

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento agronomia animali alimenti risorse naturali e
ambiente

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie viticole ed enologiche

IMPATTO DI DIVERSI CEPPI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE SUL
CONTENUTO DI TIOLI VOLATILI IN VINO ROSSO

Docente di riferimento:

Prof. Simone Vincenzi

Laureanda:

Chiara Lain

Mat. n° 2045969

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	4
2. I TIOLI	6
2.1 I PRECURSORI INODORI	8
2.2 L'ATTIVITA' β -LIASICA.....	10
2.3 L'INFLUENZA DELLE PRATICHE VITICOLE SUI PRECURSORI INODORI.....	13
2.4 L'IMPORTANZA DELLE OPERAZIONI DI CANTINA	15
3.MATERIALI E METODI.....	17
3.1 PROTOCOLLO	20
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	23
4.1 DISCUSSIONE	32
RINGRAZIAMENTI	34
BIBLIOGRAFIA.....	35
SITOGRAFIA.....	38

RIASSUNTO

I tioli volatili come il 4-mercapto-4-metilpentan-2-one (4MMP), il 3-mercaptoesano-1-olo (3MH), e il suo acetato (3MHA) contribuiscono positivamente all'aroma fruttato dei vini rossi giovani. Questi composti rientrano nella classe degli aromi varietali poiché derivano da precursori inodori che, mediante l'attività beta-liasica dei lieviti, vengono rilasciati durante la fermentazione alcolica.

L'obiettivo di questa tesi è valutare l'influenza di diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sul contenuto di tioli volatili in vino rosso. Sono stati selezionati otto ceppi commerciali, inoculati in mosto di Syrah, e le fermentazioni sono state condotte in condizioni controllate. Al termine delle fermentazioni è stata effettuata l'analisi degli aromi per quantificare i principali tioli volatili presenti. È stata anche comparata la nutrizione organica con la nutrizione inorganica per studiare l'influenza sui composti aromatici.

ABSTRACT

Volatile thiols, such as 4-mercapto-4 methylpentan-2-one (4MPP), 3-mercaptohexan-1-ol, and its acetate (3MHA) contribute positively to the fruity aroma of young red wines. These compounds belong to the group of varietal aromas because they originate from odourless precursors that, through the beta-lyase activity of yeasts, are cleaved during alcoholic fermentation.

The aim of the thesis is to evaluate the impact of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the content of volatile thiols in red wine. Eight commercial strains were selected, inoculated in Syrah must and the fermentations were carried out under controlled conditions. At the end, aroma analysis was performed to quantify the principal thiols in wine. The study also investigated the influence on the aromatic compounds of an organic nutrition compared to an inorganic nutrition.

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Le preferenze dei consumatori in materia di vino sono in continua evoluzione. Vini che in passato erano molto apprezzati possono oggi non essere altrettanto graditi o non rispecchiare completamente i gusti della popolazione. I cambiamenti possono derivare da cambiamenti negli stili di vita, innovazioni enologiche, motivi etici o morali.

Il vino rosso, più di tutti, ha accusato questa evoluzione. Negli ultimi vent'anni il suo consumo è calato drasticamente. Secondo il Focus dell'OIV del 2023 nei tre paesi maggiori produttori (Italia, Francia e Spagna) il consumo di vino rosso è diminuito rispettivamente del 29,2%, 39,9% e 18,9% negli anni dal 2017-2021 rispetto al periodo che va dal 2000 al 2004.

Il vino rosso tutt'ora è fortemente legato all'idea di bevanda impegnativa, da consumare solo in occasioni speciali, accompagnata da piatti come carni rosse e formaggi stagionati. Tuttavia, le tendenze di mercato hanno evidenziato un interesse sempre maggiore dei consumatori nei confronti di vini rossi ricchi di note fruttate rispetto ai rossi più strutturati e tannici. I consumatori chiedono ai produttori un vino poco alcolico, non molto colorato e fruttato.

Questa tendenza è influenzata da diversi fattori. In primo luogo, i consumatori tendono a bere vino fuori casa, in contesti all'aperto e conviviali, preferendo spesso le bollicine. Anche il cambiamento climatico gioca un ruolo da protagonista: le temperature sempre più alte spingono verso il consumo di vini freschi e meno alcolici. Inoltre, la crescente attenzione soprattutto della "Gen Z" verso la salute e il benessere incrementa la richiesta di bevande poco alcoliche (non sopra i 12 gradi), senza residuo zuccherino e con poche calorie. Questo spiega la crescente domanda dei no-alcohol wines.

Un recente studio condotto da Mora e colleghi (2021) ha evidenziato che i giovani consumatori prediligono vini rossi leggeri e fruttati. Al contrario, i vini con un elevato contenuto alcolico, marcata acidità e astringenza e che presentano descrittori come chiodi di garofano, legno e aromi animali risultano poco apprezzati da questa fascia di acquirenti.

La continua evoluzione di gusti e preferenze da parte della popolazione obbliga i produttori ad adattare le tecniche di vinificazione ai desideri dei consumatori per rendere il proprio prodotto competitivo sul mercato.

Produrre vini rossi fruttati che rispondano alle richieste dei consumatori è una sfida notevole, spesso oggetto di studio da parte di aziende o enti di ricerca.

Il carattere fruttato in un vino deriva da molteplici classi di composti ed è influenzato da diversi fattori: varietà di uva utilizzata, pratiche viticole, clima, terreno, temperature di fermentazione, ceppo di lievito, tipo di affinamento e lunghezza dell'affinamento.

I composti aromatici nel vino possono essere di origine varietale oppure possono formarsi durante il processo di vinificazione o di affinamento. In particolare, possono essere divisi in quattro classi: varietali, pre-fermentativi, fermentativi, post fermentativi.

Gli aromi varietali sono fortemente correlati alla varietà di uva. L'uva è un frutto inodore ad eccezione di poche varietà come il Moscato e il Gewurtztraminer il cui aroma caratteristico può essere percepito annusando l'uva e viene mantenuto durante tutto il processo di vinificazione. I composti che danno l'aroma varietale sono localizzati nella buccia in forma libera quindi volatili e percepibili o legati ad un mezzo non volatile come zuccheri o amminoacidi. Durante la vinificazione avviene la rottura del legame e di conseguenza, la liberazione dell'aroma.

Gli aromi pre-fermentativi sono generati durante le diverse operazioni che anticipano la fermentazione come pigiatura e pressatura e spesso sono responsabili di note erbacee, non molto gradite al palato.

Gli aromi fermentativi si formano durante la fermentazione alcolica e malolattica e si originano dal metabolismo di lieviti e batteri. Sono responsabili del gusto fruttato e vinoso del vino.

Gli aromi post fermentativi sono associati a tutte le operazioni che seguono la fermentazione e provengono quindi dall'affinamento che può avvenire anche in botti di legno.

2. I TIOLI

I tioli, o mercaptani, sono composti che contengono al proprio interno un gruppo solfidrile (-SH). Derivano dagli alcoli (R-OH) per sostituzione dell'ossigeno con lo zolfo. I composti solforati generalmente sono responsabili di difetti nel vino poiché sono associati a forti odori di uova marce, cavolo...

I tioli sono stati identificati per la prima volta nel 1993 nella polpa e nella buccia dell'acino d'uva di Sauvignon Blanc da Philippe Darriet del gruppo di ricerca del celebre professor Denis Dubourdieu della facoltà di Enologia dell'Università di Bordeaux (Darriet et al., 1993). Fanno parte della classe di aromi varietali in quanto l'odore si sviluppa solo a seguito della rottura del legame da parte dei lieviti durante la fermentazione alcolica.

La prima molecola identificata è il 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (4MMP) (Darriet et al., 1993) l'aroma di bosso e ginestra, tipico descrittore del Sauvignon Blanc. In seguito, questo composto è stato identificato in diverse varietà bianche e rosse. Successivamente a questa scoperta sono stati individuati altri composti tiolici (Tominaga et al., 1998a): 3-mercaptoesanolo (3MH) e il suo acetato, 3-mercapto-esan-1-olo acetato (3MHA), il 4-mercapto-4-metilpentan-2-olo e il 3-mercapto-3-metilbutan-1-olo.

L'acetato di 3-mercapto-esan-1-olo ha un forte aroma di bosso, di buccia di pompelmo e di frutto della passione mentre il 3-sulfanilesanolo (3-MH) ha l'aroma di frutto della passione e di pompelmo. Il 3 MH partecipa al bouquet aromatico di numerosi vini bianchi derivanti da varietà quali Sémillon, Colombard, Petit e Gros Manseng, Arvine, Chardonnay, Chenin ma anche di vitigni a bacca scura come Cabernet Sauvignon e Merlot.

Il 4-mercapto-4-metilpentan-2-olo corrisponde all'aroma di buccia di agrumi mentre il 3-sulfanil-3-metilbutan-1-olo ha odore di pere cotte.

Recentemente è stato appurato che 3MH è legato alla presenza di note speziate mentre 4MMP e 3MHA a note di erbe aromatiche.

La soglia di percezione è la concentrazione al di sopra della quale una molecola viene percepita come odorosa. Se la molecola è presente in concentrazioni inferiori alla soglia di percezione non è riconoscibile durante la degustazione. La soglia di percezione dei tioli è molto bassa (nell'ordine dei nanogrammi), il che vuol dire che, anche se la molecola è presente in concentrazioni molto basse è comunque percepibile. Il 4 MMP ha una soglia di percezione di 0,8 ng/L mentre la sua concentrazione nel vino è attorno a qualche decina di nanogrammi per litro. Più alta

è invece la soglia di percezione del 3-mercaptoesanolo (60 ng/L) mentre il suo tenore in vino bianco, rosso e rosato varia da qualche centinaio di nanogrammi per litro a decine di microgrammi litro. Per quanto riguarda l'acetato di 3MH la soglia di percezione è di 4 ng/L mentre la concentrazione è di diverse centinaia di ng/L.

I tioli sono stati largamente studiati nei vini prodotti da varietà a bacca chiara, in particolare su Sauvignon blanc e Chardonnay mentre l'importanza nei vini rossi e rosati non è ancora del tutto nota. Tuttavia, la loro presenza nei vini rossi è stata più volte dimostrata.

Tabella 1: Descrizione dei principali composti tiolici, il range medio in cui sono presenti nel vino e la soglia di percezione (A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols; Coetzee, 2012)

Composto	Descrizione olfattiva	Range nel vino (ng/L)	Soglia di percezione
4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (4MMP)	Bosso, frutto della passione, ribes	4-40	0,8
3-mercaptoesanolo (3MH)	Frutto della passione, pompelmo, guava	26-18000	60
3-mercapto-esan-1-olo acetato (3MHA)	Frutto della passione, pompelmo, bosso, uva, guava	0-2500	4,2

2.11 PRECURSORI INODORI

Come scritto in precedenza, i tioli nell'uva sono presenti sotto forma di precursori inodori e l'azione dei lieviti durante la fermentazione alcolica risulta essere fondamentale per la percezione dell'odore. La vinificazione, quindi permette di rivelare l'aroma presente nell'uva.

I precursori sono legati a due amminoacidi, glutatione (Glu- 3MH e Glu- 4MMP) e cisteina (Cys-3MH e Cys- 4MMP), mediante un ponte di zolfo. I precursori del 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one legati alla cisteina sono presenti maggiormente nella polpa, circa l'80%, mentre i precursori cisteinilati del 3-mercaptoesanololo sono distribuiti equamente tra polpa e buccia (Roland, Schneider et al.,2011). La distribuzione dei precursori di 3MH legati al glutatione è analoga all'altra forma mentre diversa è la distribuzione dei precursori di 4MMP legati al glutatione (la maggior parte è nella buccia). In realtà la distribuzione e la concentrazione dei precursori è fortemente legata alla varietà di uva.

Il 3-MHA non è stato trovato legato a nessun aminoacido poiché si forma a seguito di una reazione di acetilazione. Ad oggi il meccanismo di formazione dell'acetato di 3-mercaptoesanololo non è ancora del tutto conosciuto, pare però che si formi a partire da 3 MH ad opera di un alcol acetiltrasferasi. L'alcol acetiltrasferasi è un enzima responsabile della produzione della maggior parte degli esteri durante la fermentazione, codificato dal gene ATF1 e presente nei lieviti. Il tenore di 3-MHA generalmente è circa il 10% del livello di 3-MH (Dubourdieu et al., 2006).

Nel mosto la concentrazione di Glu-3MH può essere fino a 35 volte superiore del rispettivo precursore legato alla cisteina. Tuttavia, il tasso di conversione a tioli volatili è risultato essere maggiore nei precursori legati alla cisteina.

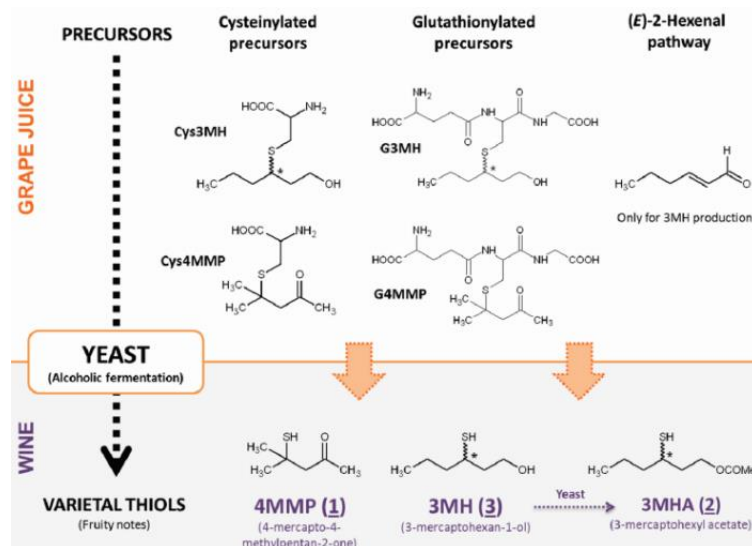


Figura 1: Vie di biogenesi differenti per 4MMP (1), 3MH (3) e 3MHA (2) durante la fermentazione alcolica a partire dai precursori nell'uva. *Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. Roland et al. 2011*

Glu-3MH svolge un ruolo molto importante: può trasformarsi in Cys-3MH. In merito è stato scoperto un percorso biochimico di formazione di precursori cisteinilati a partire da coniugati di glutazione (Peyrot des Gachons et al., 2002b).

2.2 L'ATTIVITA' β -LIASICA

Lo studio di Howell e colleghi (2004) ha come obiettivo sottolineare l'importanza dell'attività dei lieviti sul contenuto di tioli volatili. È risultato che nel caso in cui non vengano aggiunti lieviti al mosto la concentrazione di 4MMP è estremamente bassa. Ciò conferma che il suo rilascio dipende quasi esclusivamente dai lieviti. Il rilascio spontaneo che si è verificato è dipendente dalla temperatura.

Durante la fermentazione alcolica i lieviti rompono il legame con l'amminoacido grazie all'attività β -liasica. Il preciso meccanismo che permette al lievito di rilasciare il precursore inodore legato alla cisteina o al glutatone è ancora incerto. Si pensa che questa attività sia indotta dai trasportatori di amminoacidi (Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008b; Winter et al., 2011). Questo enzima normalmente non catalizza una reazione β -liasica, ma induce una reazione collaterale β -liasica non fisiologica che dipende dalle caratteristiche elettron-attrattive dei coniugati S-cisteina (Cooper et al., 2010). Data la bassa soglia di percezione dei tioli, anche piccole variazioni nelle loro concentrazioni, dovute a queste reazioni collaterali, possono influire sul profilo aromatico del vino.

La scissione è provocata dall'enzima β -liasi che rompe il legame zolfo-carbonio. Questa rottura probabilmente avviene in uno step unico nei precursori legati alla cisteina mentre è possibile che per i precursori legati al glutatone il meccanismo sia più complesso e richieda più passaggi.

In *Saccharomyces cerevisiae*, il lievito che comunemente viene utilizzato per la vinificazione, a controllare l'enzima β -liasi sono almeno 3 geni (IRC7, STR3, CYS3). In particolare, IRC7 è ritenuto il responsabile del rilascio di 4MMP e 3-MH dalla cisteina.

In realtà gli studi sui geni responsabili di questa attività non sono molto avanzati e sono discordanti tra di loro. Howell et al. (2005) hanno dimostrato che eliminando CYS3 non si è notato nessun cambiamento significativo nella concentrazione di 4MMP in vino. Al contrario, l'eliminazione di IRC7 nello stesso ceppo ha portato alla riduzione del 40% di quest'ultimo.

Molti ceppi di *S. cerevisiae* presentano un'attività β -liasica molto ridotta poiché hanno una delezione di 38 paia di basi e presentano due alleli di lunghezza inferiore nel gene IRC7; di conseguenza, la concentrazione di tioli volatili risulta essere molto bassa, al di sotto della soglia di percezione. È stato dimostrato che questa variazione non interessa solo la concentrazione di tioli, ma è correlata anche alla comparsa di composti volatili dello zolfo a partire dalla cisteina.

Negli ultimi anni molte aziende produttrici di lieviti stanno investendo sulla selezione di ceppi che producono elevate concentrazioni di tioli. Due anni fa Sofralab ha presentato il “*Selectys Thiol Rouge*”, un ceppo di *S. cerevisiae* selezionato proprio perché portatore della sequenza nucleotidica sul gene IRC7. Questo ceppo permette di ottenere concentrazioni di tioli significativamente superiori rispetto ai ceppi che presentano alleli di lunghezza ridotta del gene IRC7 (38 pb in meno).

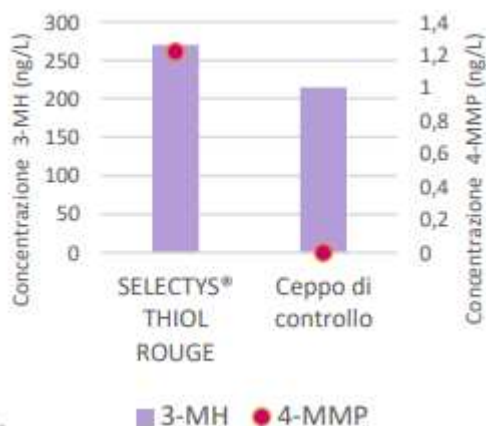


Figura 2: Concentrazioni di tioli misurata dopo la fermentazione con Selectys Thiol Rouge e con un ceppo di controllo dotato di due alleli corti nel gene IRC7.

Recentemente anche Lallemand ha presentato un ceppo di lievito specifico per questo obiettivo per vini rossi, chiamato Ruby, anch'esso selezionato per la spiccata produzione di tioli in fermentazione. Diversi studi hanno confermato che la fermentazione condotta con questo ceppo ha portato a vini più freschi e fruttati con note intense di frutti a bacca rossa rispetto a ceppi standard.

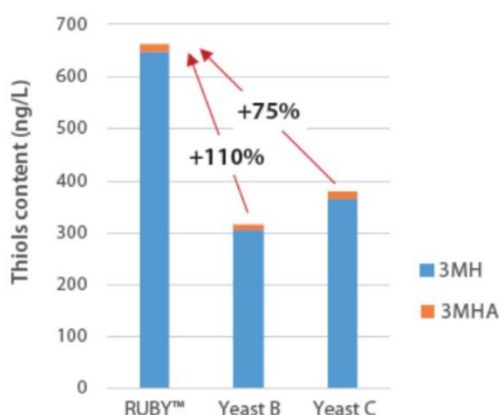


Figura 3: Concentrazione di tioli volatili alla fine della fermentazione alcolica su vino Syrah, sud della Francia: RUBY™ in comparazione al lievito A e al lievito B.

Il rilascio di tioli volatili non è esclusivo di *Saccharomyces cerevisiae*; è stato infatti dimostrato che anche diversi lieviti non-*Saccharomyces* presentano attività β-liasica come *Pichia kluyveri*, *Torulasporea delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*. In

particolare, *P. kluyveri* ha mostrato una notevole capacità di rilasciare 3-MHA. Rispetto ad una fermentazione condotta esclusivamente con ceppi di *S. cerevisiae*, l'inoculo sequenziale di *P. kluyveri* prima e *S. cerevisiae* poi, porta ad un aumento della concentrazione di 3-MHA dal 10 al 72 %, a seconda del ceppo scelto. Un particolare ceppo di *P. kluyveri* è stato commercializzato con l'obiettivo di esaltare l'aroma fruttato (Frootzen, Chr. Hansen).

2.3 L'INFLUENZA DELLE PRATICHE VITICOLE SUI PRECURSORI INODORI

Le pratiche viticole possono influire sia positivamente che negativamente sulla quantità di precursori inodori.

Durante la maturazione la concentrazione di precursori aumenta. Uno studio di Roland, Vialaret, Razungles, Rigou, e Schneider (2010) ha evidenziato che il livello di Glut-3MH e Cys-3MH cresce significativamente da sette giorni prima della data della vendemmia sette giorni dopo mentre l'aumento di Glu-4MMP non è così importante. In questa analisi l'evoluzione di Cys-4MMP è legata alla zona di coltivazione ma in ogni caso la sua concentrazione alla data della raccolta è risultata essere la più bassa. Altri lavori hanno evidenziato un incremento dei precursori dei tioli fino a dieci volte nel periodo di precedente alla raccolta (Capone et al., 2011).

La quantità di precursori è fortemente legata a diversi fattori come il contenuto di azoto assimilabile e il deficit idrico. Un maggiore contenuto di azoto favorisce la presenza di precursori legati alla cisteina. È stato dimostrato che un'aggiunta di azoto nell'uva porta alla diminuzione dei composti fenolici e ad un aumento di glutazione nel mosto (Chonè et al., 2006). Questa situazione porterà poi alla produzione di un vino con un forte aroma varietale. Al contrario, livelli troppo elevati di azoto rendono l'acino più sensibile, favorendo l'attacco di *Botrytis cinerea*.

Per quanto riguarda l'apporto idrico, un leggero deficit di acqua sembra possa avere un'influenza positiva sul livello di precursori inodore. Cys-3MH sembra essere favorito dal deficit idrico, al contrario di Cys-4MMP che soffre la carenza d'acqua (Chonè et al., 2001).

La scelta tra la raccolta manuale e meccanica va ad influire sul livello di precursori. Infatti, la vendemmia manuale sembra essere la meno indicata sotto questo aspetto. Con la vendemmia manuale l'acino si danneggia meno e quindi l'estrazione di precursori è limitata così come le reazioni enzimatiche che si verificano. Per lo stesso motivo anche il trasporto e la conservazione dell'uva causano un aumento nella concentrazione (Capone e Jeffery, 2011).

I precursori cisteinilati e glutationilati risultano stabili all'ossidazione grazie al legame carbonio – zolfo. Tuttavia, un contatto controllato con l'ossigeno ha mostrato un aumento significativo dei precursori legati al glutatione (fino a 140%) (Roland, Vialaret et al. 2010). Inoltre, l'anidride solforosa che comunemente viene aggiunta per prevenire l'ossidazione, sembra bloccare le reazioni enzimatiche ed avere quindi un impatto negativo.

L'attacco di *Botrytis cinerea* nella forma nobile, fungo responsabile della presenza di muffa nell'acino, ha effetto sul livello di precursori e di conseguenza sul contenuto di tioli volatili nel vino. Lo stress provocato da questo fungo causa l'innescò di un meccanismo di detossificazione della vite. Questo comporta la produzione di aldeidi reattive, in particolare di trans-2-esanale tossiche alla pianta e al patogeno oltre determinate concentrazioni (Ribereau-Gayon et al., Trattato di enologia 2)

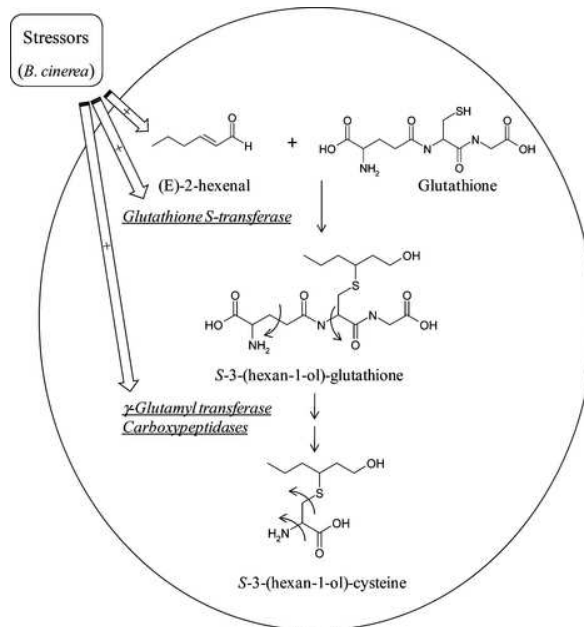


Figura 4: Ipotetica via di trasformazione del precursore legato al glutatione in precursore legato alla cisteina. 3-Sulfanylhexanol Precursor Biogenesis in Grapevine Cells: The Stimulating Effect of *Botrytis cinerea* (Thibon et al., 2011).

2.4 L'IMPORTANZA DELLE OPERAZIONI DI CANTINA

Come in vigneto, anche in cantina ci sono diversi fattori e operazioni che favoriscono l'aumento di tioli volatili nel vino. Il tasso di conversione dei precursori in composti volatili è molto basso: da Cys-MH a 3-MH e 3-MHA varia da 0,1 a 12% mentre per il Glu-3MH è meno del 5%. La differenza di estrazione da precursori cisteinil derivati e glutationil derivati può essere dovuta alla diversa distribuzione nella buccia (epidermide o ipoderma). È fondamentale quindi, massimizzare il tasso di conversione attraverso scelte accurate durante la vinificazione.

Il contatto con le bucce prima della fermentazione alcolica è molto importante per l'estrazione dei precursori. Alcuni studi hanno dimostrato che un contatto prolungato incrementa l'estrazione di Cys-3MH mentre ha un effetto limitato su 4-MMP. L'estrazione e la conseguente diffusione nel mosto sono processi lenti e richiedono diverse ore. Maggu et al., (2007) consigliano 18 ore di contatto per avere concentrazioni di precursori di 3-MH elevate.

Anche la pressatura aumenta la concentrazione dei precursori di tioli varietali: a pressioni maggiori c'è una maggiore estrazione. Cys-3MH è presente in quantità 6,2 volte superiori nel mosto sottoposto a 2 bar di pressione rispetto al mosto fiore (Maggu et al., 2007). Bisogna però sottolineare che pressioni elevate comportano l'estrazione della frazione polifenolica che causa imbrunimenti e ossidazione dell'aroma varietale. È bene quindi non eccedere con pressioni troppo alte.

La temperatura gioca un ruolo fondamentale nella comparsa dell'aroma fruttato. I risultati in merito sono piuttosto variabili e sono fortemente correlati al ceppo utilizzato. In generale, è consigliato condurre la fermentazione a temperature moderate (dai 18 a 20 °C). Temperature di fermentazione più alte (23-28 °C) portano ad un picco iniziale nella concentrazione di tioli che però è soggetto ad una diminuzione importante verso la fine della fermentazione.

Anche la nutrizione del lievito è un fattore rilevante ed è controllabile mediante le scelte che l'enologo deve compiere nella gestione del processo di vinificazione. La sostituzione del DAP (diammonio fosfato) con l'urea come fonte di azoto va ad incrementare la quantità di 3-MH.

I tioli volatili sono molto sensibili all'ossigeno e l'ossidazione viene favorita dalla presenza di ferro. In aggiunta, sono molto reattivi soprattutto con i prodotti dell'ossidazione dei fenoli come i chinoni. La reazione di sostituzione è catalizzata da ferro e rame ed è favorita da bassi livelli di anidride solforosa. Blanchard et al., (2004) hanno evidenziato una diminuzione nella concentrazione di 3-MH in presenza di

ossigeno e (+) -catechine. La reazione tra il chinone e i tioli causa la perdita totale dell'aroma rendendolo inodore. L'aggiunta di anidride solforosa risulta quindi essere indispensabile per il mantenimento dell'aroma.

Durante l'invecchiamento, prima dell'imbottigliamento per prevenire l'ossidazione si può mantenere il vino in contatto con le fecce. La presenza di glutazione e gli antociani nel vino rosso e rosato, soprattutto la malvidina-3-glucoside, aiutano il mantenimento dell'aroma fruttato data la loro azione antiossidante.

Un'altra scelta importante per il mantenimento dell'aroma è il sistema di chiusura. Negli ultimi anni c'è un interesse sempre crescente nell'utilizzo di tappi alternativi al sughero. È stato dimostrato che la quantità di tioli volatili nelle bottiglie con la chiusura tradizionale è risultato essere inferiore del 18-23% rispetto al tappo a vite. È possibile, quindi un assorbimento dei tioli da parte del sughero (Brajkovich et al.,2005).

3.MATERIALI E METODI

L'obiettivo della prova è valutare e classificare otto ceppi di lievito in commercio in funzione del loro impatto sul contenuto di tioli volatili. Insieme ai tioli è stato valutato il profilo aromatico generale del lievito e il colore. In aggiunta lo studio ha permesso di comparare la nutrizione organica con una nutrizione minerale, analizzando come questo aspetto possa interferire con il profilo organolettico del vino.

L'intera prova è stata eseguita presso il Campus di Montagnac dell'azienda Sofralab. In particolare, le fermentazioni, stabilizzazioni e imbottigliamento sono avvenute nella cantina sperimentale mentre le analisi sono state svolte presso il laboratorio adiacente alla cantina. Analisi aggiuntive come analisi degli aromi e dei precursori sono state effettuate presso un laboratorio esterno all'azienda (Nyseos, Montpellier).

Per l'analisi di parametri come zuccheri residui, pH, acidità totale, acidità volatile, alcol acquisito, acido lattico, acido malico, potassio, azoto prontamente assimilabili (APA), azoto ammoniacale, azoto amminoacidico e rame è stato utilizzato uno strumento che si basa sulla tecnologia al medio infrarosso (FTIR), il FOSS Winescan. La luce nell'intervallo di lunghezze d'onda del medio infrarosso (2500-1000) attraversa il campione e viene assorbita diversamente a seconda dei costituenti presenti nel vino. I valori di assorbimento vengono elaborati attraverso un'equazione matematica, consentendo di ottenere le concentrazioni dei costituenti.

Attraverso un'unica lettura della durata di un minuto lo strumento fornisce tutti i parametri necessari per valutare le caratteristiche del vino o del mosto. Sebbene non possa essere utilizzato per le analisi ufficiali, FOSS Winescan rappresenta un valido supporto nel processo di vinificazione.

Le analisi del colore sono state effettuate durante tutto il processo di vinificazione mediante l'uso dello spettrofotometro. In particolare, nello strumento è presente una lampada che emette luce a diverse lunghezze d'onda nello spettro dell'ultravioletto e del visibile. Non tutta la luce attraversa il campione poiché una parte viene assorbita dai composti presenti nella soluzione. Ogni composto ha un caratteristico spettro di assorbimento che permette di identificarlo e quantificarlo. Le misurazioni sono state effettuate a diverse lunghezze d'onda: 280 nm, 320 nm, 420 nm e 520 nm. A 280 nm si ottiene l'indice di polifenoli totali presenti nel vino mentre a 320 nm i polifenoli facilmente ossidabili. Andando nello spettro del visibile, la misurazione a 420 nm fornisce l'intensità del colore giallo mentre a 520 nm quantifichiamo gli antociani, i pigmenti responsabili del colore rosso nel vino. Prima dell'analisi i campioni sono stati diluiti 100 volte in acqua.

A supporto dell'analisi del colore sono stati utilizzati altri due strumenti: Polyscan e Nomacolor (Vinventions). Polyscan permette di ottenere due indici: PhenOx (indice dei polifenoli totali) e EasyOx (composti facilmente ossidabili). La tecnologia si basa sulla voltammetria a scansione lineare, ovvero sulla corrente generata dall'ossidazione del campione. Nomacolor, invece è un colorimetro che fornisce risultati in coordinate LCh*, accurati e facilmente interpretabili.

La scelta del lievito per la conduzione della fermentazione alcolica può influenzare il colore finale del vino in quanto la parete cellulare potrebbe adsorbire gli antociani. L'adsorbimento varia in base al ceppo, rendendo l'analisi del colore determinante nella scelta.

Per lo svolgimento della prova sono stati utilizzati otto ceppi di lieviti disponibili in commercio il cui nome non può essere rivelato per riservatezza. Altri prodotti sono stati aggiunti quali:

- Nutricell AA: commercializzato da Martin Vialatte, è un nutriente per lieviti prodotto a partire da derivati di lievito ricco in amminoacidi, vitamine e fattori di sopravvivenza. Oltre a permettere di condurre la fermentazione senza arresti, favorisce la produzione di esteri ed alcoli superiori attraverso la reazione di Ehrlich. In aggiunta contribuisce alla rivelazione dei tioli. Abbinato ad un lievito dotato di attività acetil trasferasi sarà possibile in seguito ricavare esteri (noti per il loro aroma fruttato) a partire dagli alcoli superiori.

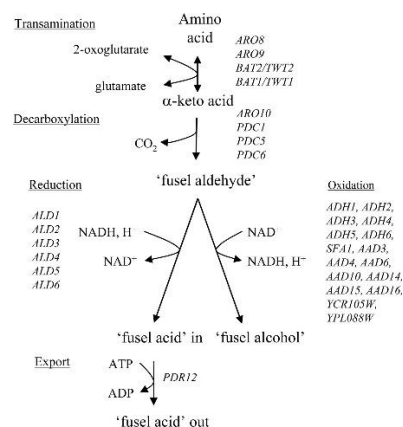


Figura 5: Via di Ehrlich

- DAP: diammonio fosfato. È un attivante che può essere aggiunto al momento dell'inoculo o durante la fermentazione e che il lievito utilizza per l'accrescimento e la sopravvivenza. Si tratta di azoto inorganico in forma minerale, prontamente e facilmente assimilabile.
- Nutricell Midferm: anche questo prodotto viene venduto da Martin Vialatte. Si tratta di un nutrimento complesso senza solfati che permette di

terminare al meglio la fermentazione senza incorrere il rischio di cadere in fermentazioni stentate. Rilascia azoto in forma minerale ed organica; in aggiunta è composto da scorze di lievito che garantiscono una detossificazione da possibili inibitori.

3.1 PROTOCOLLO

Per effettuare questa prova, l'enologo della cantina ha acquistato cinque ettolitri di mosto di Syrah presso la cantina sociale di Montagnac "Cave Cooperative Montagnac". Si tratta di mosto termovinificato, una tecnica che consente di ottenere i "vini rossissimi". Questo processo consiste nel riscaldare le vinacce e il mosto ad una temperatura compresa tra 65-75 °C seguito da un raffreddamento della parte liquida. Permette quindi di estrarre più velocemente il colore dalla buccia e di condurre la fermentazione senza il cappello di vinacce risparmiando spazio. Questa tecnica ad oggi non è molto diffusa e comporta il rischio di un'eccessiva estrazione di componenti fenoliche che conferiscono note amare al vino.

Il mosto al suo arrivo in cantina era alla temperatura di 25° e aveva una densità di 1,100 kg/m³.

Prima dell'inizio della fermentazione sono stati prelevati dei campioni per l'analisi di parametri come zuccheri, alcol, acidità totale e acidità volatile, pH, anidride solforosa libera e totale e acido malico e tartarico e campioni per l'analisi dei precursori di aromi. Il mosto è stato poi suddiviso in 10 parti uguali ed è stato posto in recipienti di acciaio da 50 litri l'uno.

In seguito, è avvenuto l'inoculo dei lieviti per l'avvio della fermentazione alcolica e l'aggiunta di nutrienti.

La prova è suddivisa in 10 modalità, così suddivise:

- Modalità 1: lievito A + DAP (20 g/hL) all'inoculo
- Modalità 2: lievito A + Nutricell AA (20 g/hL) all'inoculo
- Modalità 3: Lievito B
- Modalità 4: Lievito C
- Modalità 5: Lievito D
- Modalità 6: Lievito E
- Modalità 7: Lievito F + DAP (20 g/hL) all'inoculo
- Modalità 8: Lievito F + Nutricell AA (20 g/hL) all'inoculo
- Modalità 9: Lievito G
- Modalità 10: Lievito H

Tutti i lieviti prima di essere inoculati in quantità di 20 g/hl sono stati idratati in acqua a 37 °C in un volume pari a dieci volte il peso per circa mezz'ora. Successivamente la temperatura è stata abbassata aggiungendo mosto per fare in modo che la differenza di temperatura tra l'inoculo e il mosto fosse inferiore a 10 °C evitando eventuali shock termici per i lieviti.

Ogni giorno, per tutta la durata della fermentazione alcolica è stato prelevato un campione per l'analisi e sono state controllate le densità e le temperature di tutte e 10 le modalità.

Finita la fase di moltiplicazione del lievito, quando le densità erano attorno a 1060 è stato aggiunto Nutricell Midferm (20 g/hl) per prevenire eventuali carenze nutrizionali che potrebbero rallentare la fermentazione e provocare stress al lievito. Come per i lieviti, anche Nutricell Midferm prima di essere aggiunto è stato reidratato in acqua in proporzioni pari a 1:10. Inoltre, a metà fermentazione è stato prelevato un campione per l'esecuzione di un controllo dei lieviti, garantendo così che la fermentazione fosse condotta dal lievito inoculato e non da lieviti indigeni.

Durante la fermentazione, in particolare verso la fine, sono stati eseguiti rimontaggi, aerazione e battonage per ossigenare il mosto, rimettere in sospensione i lieviti e aiutarli nelle fasi finali.

Finita la fermentazione alcolica il vino è stato travasato ed è stato prelevato un campione per l'analisi degli aromi e del colore. Successivamente, in tutte le modalità sono stati inoculati i batteri lattici (*Oenococcus oeni*). I batteri lattici eseguono la fermentazione malolattica, ovvero trasformano l'acido malico naturalmente presente nel vino in acido lattico mediante una decarbossilazione che provoca la perdita di una funzione acida. Si assiste quindi ad una riduzione dell'acidità e ad un innalzamento del pH oltre ad una modifica del profilo aromatico del vino, che risulterà più morbido e corposo.

I batteri (2 g/hl) prima dell'inoculo sono stati idratati in acqua demineralizzata alla temperatura di 25 °C in proporzione 1:20. Finita la fermentazione malolattica è stato prelevato nuovamente un campione per modalità per l'analisi degli aromi.

In seguito, il vino è stato solfitato mediante l'aggiunta di metabisolfito di potassio in modo da preservare le caratteristiche del vino, evitare eventuali ossidazioni e perdita di aromi e bloccare la possibile proliferazione di batteri acetici.

Poi il vino è stato stabilizzato. Per l'illimpidimento è stata aggiunta colla di pesce (Qalisol, 5 cl/hL) mentre per la stabilizzazione tartarica è stato aggiunto Antartika VR (20 cl/hL), un prodotto a base di un poliamminoacido, un polimero di recente approvazione da parte dell'OIV, e di un polisaccaride vegetale.

Infine, il vino è stato filtrato ed imbottigliato. Prima dell'imbottigliamento è stata eseguita l'analisi del vino finito (alcol, pH, zuccheri, acidità totale, acidità volatile, SO₂ libera, SO₂ totale, acido lattico e acido malico), del profilo aromatico e del colore. Per tutte e 10 le modalità è stata eseguita l'analisi sensoriale.

Da 1 a 6: prelievo di un campione per l'analisi



Tabella 2: Protocollo seguito durante lo svolgimento della prova, dall'arrivo del mosto in cantina all'imbottigliamento

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il mosto all'arrivo in cantina è stato subito suddiviso nelle dieci modalità ed è stata fatta la prima analisi, utile per valutare le caratteristiche e pianificare eventuali aggiunte o trattamenti. I parametri analizzati risultano piuttosto simili tra le modalità, un aspetto fondamentale per comparare comportamenti differenti dei ceppi di lievito utilizzati.

Tabella 3: Analisi dei principali parametri del mosto all'arrivo in cantina e dopo essere stato suddiviso nelle 10 modalità.

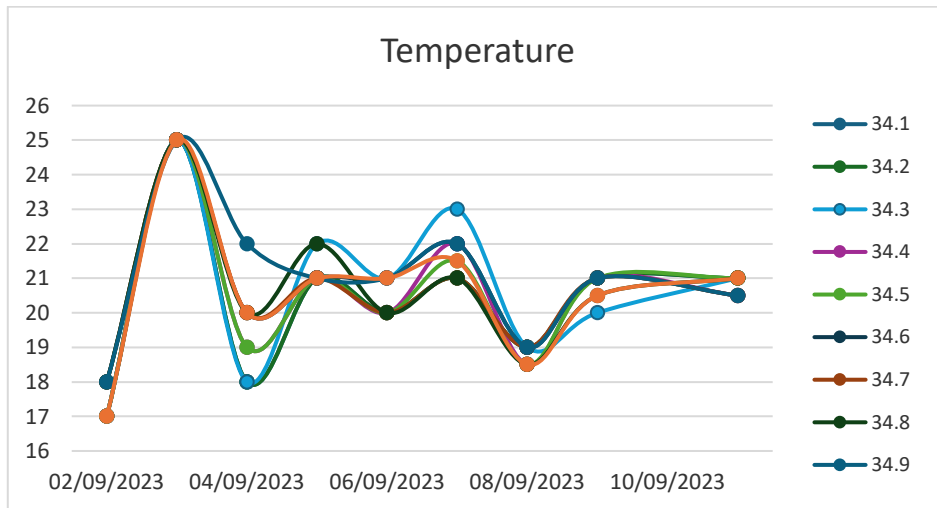
Data	Modalità	pH	TAV acquis	Zuccheri	A. Volatile	A. Totale	A. Lattico	A. Malico	TAV total
02/09/2023	34-1	3,78	0,3	229	0,07	3,34	0	1,72	13,92
02/09/2023	34-2	3,78	0,27	229	0,07	3,37	0	1,74	13,87
02/09/2023	34-3	3,78	0,22	232	0,07	3,4	0	1,83	13,98
02/09/2023	34-4	3,76	0,33	229	0,07	3,4	0	1,87	13,93
02/09/2023	34-5	3,79	0,33	229	0,07	3,38	0	1,87	13,94
02/09/2023	34-6	3,76	0,33	228	0,08	3,41	0	1,75	13,86
02/09/2023	34-7	3,72	0,77	221	0,09	3,54	0	1,75	13,87
02/09/2023	34-8	3,71	0,76	220	0,09	3,52	0	1,7	13,82
02/09/2023	34-9	3,75	0,28	228	0,08	3,42	0	1,72	13,84
02/09/2023	34-10	3,78	0,31	230	0,09	3,45	0	1,69	13,95

Per controllare il corretto andamento delle fermentazioni sono state controllate quotidianamente le densità attraverso un densimetro. Si è osservata una progressiva diminuzione causata dalla trasformazione dello zucchero in alcol da parte del lievito. La cinetica di fermentazione è fortemente influenzata dalla temperatura, motivo per cui anche questo parametro è stato controllato frequentemente. L'obiettivo era mantenere temperature omogenee tra le modalità per garantire che le eventuali differenze nelle fermentazioni fossero attribuibili esclusivamente al lievito o alla nutrizione e non alla temperatura.

Tabella 4: Temperature di fermentazione mantenute durante la fermentazione alcolica per le 10 modalità.

T°	34.1	34.2	34.3	34.4	34.5	34.6	34.7	34.8	34.9	34.10
02/09/2023	17	17	17	17	17	18	18	18	18	17
03/09/2023	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
04/09/2023	18	18	18	19	19	20	20	20	22	20
05/09/2023	21	21	22	21	21	21	21	22	21	21
06/09/2023	20	20	21	20	20	21	20	20	21	21
07/09/2023	21	21	23	22	21.5	22	21	21	22	21.5
08/09/2023	19	19	19	18.5	18.5	19	19	18.5	19	18.5
09/09/2023	21	21	20	21	21	21	21	20.5	21	20.5
11/09/2023	21	21	21	20.5	21	20.5	20.5	21	20.5	21

Tabella 5: Temperature di fermentazione



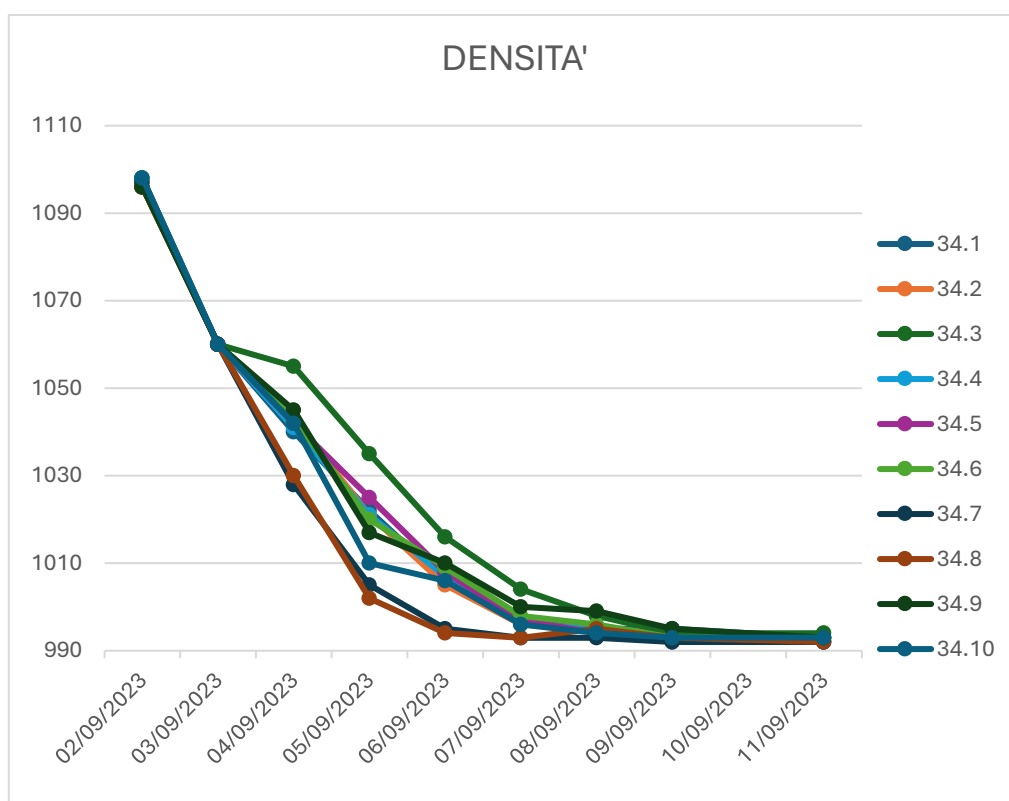
Le fermentazioni sono state condotte ad una temperatura media di 21° con un picco di 25°C il secondo giorno.

Le densità durante gli 11 giorni di fermentazione sono state le seguenti:

Tabella 6: Densità dei 10 mosti in fermentazione monitorate quotidianamente durante la fermentazione alcolica

Densità	34.1	34.2	34.3	34.4	34.5	34.6	34.7	34.8	34.9	34.10
02/09/2023	1097	1098	1098	1098	1096	1096	1097	1096	1096	1098
03/09/2023	1060	1060	1060	1060	1060	1060	1060	1060	1060	1060
04/09/2023	1040	1043	1055	1041	1042	1043	1028	1030	1045	1042
05/09/2023	1022	1021	1035	1021	1025	1020	1005	1002	1017	1010
06/09/2023	1006	1005	1016	1007	1008	1009	995	994	1010	1006
07/09/2023	997	996	1004	996	997	998	993	993	1000	996
08/09/2023	995	995	998	995	994	996	993	993	999	994
09/09/2023	995	994	994	993	992	993	992	993	995	993
11/09/2023	993	993	994	992	992	993	992	992	993	993

Tabella 7: Densità



Come si può notare dal grafico le curve di fermentazione differiscono tra di loro dopo il secondo giorno di fermentazione. Le modalità 34.7 e 34.8 sono state le prime a terminare la fermentazione in quanto già dopo cinque giorni le densità erano rispettivamente 995 e 994. La modalità che invece ha impiegato più tempo a trasformare lo zucchero è stata la 34.3. In generale, tutti i lieviti hanno condotto le fermentazioni regolarmente, senza arresti.

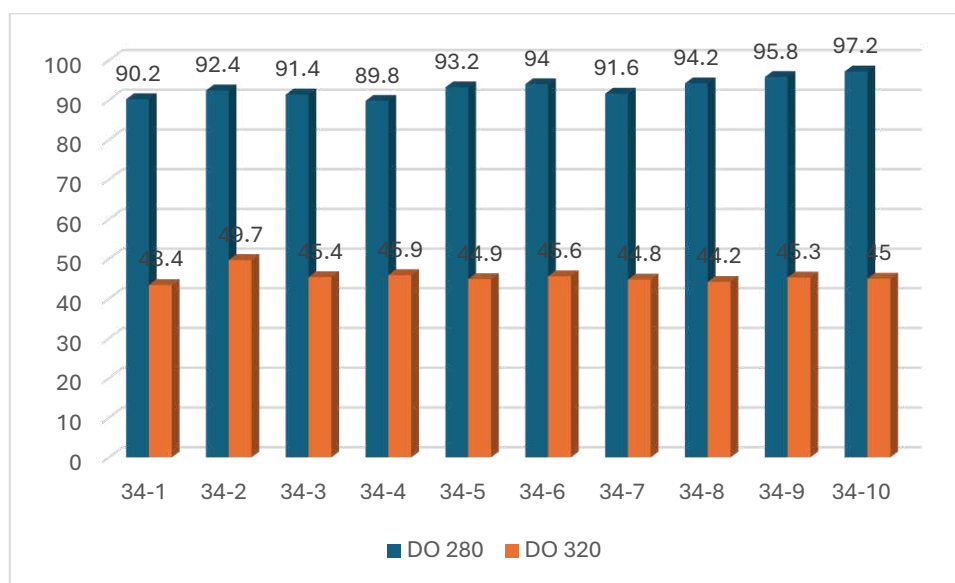
In questa prova non c'è stata nessuna differenza nella cinetica di fermentazione tra i lieviti con le due tipologie di nutrienti; infatti, sia la curva 34.1 e 34.2 e le modalità 34.7 e 34.8 hanno condotto la fermentazione in modo analogo. Sono quindi necessari ulteriori studi per approfondire l'argomento e per decretare quale nutrizione sia la più adatta.

Tabella 8: Analisi del colore fine FA effettuata mediante spettrofotometro e Nomacolor

Data	Modalità	DO 280	DO 420	DO 520	DO 320	DO 620	L	c*	h°	a*	b*
09/09/2023	34-1	90,2	6,42	6,5	43,4	2,57	5	10,3	7,7	10,2	1,4
	34-2	92,4	6,5	8,4	49,7	2,59	4,7	10	3,6	10	0,6
	34-3	91,4	6,75	7,4	45,4	2,78	3,3	8,4	5,2	8,4	0,8
	34-4	89,8	6,54	6,8	45,9	2,645	3,9	9,2	2,1	9,2	0,3
	34-5	93,2	6,35	6,7	44,9	2,625	3,3	8,5	2,4	8,5	0,4
	34-6	94	6,3	7	45,6	2,45	4,4	10,4	3,6	10,4	0,6
	34-7	91,6	6,48	6,9	44,8	2,685	3	7,7	3	7,7	0,4
	34-8	94,2	6,55	6,8	44,2	2,74	2,8	7,5	3,4	7,5	0,4
	34-9	95,8	6,58	7	45,3	2,58	4,1	10,2	3,9	10,1	0,7

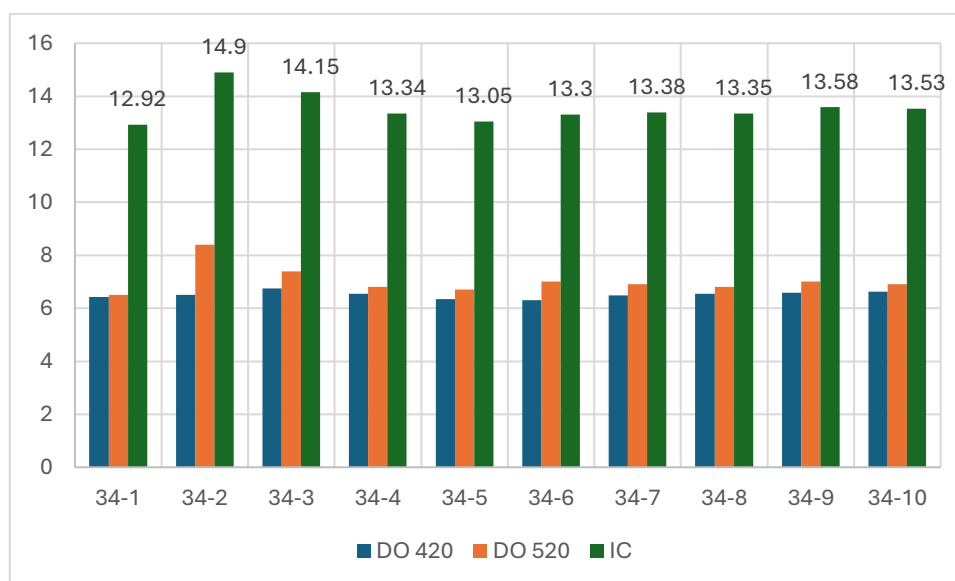
	34-10	97,2	6,63	6,9	45	2,605	3,2	10,1	6,3	10	1,1
--	-------	------	------	-----	----	-------	-----	------	-----	----	-----

Tabella 9: Analisi dei polifenoli totali e facilmente ossidabili a fine FA effettuata mediante spettrofotometro



Considerando l'indice di polifenoli totali i risultati variano tra 89.8 della modalità 34-4 a 97.2 della modalità 34-10. Invece per i polifenoli facilmente ossidabili il picco è nella modalità 34-2 con 49,7. Si nota un'omogeneità nei risultati, senza differenze tra i ceppi utilizzati.

Tabella 10: Analisi del colore delle 10 modalità a fine FA effettuata mediante spettrofotometro



In merito alle densità ottiche a 420 nm e 520 nm e l'intensità colorante è interessante la modalità 34-2 che ha in media ha valori più alti rispetto alle altre. Anche la modalità 34-3 un'intensità colorante elevata. Quest'ultima è fortemente influenzata dal pH che modifica l'equilibrio tra gli antociani. Un pH più basso è associato ad una maggiore

intensità colorante. Anche la quantità di anidride solforosa può influire poiché può legarsi agli antociani rendendoli incolore. Sia il pH (valori che variano tra 3,61 e 3,75) che la concentrazione di SO₂ libera (intorno a 20 mg/L) risultano simili tra i vini. Nella modalità 2 rispetto alla 1 è stata utilizzata una fonte azotata diversa, che potrebbe influenzare il colore. Questa tesi non viene però confermata nelle modalità 7-8 che hanno valori molto simili.

Tabella 11: Analisi del vino a fine FA mediante FOSS Winescan

Data	Modalità	pH	TAV acquis	SO2 L	Zuccheri	A. Volatile	A. Totale	SO2 Total	A. Lattico	A. Malico
08/09/2023	34-1	3,68	13,58	6	2,7	0,26	3,7	14	0	1,56
	34-2	3,67	13,51	5	2,7	0,29	3,68	15	0	1,6
	34-3	3,71	13,77	5	0,9	0,15	3,93	19	0	1,67
	34-4	3,67	13,58	5	2,2	0,19	3,66	8	0	1,43
	34-5	3,73	13,73	4	1,3	0,14	3,4	8	0	1,22
	34-6	3,62	13,72	7	1,2	0,24	4,17	25	0	1,98
	34-7	3,75	13,71	5	0,8	0,17	3,46	13	0	1,31
	34-8	3,75	13,92	5	0,8	0,18	3,39	14	0	1,3
	34-9	3,61	13,53	5	4,5	0,29	4,1	15	0	1,74
	34-10	3,7	13,84	9	0,6	0,27	3,84	27	0	1,65

Dalle analisi emerge che tutti gli otto ceppi di lieviti hanno condotto regolarmente la fermentazione, come già affermato in precedenza. I valori di tutti i parametri risultano regolari e molto simili tra loro.

Tabella 12: Precursori di Tioli

Precursori dei tioli							
Cisteina-3MH	Cisteinil-glicina-3MH	γ-glutamyl-cisteina-3MH	glutathione-3MH	Precursori di 3SH	cisteina-4MMP	glutathione-4MMP	Precursori di 4SMP
C3SH	CG3SH	GC3SH	G3SH	P3SH	C4SMP	G4SMP	P4SMP
(μg/L)	(μg/L)	(μg/L)	(μg/L)	nM	(μg/L)	(μg/L)	nM
31	30	14	889	2474	nd	nd	0

Dalla prima analisi dei precursori di tioli si nota un'abbondanza di precursori di 3-mercaptoesanolo rispetto ai precursori di 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one. Degno di nota è Glu-3MH presente ad una concentrazione di 889 μg/L. Il dato conferma la tesi di Capone e colleghi (2010) che affermava che 3-MH legato al glutathione fosse in concentrazioni superiori rispetto allo stesso legato alla cisteina, fino a 35 volte.

Tabella 13: Analisi dei tioli eseguita da Nyseos a fine fermentazione alcolica e a fine fermentazione malolattica

	Tioli				
	3-mercaptoesanololo	3-mercaptoesanololo acetato	Somma 3SH + 3SHA	4-mercapto-4-metilpentano	4SMP
	3SH	3SHA		4SMP	

		(ng/L)	(ng/L)	NUO	(ng/L)	NUO
34-1	Fine FA	285	41	15	nd	0,0
34-2	Fine FA	273	39	14	nd	0,0
34-3	Fine FA	291	30	12	0,9	1,1
34-4	Fine FA	215	39	13	nd	0,0
34-5	Fine FA	257	46	16	0,5	0,6
34-6	Fine FA	278	40	15	nd	0,0
34-7	Fine FA	240	37	13	1,3	1,6
34-8	Fine FA	265	34	13	1,2	1,4
34-9	Fine FA	285	32	13	nd	0,0
34-10	Fine FA	479	50	20	3,7	4,6
34-1	Fine FML	304	50	18	nd	0,0
34-2	Fine FML	317	41	15	nd	0,0
34-3	Fine FML	342	36	15	0,9	1,1
34-4	Fine FML	264	47	16	nd	0,0
34-5	Fine FML	310	52	18	0,6	0,8
34-6	Fine FML	318	44	16	nd	0,0
34-7	Fine FML	284	44	16	1,2	1,5
34-8	Fine FML	287	34	13	1,2	1,5
34-9	Fine FML	322	34	14	Nd	0,0
34-10	Fine FML	543	57	23	4,0	5,0

Tra tutti i ceppi, il lievito 34-10 è quello che ha avuto attività β -lasiica più intensa. Infatti, il contenuto di tioli volatili risulta essere maggiore in tutti i composti con, in alcuni casi, valori quasi il doppio della media. Il livello di 3-MH in tutte le modalità è superiore alla soglia di percezione (60 ng/l), dando così ai vini l'aroma di frutto della passione. Anche il suo acetato è presente in concentrazioni maggiori rispetto alla soglia di percezione (4,2 ng/l). Relativamente a 4MMP il contenuto è basso rispetto al contenuto medio nei vini (fino a un centinaio di ng/L). Solo nelle modalità 34-3, 34-5, 34-7, 34-8 e 34-10 il livello è superiore alla soglia di percezione.

Confrontando le modalità 34-1 e 34-2 in cui il ceppo A è stato inoculato con i due diversi nutrienti non si osservano differenze rilevanti nel contenuto di tioli né dopo la fermentazione alcolica né all'imbottigliamento. In riferimento al ceppo F (modalità 34-7 e 34-8) nella prima analisi 3-MH è presente in concentrazioni maggiori nella modalità in cui è stato aggiunto nutrimento organico mentre a fine fermentazione malolattica la situazione si capovolge con una concentrazione maggiore nella modalità 34-2. C'è da sottolineare però un livello maggiore di 3-MHA in quest'ultima.

Dalle analisi dei tioli volatili emerge un aumento nel contenuto tra la fermentazione alcolica e malolattica. Questo aumento può essere dovuto da un'attività β -lasiica di *Oenococcus Oeni* (Knoll et al., 2011)

Tabella 14: Analisi dei principali esteri a fine FA effettuata da Nyseos.

2-feniletanolo	Esteri
----------------	--------

Analisi 25/09/2023 FINE FA	2-feniletanolo	2-feniletanolo	acetato d'etile	acetato di isoamile	acetato di 2-feniletile	Esteri acetici	decanoato d'etile	esanoato d'etile	ottanoato d'etile	butanoato d'etile	Esteri etilici lineari
	2PHEN	2PHE N	HEAC	IAAC	2PHE NAC	EA	ETDE C	ETHEX	ETOCT	ETB U	EE
	(µg/L)	NUO	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	NUO	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	NUO
34-1	47103	4,7	81	4557	1032	156	262	664	917	315	76
34-2	50284	5,0	54	3384	968	117	240	604	862	279	70
34-3	72038	7,2	63	2960	1102	103	207	589	813	259	66
34-4	51229	5,1	98	6515	1799	224	261	622	889	380	77
34-5	77132	7,7	104	6980	2255	242	277	664	890	362	77
34-6	83400	8,3	81	5522	1739	191	180	468	672	272	57
34-7	59145	5,9	89	4588	1602	159	255	496	709	224	58
34-8	67471	6,7	78	3560	1417	124	195	469	684	234	56
34-9	47077	4,7	70	2760	817	95	192	528	645	273	57
34-10	69514	7,0	76	3736	1297	130	174	549	706	234	59

Analisi 25/09/2023 FINE FA	2-idrossipropanoato d'etile	3-idrossibutanoato d'etile	2-metilbutanoato d'etile	2-metilpropanoato d'etile	2-idrossisocaproato d'etile	Esteri etilici ramificati
	2HPE	3HBE	2MBE	2MPE	2HICE	EER
	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	NUO
34-1	12621	655	nd	21	23	2,0
34-2	11715	653	nd	16	20	1,6
34-3	8616	550	nd	20	13	1,8
34-4	9860	904	nd	20	18	1,9
34-5	11029	1164	nd	17	12	1,9
34-6	7469	603	nd	27	14	2,2
34-7	8007	475	nd	15	14	1,4
34-8	7530	512	nd	13	13	1,2
34-9	11189	528	nd	22	15	1,9
34-10	6732	713	nd	17	12	1,6

Osservando i risultati ottenuti dall'analisi degli esteri si notano differenze significative tra le dieci modalità. In particolare, le modalità 34-6, 34-5 e 34-3 risultano avere quantità maggiori di 2-feniletanolo, l'aroma di rosa. Per quanto riguarda gli esteri acetici sono interessanti le modalità 4 e 5 poiché si evidenziano valori maggiori di acetato di isoamile (aroma di banana) e di acetato di 2-feniletile (aroma floreale, di rosa.). Quasi analoga è la situazione tra gli esteri etilici lineari con le modalità 4 e 5 che spiccano, insieme alla modalità 1. Dal punto di vista aromatico è importante l'esanoato d'etile avente un aroma floreale e fruttato che richiama la mela verde. I dati sono superiori alla soglia di percezione che risulta essere 0,08 mg/L (Lambrechts, 2000), riuscendo così ad essere percepito durante la degustazione. Anche il butanoato di etile e l'ottanoato d'etile con aroma fruttato e di fragola contribuiscono positivamente al profilo organolettico dei vini.

Con riferimento agli esteri etilici ramificati le concentrazioni sono abbastanza omogenee tra le modalità. L'etil lattato (2-idrossipropanoato d'etile) dona al vino gradevoli note burrose; le modalità con le concentrazioni maggiori sono la 1, 2,5 e 9, comunque inferiori alla soglia di percezione (150000 µg/L).

In generale, i ceppi di lievito che hanno prodotto esteri in maggiori quantità sono quelli utilizzati nelle modalità 4, 5 e 6. Comparando i valori ottenuti nelle modalità 1 e 2, 7-8 si nota che la nutrizione ricca in amminoacidi ha favorito la produzione di esteri in entrambi i casi. Uno studio condotto da Vilanova e colleghi ("Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts", 2007) ha confermato questa tesi: l'aggiunta di nutrienti organici favorisce la produzione di esteri etilici da parte dei lieviti.

Tabella 15: Analisi degli alcoli superiori a fine FA effettuata da Nyseos.

Analisi 25/09/2023 FINE FA	alcoli superiori					
	propanolo	isobutanolo	butanolo	somma 2-metil butanolo e 3-metil butanolo	esanolo	alcoli superiori
	PROP	ISOBUT	BUT	2MB + 3MB	HE	AS
	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	NUO
34-1	19978	62553	995	269515	456	10,2
34-2	17833	59745	1023	265875	447	10,0
34-3	24294	38439	1609	238408	563	8,7
34-4	17518	36912	1330	232738	468	8,5
34-5	22082	32144	6057	237635	553	8,6
34-6	18028	47361	1247	299371	550	10,9
34-7	20723	26268	1182	198659	436	7,2
34-8	18640	25600	1220	187379	509	6,8
34-9	18314	59796	942	238522	649	9,1
34-10	23311	42724	1177	269646	546	9,9

Dal punto di vista organolettico gli alcoli superiori sono sicuramente meno interessanti degli esteri poiché, ad eccezione del feniletanolo il cui profumo ricorda la rosa, hanno tutti odori sgradevoli di solvente. Tuttavia, l'analisi è interessante poiché evidenzia una relazione tra la concentrazione di esteri e la concentrazione di alcoli superiori. Infatti,

la modalità 34-6 che più di tutte ha concentrazioni elevate di esteri anche tra gli alcoli superiori è quella con valori maggiori. Questa relazione trova conferma nella prova di Mouret e colleghi del 2013 che ha dimostrato che c'è una relazione tra la sintesi di alcoli superiori e del relativo estere.

4.1 DISCUSSIONE

La prova ha permesso di confrontare otto ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in base alla capacità di liberare i tioli, presenti nel mosto sottoforma di precursori inodori. In aggiunta, lo studio ha consentito anche di confrontare due tipologie diverse di nutrizione: l'utilizzo di azoto inorganico mediante l'aggiunta di DAP e di azoto organico utilizzando Nutricell AA.

I ceppi di lievito sono stati valutati non solo per la concentrazione di tioli nei diversi vini ma anche per le cinetiche di fermentazione, l'intensità colorante e la concentrazione di esteri ed alcoli superiori.

Analizzando le curve di fermentazione e i parametri dell'analisi del vino non si notano differenze significative tra i ceppi: tutti hanno terminato la fermentazione in modo ottimale senza particolari difficoltà.

Relativamente al colore e al contenuto di polifenoli la situazione è analoga; le tonalità dei dieci vini risultano essere molto simili tra loro con le modalità 2 e 3 che presentano un'intensità colorante maggiore rispetto alle altre. Al contrario, la modalità 1 è quella con valori inferiori.

Dall'analisi dei tioli, le concentrazioni di 3-mercaptoesanolo e del suo acetato sono superiori alla soglia di percezione e presentano valori più alti rispetto al range tipico nei vini. Al contrario, la concentrazione di 4-MMP in tutte le modalità è bassa ed inferiore alla soglia di percezione. Non si notano differenze legate alla nutrizione: le concentrazioni di tioli volatili nelle modalità 1 e 2, 7 e 8 sono praticamente identiche. Sono quindi necessari ulteriori studi per definire l'influenza che ha la nutrizione sul contenuto di tioli.

In merito agli esteri, le modalità più rilevanti sono la 4, 5 e soprattutto la 6 con concentrazioni al di sopra della soglia di percezione. In questo caso c'è differenza in base alla nutrizione, con le modalità a cui è stata aggiunta la nutrizione organica all'inoculo che presentano valori più elevati sia di esteri etilici che di esteri acetati.

In conclusione, la scelta del ceppo determina le caratteristiche finali del vino andando ad influenzare il colore, l'aroma e il bouquet aromatico. Tuttavia, non è sufficiente scegliere il lievito corretto ma è altrettanto importante la scelta della nutrizione e della temperatura ottimale a cui condurre la fermentazione.

Come affermato in precedenza e come confermano altri studi (Vilanova et al., 2007) l'aggiunta di nutrienti organici favorisce la produzione di esteri etilici. Al contrario, in questa prova la diversa nutrizione non ha influenzato il contenuto di tioli come Subileau e colleghi hanno affermato.

Ulteriori studi sono quindi necessari per definire l'effetto dei nutrienti organici sul contenuto di tioli. In aggiunta, può essere interessante investigare l'impatto di diverse temperature di fermentazione sull'aroma fruttato, in particolare su esteri e tioli.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia famiglia, le mie amiche ed i miei amici per aver appoggiato ogni mia scelta, per avermi sostenuto ed aver creduto in me consigliandomi e guidandomi in questi anni.

Grazie ai miei compagni di università senza i quali questi tre anni sarebbero stati più difficili e noiosi. Grazie per avermi alleggerito le lezioni, per gli aperitivi e tutte le esperienze.

Merci à Olivier Fonade pour les enseignements précieux qu'il m'a transmis pendant le quatre mois passés dans la cave expérimentale. Cette expérience a été essentielle pour ma croissance, tant sur le plan professionnel que personnel.

Merci à Céline Sparrow, Daniele Pizzinato et tout l'équipe de Sofralab pour cette belle expérience et pour m'avoir permis d'utiliser un essai réalisée en cave comme sujet de ma thèse de fin d'études.

Grazie al professor Vincenzi per il suo aiuto fondamentale, sia durante il tirocinio che per la stesura della tesi.

BIBLIOGRAFIA

- Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. *International Journal of Food Microbiology*, 225, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001>
- Blanchard, L., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2004). Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 115–120.
- Bonnaffoux, H., Roland, A., Schneider, R., & Cavelier, F. (2021). Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages. *Food Chemistry*, 339, 127628. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127628>
- Brajkovich, M., Tibbits, N., Peron, G., Lund, C. M., Dykes, S. I., Kilmartin, P. A., & Nicolau, L. (2005). Effect of Screwcap and Cork Closures on SO₂ Levels and Aromas in a Sauvignon Blanc Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10006–10011. <https://doi.org/10.1021/jf0512813>
- Cameleyre, M., Lytra, G., Tempere, S., & Barbe, J.-C. (2015). Olfactory Impact of Higher Alcohols on Red Wine Fruity Ester Aroma Expression in Model Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), 9777–9788. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03489>
- Capone, D. L., & Jeffery, D. W. (2011). Effects of Transporting and Processing Sauvignon blanc Grapes on 3-Mercaptohexan-1-ol Precursor Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4659–4667. <https://doi.org/10.1021/jf200119z>
- Choné, X. (2001). Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux: étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. University of Bordeaux
- Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., Van Leeuwen, C., Castagnède, C., Saucier, C., & Dubourdieu, D. (2006). Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. Cv Sauvignon blanc grape juice. *OENO One*, 40(1), 1. <https://doi.org/10.20870/oenone.2006.40.1.880>
- Coetzee, C., & Du Toit, W. J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International*, 45(1), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.017>

Cordente, A. G., Curtin, C. D., Solomon, M., Kulcsar, A. C., Watson, F., Pisaniello, L., Schmidt, S. A., & Espinase Nandorfy, D. (2022). Modulation of Volatile Thiol Release during Fermentation of Red Musts by Wine Yeast. *Processes*, *10*(3), 502. <https://doi.org/10.3390/pr10030502>

Cooper, A.J., Krasnikov, B.F., Pinto, J.T., Bruschi, S.A., 2010. Measurement of cysteine S-conjugate β -lyase activity. *Curr. Protoc. Toxicol.* (May; Chapter 4: Unit 4.36)

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot des Gachons, C., & Murat, M. L. (2006). The role of yeast in grape flavour development during fermentation: The example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(1), 81–88.

Howell, K. S., Swiegers, J. H., Eelsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., & Barros Lopes, M. A. (2004). Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters*, *240*(2), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.022>

Howell, K.S., Klein, M., Swiegers, J.H., Hayasaka, T., Eelsey, G.M., Fleet, G.H., Hoj, P.B., Pretorius, I.S., Lopes, M.A.d.B., 2005. Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* *71*, 5420e5426.

Knoll, C., du Toit, M., Schnell, S. *et al.* Cloning and characterisation of a cystathionine β/γ -lyase from two *Oenococcus oeni* oenological strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 1051–1060 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2911-x>

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

Mora, M., Dupas De Matos, A., Vázquez-Araújo, L., Puente, V., Hernando, J., & Chaya, C. (2021a). Exploring young consumers' attitudes and emotions to sensory and physicochemical properties of different red wines. *Food Research International*, *143*, 110303. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110303>

Mora, M., Dupas De Matos, A., Vázquez-Araújo, L., Puente, V., Hernando, J., & Chaya, C. (2021b). Exploring young consumers' attitudes and emotions to sensory and physicochemical properties of different red wines. *Food Research International*, *143*, 110303. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110303>

- Mouret, J.R., Perez, M., Angenieux, M. *et al.* Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. *Food Bioprocess Technol* **7**, 1235–1245 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4076–4079
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. *Trattato di enologia* 1
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu D. *Trattato di enologia* 2
- Rigou, P., Triay, A., & Razungles, A. (2014). Influence of volatile thiols in the development of blackcurrant aroma in red wine. *Food Chemistry*, *142*, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.024>
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., & Cavelier, F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chemical Reviews*, *111*(11), 7355–7376. <https://doi.org/10.1021/cr100205b>
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010a). Evolution of S-Cysteinylylated and S-Glutathionylated Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/jf904164t>
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010b). Evolution of S-Cysteinylylated and S-Glutathionylated Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/jf904164t>
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M., & Degryse, E. (2008). Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Research*, *8*, 771–780
- Thibon, C., Cluzeet, S., Mérillon, J. M., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2011). 3-Sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: The stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 1344–1351
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D., 1998. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* *46*, 5215–5219.

Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C. *et al.* Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 145–157 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>

Winter, G., Van der Westhuizen, T., Higgins, V. J., Curtin, C., & Ugliano, M. (2011). Contribution of cysteine and glutathione conjugates to the formation of the volatile thiols 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 285–290.

SITOGRAFIA

OIV-FOCUS

2023_Evolution_of_the_world_wine_production_and_consumption_by_colour_0

<https://www.theiwsr.com/seven-key-trends-that-will-shape-the-global-wine-industry-in-2024/>

