UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territori e Sistemi Agroforestali

Corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

Il gusto luce nei vini bianchi e rosati: analisi quanti-qualitativa della produzione di riboflavina da parte di alcuni ceppi di lievito

Relatore
Prof. Simone Vincenzi

Correlatore
Dott. Luca Boschian

Laureanda
Gloria Bottega

Matricola n. 1225122

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Alla memoria del caro nonno Placido

SOMMARIO

RIASSUNTO……3

ABSTRACT……..5

1. INTRODUZIONE……...7

1.1 LA RIBOFLAVINA...…..……..……..……7

1.2 L'ORIGINE DELLA RIBOFLAVINA NEI VINI....……...11

1.2.1 La composizione chimica dei mosti……..……..……..…….…..11

1.2.2 L'apporto dei lieviti….…….……13

1.2.3 I coadiuvanti della fermentazione….…….…….….14

1.2.4 I vini….…….……...16

1.2.4.1 La metionina……..……...17

1.3. IL GUSTO LUCE…….....19

1.3.1 Generalità..……...19

1.3.2 Metodi comuni per limitare il problema…….…….21

1.4. SCOPO DEL LAVORO…….22

2. MATERIALI E METODI……25

2.1 I lieviti....……...……....25

2.2 Mosti e relative correzioni….…….……..25

2.3 Le fermentazioni….……..……26

2.4 Campionamenti…….……..……..26

2.5 Misura della densità ottica...…….…27

2.6 Analisi HPLC....……27

3. RISULTATI E DISCUSSIONE……...29

3.1 Cinetiche fermentative nei mosti 1-4……29

3.2 La produzione di riboflavina…….31

3.3 Il confronto tra due lieviti…….35

4. CONCLUSIONI……41

5. BIBLIOGRAFIA……..……43

6. SITOGRAFIA……...…45

RIASSUNTO

Il gusto luce è un difetto che si può riscontrare nei vini bianchi e rosati imbottigliati in vetro incolore ed esposti a radiazione luminosa.

La causa di questa problematica è la fotoriduzione che avviene a carico della riboflavina (o vitamina B_2), la quale deriva principalmente dal metabolismo dei lieviti. Il fenomeno si verifica attraverso alcune reazioni biochimiche che coinvolgono la riboflavina e la metionina: queste provocano la formazione di metantiolo e disolfuro di metile, ossia composti solforati caratterizzati da un odore sgradevole di aglio, cipolla, cavolo cotto e gomma.

Per tale motivo, il vino viene penalizzato sia dal punto di vista aromatico, con perdita di eleganza, freschezza e fragranza, sia dal punto di vista cromatico, a causa dell'ossidazione dei composti polifenolici coloranti.

L'interesse a contrastare il gusto luce sta aumentando notevolmente negli ultimi anni, in particolar modo per l'emergenza preponderante di tipologie di vino rosato le quali, per moventi puramente commerciali, vengono vendute prevalentemente in bottiglie trasparenti.

Negli anni sono state consolidate alcune soluzioni, più curative che preventive, e spesso non sufficienti ad arrestare efficacemente il problema. A tale proposito, con l'avvento del Prosecco Rosé, richiesto da una determinata nicchia del mercato, la relativa area di produzione è attualmente interessata alla ricerca di alternative valide, a quelle già conosciute, che evitino l'insorgere del difetto nei prodotti venduti.

Con lo studio proposto si è cercato di analizzare il problema da un punto di vista preventivo, osservando il metabolismo fermentativo di alcuni ceppi di lievito su diversi mosti Glera; i microrganismi sono stati selezionati tra quelli commercialmente disponibili e di maggiore utilizzo nell'areale del Prosecco DOC.

L'obiettivo finale è limitare l'accumulo di riboflavina durante la fermentazione alcolica, inoculando lieviti che presentano una bassa produzione di questa sostanza.

I risultati hanno evidenziato la presenza di lieviti con capacità di rilascio diverse e hanno permesso di identificare un ceppo particolarmente promettente. La solidità dei dati raccolti è confermata dalla coerente bassa produzione di riboflavina da parte del ceppo scelto in 5 mosti reali differenti. I dati raccolti rappresentano una base di partenza per comprendere al meglio il metabolismo di questa vitamina e avere quindi i mezzi necessari a ridurne il contenuto nel vino, in maniera del tutto naturale.

ABSTRACT

The light-struck taste is a defect that can be found in white and rosé wines bottled in colorless glass and exposed to light radiation.

The cause of this problem is the photoreduction that occurs in riboflavin (or vitamin B2), which derives mainly from yeast metabolism.

The phenomenon occurs through some biochemical reactions involving riboflavin and methionine: these cause the formation of methanthiol and methyl disulfide, that are sulfur compounds characterized by an unpleasant smell of garlic, onion, cooked cabbage and rubber.

For these reasons, the wine is penalized both from the aromatic point of view, with a loss of elegance, freshness and fragrance, and from a chromatic point of view, due to the oxidation of colouring polyphenolic compounds.

The interest in contrasting the light taste is increasing considerably in recent years, especially for the preponderant emergence of rosé wines which, for purely commercial reasons, are sold mainly in transparent bottles.

Over the years, some solutions have been consolidated, more curative than preventive, and often not enough to effectively stop the problem.

In this regard, with the advent of Prosecco Rosé, required by a certain niche in the market, the related production area is currently interested in the search for valid alternatives, to those already known, that can compensate for the onset of the defect in the products sold.

With the proposed study we tried to analyse the problem from a preventive point of view, observing the fermentative metabolism of some yeast strains on different Glera musts; the microrganisms were selected from those much used in the Prosecco DOC area.

The ultimate goal is to limit the accumulation of riboflavin during alcoholic fermentation by inoculating yeasts that have a low production of this substance.

The results highlighted the presence of yeasts with different release capacities and made it possible to identify a particularly promising strain. The solidity of the data collected is confirmed by the consistent low production of riboflavin by the chosen strain in 5 different real musts. The data collected represent a starting point to better understand the metabolism of this vitamin and therefore have the necessary means to reduce its content in wine, in a completely natural way

1. INTRODUZIONE

1.1 LA RIBOFLAVINA

La riboflavina, o vitamina B_2, è stata isolata parzialmente per la prima volta nel 1879 dal chimico inglese A. Wynter Blyth durante degli studi sulla composizione del latte vaccino: egli identifica un pigmento di colore giallo brillante, che chiama lattocromo (Santos de Souza et al., 2005). Questo pigmento ha inoltre la peculiarità di emettere fluorescenza se esposto alla luce.

Il nome di riboflavina gli viene riconosciuto alcuni decenni dopo, a seguito del progresso della ricerca sulle vitamine.

All'inizio del '900, infatti, viene scoperta una nuova classe di nutrienti essenziali al fabbisogno umano e, in soli cinque decenni, vengono isolate più di una dozzina di vitamine come sostanze chimiche pure (l'ultima ad essere scoperta è la vitamina B_{12} nel 1948).

È negli anni 30 del 1900 che vengono trovati, in diverse fonti, dei pigmenti giallo-verdi simili al lattocromo. Uno di questi viene anche riconosciuto come costituente del complesso vitaminico B.

Nel 1933, un gruppo dell'Università di Heidelberg (Germania), tra cui Paul György, Richard Kuhn e Theodore Wagner-Jauregg, riesce, per la prima volta, nell'isolamento e nella purificazione della vitamina B_2 utilizzando, come test sperimentale, la risposta di crescita di alcuni ratti alimentati con una dieta controllata.

Tra il 1934 ed il 1935, Richard Khun e Paul Karrer verificano inoltre la natura chimica dei pigmenti precedentemente scoperti, accomunati dal carattere fluorescente; essi scoprono che si tratta di un'unica sostanza, della quale successivamente determinano la struttura molecolare: la riboflavina.

Il nome riboflavina è composto dal suffisso "ribo", indicante il ribitolo, e flavina, dal latino "flavus", giallo: il primo è un alcol polivalente prodotto dalla riduzione del monosaccaride ribosio, le flavine invece sono dei composti organici a base di isoallossazina; quest'ultima è una molecola aromatica eterociclica originata dalla pteridina, caratterizzata a sua volta dalla fusione di un anello di pirimidina ed uno di pirazina.

La vitamina B_2 deve il suo nome al fatto che inizialmente si riteneva che la vitamina B avesse due componenti, una termolabile (B-1) ed una termostabile (B-2). La tiamina venne identificata come la prima componente, mentre la seconda si scoprì essere un

complesso di diverse vitamine. Di tale gruppo, la riboflavina è stata la prima ad essere isolata, perciò le venne conferito il nome B_2.
Si tratta di una vitamina idrosolubile, anche se non ad alte concentrazioni, presente in diversi alimenti, tra cui il latte ed i suoi derivati, le uova ed i vegetali, ma si può trovare anche nel fegato animale, nel lievito e nei cereali.
Se l'uomo necessita di assumere questa fonte vitaminica attraverso l'alimentazione, poiché non è capace di sintetizzarla autonomamente, diversamente i lieviti devono obbligatoriamente produrla in quanto non sono caratterizzati da trasportatori specifici.
Rispetto alle quantità riscontrabili nei mosti, che sono riconducibili alla composizione chimica dell'uva, la vitamina B_2 predomina nei vini: è possibile quindi affermare che la sua presenza, nel prodotto finito, ha natura prevalentemente microbica (Fracassetti et al., 2021).

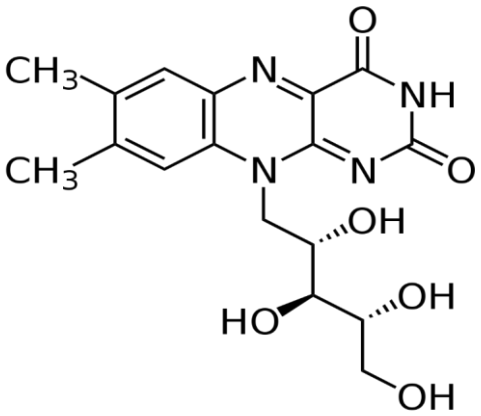


Figura 1.1 - Struttura molecolare della riboflavina.

Data la sua struttura molecolare, essa ha una caratteristica molto importante, ossia ha la capacità di partecipare attivamente alle reazioni di ossidoriduzione, con trasferimento di uno o due elettroni.
La vitamina B_2, infatti, possiede una funzione prevalentemente coenzimatica, partecipando alla costituzione del FAD (flavin adenin dinucleotide) e del FMN (flavin mononucleotide), due coenzimi ossidoriduttivi essenziali, tra gli altri, per il funzionamento di una classe di proteine chiamate flavoenzimi o flavoproteine. Questi enzimi sono necessari al metabolismo energetico dei lieviti ed, in particolar modo, alla

loro respirazione cellulare; la riboflavina ha inoltre un ruolo nelle vie metaboliche di carboidrati, proteine e grassi.

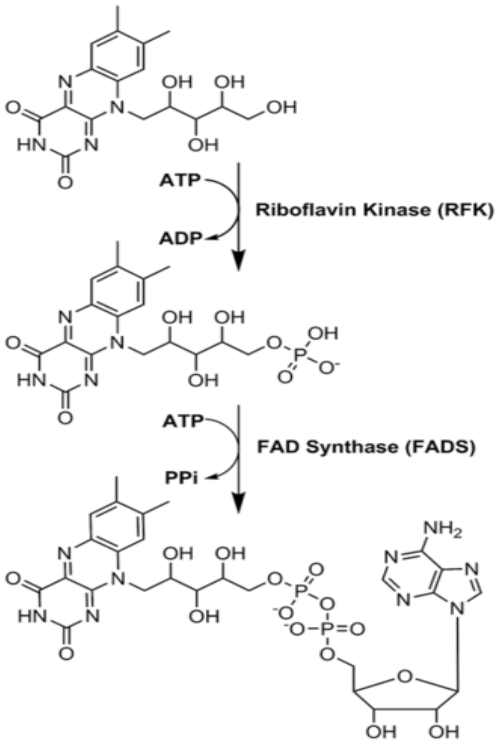


Figura 1.2 – Sintesi di FMN e FAD a partire dalla riboflavina.

Più precisamente, il flavina mononucleotide si origina dalla riboflavina, a seguito di fosforilazione operata dall'enzima flavochinasi: a seguito dell'idrolisi di una molecola di ATP, viene liberato un gruppo fosfato che si aggancia al gruppo ossidrile (-OH) presente sull'ultimo atomo di carbonio del ribitolo.

Il flavina mononucleotide differisce dal flavina adenin dinucleotide esclusivamente per la mancanza di un gruppo AMP, l'adenosina monofosfato, ossia un nucleotide convolto in molte reazioni biochimiche e presente nell'RNA.

La reazione di elaborazione del FAD prevede la partecipazione dell'enzima FAD sintasi il quale anch'esso utilizza una molecola di ATP.

Tra i processi biochimici che richiedono FMN e FAD vi sono:

- l'ossidazione del succinato nel ciclo di Krebs;
- la β-ossidazione degli acidi grassi;
- l'ossidazione del glicerolo 3-fosfato a diidrossiacetonefosfato (DHAP);

- il trasporto di elettroni nella catena respiratoria.

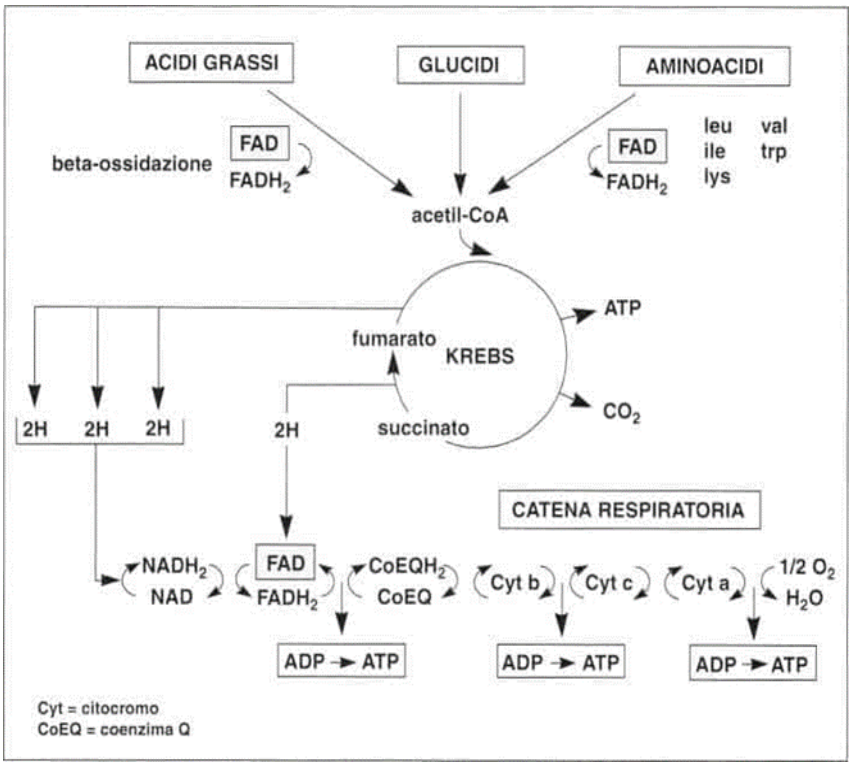


Figura 1.3 – Ruolo dei coenzimi flavinici nel metabolismo cellulare dei lieviti.

Il FAD è un componente molto importante della catena respiratoria delle cellule di lievito, è infatti parte della succinato deidrogenasi, la quale è inserita nella loro membrana mitocondriale.

Il FAD inoltre ha un ruolo importante nel ciclo di Krebs, il quale è, assieme alla glicolisi, una delle due importanti fasi che caratterizza la respirazione cellulare dei lieviti.

Come si può notare anche dalla figura 1.3, all'interno del ciclo di Krebs, o ciclo degli acidi tricarbossilici, o ciclo dell'acido citrico, il FAD ha la funzione di ossidare il succinato in fumarato, dal quale si origina successivamente il malato e ancora l'ossalacetato: quest'ultimo appartiene alla classe degli α-chetoacidi.

Ad alimentare il ciclo di Krebs è l'acetil-CoA, il quale deriva dalla decarbossilazione dell'acido piruvico; quando viene carbossilato, con relativa produzione di malonil-CoA, esso può attivamente partecipare alla biosintesi degli acidi grassi, indispensabili per la formazione dei fosfolipidi di membrana.

Per concludere, il FAD ha quindi una funzione energetica di vitale importanza per le cellule di lievito e partecipa alle reazioni cataboliche mediante trasporto di elettroni.

1.2 L'ORIGINE DELLA RIBOFLAVINA NEI VINI

1.2.1 La composizione chimica dei mosti

Le vitamine si trovano in tutte le componenti delle bacche d'uva, in particolar modo nelle bucce. Il loro ruolo è rilevante nel processo fermentativo dei mosti: esse, infatti, agiscono come fattori di crescita per i lieviti, intervenendo sulla moltiplicazione e le attività cellulari.

Il contenuto vitaminico solitamente aumenta con l'approssimarsi della raccolta, tuttavia la presenza di patogeni, come ad esempio gli attacchi fungini, può ridurne la disponibilità.

Secondo quanto descritto da Ribéreau-Gayon et al. (2017), il mosto d'uva è sufficientemente provvisto di queste sostanze anche se "i tenori naturali non corrispondono necessariamente alla dose ottimale".

Durante la fermentazione alcolica, il comportamento variabile dei lieviti provoca la rielaborazione della componente vitaminica in maniera diversificata.

Se alcuni lieviti sono capaci di sintetizzare in parte o totalmente questi fattori di crescita, altri non hanno le caratteristiche per farlo e, in loro assenza, non possono svilupparsi; è quindi fondamentale la presenza di una sufficiente quantità di vitamine nel mosto.

Tra le vitamine presenti nei mosti, il cui tenore varia sulla base di fattori come il grado di maturazione o la tipologia del vitigno (Cappelli e Vannucchi, 2014), è possibile ritrovare quelle del gruppo B (la tiamina, la riboflavina, l'acido pantotenico, la piridossina, la nicotinammide, la biotina, il mesoinositolo, la cobalamina e la colina), l'acido ascorbico (vitamina C) e il beta-carotene (pro-vitamina A).

Nel caso specifico, la concentrazione della riboflavina nell'uva non sempre aumenta contemporaneamente alla maturazione del frutto stesso. Le quantità riscontrabili nei mosti sono infatti generalmente minori rispetto a quelle presenti nei vini in quanto una notevole quantità ne viene prodotta e rilasciata dai lieviti durante la fermentazione alcolica (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

Nel prossimo capitolo verrà discusso il tema del gusto luce e verrà quindi chiarito il

motivo per il quale la riboflavina è così importante. Affrontando però, in questo paragrafo, la composizione chimica dell'uva e del mosto, è bene discutere brevemente il tema delle fonti azotate: tra gli aminoacidi presenti nell'uva è la metionina a richiamare l'attenzione, in quanto responsabile, insieme alla vitamina B_2, dell'insorgere del gusto di luce (Fracassetti et al., 2021).

Il tenore di azoto totale presente nell'uva, che si compone di composti organici ed inorganici, dipende dalla tipologia di varietà coltivata, dalle caratteristiche del portinnesto, dal terreno e dalle pratiche colturali: esso si localizza soprattutto nella buccia degli acini, mentre la polpa ne è relativamente povera (Nicolini et al., 2004).

Al momento dell'invaiatura è l'azoto organico a prevalere su quello inorganico, in quanto quest'ultimo si riduce in modo rapido, perché utilizzato nell'elaborazione di sostanze complesse.

I lieviti utilizzano prevalentemente aminoacidi, peptidi, ioni ammonio (NH_4^+), urea e nitrati. Le prime tre fonti di azoto appena citate sono quelle che vengono preferite, perché facilmente disponibili nei mosti: il tenore ammoniacale costituisce normalmente 1/3 dell'azoto prontamente assimilabile (APA), mentre i restanti 2/3 sono caratterizzati dalla quota amminoacidica. Tra gli aminoacidi, quello più presente è l'arginina, 5-10 volte più concentrato rispetto agli altri. I microrganismi della fermentazione alcolica consumano principalmente i ramificati (valina, leucina, isoleucina) e gli aromatici (triptofano, tirosina, fenilalanina).

Diversamente, l'urea non è solitamente presente nei mosti e la sua aggiunta non è permessa nei paesi dell'Unione Europea; i nitrati invece possono essere assimilati solo in pochissime specie enologiche, tra di esse però non troviamo *S. cerevisiae.*

GRUPPO A	GRUPPO B	GRUPPO C	GRUPPO D
Arginina Asparagina Ac. Aspartico Ac. Glutammico Glutammina Lisina Serina Treonina	Istidina Isoleucina Leucina **Metionina*** Valina	α-alanina Ammoniaca Glicina Fenilalanina Triptofano Tirosina	Prolina

Tabella 1.1 – Ordine di assorbimento degli aminoacidi da parte dei lieviti (Zambonelli, 2003).

Come è possibile notare dalla tabella 1.1, gli aminoacidi consumati dai lieviti sono suddivisi in 4 gruppi, sulla base della velocità di utilizzazione degli stessi: la metionina appartiene al gruppo B, di cui fanno parte gli aminoacidi assorbiti gradualmente durante il processo fermentativo.
Secondo Thorne e Barton-Wright (1949), l'utilizzazione degli aminoacidi da parte dei lieviti può avvenire anche senza alcuna preventiva trasformazione, mentre altri autori (Jones et al., 1969) negano questa possibilità e sostengono che la loro utilizzazione avviene soltanto dopo transaminazione (Zambonelli, 2003).
Per effetto delle trasformazioni cui vanno soggetti, gli aminoacidi partecipano alla formazione di composti secondari alla fermentazione.
Per quanto riguarda le concentrazioni, bisogna ricordare che un litro di mosto contiene il 70-80% di acqua, all'interno della quale si trovano tutti gli altri componenti del succo d'uva in soluzione vera, in dispersione colloidale o in sospensione; tra questi, gli zuccheri (150-300 g/l) e gli acidi organici (5-14 g/l) rappresentano la frazione più rilevante. Le proteine e gli aminoacidi, invece, sono la fonte azotata maggiormente presente nei mosti, circa 0,07-0,50 g/l, valori che possono essere anche più o meno elevati sulla base delle diverse condizioni pedo-climatiche che si verificano annualmente. Infine, le vitamine si trovano nel mosto in quantità misurabili in µg/l. Nonostante questo, la loro presenza è di fondamentale importanza e basse concentrazioni di riboflavina possono causare l'insorgere del gusto luce nei vini.

1.2.2 L'apporto dei lieviti

Durante il corso della fermentazione alcolica, i lieviti utilizzano e rielaborano sia la componente azotata, sia la frazione vitaminica, in particolar modo questi microrganismi sfruttano le vitamine come coenzimi.
Durante il loro metabolismo fermentativo, i lieviti producono riboflavina e, come già detto precedentemente, la sua presenza nei vini è infatti prevalentemente di natura microbica.
Si pensa che la produzione della vitamina B_2 sia dovuta alla mancanza di trasportatori affini alla molecola, i quali non consentono ai microrganismi di arricchirsene. Risulta quindi essere una caratteristica fisiologica dei lieviti, che esalta l'importanza del ruolo biologico della riboflavina.
I molteplici studi eseguiti sul fabbisogno in fattori di accrescimento hanno dimostrato

che i lieviti utilizzano prevalentemente biotina, acido pantotenico, tiamina, piridossina, acido nicotinico e inositolo; solo raramente viene richiesto da alcuni ceppi l'acido para-aminobenzoico. Per quanto riguarda *S. cerevisiae,* la maggior parte dei ceppi richiede acido pantotenico, invece tutti necessitano della biotina.
La mancanza di uno di uno dei fattori di accrescimento nel mosto causa un ritardo nello sviluppo del lievito: questo comportamento è una delle cause della difficoltà riscontrabile nello studio dell'ereditarietà della capacità di sintesi vitaminica.
In nessun caso invece è stata riscontrata la necessità di acido folico e riboflavina; quest'ultima anzi, viene generalmente secreta nel mezzo, durante lo sviluppo dei lieviti stessi (Zambonelli, 2003).
Da quanto appena descritto si evince che i lieviti hanno la caratteristica di non riuscire ad approvvigionarsi di riboflavina. Nonostante questo, la vitamina B_2 è molto importante per il metabolismo energetico quindi, l'unica soluzione risulta essere la sintesi internamente alla cellula.
La produzione di questa sostanza è inoltre ceppo-specifica e notevoli differenze si possono riscontare anche all'interno della medesima specie.

1.2.3 I coadiuvanti della fermentazione

Com'è stato descritto finora, la presenza di questa vitamina nei vini è dovuta principalmente al metabolismo fisiologico dei lieviti, i quali la rilasciano nel mezzo in quantità più o meno spinta.
A causare un aumento della concentrazione di questa sostanza sono però anche tutti quei prodotti che vengono utilizzati per favorire e garantire il metabolismo cellulare dei lieviti e che sono derivati da una o più parti dei microrganismi stessi.
Tra questi, vi sono le scorze e gli idrolizzati di estratto di lievito, ma anche le sostanze azotate semplici (sali di ammonio). Le prime possono essere addizionate già nella fase di inoculo; oltre a migliorare la vitalità dei microrganismi, ne favoriscono la tolleranza all'ambiente alcolico, contribuendo al profilo organolettico dei vini. Si tratta di additivi enologici ottenuti dalla purificazione degli "involucri" (termine industriale che indica parete e membrana plasmatica) delle cellule di lievito.
Esse hanno la capacità di fissare gli acidi grassi tossici (dannosi), svolgendo un ruolo adsorbente. L'effetto di queste sostanze è più pronunciato quando vengono aggiunte dopo che la fase di crescita dei lieviti è terminata. Il loro utilizzo è accompagnato dalla

variazione della concentrazione dei prodotti secondari e quindi dell'aroma, ecco perché le scorze di lievito devono essere utilizzate in modo prudente.
Per favorire il controllo della fermentazione alcolica, possono essere impiegati anche gli idrolizzati di estratto di lievito, ricchi in azoto assimilabile, vitamine, fattori di sopravvivenza (acidi grassi, steroli) e sali minerali. Sono gli steroli che, combinandosi con altre sostanze quali l'ossigeno, le vitamine e l'azoto, favoriscono lo sviluppo e la sopravvivenza dei lieviti; possono però impartire odori e aromi estranei al vino.

Vitamina	Contenuto di vitamina in µg/g di autolisato
Tiamina	10-50
Riboflavina	15-75
Nicotinamide	125-550
Ca pantotenato	30-120
Biotina	0,05-2

Tabella 1.2 – Composizione in vitamine di autolisati commerciali (Zambonelli, 2003).

I prodotti sopra elencati contribuiscono quindi all'accumulo di riboflavina perché sono costituenti essenziali delle cellule dei lieviti.
Si tratta pur sempre di sostanze di una grande importanza in fermentazione, ecco perché ridurne l'utilizzo sarebbe impossibile e controproducente. Quando però ci si interroga sull'origine della riboflavina nei vini, è bene tenere a mente che, anche i prodotti impiegati durante il processo fermentativo, per incentivare il metabolismo cellulare dei lieviti, causano l'accumulo finale di vitamina B_2.
È fondamentale anche, per limitare il gusto luce nei vini, tenere sotto controllo la produzione di aminoacidi solforati, in particolar modo la metionina. Si deve perciò prediligere una nutrizione azotata organica che presenti un basso tenore di queste sostanze.
D'altro canto, negli ultimi anni stanno comparendo sul mercato sempre più prodotti industriali derivati dai lieviti che promettono un minore apporto di precursori del gusto

luce senza compromettere l'addizione di nutrienti essenziali per la fermentazione alcolica.

1.2.4 I vini

Il vino è una bevanda di natura idroalcolica, ottenuta dalla fermentazione degli zuccheri del mosto; presenta un pH acido ed una composizione chimica molto elaborata.

Alle caratteristiche del prodotto finito concorrono non solo le condizioni dell'uva raccolta, ma anche le tecniche di vinificazione attuate, per non parlare delle cure prestate durante l'affinamento dei vini stessi.

La tabella 2.2 mette alla luce le differenze quantitative relative alla presenza di vitamina B_2 nei vini bianchi, rosati e rossi.

Vini	***Valore minimo (µg/l)***	***Valore massimo (µg/l)***	***Valore medio (µg/l)***	***Deviazione standard (+/- SD)***
Bianchi	*69*	*151*	*112*	*25*
Rosé	*74*	*193*	*115*	*45*
Rossi	*156*	*292*	*226*	*40*

Tabella 1.3 - Quantità di riboflavina nei vini (Nardiello et al., 2003).

Nei mosti sono presenti circa 3-60 µg/l di riboflavina. Queste concentrazioni aumentano durante la fermentazione alcolica.

È facile notare come, nella vinificazione in rosso delle uve, le quantità siano maggiormente elevate: la spiegazione potrebbe essere semplicemente la macerazione a cui sono sottoposti gli acini, che comporta il rilascio di sostanze presenti nelle bucce, tra le quali le vitamine stesse.

1.2.4.1 La metionina

L'azoto è fondamentale per il metabolismo cellulare dei microrganismi, partecipa infatti alla composizione chimica delle proteine, degli enzimi, del DNA.

In particolar modo i lieviti sono capaci di sintetizzare autonomamente gli aminoacidi di cui hanno bisogno (prototrofia), attraverso transaminazione di gruppi amminici, oppure organicazione.

A tale proposito, la metionina deriva dall'aspartato, il quale a sua volta proviene dall'ossalacetato. Quest'ultimo è sintetizzato a livello mitocondriale, grazie alla carbossilazione del piruvato, prodotto dalla glicolisi: questa operazione è eseguita dall'enzima piruvato carbossilasi.

Per la produzione della metionina è necessario lo ione solfuro che viene generalmente messo a disposizione dai lieviti, i quali sintetizzano una quota di anidride solforosa.

I lieviti possono utilizzare lo ione solfato (SO_4^{2-}), portandolo all'interno delle loro cellule grazie alla solfato permeasi; attraverso quindi una serie di reazioni chimiche e l'utilizzo di ATP, viene prodotto lo ione bisolfito (HSO_3^-) il quale, attraverso l'azione dell'enzima solfuro reduttasi, viene trasformato in ione solfuro (S^{2-}): si tratta di una reazione di riduzione molto potente che non potrebbe mai avvenire se il potenziale redox della cellula e del vino non fosse sbilanciato, con un eccesso di NADH.

Lo ione solfuro può quindi essere incorporato per la sintesi di cisteina e metionina, come si può vedere dalla figura 2.1, nella pagina successiva.

Per concludere, in presenza di un eccesso di questo ione, le cellule di lievito possono produrre idrogeno solforato, un composto caratterizzato dal fastidioso odore di uova marce. Senza la necessità di trasportatori, esso viene rilasciato nel vino dove reagisce principalmente con l'etanolo e gli alcoli superiori, dando origine a mercaptani, i quali possono produrre composti più complessi, ossia acidi esteri tioacetici, o disolfuri, responsabili del gusto luce.

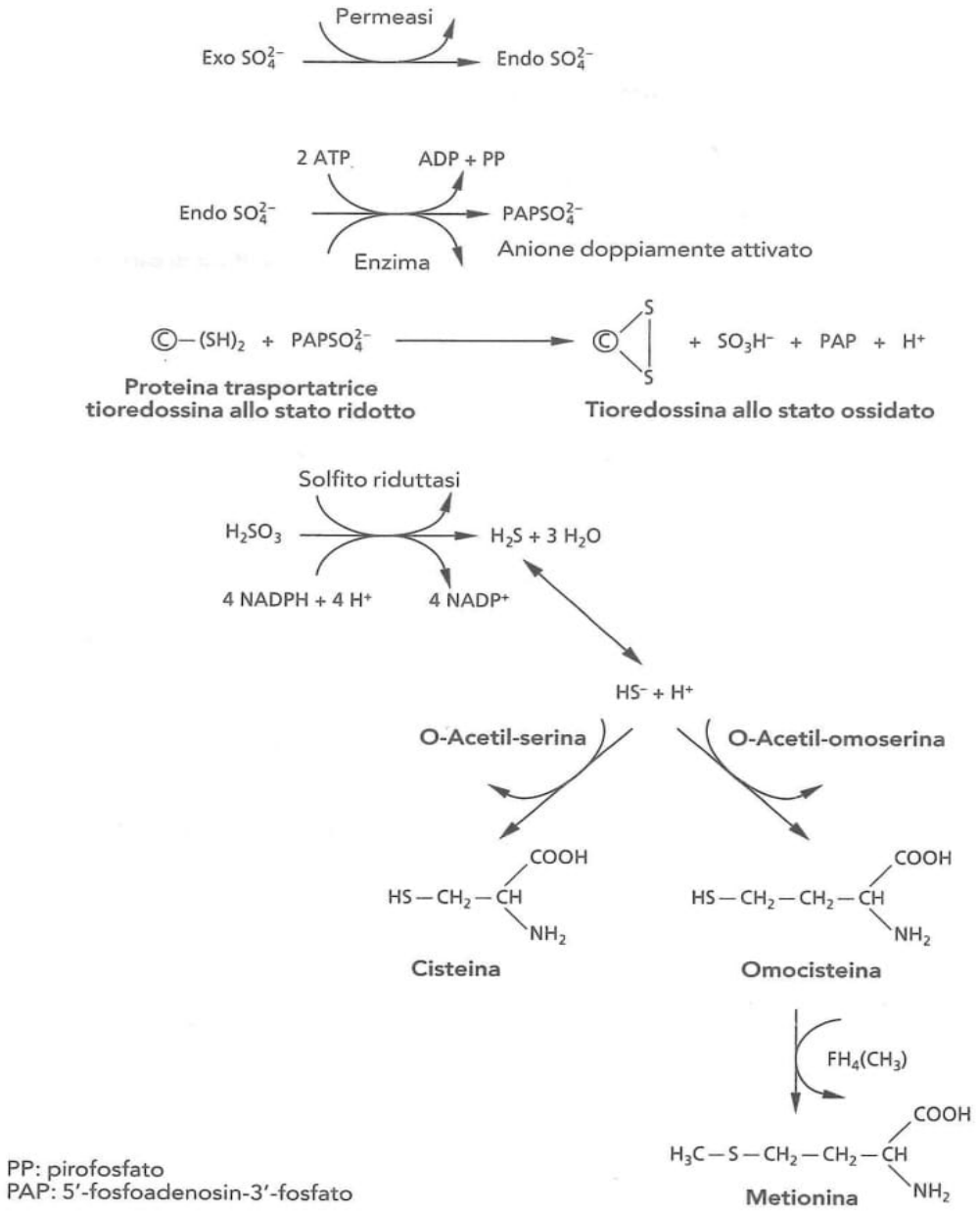


Figura 1.4 – Riduzione dei solfati, con produzione di diossido di zolfo, d'idrogeno solforato e di aminoacidi solforati (Ribéreau-Gayon et al, 2018).

1.3 IL GUSTO LUCE

1.3.1 Generalità

Il gusto luce è un difetto che impoverisce i vini dal punto vista organolettico.
Esso si verifica soprattutto a seguito dell'imbottigliamento del prodotto finito e quindi alla sua immissione sul mercato, in presenza di vetro incolore ed esposizione alla luce naturale o artificiale.
La riboflavina, infatti, è una sostanza altamente sensibile alla luce ultravioletta (picchi a 225 nm e a 275 nm) e visibile (picchi a 370 nm e 450 nm).

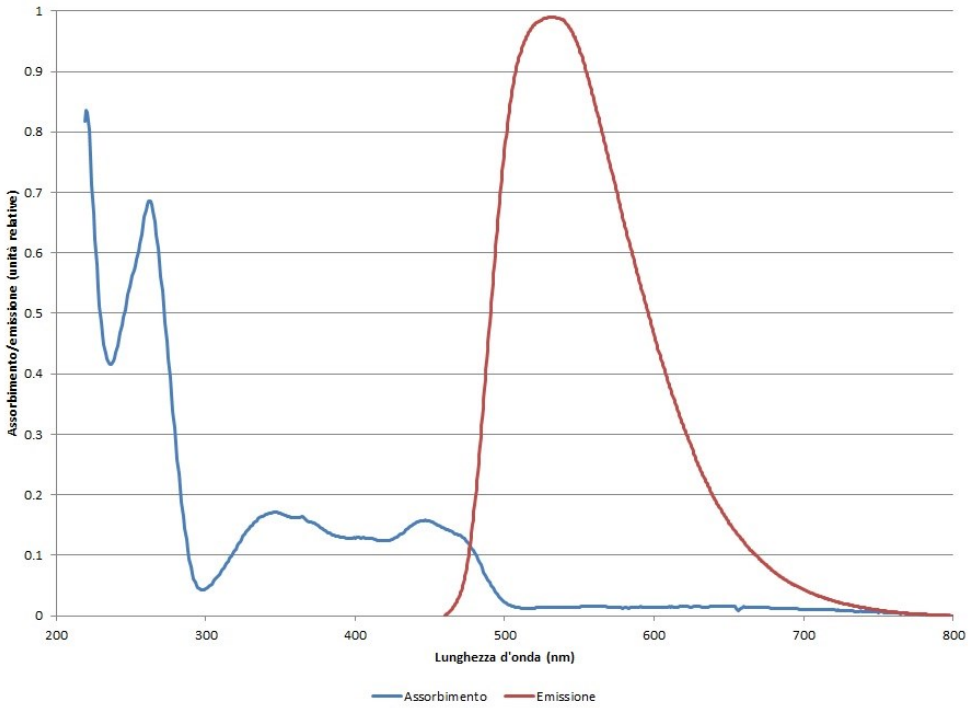


Figura 1.5 – Spettro di assorbanza e fluorescenza della riboflavina.

Una volta esposta alla radiazione luminosa, questa sostanza è soggetta ad una foto-eccitazione a causa della quale passa dallo stato chimico fondamentale a quello eccitato. In questa condizione, l'energia in eccesso può essere dissipata in tre diverse modalità:

- emissione di luce per fluorescenza;
- produzione di calore con conseguente degradazione della vitamina interessata;
- reazione chimica con altre molecole.

Nel primo caso, la vitamina B_2 può rilasciare energia sottoforma di fluorescenza a circa 530 nm, come si può notare dalla figura 3.1. Questa proprietà è solitamente sfruttata per la rilevazione in HPLC o con metodi spettrofotometrici.

La riboflavina è inoltre capace di reagire, in qualità di composto ossidante, con la metionina, subendo una fotoriduzione: l'aminoacido solforato dona due elettroni, ossidandosi a metionale, una molecola a sua volta fotolabile estremamente instabile alla luce, che si scinde in metantiolo (MeSH) ed acroleina. Quest'ultima, chiamata anche propenale o acrilaldeide, è associata al caratteristico odore del grasso bruciato; in enologia deriva anche dalla degradazione della glicerina, operata dai batteri lattici.

Il metantiolo, invece, detto anche metilmercaptano, ha un odore molto forte, sgradevole, pungente, di uova marce e cavolo cotto. Esso presenta una soglia di percezione molto bassa, 0.3-3 µg/l.

La reazione di due molecole di questa sostanza porta alla formazione del dimetil disolfuro (DMDS), un composto meno volatile, ma con una soglia di percezione altrettanto bassa, mediamente 30 µg/l. Esso è responsabile della comparsa di puzze riconducibili alla cipolla, all'aglio, al cavolfiore in cottura.

Generalmente, nei vini, il rapporto stechiometrico RF:Met è superiore all'unità, raggiungendo anche il valore di 1:20; la metionina quindi svolge un ruolo rilevante nella comparsa del gusto luce.

A tale proposito però, è stato dimostrato che una concentrazione di vitamina B_2 inferiore a 100 µg/l può ridurre il rischio di un'eventuale alterazione nei vini.

l lieviti sono noti per contenere un gene, RIB5, che codifica per la formazione dell'enzima riboflavina sintasi, il quale è coinvolto nell'ultima fase della sintesi di riboflavina da parte del lievito (Mislata et al., 2021).

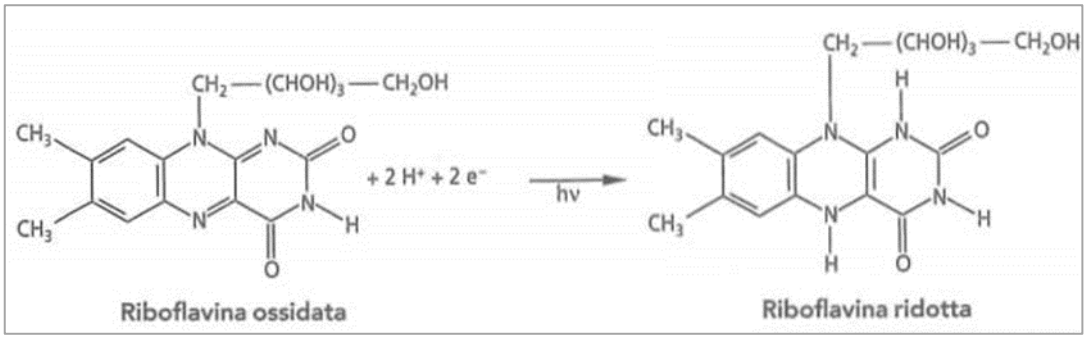


Figura 1.6 – Riduzione fotochimica della riboflavina, attiva nel gusto di luce (Ribéreau-Gayon et al, 2018).

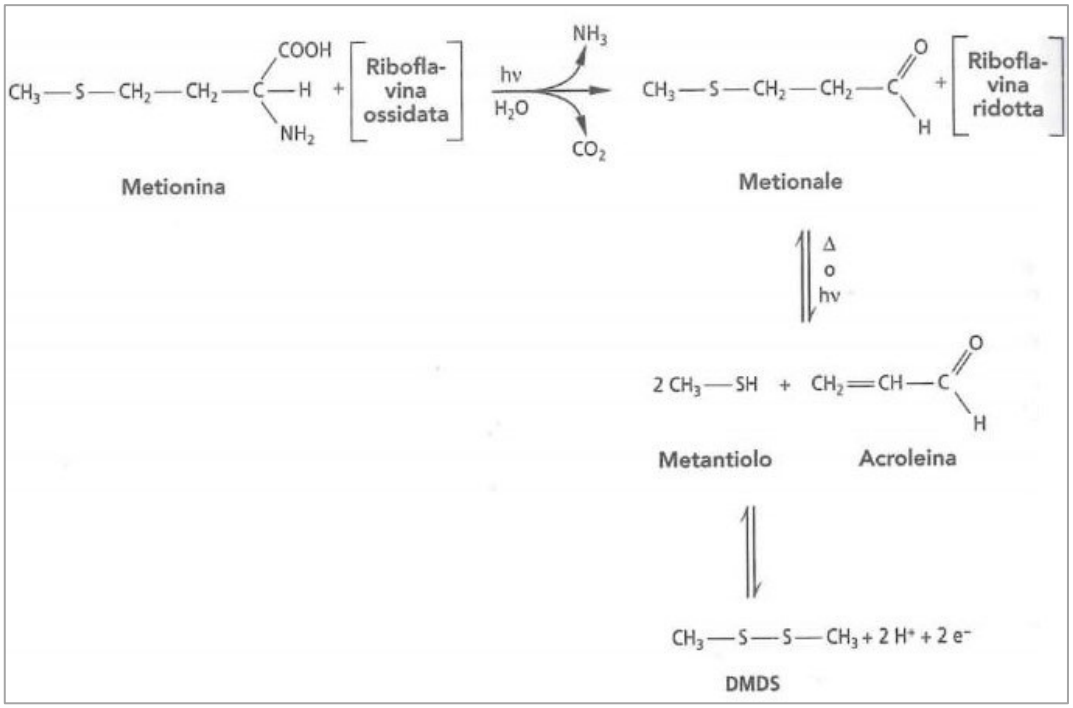


Figura 1.7 – Sequenza delle reazioni chimiche implicate nella comparsa del gusto di luce (Ribéreau-Gayon et al, 2018).

1.3.2 Metodi comuni per limitare il problema

È chiaro che utilizzare bottiglie colorate ed evitare le sorgenti luminose durante il periodo di conservazione e affinamento del prodotto, siano le soluzioni più efficaci per evitare o limitare il gusto luce nei vini. A causa di motivi prettamente commerciali però, queste precauzioni non vengono sempre prese in considerazione.

Si pensi ad esempio alle GDO, dove le bottiglie di vino bianco e rosé in vendita sono frequentemente di vetro trasparente, proprio per esaltarne il colore, la brillantezza, la limpidezza; esse, infatti, vengono solitamente esposte in appositi scaffali illuminati.

Per prevenire questo problema, quindi, è possibile mettere in atto alcune strategie che favoriscono la rimozione o la protezione della riboflavina presente nei vini. Purtroppo, intervenire sulla metionina non è possibile dato che prende parte alla nutrizione azotata dei lieviti e perché comunque non esistono tecniche specifiche in grado di rimuovere selettivamente un solo aminoacido.

Le soluzioni curative prevedono l'utilizzo di prodotti enologici adsorbenti, tra i quali il carbone e la bentonite, oppure antiossidanti, come i tannini e l'acido ascorbico.

I primi possono ridurre il contenuto della vitamina B_2 nel mezzo del 70%; tuttavia,

essendo materiali aspecifici, impoveriscono il vino delle sostanze che lo caratterizzano, tra cui gli aromi e gli antociani. Questi prodotti devono quindi essere utilizzati con molta cautela.

Anche i tannini (catechine) si rivelano efficaci perché hanno un effetto schermante nei confronti della riboflavina ma, in opposizione, possono apportare un sapore legnoso ed amaro, non necessariamente desiderato nel prodotto finito.

Fra gli altri antiossidanti utilizzabili vi è l'acido ascorbico il quale, dato il suo carattere riducente e fotosensibile, può interagire con la vitamina B_2, evitando che quest'ultima reagisca con la metionina. Nonostante ciò, ci sono dei limiti legali sulla dose massima utilizzabile, fissata a 100 mg/l.

Un'altra soluzione preventiva, abbastanza efficace, nei confronti del gusto luce, è l'addizione del rame che può formare dei composti con la riboflavina, esponendo però più facilmente il vino a rischi ossidativi. Inoltre, essendo un metallo pesante, deve essere presente nella bevanda alcolica in quantità inferiori a 1 mg/l.

Tutte queste soluzioni trattate sono prevalentemente curative; sono utili, ma non sufficientemente vantaggiose o proficue nel limitarne il problema.

Un'ultima alternativa a cui potersi approcciare è quindi fare uso di lieviti che producono una bassa quantità di riboflavina, agendo in maniera preventiva e in modo del tutto non invasivo.

1.4 SCOPO DEL LAVORO

Agire in maniera preventiva sembra essere una soluzione valida ed opportuna a limitare il gusto luce nei vini.

Vari lavori pubblicati testimoniano che è già attiva la ricerca sperimentale di microrganismi che producono una bassa quantità di riboflavina durante la fermentazione alcolica. Tuttavia, non è mai stato condotto uno studio inerente i lieviti maggiormente utilizzati nella zona di produzione del Prosecco DOC.

Come è già stato sottolineato nell'introduzione, nelle zone vitivinicole a noi vicine, l'avvento del Prosecco Rosé ha causato l'aumento di casistiche in cui i produttori necessitano di soluzioni tempestive ed adeguate per prevenire il problema nei vini.

Ad aggravare la situazione, sono le condizioni di luce, ossigeno e temperatura imprevedibili, tipiche dei lunghi trasporti e spostamenti cui sono soggetti questi prodotti, quando commercializzati all'estero.

Ci troviamo infatti di fronte ad un mercato centralizzato maggiormente in determinati paesi, grazie alla presenza di alcune nicchie di consumatori.
Con la tesi proposta, si è voluto approfondire il metabolismo fermentativo di alcuni ceppi di lievito appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* già comunemente in uso nella zona del Prosecco DOC, verificando l'eventualità della presenza di almeno un microrganismo che si contraddistingua per una minore produzione di riboflavina.
Una volta individuati due lieviti agli antipodi del rilascio di vitamina B_2, ovvero un alto ed un basso produttore, lo studio si è focalizzato sull'analisi di alcuni parametri fondamentali della cinetica di fermentazione, con relativa caratterizzazione dell'accumulo di riboflavina in entrambi i lieviti scelti e durante tutto il processo fermentativo.

2. MATERIALI E METODI

2.1 I lieviti

In questa sperimentazione è stato analizzato il metabolismo fermentativo di 8 lieviti, appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, di comune utilizzo nella zona di produzione del Prosecco.

In particolar modo, si tratta di: SP665, CGC62, SP49, Uvaferm DV10, Uvaferm FC-513, Lalvin ICV OKAY, Lalvin QA23 e Premium Prosecco.

SP665 e CGC62 sono due lieviti prodotti dall'azienda francese La Claire, con sede in Champagne.

SP49 è fabbricato da Station Oenotechnique de Champagne, situata anch'essa nello Champagne.

È di origine canadese, invece, l'azienda Lallemand, la quale fornisce sul mercato Uvaferm DV10 e Lalvin ICV OKAY, selezionati in Francia, ma anche Lalvin QA23 e Uvaferm FC-513, rispettivamente isolati in Portogallo e in Spagna.

Infine, è prodotto in Italia il lievito Premium Prosecco, dall'azienda enologica Vason, localizzata in Veneto, in provincia di Verona.

Tutti gli 8 ceppi discussi sono caratterizzati da buone cinetiche di fermentazione, hanno un buon potere alcoligeno e un'ottima tolleranza alle caratteristiche chimiche del mezzo, ossia la presenza delle basse temperature, di etanolo, diossido di carbonio ed anidride solforosa. Inoltre, dal punto di vista organolettico, garantiscono la produzione di vini complessivamente qualitativi.

2.2 Mosti e relative correzioni

Lo studio di ciascun lievito è stato condotto su 5 diversi mosti, per aumentare la solidità dei dati ottenuti ed esplorare, inoltre, diverse composizioni iniziali dei mezzi fermentanti.

Il primo mosto (mosto 1) è stato fornito dall'azienda Bonotto Delle Tezze, locata a Vazzola (TV), mentre ulteriori 3 (mosto 2, 3 e 4) sono stati forniti dalla cantina Perlage, situata a Farra di Soligo (TV). Il mosto su cui sono state effettuate le fermentazioni dei due ceppi selezionati (SP49 e QA23) è stato fornito dal Consorzio Prosecco DOC e proveniente dalla zona di Trieste (mosto 5). Sono stati tutti ottenuti da uve 100% Glera.

I mosti sono stati conservati a basse temperature (-20°C) fino al momento dell'utilizzo. Sono quindi stati scongelati e filtrati con filtro di lana di vetro, avente diametro di 47 mm e dimensione dei pori di 0,7 µm.
Successivamente, prima dell'inoculo fermentativo, sono stati sottoposti ad alcune correzioni inerenti sulla composizione chimica, ottenendo così 5 prodotti di partenza omogenei e con caratteristiche ideali.
A tal proposito, è stato addizionato quando necessario acido tartarico fino a 6,5 g/l, APA fino a 200 mg/L, oltre che lisozima fino a 200 mg/L su tutti i campioni.
L'azoto prontamente assimilabile, comprendente sali di ammonio e azoto organico, è stato addizionato grazie al prodotto Fermaid E, fabbricato dall'azienda Lallemand.

2.3 Le fermentazioni

I microrganismi sono stati reidratati in acqua di rubinetto, alla temperatura di 37°C, in un volume pari a dieci volte il loro peso secco (1g di lievito in 10 mL di acqua).
Inoltre, per rinforzare la membrana cellulare e migliorare la resistenza del lievito agli stress della fermentazione, è stato aggiunto Go-Ferm Protect, sempre prodotto da Lallemand, costituito da autolisato ad alto contenuto in steroli e lieviti inattivati, particolarmente ricchi di minerali, in concentrazione finale del 10% (1g in 10 mL di sospensione di lievito).
Trascorsi 30 minuti di reidratazione a 37°C, è stato eseguito l'inoculo.
Per i mosti 1, 2, 3 e 4 sono state utilizzate delle beute da 250 ml, sono stati inseriti 300 µl di lievito e 150 mL di mosto (diluizione 1:500). Per il mosto 5 sono state impiegate beute da 1L, 500 mL di mosto e un inoculo di 1 mL di lievito. In questo modo è stata adoperata la dose di 20 g/hl, solitamente utilizzata nelle cantine.
Le fermentazioni sono state condotte in luogo chiuso e termostato alla temperatura di 18°C.

2.4 Campionamenti

Quotidianamente, durante la fermentazione di tutti i mosti, è stato eseguito il peso delle beute, monitorando il rilascio di CO_2 e quindi l'andamento fermentativo dei lieviti.
Nel caso del mosto 5, in aggiunta, sono stati prelevati 5 mL da ogni beuta, per eseguire le misure di densità ottica e per ottenere i campioni HPLC. Questi ultimi sono stati

centrifugati in modo da eliminare le fecce grossolane, filtrati tramite filtro da siringa in acetato di cellulosa e congelati a -20°C fino al momento dell'analisi.
Terminata la fermentazione dei mosti 1, 2, 3 e 4, i 150 ml totali di vino presenti sono stati così suddivisi: 50 ml sono stati filtrati e congelati per poi essere analizzati attraverso HPLC; i restanti 100 ml sono stati ripartiti in due aliquote da 50 mL ciascuna e lasciati a riposare a contatto con le fecce fini, per 2 settimane, a temperatura controllata (4° e 12°).
Una volta terminata la sosta e quindi trascorsi i 14 giorni, sono stati separati i surnatanti dei relativi campioni tramite filtro di lana di vetro, avente diametro di 47 mm, per poi essere successivamente congelati a -20°C fino all'utilizzo.
Un'aliquota da 1 mL è stata prelevata al momento dell'analisi HPLC e filtrata tramite filtro da siringa in acetato di cellulosa.

2.5 Misura della densità ottica

La misura della densità ottica è stata eseguita con frequenza giornaliera, per i campioni del mosto 5, con l'obiettivo di monitorare la torbidità cellulare, ovvero la presenza di cellule di lievito (vive e morte).
A tale proposito è stato utilizzato uno spettrofotometro Amersham Ultrospec 2100 Pro e la rilevazione istantanea dei valori è stata eseguita a lunghezza d'onda di 600 nm (OD600).
I campioni sono stati caricati nello strumento per mezzo di cuvette monouso in plastica, aventi capacità di 2 mL.

2.6 Analisi HPLC

La riboflavina contenuta nei campioni è stata quantificata tramite HPLC a fase inversa. Il sistema è composto da una HPLC Shimadzu Nexera XR, equipaggiata con fluorimetro RF-20AC e caratterizzata da pompe LC-20AD ed autocampionatore SIL-20AC.
La colonna utilizzata per la separazione è una Kinetex C18 (4.6×150 mm), mantenuta a temperatura costante di 37°C in forno CTO-20AC, a circolazione forzata dell'aria; la dimensione delle particelle della fase stazionaria è di 5 µm, mentre quella dei pori per la separazione delle piccole molecole è di 100 Å.

Le due soluzioni per la fase mobile sono costituite da 0,1% di acido trifluoroacetico in acqua (A) e 0,1% in metanolo (B). La separazione è avvenuta tramite eluizione a gradiente con la seguente modalità: 2 minuti a 30% B, da 30% a 60% B in 8 minuti, lavaggio a 100% B per 3 minuti, ri-equilibrazione in 30% B per 3 minuti.
La riboflavina è stata identificata tramite emissione di fluorescenza a 516 nm dopo eccitazione a 450 nm.
In un secondo momento, sempre attraverso l'utilizzo dell'HPLC, sono state analizzate le cinetiche fermentative del mosto 5. In particolare sono stati misurati il consumo degli zuccheri (glucosio e fruttosio) e la produzione di etanolo da parte dei due lieviti SP49 e QA23.
In questo caso, è stata impiegata una colonna Biorad Aminex HPX-87H, mantenuta a temperatura costante di 65°C. L'acido solforico 0.01 N ha svolto la funzione di tampone, mentre il flusso della fase era di 0,6 mL/min.
Le molecole analizzate sono state rilevate tramite rifrattometro.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Cinetiche fermentative nei mosti 1-4

L'andamento fermentativo dei diversi campioni in esame è stato monitorato quotidianamente attraverso l'esecuzione di pesate alle beute, poste nelle celle termostatate, verificando quindi il progressivo rilascio di CO_2 da parte dei lieviti, dovuto al relativo consumo degli zuccheri.

Tutti i processi fermentativi si sono svolti in maniera corretta; non sono stati verificati particolari arresti o situazioni anomale.

Nel grafico 3.1 è possibile verificare l'andamento fermentativo dei diversi lieviti nel mosto 1, prodotto dall'azienda Bonotto Delle Tezze, locata a Vazzola (TV). In questo mosto l'attività fermentativa si è conclusa attorno al nono giorno.

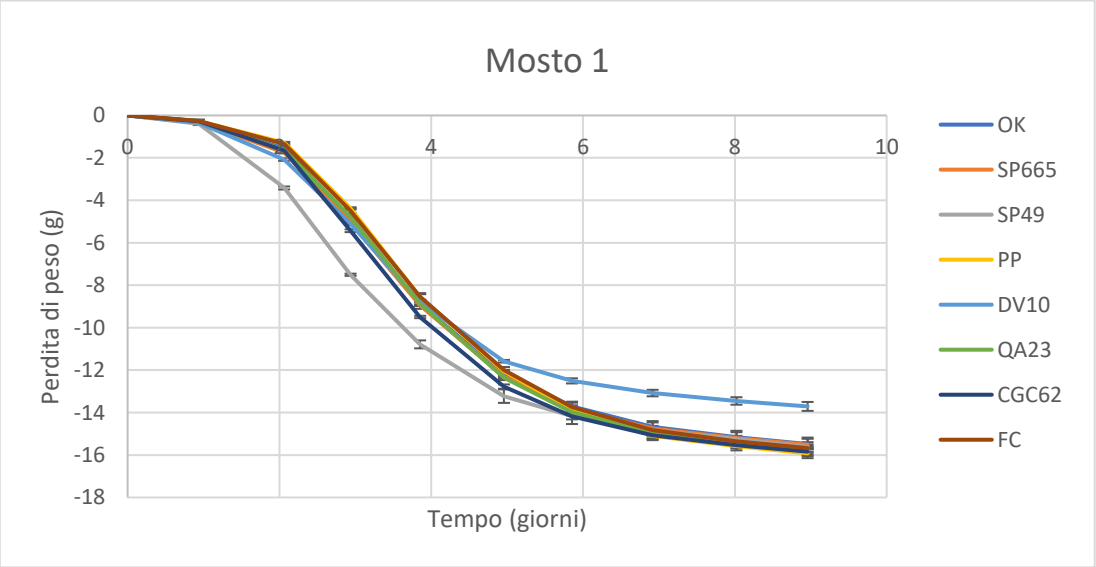


Grafico 3.1 – Perdite di peso dei vari campioni del mosto 1 durante le fermentazioni.

Ciò che si può notare è che, a parità di tempo, il lievito DV10 è caratterizzato da una minor produzione finale di CO_2 rispetto agli altri ceppi, presentando un minor vigore fermentativo.

Il lievito SP49, invece, risulta essere il più rapido nell'esecuzione delle prime fasi della fermentazione alcolica e quindi più efficiente.

Per quanto riguarda tutti gli altri microrganismi, l'andamento fermentativo sembra essere molto simile.

Grafico 3.2 – Perdite di peso dei vari campioni del mosto 2 durante le fermentazioni.

Nel mosto 2 (fig. 3.2) sono evidenti maggiori differenze tra le cinetiche fermentative dei diversi lieviti. Questo è visibile dalla minor sovrapposizione delle curve e dalla distanza fra di esse.

In questo mosto i lieviti FC e PP risultano avere una minore attività fermentativa. Al contrario il ceppo SP49 prevale ancora sugli altri per il proprio maggior vigore fermentativo.

Questo avviene anche nel penultimo mosto, il numero 3 (fig. 3.3).

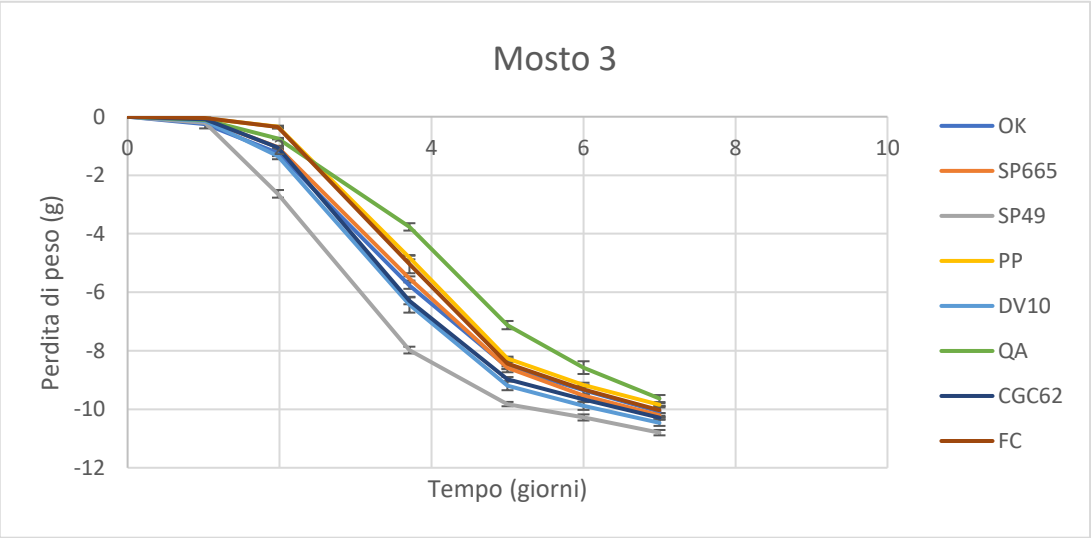


Grafico 3.3 – Perdite di peso dei vari campioni del mosto 3 durante le fermentazioni.

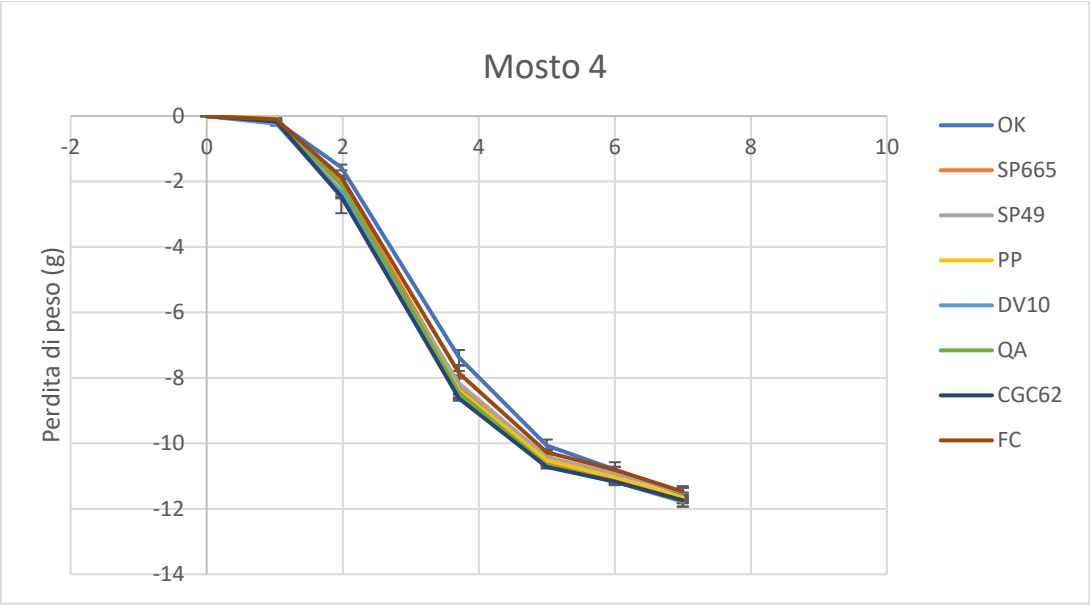


Grafico 3.4 – Perdite di peso dei vari campioni del mosto 4 durante le fermentazioni.

Nel caso del mosto 4 (fig. 3.4), infine, si nota una maggiore coerenza esistente nell'andamento fermentativo dei diversi lieviti. Essi sembrano avere delle cinetiche di fermentazione perlopiù simili. Il ceppo SP49 non prevale più nettamente sugli altri e le attività fermentative sono tutte similari. Leggermente distaccati dagli altri sono i lieviti FC e OK.

In ogni caso, quindi, ci sono delle differenze di comportamento tra i lieviti. Tali piccole variazioni possono essere imputate alle diverse composizioni dei mosti. In questa sede è anche importante ricordare che i mosti 2, 3 e 4 presentano una natura differente rispetto al primo, in quanto provenienti da un'altra zona della provincia di Treviso. Ciononostante il ceppo SP49 risulta essere, in tre casi su quattro, il lievito più performante e con una fermentazione più veloce.

3.2 La produzione di riboflavina

Terminate tutte le fermentazioni dei mosti e le eventuali soste sulle fecce fini a bassa temperatura, è stata analizzata la presenza finale di riboflavina nei campioni, attraverso l'utilizzo dell'HPLC.

Le aree ottenute tramite l'analisi HPLC sono state rapportate ai relativi quantitativi di riboflavina in µg/L, tramite l'ausilio di una retta di taratura approntata con riboflavina pura a concentrazione nota.

I risultati ottenuti rivelano che uno dei microrganismi in esame produce nettamente un minor quantitativo di riboflavina rispetto agli altri. Inoltre uno di essi prevale per il motivo opposto, ovvero risulta un alto produttore di vitamina B_2.

L'analisi del mosto 1 (fig. 3.5) rappresenta un andamento che si ripeterà essenzialmente per tutti gli altri mosti.

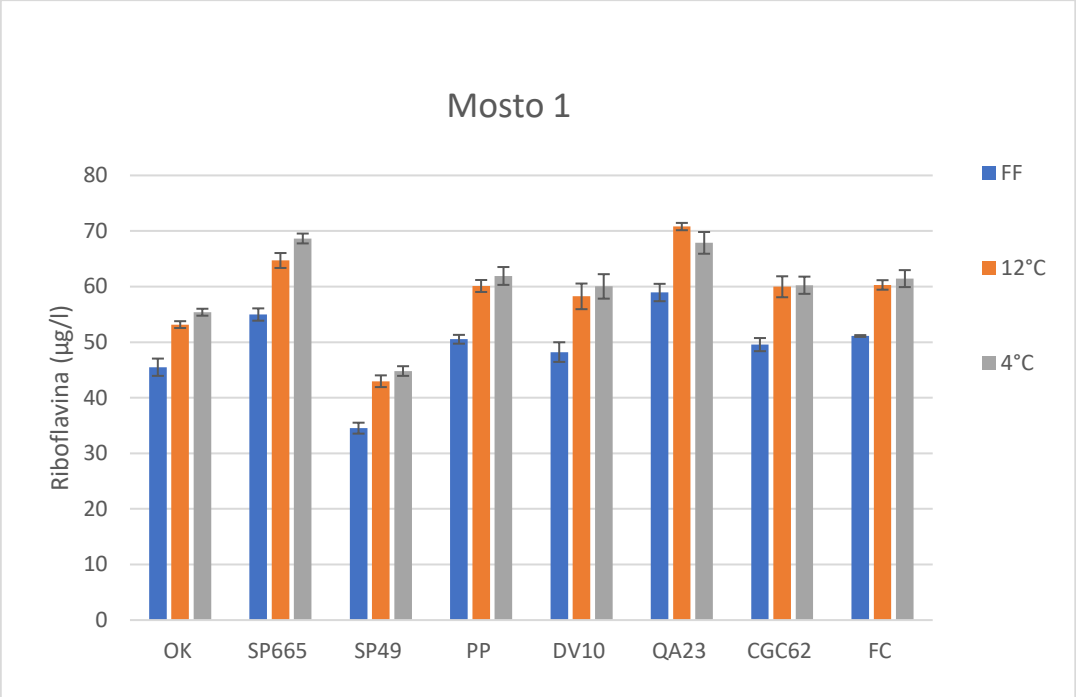


Grafico 3.5 - Produzione di riboflavina da parte dei lieviti nel mosto 1.

I dati rivelano infatti che il ceppo SP49, prodotto dall'azienda francese Station Oenotechnique de Champagne, rilascia meno riboflavina nel mosto/vino rispetto agli altri lieviti. È inoltre evidente che il ceppo Lalvin QA23, fornito sul mercato da Lallemand, accumula nel mezzo il quantitativo nettamente più alto, superiore di circa 30 µg/L rispetto all'SP49, seguito dal lievito SP665, fornito da La Claire.

Complessivamente, però, si tratta pur sempre di valori inferiori a quelli che, nel vino, sono responsabili dell'innesco del gusto luce.

Nonostante questo, è bene ricordare che il Prosecco Rosé, come altri spumanti, è soggetto ad una seconda fermentazione in autoclave, che può causare un ulteriore aumento del contenuto finale di vitamina B_2.

Perciò, utilizzare un lievito come l'SP49, durante la prima fermentazione alcolica,

potrebbe essere un punto di partenza per prevenire e limitare il problema.
Ci si può invece soffermare sulle diverse condizioni postfermentative, imposte ai vini con il solo obiettivo di ricreare le pratiche enologiche normalmente eseguite in cantina, in modo tale da monitorare il rilascio della riboflavina nelle fasi post-fermentative.
Solitamente, a fermentazione avvenuta, le temperature dei vasi vinari vengono abbassate, dall'enologo, al di sotto dei 10°C.
E' proprio per questo motivo che, con la tesi proposta, abbiamo deciso di analizzare anche le differenze tra i campioni sottoposti ad una sosta sulle fecce fini, alle basse temperature, per 14 giorni, con quelli soggetti alla separazione e relativa filtrazione dei surnatanti, trascorse le 24 ore dall'avvenuta fermentazione.
Una sosta a 12°C, quindi a temperatura maggiore, potrebbe dar luogo a un maggior rilascio di riboflavina, a causa di un possibile stress da parte delle cellule di lievito depositate sul fondo del recipiente: così, però, non è stato, almeno nel mosto 1.
Infatti la maggior produzione di vitamina B_2 si riscontra nei campioni lasciati riposare a 4°C. Le differenze sono tuttavia molto marginali e rappresentano comunque un aumento del solo 30% rispetto alla quantità di riboflavina rilasciata durante la fermentazione. Questo conferma quindi che la maggior parte della riboflavina, ritrovata nel vino, viene prodotta durante il processo fermentativo e non durante la sosta finale sui lieviti.

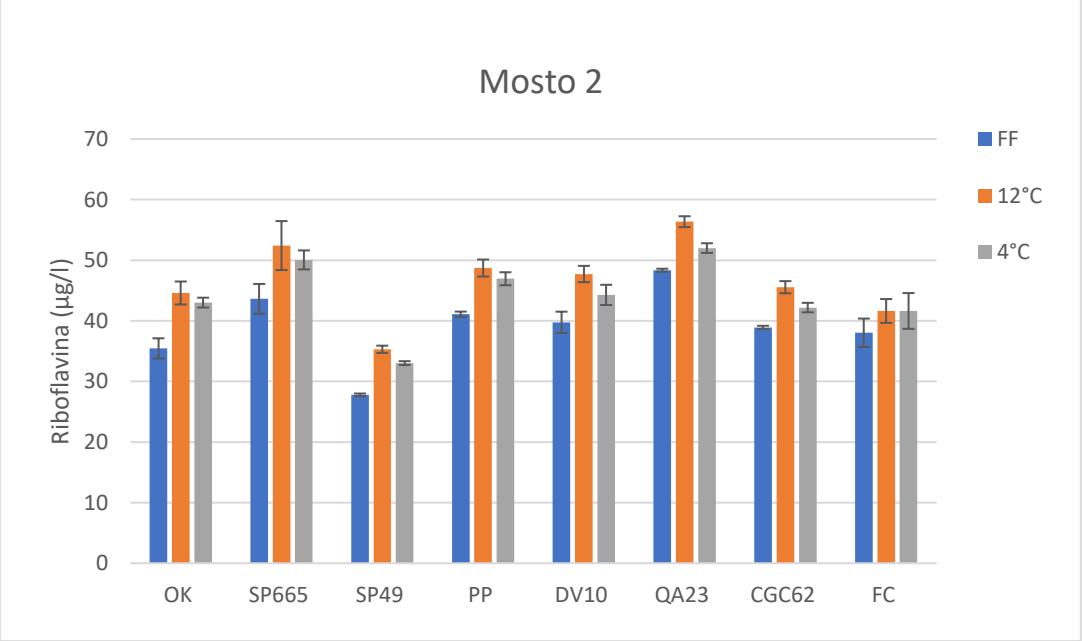
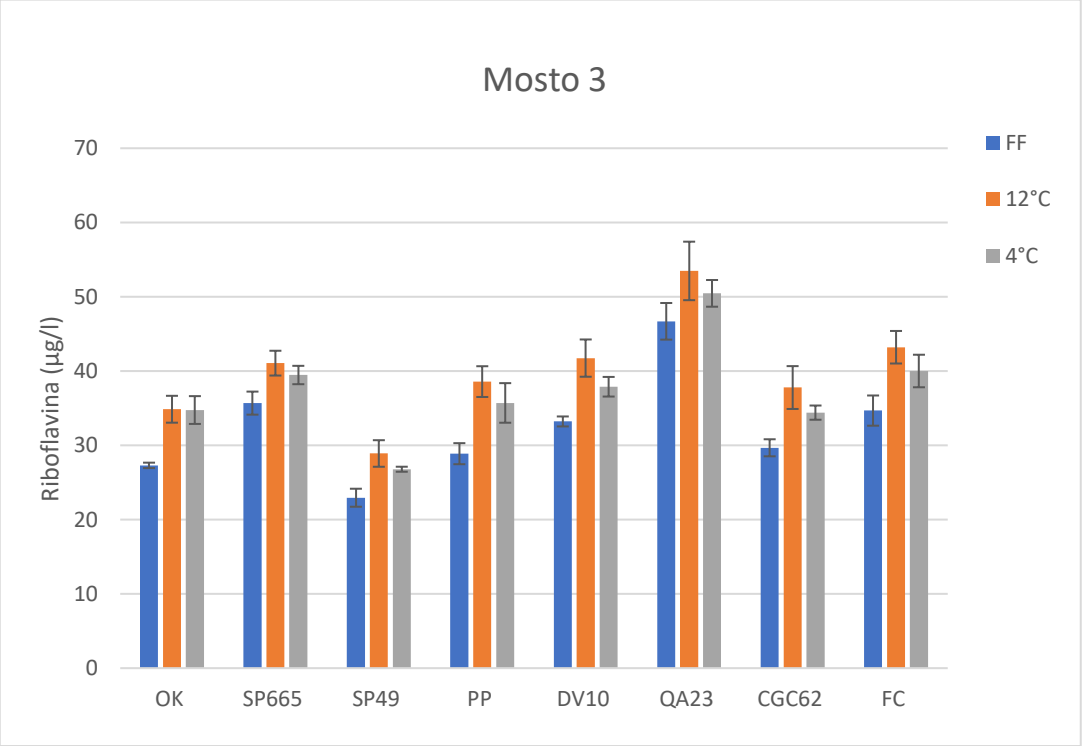


Grafico 3.6 – Produzione di riboflavina da parte dei lieviti nel mosto 2.

Anche nel mosto 2 è possibile osservare una certa coerenza con quanto osservato nel mosto 1. In questo caso, inoltre, i campioni sostati a 12°C hanno un contenuto leggermente più alto rispetto ai sostati a 4°C, cosa che si potrà notare anche per il mosto 3 e 4.

La produzione media di riboflavina rilasciata dai vari lieviti, inoltre, diminuisce.

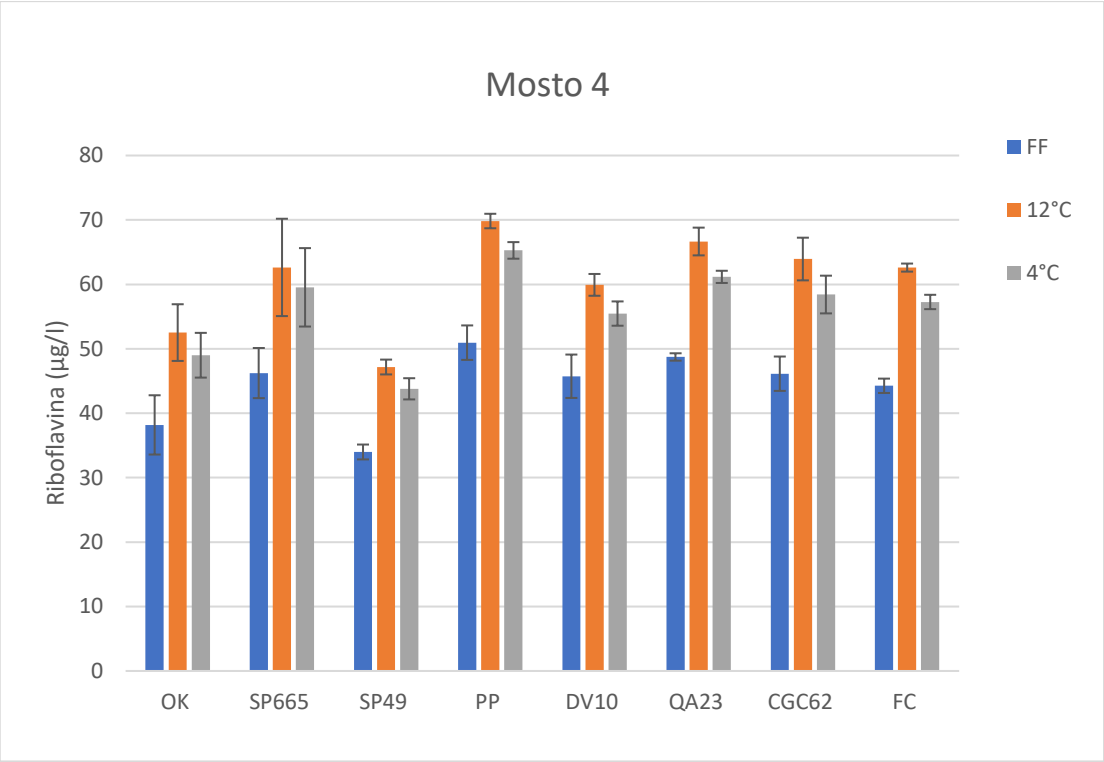
Rimane invariato il ruolo giocato dal ceppo SP49 quale minor produttore, seguito da Uvaferm FC-513 e Lalvin ICV OKAY. QA23 riconferma un'elevata produzione di riboflavina.



3.7 – Produzione di riboflavina da parte dei lieviti nel mosto 3.

Il mosto 3 si contraddistingue dagli altri esclusivamente per la quantità finale di riboflavina prodotta dai lieviti e riscontrata nei vini.

Ad esempio, rispetto al mosto 1, il ceppo QA ha rilasciato un contenuto di vitamina B_2 inferiore di circa 15 µg/l. Probabilmente, condizioni fermentative e postfermentative meno stressanti hanno garantito l'ottenimento di risultati più soddisfacenti, dovuti alla minor presenza di cellule morte nei campioni.



3.8 – Produzione di riboflavina da parte dei lieviti nel mosto 4.

Infine, nel mosto 4 (fig. 3.8) si può osservare che il contenuto finale di vitamina B_2 nei diversi campioni aumenta nuovamente.

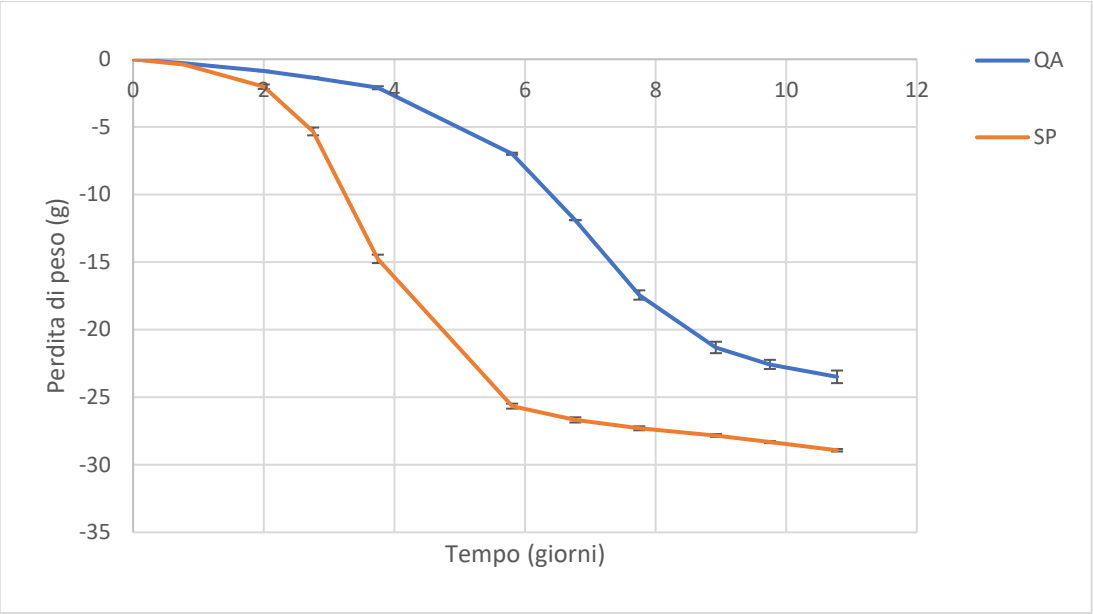
Il lievito QA viene superato di poco, quale maggior produttore, dal ceppo PP, per i "fine fermentazione" e per i "sostati" a 12°C.

Nella maggioranza dei casi, sono i ceppi SP665 ed FC ad avere un comportamento similare a quello del lievito QA.

3.3 Il confronto tra due lieviti

I risultati ottenuti dallo screening degli 8 lieviti ha permesso di isolare due ceppi commerciali, SP49 e QA23, caratterizzati rispettivamente da un basso ed un alto rilascio di riboflavina. Sono quindi state condotte delle nuove fermentazioni, utilizzando esclusivamente questi due lieviti, i quali sono stati seguiti con maggiore dettaglio.

Per suddetta parte della sperimentazione è stato utilizzato un mosto sempre di uve Glera ma proveniente dalla provincia di Trieste (Friuli Venezia Giulia).



3.9 – Perdite di peso dei campioni durante le fermentazioni.

I due processi fermentativi si sono svolti correttamente e si sono conclusi all'undicesimo giorno. Si notano però delle differenze nel metabolismo dei due ceppi di lievito: l'SP49 dimostra di avere un maggiore vigore durante le fermentazioni, con un relativo rilascio di CO_2 più rapido. Il QA23, invece, ha avuto un inizio di fermentazione stentato, per poi riprendersi successivamente. Non ha però raggiunto la stessa perdita di peso, sintomo di una minore produzione di etanolo.

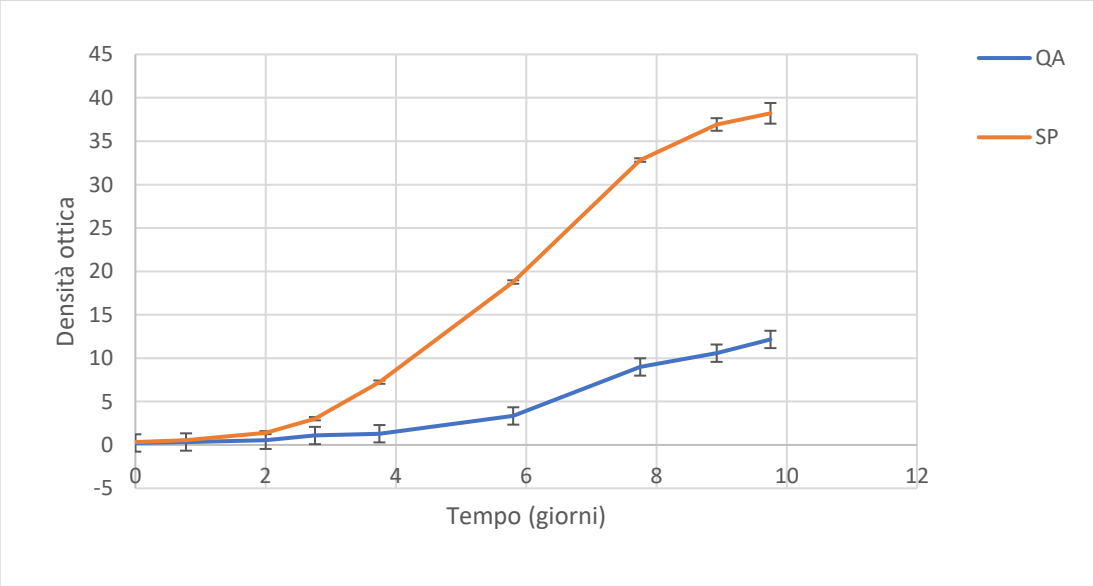


Grafico 3.10 – Torbidità dei campioni durante le fermentazioni.

L'analisi della densità ottica permette di ottenere una stima del numero di cellule di lievito presenti nella sospensione. Ciò che si può notare (fig. 3.10) è che la torbidità dei mosti inoculati con lievito SP49 è maggiore. Questo indica quindi una migliore attività, non solo fermentativa, ma anche di divisione cellulare, il che spiega la notevole velocità che ha dimostrato il ceppo SP49 nel portare a termine la fermentazione.

A tale proposito, il lievito in questione ha consumato quasi completamente gli zuccheri fermentescibili (glucosio e fruttosio) e ha prodotto una quantità di alcol etilico superiore (1% vol) rispetto a quella rilasciata dal ceppo QA (fig. 3.11).

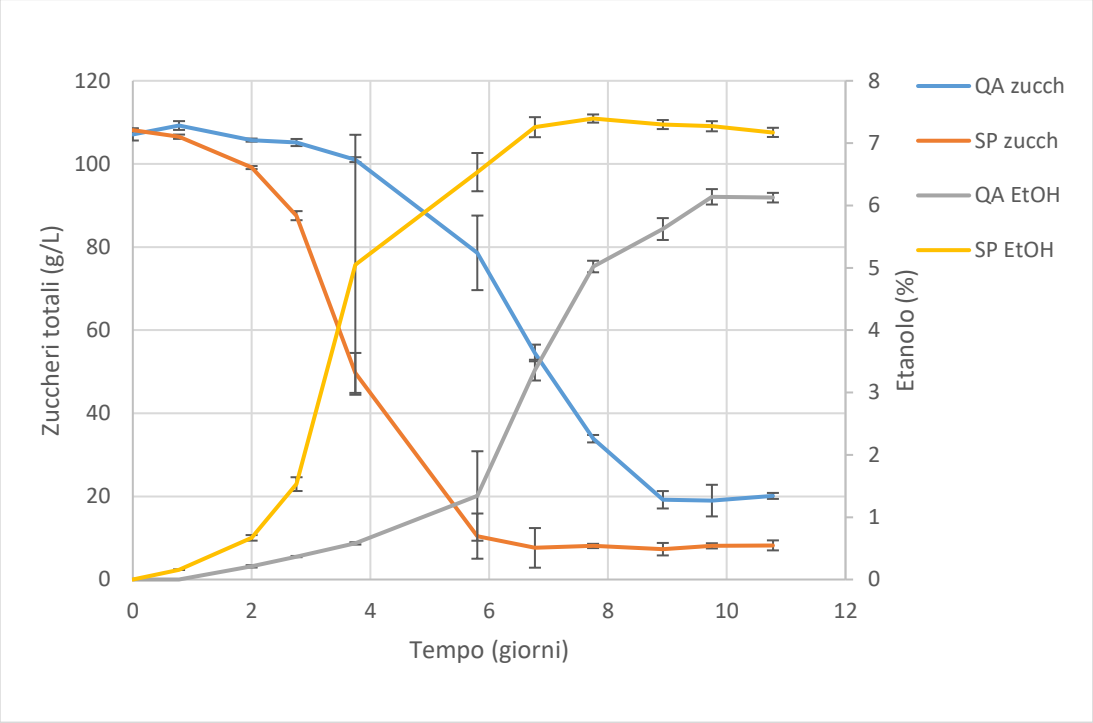


Grafico 3.11 – Consumo degli zuccheri da parte dei lieviti e relativa produzione di etanolo durante le fermentazioni.

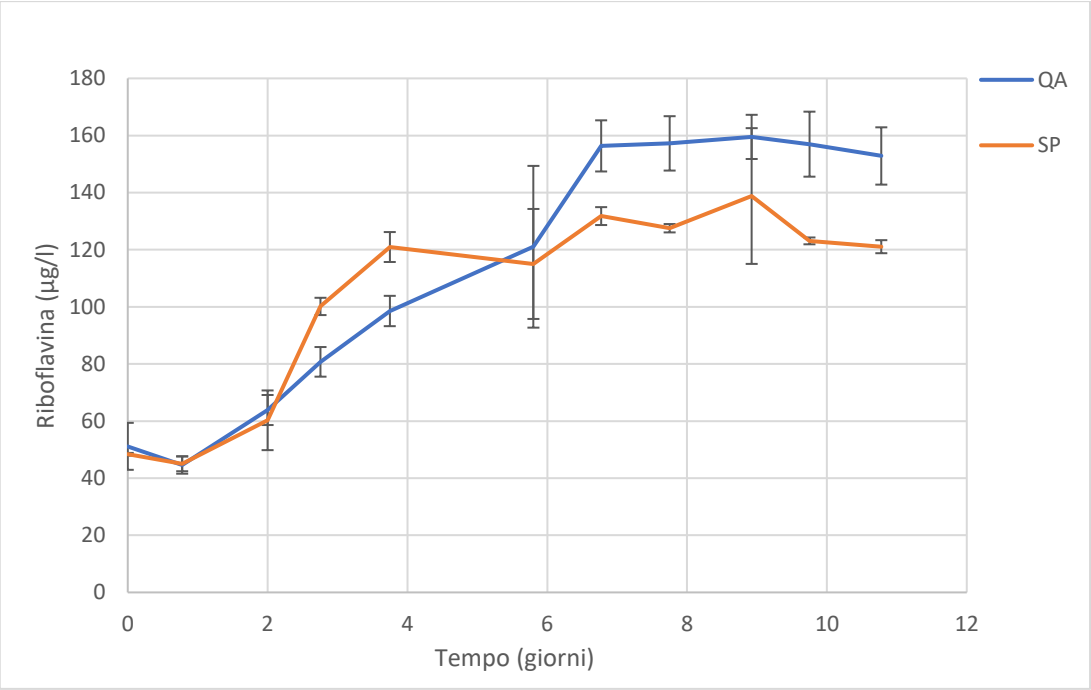


Grafico 3.12 – Produzione di riboflavina durante le fermentazioni.

L'andamento delle curve della riboflavina (fig. 3.12) riflette da vicino quello delle fermentazioni. In particolare il lievito SP49 dimostra una produzione più rapida di riboflavina che però si arresta precocemente, mentre quella del lievito QA23 procede più lentamente ma raggiunge livelli più elevati. E' inoltre interessante notare che non c'è un rilascio di riboflavina successivo al termine della fermentazione. Sembra quindi evidente che il rilascio di vitamina B_2 coincide con la fase fisiologicamente attiva del lievito.

Si può però notare che il calo nel rilascio di riboflavina da parte dei due lieviti si verifica esattamente dopo che sono stati consumati circa 50 g/l di glucosio e fruttosio. Questo si verifica indipendentemente dalla tipologia di ceppo e dalla quantità di cellule presenti nel mezzo.

Quindi, SP49 esegue un processo fermentativo più rapido e vigoroso, si moltiplica più facilmente, consuma più velocemente gli zuccheri, elaborando un prodotto più alcolico, contrariamente al lievito QA il quale risulta avere delle caratteristiche esattamente opposte, tra cui un metabolismo più lento ed un maggiore rilascio di riboflavina. Nonostante tutte queste differenze, in entrambi i casi, si verifica un calo graduale nella sintesi della vitamina, proprio quando il glucosio ed il fruttosio non vengono più consumati.

Rispetto alle fermentazioni precedenti, svolte con i mosti ottenuti da due diverse aziende situate nella provincia di Treviso, si raggiungono quantità più elevate di riboflavina, superiori alla soglia di 100 µg/L. La motivazione è da imputare alle diverse caratteristiche dei prodotti di partenza, derivanti anche da uve raccolte in località differenti. Uno stress cellulare da parte delle cellule di lievito è da escludere perché le fermentazioni sono avvenute correttamente.

4. CONCLUSIONI

La tesi proposta si è basata sulla ricerca di una soluzione preventiva e del tutto naturale utile ad arrestare e limitare in modo efficace il gusto luce nei vini bianchi e rosati.
Alcuni articoli già pubblicati descrivono l'attuale presenza sul mercato di lieviti basso produttori di riboflavina.
Il nostro obiettivo è stato quello però di focalizzarci sulla zona di produzione del Prosecco DOC, ponendo un'accurata attenzione alle caratteristiche dei relativi prodotti di partenza utilizzati e alle successive pratiche enologiche eseguite ai vini.
Nei mosti, sono stati inoculati lieviti differenti, selezionati tra quelli di maggior impiego nelle cantine del relativo areale.
I risultati si sono dimostrati immediatamente promettenti: il ceppo SP49, prodotto dall'azienda francese Station Oenotechnique de Champagne ed ottenuto dall'incrocio di *Saccharomyces cerevisiae galactose* - (ex- bayanus) e *Saccharomyces cerevisiae*, rappresenta un ottimo candidato. Le fermentazioni con questo lievito sono procedute in maniera più rapida e i vini risultanti dimostrano la presenza di un contenuto minore di riboflavina.
Dall'altro lato dello spettro si posiziona il lievito QA23, che invece garantisce una determinata coerenza relativa all'elevata produzione di riboflavina, in tutte le prove preliminari.
Una volta analizzati in maggior dettaglio, questi due lieviti hanno dimostrato ulteriori differenze. SP49 esplica infatti la sua maggiore vigoria fermentativa con una migliore attività replicativa e raggiunge una notevole biomassa, testimoniata dagli alti valori di densità ottica. Nonostante però il numero elevato di cellule presenti nella sospensione, non si verifica un maggiore rilascio di riboflavina, cosa che invece si evidenzia nelle fermentazioni del lievito QA23.
È interessante notare che il rilascio di riboflavina è coincidente col periodo di divisione attiva dei lieviti e non, come si ipotizzava, in corrispondenza della fine della fermentazione e coi supposti processi di autolisi. L'accumulo di riboflavina da parte dei due lieviti segue infatti strettamente le velocità e tempi di fermentazione: per il lievito SP49 il rilascio è veloce e raggiunge il *plateau* molto velocemente. Scenario opposto invece per il lievito QA23.
Un dato ulteriormente interessante è che il già citato *plateau* nel rilascio di riboflavina sembra essere coincidente col raggiungimento e superamento di una determinata

concentrazione di zuccheri nel mosto. Questo potrebbe indicare che il rilascio di riboflavina potrebbe essere legato a stress osmotici.

Resta ancora da esplorare la parte finale del processo produttivo tipico del Prosecco, ovvero la rifermentazione in autoclave. L'investigazione di questo ultimo passaggio potrà dare un'immagine più completa delle origini della riboflavina che si ritrova in un vino spumante finito. Si può inoltre supporre che la seconda fermentazione in autoclave, presentando condizioni chimico-fisiche notevolmente diverse, possa nuovamente richiedere un cambio di lievito.

5. BIBLIOGRAFIA

Cappelli, P., & Vannucchi, V. (2014). *Enologia.* Bologna: Zanichelli.

Evers, M. S., Roullier-Gall, C., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., & Alexandre, H. (2021). Vitamins in wine: Which, what for, and how much? *Comprehensive reviews in food science and food safety, 20* (3), 2991-3035.

Fracassetti, D., Di Canito, A., Bodon, R., Messina, N., Vigentini, I., Foschino, R., & Tirelli, A. (2021). Light-struck taste in white wine: Reaction mechanisms, preventive strategies and future perspectives to preserve wine quality. *Trends in Food Science & Technology, 112,* 547-558.

Fracassetti, D., Gabrielli, M., Encinas, J., Manara, M., Pellegrino, L., & Tirelli, A. (2016). Prevention of the appearance of light-struck taste in white wine. *BIO Web Of Conferences, 7,* 1-3.

Fracassetti, D., Limbo, S., Messina, N., Pellegrino, L., & Tirelli, A. (2021). Light-Struck Taste in White Wine: Protective Role of Glutathione, Sulfur Dioxide and Hydrolysable Tannins. *Molecules*, *26* (17), 1-20.

Fracassetti, D., Limbo, S., Pellegrino, L., & Tirelli, A. (2019). The light-struck taste in white wine: Effect and evolution during the storage. *BIO Web of Conferences, 15,* 1-4.

Fracassetti, D., Limbo, S., & Tirelli, A. (2017). Il gusto di luce nel vino bianco: Meccanismi di formazione e prevenzione. *L'enologo: Vincitore premio assoenologi-Versini 2017, 11,* 89-93.

Hillis, D. M., Sadava, D., Heller, H. C., & Price, M. V. (2013). *Fondamenti di biologia*. Bologna: Zanichelli.

Mislata, A. M., Puxeu, M., Mestres, M., & Ferrer-Gallego, R. (2021). The Light Struck Taste of Wines. *Uva e Vino, 16,* 1-20.

Mislata, A. M., Puxeu, M., Nadal, M., de Lamo, S., Mestres, M., & Ferrer-Gallego, R. (2022). Influence of different types of LEDs lights on the formation of volatile sulfur compounds in white and rosé wine. *Food Chemistry, 371,* 1-10.

Nardiello, D., Bufo, S. A., & Cataldi, T. R. I. (2003). Riboflavin in Dietary Sources: Separation and Detection by CE-LIF. *LC GC Europe, 16* (1), 30-35.

Nicolini, G., Larcher, R., & Eccli, E. (2004). L'azoto prontamente assimilabile dai lieviti nei mosti d'uva. *L'informatore agrario, 60* (34): 83-86.

Nicolini, G., Román, T., Nardin, T., Debiasi, L., Ingrassia, S., & Larcher, R. (2018). Vitamine dei vini bianchi: concentrazione e variabilità indotta dai lieviti. *Vite e Vino, 4,* 47-57.

Northrop-Clewes, C. A., & Thurnham, D. I. (2012). The discovery and characterization of riboflavin. *Annals of nutrition & metabolism, 61* (3), 224-230.

Rebuli, A. (2021). *Purificazione e applicazione di RfBP (Riboflavin Binding Protein) per la rimozione di riboflavina dal vino*. Relatore Vincenzi, S., Correlatore Boschian, L. Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali, Facoltà di Agraria, Università degli Studi Di Padova, Legnaro.

Reihl, P., & Stolz, J. (2005). The Monocarboxylate Transporter Homolog Mch5p Catalyzes Riboflavin (Vitamin B_2) Uptake in Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Biological Chemistry, 280* (48), 39809-39817.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, B., Donéche, B., & Lonvaud, A. (2017). *Trattato di enologia 1: Microbiologia del vino e vinificazioni* (4th ed.). Bologna: Edagricole.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2018). *Trattato di enologia 2: Chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti* (4th ed.). Bologna: Edagricole.

Santos de Souza, A. C., Ferreira, C. V., Bezerra Jucà, M., & Aoyama, H. (2005).

Riboflavina: Uma Vitamina Multifuncional. *Quìmica Nova, 28* (5), 887-891.

Zambonelli, C. (2003). *Microbiologia e biotecnologia dei vini: I processi biologici e le tecnologie della vinificazione* (3th ed.). Bologna: Edagricole.

6. SITOGRAFIA

https://it.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_liquida_ad_alta_prestazione

https://www.millevigne.it/il-gusto-di-luce-le-cause-la-prevenzione-leliminazione/

https://www.oenotechnic.com/DOCS/FT-SOEC_SP49_IT.pdf

https://laffort.com/wp-content/uploads/Laffort-Info/Laffort_info_123_Gusto_Luce-1.pdf

https://it.wikibooks.org/wiki/Biochimica/Vitamine

https://www.torrinomedica.it/approfondimenti/vitamine/vitamina-b2-riboflavina/

10. RINGRAZIAMENTI

In primo luogo intendo ringraziare vivamente i miei genitori, mamma Roberta e papà Gianpietro, che mi hanno permesso di affrontare questo percorso universitario.
Sono la mia fonte d'ispirazione, il mio orgoglio.
I miei traguardi li dedico a loro.

Ringrazio il Prof. Simone Vincenzi e il Dott. Luca Boschian per avermi seguita in questo importante progetto di studio con grande professionalità, disponibilità e cordialità.

Rivolgo un ringraziamento speciale alle mie sorelle, Marilena, Vilma e Nadia, per supportarmi ogni giorno nel raggiungere i miei obiettivi.

Ringrazio le mie amiche, in particolar modo Giada, Lisa, Gaia e Caterina, per essermi rimaste sempre accanto, per prendere parte costantemente alla mia felicità e alla mia pazzia.

Ringrazio infine il mio fidanzato Simone, una persona dal cuore d'oro. Mi ha trasmesso il corraggio e la forza di cui ho sempre avuto bisogno.

Dedico la felicità di questi giorni a mio nonno Placido, alla sua memoria, alle sue passioni, alla sua grinta, alle sue vittorie.
Un pensiero speciale a tutti i miei nonni.

Gloria