto e vino mediante derivatizzazione con p-benzochinone (pBQ), come già descritto da Tirelli, Fracassetti e De Noni (2010), e la valutazione del contenuto di GSH nel corso di vinificazioni condotte su scala industriale.

Un quantitativo di uva pari a 250-300 g in acini viene posto in un sacchetto di materiale plastico a bassa permeabilità all'aria, addizionato di 2 mL di NaF 0.12 M e di 0.75 mL di EDTA 0.5 M, curando di disporre gli acini in un unico strato. Nel sacchetto viene quindi prodotto il vuoto e l'apertura viene termosaldata. L'uva così confezionata viene pigiata, cercando di lasciare le parti solide il più possibile integre, miscelando bene il succo ottenuto e lasciando in sosta per 60 minuti. Successivamente si apre il sacchetto, il succo viene trasferito in una beuta e agitato sotto flusso di azoto per 2-3 minuti. Il succo viene quindi centrifugato a 5000 x g per 5 minuti e sottoposto alla procedura di derivatizzazione.

I campioni di mosto e vino bianco vengono centrifugati a 5000 x g per 5 minuti. Venti millilitri di vino rosso vengono lasciati in agitazione sotto flusso di azoto per 5 minuti dopo l'aggiunta di 3 g di PVPP cui segue la centrifugazione a 5000 x g per 5 minuti. Si recupera il surnatante che viene addizionato di 100 µL di etanale 16 µM e, dopo 15 minuti, si procede con la derivatizzazione.

Due millilitri di succo o vino purificati vengono aggiunti di 100 µL di pBQ 400 µM e agitati per circa 1 minuto prima di aggiungere 1 mL di acido 3-mercaptopropanoico 500 µM. Dopo 1 minuto, il campione viene filtrato con filtri di PVDF da 0.22 µm e sottoposto ad analisi HPLC su una colonna esil-fenilica da 250 x 4.6 mm, 5 µm, 110 Å (Phenomenex) utilizzando un gradiente di acqua/acido trifluoroacetico (0.05% v/v) e metanolo, dove quest'ultimo aumenta linearmente dal 10% al 35% in 18 minuti. La rilevazione è effettuata per spettrofotometria UV a 303 nm.

Il livello di GSH è stato monitorato in 18 vinificazioni su scala industriale nelle annate 2009 e 2010. Per la vendemmia 2009, i campioni di mosto e vino sono ottenuti da 8 vinificazioni eseguite in 4 cantine utilizzando 3 differenti cultivars (Chardonnay, Sauvignon blanc and Trebbiano) e 7 ceppi di *S. cerevisiae*. Per la vendemmia 2010, i campioni di mosto e vino sono ottenuti da 10 vinificazioni eseguite in 5 cantine utilizzando 3 differenti cultivars (Chardonnay, Sauvignon blanc and Trebbiano) and 5 ceppi di *S. cerevisiae*. Ciascun campione di mosto e vino è stato addizionato di 0.8 g L⁻¹ di metabisolfito di potassio (K₂S₂O₅) al fine di prevenire le ossidazioni. Le vinificazioni sono state monitorate per almeno 24 giorni.

La determinazione del contenuto di azoto prontamente assimilabile (APA) nei mosti è eseguita per mezzo del numero di formolo con titolazione a pH 8.5.

La quantificazione del contenuto di rame è effettuata secondo la metodica di riferimento OIV-MA-AS322-06:R2009.

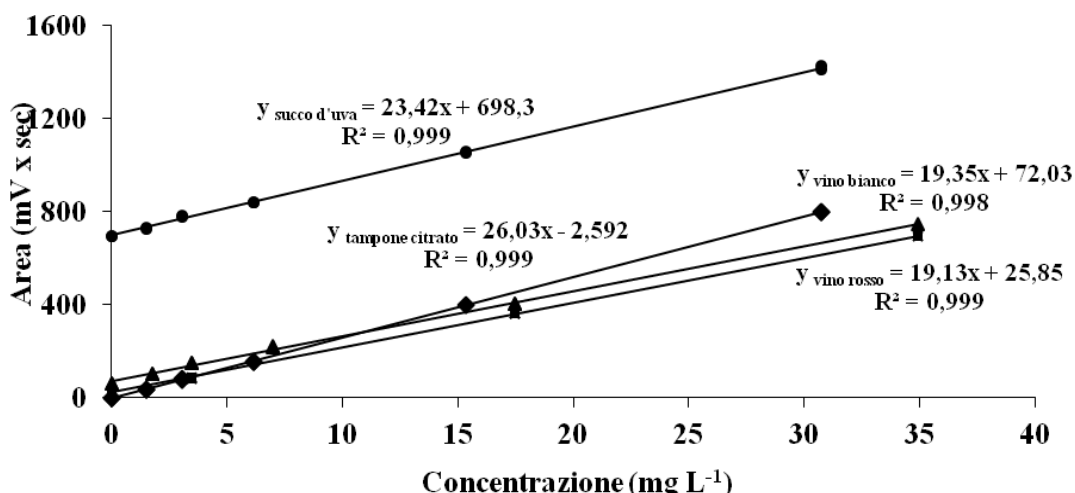
Le condizioni analitiche adottate hanno consentito la separazione del GSH in succo d'uva, mosto e vino, sia bianco che rosso, come idrochinone tio-sostituito. Il metodo consente anche la determinazione di cisteina (Cis) tio-sostituita e di GRP. Quest'ultimo è stato identificato previa preparazione dell'acido 2-S-glutationil caffeico quale riferimento per lo spettro di assorbimento UV. L'identità del GRP è stata in seguito confermata dall'analisi HPLC accoppiata con la spettrometria di massa (MS).

Per impedire le ossidazioni dell'uva per effetto degli enzimi tirosinasi, la pigiatura viene eseguita sotto vuoto ed in presenza di EDTA e di NaF. Quest'ultimo, in particolare, ha effetto inibente gli enzimi ossidasici in quanto lega il rame impedendone l'azione catalitica (Janovitz-Klapp, Richard,

Goupy & Nicolas, 1990; Richard, Goupy, Nicolas, Lacombe & Pavia, 1991). Esperimenti condotti con il solo impiego di $K_2S_2O_5$ 2 mM come agente antiossidante, hanno prodotto una risposta analitica minore e non era ripetibile.

Il metodo analitico ha mostrato risposta lineare per concentrazioni di GSH e Cis fino a 35 mg L^{-1} (Figura 1). Le curve di calibrazione in tampone citrato e succo d'uva hanno dato risposta analitica simile, come mostrato dai loro coefficienti angolari. Per il vino, la resa di derivatizzazione è inferiore di circa il 20% rispetto al succo, differenza che va considerata nella quantificazione del GSH.

Figura 1: curve di calibrazione ottenute aggiungendo concentrazioni note di GSH in tampone citrato (◆), succo d'uva (●), vino bianco (▲) e vino rosso (■).



La ripetibilità del metodo è stata valutata mediante l'aggiunta in vino rosso di quantità crescenti di GSH (Tabella 1). La deviazione standard relativa (%RSD) media per concentrazioni di GSH comprese tra $1.5\text{-}30 \text{ mg L}^{-1}$ è risultata 3.1%.

Tabella 1: parametri di ripetibilità (n=5) per la determinazione del GSH.

Concentrazione mg L^{-1}	Area Cromatografica (mAU x sec)			SD mAU x sec	RSD %
	min	max	media		
1.5	34.5	39.0	36.8	1.8	5.0
15.4	378	395	386	6.7	1.7
30.7	658	708	686	18.1	2.6

Il recupero è stato valutato in vino bianco e rosso per GSH e in succo d'uva per GSH e Cis. Le quote di GSH recuperate erano 100.1%, 101.5% e 93.9% per succo d'uva, vino bianco e vino rosso, rispettivamente. In vino rosso, un recupero leggermente inferiore rispetto alle altre matrici potrebbe essere correlato alla quantità residua di fenoli non rimossi con il trattamento con il PVPP. La Cis recuperata in succo d'uva era 102.8%, paragonabile con il valore ottenuto per il GSH. I limiti di rivelabilità di GSH e Cis, calcolati per un rapporto segnale/rumore di fondo > 3 , sono risultati di 0.13 mg L^{-1} and 0.07 mg L^{-1} rispettivamente, mentre i limiti di quantificazione (rapporto segnale/rumore di fondo > 10) assumono valori di 0.43 mg L^{-1} and 0.21 mg L^{-1} , rispettivamente. Questi livelli di GSH sono ampiamente inferiori alla quantità necessaria per esercitare un'efficace protezione dalle ossidazioni in mosto e vino (Lavigne & Dubourdieu, 2004).

Il contenuto di GSH è stato monitorato in 18 vinificazioni industriali. I vini sono stati prodotti nel corso delle annate 2009 e 2010 in 6 cantine impiegando 4 differenti varietà di uva. Il basso livello di GSH nelle uve Chardonnay nella vendemmia 2010 era probabilmente dovuto alla maturazione avvenuta in condizioni ambientali sfavorevoli (basse temperature) così come alla vendemmia precoce necessaria per la produzione di vino spumante (Cantina 5 in Tabella 2).

La perdita di GSH come GRP raggiunge fino a 80% in uva, tuttavia tale valore corrisponde a circa 6 mg L⁻¹ che costituisce una quantità inadeguata nella protezione dalle ossidazioni nel processo di vinificazione soprattutto in considerazione del fatto che fino a 95% del GSH viene perso in seguito alla pressatura, anche quando venga realizzata in anossia. I valori di GSH rilevati in mosto (Tabella 2) erano mediamente inferiori a quelli descritti da altri autori (Cheynier et al., 1989; Janěš et al., 2010). La rimozione con azoto dell'aria in pressa ha consentito di preservare maggiori quantità di GSH in mosto, tuttavia i maggiori livelli di GSH sono stati riscontrati nei campioni provenienti da uve ricche in GSH. I livelli di GRP in mosto sono ampiamente inferiori alle perdite di GSH conseguenti alla pressatura (Tabella 2) indicando che fattori diversi dall'ossidazione degli acidi idrossicinamiltartarici possono condizionare il tenore in GSH in mosto come pure l'efficacia delle presse inertizzate.

Tabella 2: confronto dei contenuti molari di GSH e GRP in uva e mosto per l'annata 2010. Le vinificazioni 4-A e 4-B si differenziano per le frazioni di pressatura: la prima frazione di pressata è stata vinificata nella produzione 4-A, mentre la seconda frazione nella produzione 4-B.

Cantina - Vinificazione	Uva	Condizioni di pressatura	GSH (µM)			GRP (µM)		
			uva	mosto	Δ	uva	mosto	Δ
5-B	Chardonnay-1	iperox	12.1	3.6	-8.5	2.9	0.45	-2.5
5-C	Chardonnay-1	aria	12.1	2.9	-9.2	2.9	1.0	-1.9
5-A	Chardonnay-2	aria	5.9	3.9	-2.0	2.1	0.15	-2.0
3-A	Vermentino-1	aria	4.6	2.9	-1.7	19.0	8.9	-10.1
3-B	Vermentino-1	aria	4.6	1.6	-3.0	19.0	7.9	-11.1
3-C	Vermentino-1	aria	4.6	11.4	+6.8	19.0	4.5	-14.5
1-A	Chardonnay-3	aria	115.0	17.3	-97.7	2.4	14.8	+12.4
1-B	Chardonnay-3	azoto	115.0	30.6	-84.4	2.4	6.6	+4.2
4-A	Trebbiano-1	azoto	274.6	13.0	-261.6	7.5	20.9	+13.4
4-B	Trebbiano-1	azoto	274.6	14.0	-160.6	7.5	21.4	+13.9

Il rame riveste un ruolo importante nel livello di GSH nel mosto (Cantina 3 in Tabella 2). I mosti ottenuti da grappoli non trattati di uve Vermentino (Vinificazione 3-A) possedevano solo il 37% del GSH iniziale, mentre con il lavaggio e asciugatura della buccia dell'uva il quantitativo di GSH nel mosto è risultato più che raddoppiato (Vinificazione 3-C). L'aggiunta di poltiglia bordolese, contenente il 2-5% di rame sotto forma di idrossido e solfato, ha provocato la scomparsa pressoché completa del GSH (Vinificazione 3-B). Questi dati confermano l'influenza del rame sul contenuto di GSH nel mosto.

L'effetto dell'ossigeno e del rame è stato ulteriormente valutato nel corso della pressatura. Due campioni di mosto sono stati ottenuti con l'impiego di una pressa sotto vuoto con e senza strippaggio dell'aria con azoto sia nella camera di pressatura e che nelle tubazioni di sgrondo. Sono state rilevate piccole variazioni di GRP (Tabella3). Il GSH è aumentato fino a 23 mg L⁻¹ solo se la pressatura era eseguita in condizioni inertizzate fino all'esaurimento delle bucce d'uva nella 6° frazione. In queste condizioni di pressatura l'aumento del contenuto di GSH era 4 volte superiore della diminuzione del GRP. Inoltre, all'aumento della quantità di GSH corrispondeva il decremento del livello di rame.

Tabella 3: contenuti di GSH, GRP e rame in frazioni consecutive di mosto ottenute da 2 cicli di pressatura in diverse condizioni di esposizioni all'aria. Il livello di GSH nell'uva era 894.5µM.

Frazione	Aria			Azoto		
	GSH µM	GRP µM	Rame mg L ⁻¹	GSH µM	GRP µM	Rame mg L ⁻¹
1° frazione	12.4	17.0	7.5	11.7	12.6	31.2
2° frazione	12.4	26.6	2.5	16.0	17.2	2.5
3° frazione	12.4	31.3	1.1	45.3	20.7	0.76
4° frazione	15.0	24.3	0.85	63.8	23.3	0.65
5° frazione	12.4	31.3	0.68	75.2	22.7	0.67
6° frazione	16.0	29.2	0.45	17.3	31.8	0.84
Media	13.4	26.6		36.6	21.4	

In tutti i processi produttivi considerati, la concentrazione di GSH subisce un incremento nel corso della fermentazione alcolica, ad eccezione del mosto ottenuto da Sauvignon blanc (Tabella 4) il cui contenuto di APA (129 mg L⁻¹) era inferiore ai 200 mg L⁻¹ necessari per la produzione di GSH ad opera dei lieviti (Lavigne & Dubourdieu, 2004). In tutti gli altri mosti, il tenore di APA è risultato compreso tra 200 mg L⁻¹ e 350 mg L⁻¹.

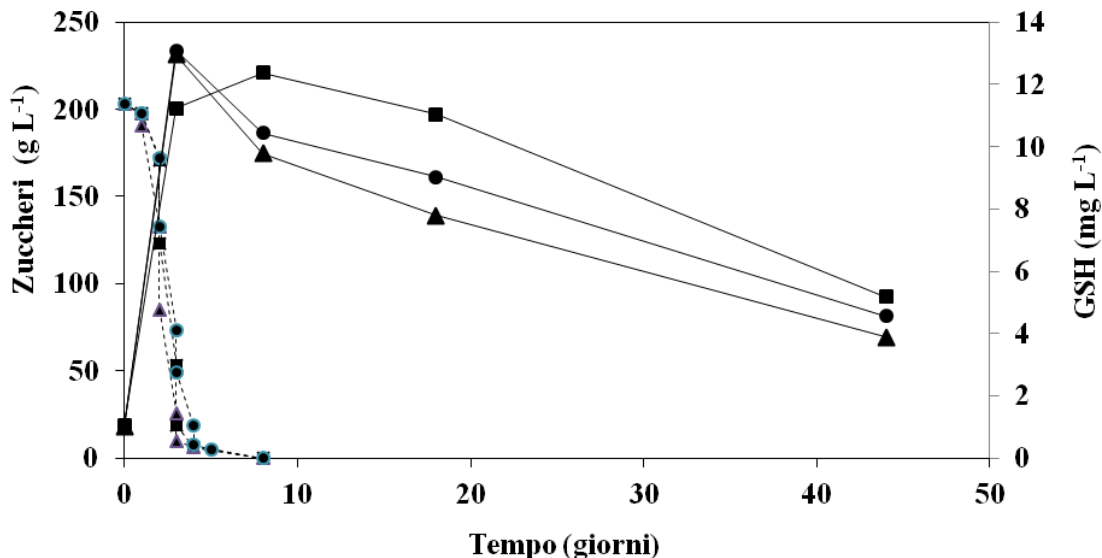
Tabella 4: concentrazioni di GSH rilevate nelle vinificazioni monitorate nelle annate 2009 e 2010 (n.r.: non rilevato).

Cantina - Vinificazione	Uva	Condizioni di pressatura	Vendemmia	GSH (mg L ⁻¹)	
				max	travaso
5-B	Chardonnay	Iperox	2009	10.9	10.9
5-B	Chardonnay	Iperox	2010	17.7	13.5
5-A	Chardonnay	Aria	2009	10.3	9.6
2-A	Chardonnay	Aria	2009	13.0	9.8
2-B	Chardonnay	Aria	2009	13.1	10.4
2-C	Chardonnay	Aria	2009	12.4	12.4
6	Sauvignon blanc	Aria	2009	0.9	n.r.
1-A	Chardonnay	Aria	2010	27.5	16.3
5-A	Chardonnay	Aria	2010	15.3	14.6
5-C	Chardonnay	Aria	2010	21.9	21.3
3-A	Vermentino	Aria	2010	7.3	6.2
3-B	Vermentino	Aria	2010	4.9	4.9
3-C	Vermentino	Aria	2010	9.1	7.4
4-A	Trebbiano	Azoto	2009	19.3	16.5
4-B	Trebbiano	Azoto	2009	14.2	13.0
1-B	Chardonnay	Azoto	2010	14.4	10.4
4-A	Trebbiano	Azoto	2010	29.5	12.4
4-B	Trebbiano	Azoto	2010	35.5	32.0

La quantità massima di GSH rilevata nelle vinificazioni monitorate è stata ottenuta prima del travaso ed era compresa tra 4.9 mg L⁻¹ e 35.5 mg L⁻¹. I campioni di mosto che hanno mostrato un maggiore contenuto di GSH hanno portato a vini più ricchi di GSH. Tuttavia, i fattori che influenzano l'accumulo di GSH non sono del tutto chiariti. Il lievito influenza debolmente la concentrazione di GSH, come mostrato in Figura 2: vinificazioni condotte con 3 diversi ceppi di *S.*

cerevisiae hanno portato a differenze minime di GSH a parità di uva impiegata e condizioni produttive.

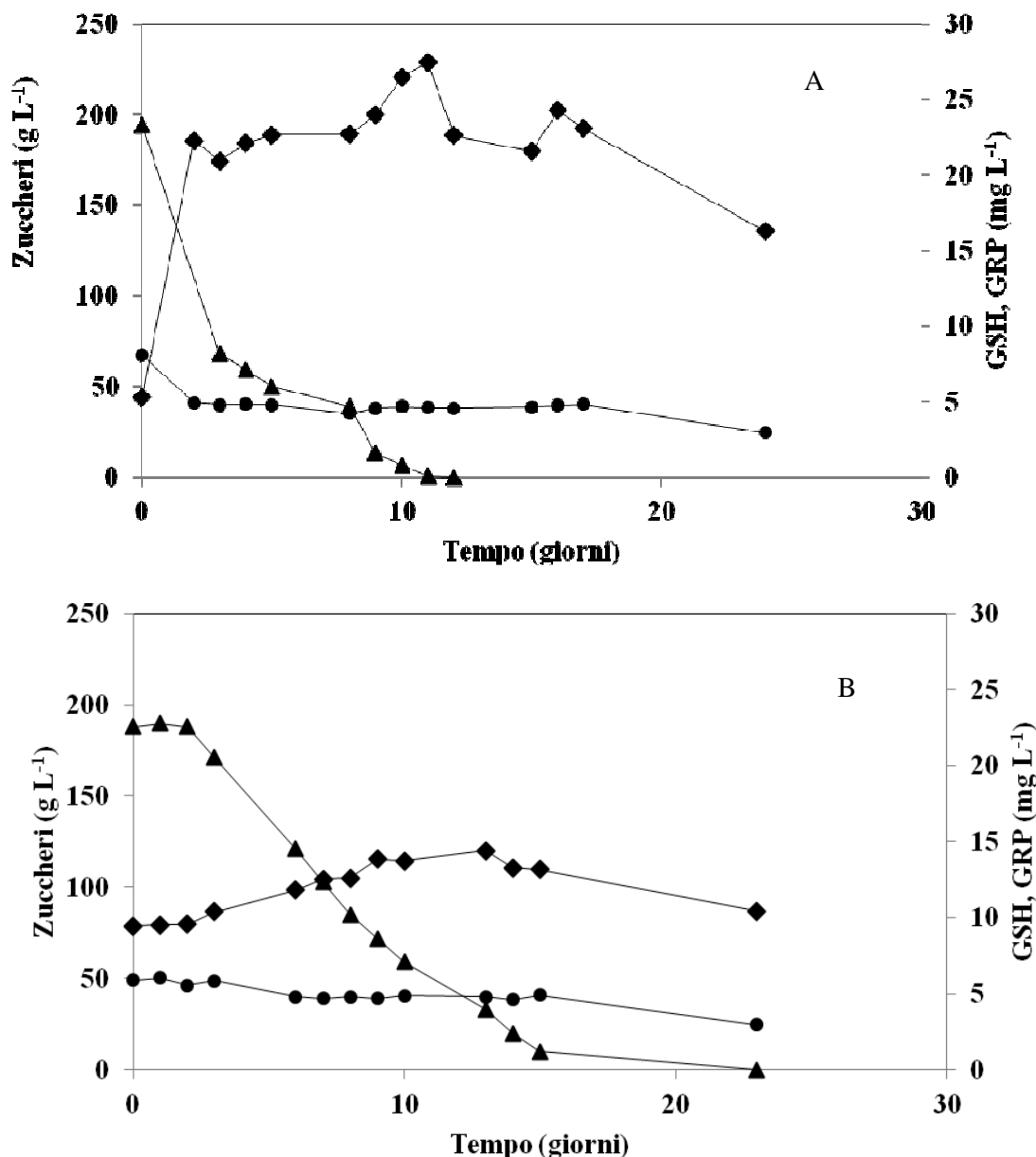
Figura 2: effetto dei ceppi di *S. cerevisiae* VP20 (■), BRG (●) and IOC (▲) sul contenuto di GSH (linea continua) e sul decorso fermentativo (linea tratteggiata) per le vinificazioni condotte nella cantina 2.



La disponibilità di ossigeno è tra i fattori che influenzano la sintesi del GSH durante la fermentazione alcolica, come mostrano le differenze nel livello di GSH per le vinificazioni condotte da uve Chardonnay in condizioni inertizzate ed in presenza di ossigeno (Cantina 1 in Tabella 4). L'esposizione all'aria del mosto aumenta sia la velocità di fermentazione che il quantitativo di GSH fino a 27 mg L⁻¹ (Figura 3). Invece, il mosto ottenuto in condizioni inertizzate mostra una più lenta fermentazione alcolica ed un minore rilascio di GSH (14 mg L⁻¹), probabilmente correlato ad una più lenta replicazione cellulare del lievito. L'esposizione all'aria del mosto, durante la pressatura e l'inizio della fermentazione alcolica, sembra promuovere la diminuzione di GSH dopo il travaso, anche se il tenore di GSH osservato nel corso della fermentazione è maggiore. Tale fenomeno potrebbe non essere correlato all'ossidazione dei fenoli dal momento che la concentrazione di GRP rimane invariata o diminuisce nel corso delle vinificazioni.

Il contenuto di GRP è risultato diminuire nella maggior parte delle vinificazioni probabilmente in seguito a fenomeni idrolitici che possono avvenire durante l'invecchiamento (Cheynier et al., 1986), così come per la formazione di composti insolubili che possono precipitare oppure essere adsorbiti dalle fecce.

Figura 3: decorso dei livelli di zuccheri (\blacktriangle), GSH (\blacklozenge) e GRP (\bullet) in vinificazioni di uva Chardonnay pressata in presenza (A) ed assenza (B) di aria (Cantina 1).



Dai dati ottenuti è emerso che l'esposizione all'aria del mosto potrebbe non essere il principale fattore che influenza le perdite di GSH. Un'attenta gestione della fermentazione alcolica può portare ad un contenuto di GSH sufficiente a proteggere il vino dalle ossidazioni durante l'invecchiamento. Il ceppo di *S. cerevisiae* influenza debolmente il livello di GSH, ma sono necessarie ulteriori ricerche per confermare quanto osservato in questo studio. Il rame può influire fortemente sul contenuto di GSH nel mosto ed i suoi residui presenti sulle bucce dell'uva a seguito ai trattamenti fitosanitari eseguiti in vigna potrebbero costituire un'importante causa di impoverimento in tioli cisteinici. Dal momento che il GSH è importante per la protezione del vino dalle ossidazioni durante l'invecchiamento ed è coinvolto nella formazione degli aromi tiolici in mosto, si dovrebbero considerare attentamente i fattori che ne influenzano il contenuto.

Bibliografia

- Adams, D. O., & Liyanage, C. (1993). Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, *44*, 333-338.
- Bramanti, E., Cavallaro, R., Onor, M., Zamboni, R., & D'Ulivo, A. (2008). Determination of thiolic compounds as mercury complexes by cold vapour atomic absorption spectrometry and its application to wine. *Talanta*, *74*, 936-943.
- Cassol, T., & Adams, D.O. (1995). Detection of glutathione in white wines using an enzymatic analytical method. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*, 410.
- Cheyrier, V., & Ricardo da Silva, J. M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solution containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 1047-1051.
- Cheyrier, V., Souquet, J.M., & Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, *40*, 320-324.
- Du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M., & Prevoo, D. (2007). Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2765-2769.
- Janès, L., Lisjak, K., & Vanzo, A. (2010). Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, *674*, 239-242.
- Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M., & Nicolas, J. J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*, 926-931.
- Lavigne, V., & Dubourdieu, D. (2004). Affinamento sulle fecce e freschezza dei vini bianchi. *VigneVini*, *31*, 58-66.
- Lavigne, V., Pons, A., & Dudourdieu, D. (2007). Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A*, *1139*, 130-135.
- Lavigne, V., Pons, A., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 2688-2693.
- Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M.C.T., & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 10281-10288.
- Marchand, S., & de Revel, G. (2010). A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. *Analytica Chimica Acta*, *660*, 158-163.
- Park, S.K., Boulton, R.B., & Noble A.C. (2000a). Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chemistry*, *68*, 475-480.
- Richard, F. C., Goupy, P. M., Nicolas, J. J., Lacombe, J. M., & Pavia, A. A. (1991). Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 841-847.
- Salgues, M., Cheyrier, V., Gunata, Z., & Wylde, R. (1986). Oxidation of grape juice 2-s-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-s-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *Journal of Food Science*, *51*, 1191-1194.
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape, must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *36*, 50-56.
- Tirelli, A., Fracassetti, D., & De Noni, I. (2010). Determination of reduced cysteine in oenological cell wall fractions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 4565-4570.

ABSTRACT

Una metodica di semplice applicazione basata sulla separazione HPLC è stata validata per la determinazione quantitativa del GSH della cisteina e del GRP in uva, mosto e vino. Il metodo è risultato lineare e ripetibile (RSD=3.1 %) Questa è stata quindi applicata per valutare il decorso del contenuto in GSH di 18 vinificazioni industriali.

Il livello di GSH è molto inferiore a quello nell'uva di partenza a causa degli effetti della pressatura anche quando si utilizzino presse inertizzate. In seguito all'attività fermentativa del lievito il livello di GSH è aumentato fino a 35 mg L⁻¹ se il livello di azoto prontamente assimilabile per il lievito era superiore a 200 mg L⁻¹. Il rame presente sull'uva può fortemente abbassare il livello di GSH residuo nel mosto mentre la disponibilità di ossigeno per il lievito lo può aumentare. Il ceppo di lievito sembra invece avere un ruolo marginale sul contenuto di GSH nel vino.