

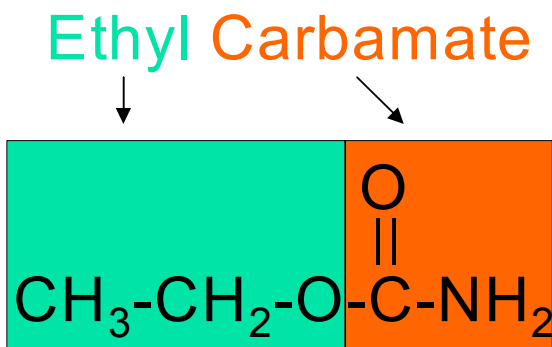
IL RUOLO DEI LIEVITI NELLA FORMAZIONE DELL'ETIL-CARBAMATO NEL VINO

Linda F. BISSON

Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis CA, USA

L'etil carbamato (uretano) è una sostanza cancerogena, che può formarsi da diversi substrati nel vino (Figura 1).. Si tratta di un carcinogeno naturale, prodotto dai metaboliti dei lieviti, piante e batteri. Nel caso del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, la formazione dell'etil carbamato è conseguente alla reazione chimica spontanea tra l'etanolo, il prodotto finale della fermentazione del glucosio e del fruttosio, e dell'urea, un intermediario della sequenza metabolica della degradazione dell'arginina, una delle fonti principali di azoto dei mosti e dei succhi d'uva. Le quantità di etil carbamato variano nel vino, essendo funzione di molte variabili, una delle quali è il tipo di ceppo di lievito. Se il limite di legge dell'etil carbamato nel vino viene abbassato rispetto ai livelli attuali ammessi, allora si renderanno necessarie nuove strategie per ridurre o eliminare la formazione di questo carcinogeno.

Figura 1. Formula chimica dell'etil carbamato (uretano)

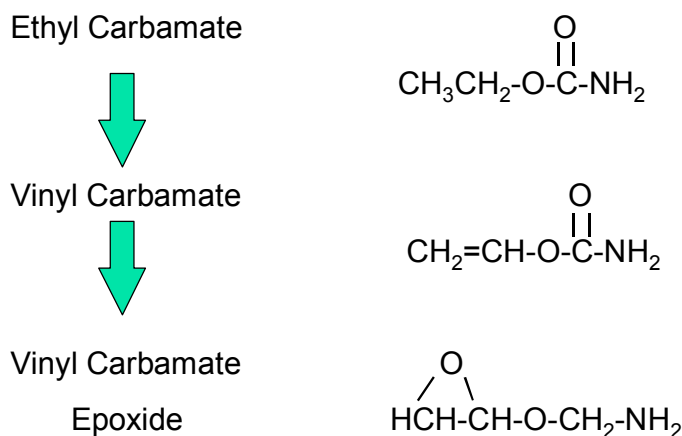


La cancerogenicità dell'etil carbamato

L'etil carbamato veniva usato come anestetico in medicina nel secolo scorso. Si osservò una incidenza alta di cancro ai polmoni nei pazienti cui era stato somministrato questo composto e questo permise di mettere in relazione l'etil carbamato con il cancro [1,2]. L'etil carbamato come tale non era cancerogeno, ma viene metabolizzato dal corpo in una sostanza cancerogena [3,4]. Nel 1978 venne chiarita la via di bio-attivazione dell'etil carbamato [5]. Il composto viene dapprima ossidato a N-2-idrossi etil carbamato, che viene deidrogenato a vinil carbamato, che viene ossidato ad epossido del vinil carbamato (Figura 2). L'eossido del vinil carbamato può interagire con i nucleotidi citoplasmatici o del RNA e DNA [6,7,8]. L'interazione con le basi nucleotidiche del DNA può condurre ad una mutazione, che a sua volta può portare alla comparsa del cancro. Si possono formare l'etenoadenosina, l'etenocitidina, l'etenoguanosina e l'ossietil-guanosina, che si appaieranno in modo sbagliato durante la replicazione del DNA [8], avendo come risultato una mutazione potenziale.

Figura 2. Via dell'ossidazione dell'etil carbamato.

Bioactivation of Ethyl Carbamate



L'analisi del destino dell'etil carbamato ingerito rivelò che la maggior parte (90-95%) viene idrolizzato da un'esterasi, divenendo così non più cancerogeno. Una piccola frazione (4-6%) viene escreta senza subire cambiamenti. Solo una piccolissima parte (meno dell'1%) viene convertito a epossido del vinil carbamato, ma questa quantità è sufficiente per aumentare l'incidenza del cancro, soprattutto quando vengono somministrate alte dosi di etil carbamato. Poiché l'etil carbamato si trova in molte bevande e cibi fermentati (Tabella 1) [9], venne fatta una stima dei rischi a livello alimentare [10,11], che servì come base per il governo Canadese per limitare le quantità ammesse di etil carbamato nei vini venduti in Canada. Gli Stati Uniti hanno adottato in modo volontario il tetto massimo di 15 µg/L di etil carbamato per i vini da tavola e di 60 µg/L per i vini fortificati. La maggior parte dei vini prodotti presentano livelli più bassi di etil carbamato, indipendentemente dalla regione di origine.

Tabella 1. Fonti alimentari dell'etil carbamato.

Cibo o bevanda	Intervallo dei livelli di etil carbamato	
Pane	0.8-1.2	µg/Kg
Yogurt	nd-0.3	µg/kg
Formaggio	nd-6	µg/kg
Salsa di soia	nd-46	µg/L
Birra	nd-0.6	µg/L
Vino da tavola	nd-100	µg/L
Vino da dessert	7-150	µg/L
Distillati	0.5-5000	µg/L
Saké	10-900	µg/L
Fumo di tabacco	300-400	µg/Kg

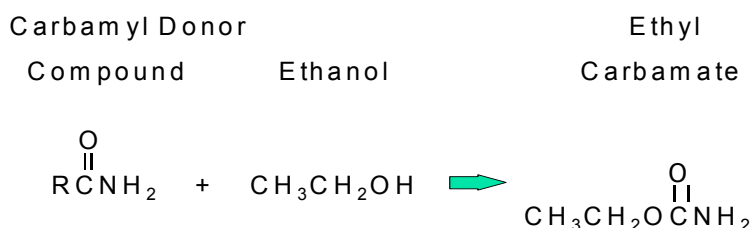
nd – non rilevato.

Il governo americano ha promosso studi ulteriori per verificare la cancerogenicità dell'etil carbamato e tali risultati sono attualmente valutati dal US Food and Drug Administration. Se è possibile diminuire ulteriormente la quantità di etil carbamato nei vini, allora i limiti volontari saranno probabilmente abbassati e diventeranno ingiuntivi.

I precursori dell'etil carbamato

Se sarà necessario ridurre il livello dell'etil carbamato nel vino, occorreranno altre misure per ridurre la sua presenza nel vino. E' importante capire i fattori che portano alla formazione dell'etil carbamato nel vino, per poterne minimizzare la presenza. L'etil carbamato può essere formato chimicamente dall'idrogeno cianide, dall'acido cianico e dai composti N-, S-, O-carbamilici, composti che possono dare facilmente un gruppo carbamilico in una reazione chimica [12,13]. La cianide e l'acido cianico sono stati trovati in alcune piante, ma non nell'uva o nel vino e non sono quindi responsabili della comparsa dell'etil carbamato. D'altra parte, i composti carbamilici abbondano in biologia, particolarmente nella degradazione e nella sintesi dei composti contenenti azoto, amino acidi e nucleotidi. La via generica per la formazione dell'etil carbamato negli organismi viventi è riportata nella Figura 3.

Figura 3. Formazione biologica dell'etil carbamato.



Sia i lieviti che i batteri possono rilasciare composti carbamilici che possono reagire con l'etanolo dando l'etil carbamato. Nel caso dei lieviti, il problema principale consiste nel rilascio nel mezzo di urea che non viene consumata e che può quindi reagire con l'etanolo. La produzione di citrullina e di carbamil fosfato dall'arginina attraverso la via dell'arginina deaminasi sembra essere la strada principale per la formazione dell'etil carbamato nel caso dei batteri [14,15]. Vi sono differenze a livello dei diversi ceppi nella produzione di etil carbamato, sia per quanto riguarda i batteri che per quanto riguarda i lieviti [16,17]. Alcuni lieviti producono poco etil carbamato, altri ne producono molto ed altri ancora producono quantità variabili di etil carbamato, mostrando una forte dipendenza dal tipo di substrato usato per la loro crescita.

Molti fattori influiscono sul rilascio di urea da parte dei ceppi di lieviti [18]. La composizione azotata del mezzo sembra essere di estrema importanza sotto questo punto di vista. L'urea è un prodotto intermedio prodotto dall'arginasi durante la degradazione dell'arginina. L'urea è poi degradata nel lievito dall'urea amidolasi, un enzima multifunzione che catalizza una reazione in due stadi successivi, che prevede dapprima la carbossilazione dell'urea (urea carbossilasi) formando l'allofanato, che viene attaccato dall'allofanato idrolasi, che rilascia due molecole di diossido di carbonio e ammonio. L'urea può essere prodotta nel corso della degradazione dell'allantoina e dell'allantoato, ma questi composti non sono stati trovati ad alte concentrazioni nel succo d'uva. Il

ruolo centrale dell'urea nella formazione dell'etil carbamato durante la produzione del vino venne confermato da studi con traccianti radioattivi [19].

L'urea carbossilasi richiede sia l'ATP che il bicarbonato, oltre alla biotina. Se si riscontra una carenza vitaminica o energetica, l'urea non verrà degradata. Quando nel mezzo c'è abbondanza di ammonio, l'urea viene escretata nel mezzo esterno per essere ripresa in un secondo tempo, quando l'ammonio è stato esaurito. Se la quantità di ammonio è tale da non essere esaurito, l'urea rimarrà nel vino e non verrà riconsomata dai lieviti. La reazione dell'urea e dell'etanolo dipende dalla temperatura e dal tempo, così che potrà avvenire nel vino col tempo. Se un vino viene esposto ad alte temperature, come durante il trasporto, i livelli dell'etil carbamato potrebbero diventare elevati. E' quindi importante prevenire la comparsa dell'urea e di altri precursori carbamilici nel vino

I livelli dell'arginina, dell'urea e dell'ammonio influiscono sulla quantità di urea rilasciata e del suo riutilizzo. Lo scenario peggiore consiste nell'apportare ammonio a metà fermentazione dopo che l'urea è stata rilasciata, in quanto sarebbe garanzia che non verrà ripresa. La quantità di etanolo ha anch'essa un ruolo importante, in quanto l'etanolo inibisce l'assorbimento dei composti amminici. Se l'urea viene rilasciata troppo tardi, allora la presenza di etanolo può prevenire il suo riutilizzo.

Una delle variabili più importanti che influiscono sul rilascio dell'urea e sulla formazione dell'etil carbamato è il ceppo stesso di lievito. I ceppi di lieviti danno risposte variabili nella produzione dell'etil carbamato [16]. Noi valutiamo diverse proprietà dei ceppi di lieviti che vennero caratterizzati come bassi, medi ed alti produttori di etil carbamato. [20]. I tre ceppi mostrarono identici livelli di assorbimento e di rilascio di urea e diedero lo stesso tipo di risposta all'inibizione da parte dell'etanolo sul riutilizzo dell'urea. La differenza principale tra i ceppi riguardava i livelli di arginasi e urea amidoliasi (Tabella 2). Al crescere del rapporto tra l'attività dell'arginasi e l'attività dell'urea amidoliasi, aumentava la tendenza al rilascio di urea e all'accumulo dell'etil carbamato. Sebbene sarebbe necessario confermare questa affermazione con altri ceppi, questo suggerisce che la modifica del rapporto tra l'attività dell'urea amidoliasi e dell'arginasi potrebbe ridurre in modo consistente il rilascio dell'urea. Questo suggerisce inoltre che i ceppi che richiedono alte quantità di azoto o che non usano efficacemente l'azoto produrrebbero poca urea e di conseguenza anche poco etil carbamato.

Tabella 2. Rapporto tra l'attività dell'arginasi e dell'urea amidoliasi in ceppi di Saccharomyces.

Ceppo di lievito	Arginasi (μ mole/min/mg)	Urea Amidoliasi (μ mole/min/mg)	Rapporto
Montrachet	22	58	0.38
Premier Cuvee	13	43	0.30
71B	16	100	0.16

La prevenzione della formazione dell'etil carbamato

Molto si può fare per ridurre i livelli dell'etil carbamato nel vino. Occorrerebbe evitare di usare alte dosi di azoto nel vigneto, in quanto questo comporta un innalzamento dei valori dell'arginina nel mosto. Per verificare se si sta usando una dose eccessiva di azoto, occorrerebbe monitorare l'azoto nel terreno e del peziolo. L'assorbimento dell'azoto varia con la cultivar e con il portinnesto e di ciò bisogna tener conto. La copertura vegetale può influenzare lo stato di nutrizione azotata della pianta. Gli interventi che apportano urea per indurre l'assorbimento fogliare di altri elementi dovrebbero essere evitati in quanto l'urea può finire nel mosto.

Per quanto riguarda la vinificazione, bisognerebbe valutare la quantità di azoto già presente nel succo d'uva all'inizio della fermentazione e l'eventuale dose da apportare. Ovviamente sarebbe meglio non usare l'urea, benché sia un'ottima fonte di azoto per il lieviti. La concentrazione di arginina del succo dovrebbe essere inferiore a 1000 mg/L. Se è superiore, aumenta il rischio della formazione dell'etil carbamato. Occorrerebbe valutare il potenziale dei lieviti e dei ceppi per la ML nel formare l'etil carbamato, evitando di usare quelli che ne producono molto. Le aggiunte di nutrienti dovrebbero essere fatte nel momento appropriato, in modo da non bloccare la riutilizzazione dell'urea. Se possibile, occorrerebbe determinare la concentrazione finale dell'urea nel vino e se dovesse essere alta, non bisogna esporre il vino ad alte temperature.

Soluzioni per un'ulteriore riduzione dell'etil carbamato

Le raccomandazioni qui riportate vennero presentate all'industria enologica americana circa dieci anni fa e hanno portato ad una riduzione della presenza di alti livelli di etil carbamato nei vini. Come conseguenza, la maggior parte dei vini da tavola sono al di sotto del limite di 15 µg/L. Comunque, vi sono regolamenti pendenti che hanno il potenziale di diminuire ulteriormente tale livello e di renderlo ingiuntivo, non volontario. Alcune cantine, potrebbero trovare altre procedure per ridurre la formazione dell'etil carbamato. Sono state proposte numerose alternative. Ureasi fungine e batteriche sono state usate per degradare l'urea rimasta nel vino. Comunque, questi enzimi possiedono attività limitate e potendo essere inibiti dai composti presenti nel vino non funzionano in tutte le situazioni.

Un approccio alternativo è quello di rivolgersi all'ingegneria genetica sui ceppi di lievito. Quei ceppi che producono ureasi fungine o batteriche dovrebbero produrre meno urea. Comunque, questi organismi verrebbero geneticamente modificati, in quanto l'ureasi deve provenire da una fonte non-Saccharomyces. Ciò obbliga ad etichettare il vino con dicitura "prodotto con OGM". Ma non si conosce la reazione dei consumatori a tale problema. Inoltre, non è ancora ben noto come tali ceppi possano competere con gli organismi originali che non esprimono tale enzima.

Un approccio diverso potrebbe essere quello di manipolare geneticamente la via per la produzione dell'urea nel lievito per minimizzarne la comparsa. Si potrebbe per esempio ridurre il livello dell'espressione dell'arginasi [21] o aumentare il livello dell'espressione dell'urea amidoliasi [20].

La diminuzione dell'arginasi potrebbe comportare una perdita di competitività del ceppo, in quanto l'arginina rappresenta la fonte primaria di azoto durante la vinificazione. Invece, per assicurare competitività a tali ceppi per la produzione del sakè, fu necessario introdurre un carattere killer [22]. L'urea amidoliasi, d'altro lato, richiede energia e biotina. Eventuali carenze di uno dei due fattori avrà un impatto sull'attività dell'urea amidoliasi. La valutazione dei ceppi bassi produttori di urea suggerì che la strategia migliore sarebbe stata di mantenere bilanciate le attività dell'arginasi e dell'urea amidoliasi. Guardando le attività assolute in Tabella 2, i livelli di arginasi sono simili, mentre l'attività dell'urea amidoliasi variano anche del doppio. Non è necessario, quindi, avere alti livelli di questo enzima, per ottenere una drastica riduzione dell'urea. L'analisi di altri ceppi bassi produttori di urea potrebbe essere utile per definire una strategia per un'ulteriore diminuzione dell'etil carbamato. Potrebbe essere importante analizzare ceppi meno efficienti nell'utilizzo dell'azoto, per identificare ceppi più adatti in quelle fermentazioni di mosti e succhi contenenti molto azoto. Comunque, dato che anche i batteri possono convertire questi composti nei precursori dell'etil carbamato, qualsiasi strategia per la riduzione dell'etil carbamato dai metaboliti dei lieviti deve anche considerare la possibilità di un aumento della produzione da parte dei batteri.

Conclusioni

La cancerogenicità dell'etil carbamato e il ruolo dei microbi nella sua produzione nel corso delle trasformazioni dei cibi e delle bevande sono dati di fatto. Vi sono alcune procedure da seguire sia nel vigneto che in cantina per ridurre la comparsa dell'etil carbamato, ma se vengono emanati nuovi regolamenti, la riduzione potrebbe rivelarsi insufficiente. I ceppi di lieviti geneticamente modificati potrebbero costituire una soluzione valida contro il rilascio di alti livelli di urea. Comunque, uno scambio più naturale di alleli potrebbe essere una via altrettanto efficace ed allontanerebbe le preoccupazioni sull'utilizzo di organismi geneticamente modificati.

Relazione presentata al XI Incontro Scientifico Lallemand "Beverage Fermentation and Health", San Francisco, California, 25-26 aprile 2003

Bibliografia

1. Nettlehip, A., P. Henshaw and H. Meyer. Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane). *J. Natl. Cancer Inst.* 4:309-319 (1943).
2. Miller, J. A. The need for epidemiological studies of the medical exposure of Japanese patients to the carcinogen ethyl carbamate (urethane) from 1950 to 1975. *Jpn. J. Cancer Res.* 82:1323-1324 (1991).
3. Mirvish, S. S. The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxyurethan. *Adv. Cancer Res.* 11:1-42 (1968).
4. Pereira, M. A., M. M. Khoury, H. P. Glauert and R. A. Davis. Screen of five alkyl carbamates for initiating and promoting activity in rat liver. *Cancer Letts.* 57:37-44 (1991).
5. Dahl, G. A., J. A. Miller and E. C. Miller. Vinyl carbamate as a promutagen and a more carcinogenic analog of ethyl carbamate. *Cancer Res.* 38:3793-3804 (1978).
6. Ashby, J. Genotoxicity data supporting the proposed metabolic activation of ethyl carbamate (urethane) to a carcinogen: The problem now posed by methyl carbamate. *Mut. Res.* 260:307-308 (1991).
7. Guengerich, F. P. and D.-H. Kim. Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,N⁶-ethenoadenosine. *Chem. Res. Toxicol.* 4:413-421 (1991).
8. Park, K.-K., A. Liem, B. C. Stewart and J. A. Miller. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic mutagen and carcinogen metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis* 14:441-450 (1993).
9. Ough, C. S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.* 24:323-327 (1976).
10. Schlatter, J. and W. K. Lutz. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): Risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.* 38:205-211 (1990).
11. Inai, K., K. Arihiro, Y. Takeshima, S. Yonehara, Y. Tachiyama, N. Khatun and T. Nishisaka. Quantitative risk assessment of carcinogenicity of urethane (ethyl carbamate) on the basis of long-term and administration to B6C3F₁ mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 82:380-385 (1991).
12. Ough, C. S., E. A. Crowell and B. R. Gutlove. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:239-242 (1988).
13. Zimmerli, B. and J. Schlatter. Ethyl carbamate: Analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mut. Res.* 259:325-350 (1991).
14. Arena, M. E., M. C. Manca de Nadra and R. Munoz. The arginine deiminase pathway in wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X₁B: Structural and functional study of the *arcABC* genes. *Gene* 301:61-66 (2002).
15. Tonon, T. and A. Lonvaud-Funel. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiol.* 19:451-461 (2002).
16. Ough, C. S., Z. Huang, D. An and D. Stevens. Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: Effects on urea excretion and reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:26-40 (1991).
17. Granchi, L., R. Paperi, D. Rosellini and M. Vincenzini. Strain variation of arginine catabolism among malolactic *Oenococcus oeni* strains of wine origin. *Ital. J. Food Sci.* 10:351-358 (1998).
18. An, D. and C. S. Ough. Urea excretion by wine yeasts as affected by various factors. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:35-40, 1993.
19. Monteiro, F. F., E. K. Trousdale and L. F. Bisson. Ethyl carbamate formation in wine: Use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:1-8 (1989).
20. An, D. Urea transport and metabolism by three wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Thesis, University of California, Davis, 1993.
21. Suizu, T., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, K. Yoshikawa and G. Tamura. Construction of a urea non-producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *CAR1* gene. *Agric. Biol. Chem.* 54:537-539 (1990).
22. Yoshiuchi, K., M. Watnabe and A. Nishimura. Breeding of a non-urea producing sake yeast with killer character using a *kar1-1* mutant as killer donor. *J. Indust. Microbiol. Biotech.* 24:203-209 (2000).