

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Alimenti Risorse Naturali Animali e Ambiente

Corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

**VALUTAZIONE DELL'IMPIEGO DI RAGGI ULTRAVIOLETTI
PER LA STABILIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DEI VINI**

**EVALUATION OF THE USE OF ULTRAVIOLET RAYS
FOR THE MICROBIOLOGICAL STABILIZATION OF WINES**

Relatore:

Dott.ssa Chiara Nadai

Co-relatore:

Dott.ssa Veronica Vendramin

Laureando:

Andrea Marsura

Matricola n. 1115226

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 Stabilità microbiologica dei vini.....	6
1.2 Metodi chimici per la stabilità microbica dei vini	7
1.2.1 Metodi chimici convenzionali	7
1.2.2 Metodi chimici alternativi	12
1.3 Metodi fisici per la stabilità microbica dei vini	15
1.3.1 Metodi fisici convenzionali	15
1.3.2 Metodi fisici innovativi	16
1.4 Scopi della tesi.....	21
2. MATERIALI E METODI	23
2.1 Mezzi colturali e soluzioni	23
2.2. Analisi microbiologiche	24
2.3 Misura della torbidità.....	24
2.4 Intensità e tonalità del colore.....	24
2.5 Analisi HPLC	25
2.6 Test triangolare	25
2.7 Analisi statistiche dei dati.....	26
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	27
3.1 Trattamento con UV-C su vino bianco.....	27
3.1.1 Valutazioni microbiologiche	27
3.1.2 Valutazione del colore, della torbidità e della temperatura dei vini trattati	29
3.1.3 Valutazione della riboflavina.....	31
3.2 Trattamento con UV-C su vino rosato.....	32

3.2.1 Valutazioni microbiologiche	32
3.2.2 Valutazione del colore, della torbidità e della temperatura dei vini trattati	33
3.2.3 Valutazione della riboflavina.....	36
3.3. Analisi sensoriale dei vini.....	37
3.3.1 Test triangolare	37
3.3.2 Valutazione della riboflavina.....	38
3.4 Conclusioni.....	39
BIBLIOGRAFIA	41

RIASSUNTO

Uno degli obiettivi del trattamento con anidride solforosa nei vini è quello di limitare la presenza di microrganismi indesiderati che potrebbero alterare le caratteristiche organolettiche del vino.

Per riuscire a raggiungere la maggior stabilità microbiologica nei vini contenendo l'utilizzo dei solfiti, ai quali il consumatore è sempre più sensibile, si è deciso di sperimentare un trattamento su due diverse tipologie di vino mediante raggi ultravioletti.

L'utilizzo dei raggi UV per la sanificazione microbiologica dell'acqua potabile è una pratica già in uso da diverso tempo, e si è provato a trasferire questa tecnologia anche in ambito enologico, proprio come sostituto dei solfiti.

Per questa ricerca sono stati scelti due differenti vini prodotti dalla cantina della Scuola Enologica di Conegliano, un vino bianco (Prosecco) ed un vino rosato (Manzoni Moscato), al fine di verificare se la tecnica di trattamento risultasse efficace e se avesse dei comportamenti diversi da una tipologia di vino all'altro.

Il metodo impiegato in queste prove consisteva nell'inserire all'interno di un tubo metallico contenente una lampada a raggi ultravioletti il vino; le prove sono state eseguite in modalità statica per diversi tempi, ma la tecnica potrebbe poi diventare un trattamento in continuo facendo fluire il vino all'interno del tubo e regolando il tempo di contatto semplicemente modificando la velocità del flusso di vino all'interno del tubo.

I risultati di questa ricerca dal punto di vista microbiologico hanno dimostrato una riduzione della carica microbica, e quindi una maggiore stabilità microbiologica, in entrambi i vini.

I vini sono stati sottoposti anche ad un'analisi sensoriale per verificare se l'esposizione alla luce in presenza di riboflavina (naturalmente presente in entrambi i vini) fosse tale da determinare la comparsa del gusto di "luce". I dati ottenuti hanno permesso di dimostrare che la quantità di energia utilizzata in questi esperimenti ha apportato modifiche statisticamente significative solo nel vino bianco.

Ulteriori studi saranno necessari per verificare la reale applicabilità del metodo anche in condizioni reali di cantina.

ABSTRACT

One of the objectives of treating wines with sulfur dioxide is to limit the presence of unwanted microorganisms that could alter the organoleptic characteristics of the wine.

To achieve greater microbiological stability in wines while minimizing the use of sulfites, to which consumers are increasingly sensible, it was decided to experiment with a treatment using ultraviolet rays on two different types of wine.

The use of UV rays for the microbiological sanitation of drinking water is a practice which has been already used for a long time, and we tried to transfer this technology also in the enological area, just as a substitute of sulfites.

For this research, two different wines produced by the winery of the Scuola Enologica of Conegliano were chosen: a white wine (Prosecco) and a rosé wine (Manzoni Moscato), in order to verify whether the treatment technique was effective and whether it exhibited different behaviors between the two types of wine.

The method employed in these tests involved placing the wine inside a metal tube containing a UV lamp; the tests were conducted in static mode for various times, but the technique could then become a continuous treatment by flowing the wine inside the tube and adjusting the contact time simply by modifying the flow rate of the wine inside the tube.

The results of this research from a microbiological perspective have shown a reduction in microbial load, indicating greater microbiological stability in both wines.

The wines were also subjected to sensory analysis to assess whether exposure to light in the presence of riboflavin (naturally present in both wines) would lead to the appearance of the 'light-struck taste.' The data obtained demonstrated that the amount of energy used in these experiments brought statistically significant changes only in the white wine.

Further studies will be necessary to verify the real applicability of the method, even under actual winery conditions.

1. INTRODUZIONE

La vinificazione è un processo microbiologicamente complesso che richiede il controllo dei microrganismi nelle diverse fasi per garantire una fermentazione alcolica adeguata e ottenere prodotti di alta qualità che soddisfino le loro aspettative e quelle dei consumatori (Tedesco et al., 2022). Tuttavia, le caratteristiche chimiche e la composizione microbica del vino sono in costante evoluzione durante tutto il processo, e alcuni parametri sono difficili da controllare.

Il metabolismo microbico è uno dei molteplici fattori che influenzano la qualità del vino, contribuendo alla sua complessità o, in alcuni casi, portando ad aromi indesiderati. Il controllo dei microrganismi presenti nel vino è necessario per evitare il suo deterioramento dovuto alla crescita di lieviti e batteri lattici e acetici indesiderati, con effetti irreversibili sulla qualità del vino e perdite economiche rilevanti (Bartowsky, 2009; Tedesco et al., 2022). Questi microrganismi deterioranti possono sopravvivere in ambienti difficili, come è il vino, contraddistinti da caratteristiche fisico-chimiche quali una bassa disponibilità di nutrienti, un basso pH, un elevato contenuto alcolico e la presenza di anidride solforosa (Ruiz-Rico et al., 2021). Per questo motivo, prima dell'imbottigliamento, il vino dovrebbe essere stabilizzato microbiologicamente (Gialleli et al., 2015).

1.1 Stabilità microbiologica dei vini

La stabilità microbiologica del vino è un aspetto fondamentale per preservarne la qualità e produrre vini sostenibili evitando perdite economiche (Portillo e Mas, 2022). Infatti, sebbene i microrganismi siano fondamentali per la produzione del vino, alcune specie di lieviti e batteri, in condizioni favorevoli, possono causare alterazioni del vino, riducendone la qualità e il valore commerciale (Bartowsky, 2009; du Toit e Pretorius, 2000).

Le alterazioni nel vino possono provocare torbidità, aumento della concentrazione di acido acetico e dell'acidità volatile, aumento della viscosità e comparsa di odori sgradevoli dovuti a composti volatili come l'acetato di etile, i fenoli volatili e altri (Bartowsky, 2009; du Toit e Pretorius, 2000). Inoltre, può verificarsi la produzione di composti dannosi per la salute umana, come le amine biogene, l'acrilonitrile e il carbammato di etile (Lisanti al., 2019).

Per quanto riguarda i lieviti, i contaminanti più frequenti correlati al vino sono circa 40 diverse specie, ma quelle che potrebbero potenzialmente causare il deterioramento del vino sono molto meno. Infatti possono essere: ceppi fermentanti che rifermentano vini in bottiglia con residui di

zucchero; lieviti che formano sedimenti o torbidità nei vini in bottiglia; lieviti che formano film e producono esteri; lieviti produttori di odori sgradevoli (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Lisanti et al. 2019). I batteri lattici e i batteri acetici sono gli unici batteri presenti nel mosto d'uva e nel vino (Bartowsky, 2009). Tutti i batteri acetici sono considerati deterioranti, mentre alcuni ceppi di batteri lattici dei generi *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus* possono dare origine a diverse modalità di deterioramento, in quanto possono formare composti aromatici indesiderati, nonché amine biogene, acrilonitrile e carbammato (Bartowsky, 2009; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

La suscettibilità del vino al deterioramento microbico dipende da diversi parametri, tra cui: le caratteristiche chimico-fisiche del vino (contenuto di etanolo, concentrazione di zucchero residuo, pH, quantità e composizione dei principali acidi e ossigeno); le specie di lieviti e batteri presenti e le loro concentrazioni iniziali; la tipologia e l'intensità dei trattamenti di stabilizzazione; il tipo di conservante chimico aggiunto (Lisanti et al. 2019).

Per preservare la qualità del vino la sua stabilità microbiologica risulta pertanto fondamentale. La stabilità microbica può essere ottenuta mediante l'uso di conservanti chimici e/o di trattamenti fisici, con lo scopo di uccidere i microorganismi, inibire la loro proliferazione o rimuoverli fisicamente dal vino (Lisanti et al. 2019).

1.2 Metodi chimici per la stabilità microbica dei vini

1.2.1 Metodi chimici convenzionali

1.2.1.1 Anidride solforosa

L'anidride solforosa (SO_2) è uno degli additivi più utilizzati nell'industria alimentare, grazie al suo ampio spettro di azione legato al controllo dei microorganismi indesiderati e alla prevenzione dei fenomeni ossidativi (Lisanti et al. 2019).

A seconda del pH, nel vino possono essere presenti diverse forme di SO_2 , che sono l'acido solforoso o SO_2 molecolare (H_2SO_3), lo ione bisolfito (HSO_3^-), e lo ione solfito (SO_3^{2-}). Al pH del vino (compreso tra 3 e 4), la forma predominante è lo ione bisolfito (HSO_3^-), che può legare alcuni composti del vino, come l'acetaldeide, il glucosio, le antocianine e i chetoacidi, formando composti più o meno attivi contro il deterioramento microbiologico (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Tedesco et al., 2022). L'anidride solforosa è presente nel vino non solo come conseguenza dell'aggiunta esogena durante il processo di vinificazione, ma è anche il prodotto dal metabolismo dei lieviti durante la fermentazione alcolica.

È il conservante chimico più comune, economico ed efficace nel vino, e grazie al suo utilizzo la maggior parte delle alterazioni microbiologiche è quasi scomparsa dalle cantine. Attualmente, tra gli agenti autorizzati, l'anidride solforosa è l'unico che esercita un'efficacia ben comprovata per la stabilizzazione microbiologica del vino, offrendo ulteriori vantaggi come i costi bassi, la facilità d'uso e l'ampio spettro di efficacia (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Lisanti et al. 2019).

L'anidride solforosa inibisce lo sviluppo di diversi microorganismi, mostrando la più alta attività antimicrobica contro i batteri. L'effetto antimicrobico maggiore è dato dalla frazione di SO₂ molecolare, mentre gli ioni bisolfito mostrano una debole attività antimicrobica e la frazione di SO₂ legata esercita solo una leggera azione antibatterica (Ribéreau-Gayon et al., 2006). È per questo motivo che solo l'anidride solforosa molecolare penetra per semplice diffusione nelle cellule di lievito (Stratford e Rose, 1986). Una volta all'interno della cellula, reagisce con numerosi costituenti cellulari come sistemi enzimatici, coenzimi, co-fattori, acidi nucleici e vitamine (tiamina).

Nel vino finito, per prevenire il deterioramento microbiologico sono necessari almeno 0,6 mg/l di SO₂ molecolare per i vini secchi e almeno 0,8 mg/l di SO₂ molecolare per i vini dolci, e il livello di SO₂ molecolare dovrebbe essere mantenuto al di sotto della sua soglia sensoriale (2 mg/l) (Waterhouse et al., 2016).

Inoltre, oltre alla sua attività antimicrobica, l'anidride solforosa è l'additivo più efficace utilizzato per prevenire le ossidazioni nella produzione del vino, in grado di contrastare sia le ossidazioni enzimatiche, che avvengono prevalentemente nel mosto, che quelle chimiche, che prevalgono nel vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Tedesco et al., 2022).

Attualmente l'industria vinicola è orientata a soddisfare la richiesta, da parte dei consumatori, di vini con livelli ridotti di SO₂. Negli ultimi anni l'uso di SO₂ nell'industria alimentare ha sollevato numerose preoccupazioni sulla sicurezza dei consumatori (Vally et al., 2009). È stato dimostrato chiaramente che l'anidride solforosa ha un ruolo nelle reazioni avverse al vino che colpiscono una piccola percentuale (circa 1%) di individui "sensibili" ai solfiti (Vally e Thompson, 2003), quali reazioni a livello della pelle (orticaria, angioedema, orticaria, prurito), del sistema respiratorio (broncospasmo, bradicardia, ecc.) e dell'apparato gastrointestinale (nausea, crampi addominali, diarrea) (Lester, 1995). Inoltre, dosi eccessive di SO₂ nel vino possono causare la comparsa di difetti sensoriali, cattivi odori e aromi sgradevoli.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato un'assunzione giornaliera massima accettabile (ADI) di 0,7 mg di SO₂ per kg di peso corporeo, e la Comunità Europea ha imposto dei

limiti di dose di SO₂ per gli alimenti. La legge europea fissa il limite di concentrazione totale di SO₂ a 150 mg/l nei vini rossi e 200 mg/l nei vini bianchi e rosati contenenti un massimo di 5 g/L di zuccheri riducenti (Regolamento UE n. 1129/2011). Inoltre, il Regolamento dell'UE ha obbligato ad etichettare le bottiglie di vino con la frase "contiene solfiti" quando la concentrazione di SO₂ è superiore a 10 mg/l (Direttiva 2003/89/CE), suscitando preoccupazioni tra i consumatori che sono generalmente sempre più orientati verso prodotti "salutari" privi di conservanti chimici (Costanigro, Appleby, e Menke, 2014).

Tenendo conto di tutti questi aspetti, l'industria vitivinicola ha manifestato la necessità di metodi di controllo alternativi in grado di ridurre o addirittura eliminare l'anidride solforosa in vinificazione.

1.2.1.2 Lisozima

Il lisozima è un enzima isolato dall'albume dell'uovo che ha un'azione distruttiva sulle pareti cellulari di batteri suscettibili. È in grado di causare la lisi della cellula batterica, portandola alla morte; in particolare, rompe i legami glicosidici tra acido N-acetilmuramico e N-glucosamina nella parete dei batteri Gram-positivi. Per questo motivo è molto attivo contro i batteri Gram-positivi, ha bassa attività contro i batteri Gram-negativi ed è inattivo contro le cellule eucariotiche (Liburdi et al., 2014). Questa sua proprietà antimicrobica è stata sfruttata per prolungare la shelf-life di molti alimenti, come frutta e verdura fresche, frutti di mare, carne e formaggi. In enologia viene utilizzato come parziale sostituto dell'anidride solforosa in diverse fasi del processo tecnologico e come agente di chiarificazione. L'aggiunta di lisozima ai vini, dopo l'eventuale fermentazione malolattica, favorisce la stabilizzazione microbiologica e limita quindi la produzione di composti indesiderati (Lisanti et al., 2019; López et al., 2009).

Come riportato da Bartowsky et al. (2004), nei vini rossi il lisozima è poco efficace, poiché i componenti polifenolici possono legarlo e inibirne l'effetto, mentre il miglior risultato si riscontra nei vini bianchi. Tuttavia, il lisozima può indurre instabilità al calore, di conseguenza possono verificarsi fenomeni di torbidità che potrebbero richiedere una stabilizzazione proteica dopo il trattamento dei vini bianchi con lisozima. Contrariamente all'anidride solforosa, l'attività del lisozima aumenta quando il pH del vino aumenta (Ribéreau-Gayon et al., 2006), quindi può essere particolarmente utile nei vini con pH elevato. Poiché il lisozima non ha proprietà antiossidanti, né attività antimicrobica contro batteri acetici e lieviti, non può sostituire totalmente l'anidride solforosa.

In enologia il suo uso è approvato con un'aggiunta massima di 500 mg/l nel mosto, mentre nel vino questa dose deve essere considerata come cumulativa, tenendo conto di eventuali aggiunte nel mosto (Regolamento CE n. 606/2009 e modifiche). A causa della sua potenziale allergicità (essendo isolato dall'albumina dell'uovo), il lisozima deve essere dichiarato sull'etichetta del vino se rilevabile nel prodotto finale a 0,25 mg/L o superiore, anche se utilizzato come coadiuvante tecnologico (Direttiva 2007/68/CE che modifica la Direttiva 2000/13/CE).

L'aggiunta di lisozima non comporta cambiamenti negativi nel contenuto alcolico, nel pH e nelle caratteristiche organolettiche del vino; nei vini rossi previene la perdita di colore e l'uso di lisozima, insieme all'aggiunta di tannini enologici, migliora l'aroma del vino in seguito all'aumento del contenuto di esteri e acidi (Tedesco et al., 2022).

1.2.1.3 Dicarbonato di dimetile (DMDC)

Il dicarbonato di dimetile (DMDC) è un composto organico in grado di inibire i microorganismi reagendo irreversibilmente con i gruppi amminici sui siti attivi degli enzimi cellulari, in particolare l'alcol deidrogenasi e la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (Daudt e Ough, 1980).

Diversi studi hanno dimostrato che l'attività del DMDC è più efficace contro i lieviti che contro i batteri (Santos et al., 2012). Inoltre, il DMDC è risultato più efficace contro i lieviti rispetto all'anidride solforosa, poiché porta alla morte cellulare a differenza di quando si usa SO₂, che induce il lievito in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) inibendone la crescita (Divol et al., 2005).

L'efficacia del DMDC dipende da diversi fattori: la specie microbica, il ceppo, la concentrazione iniziale della popolazione microbica, la composizione chimica del vino (ad esempio, contenuto di etanolo, pH), temperatura, modalità di aggiunta e omogeneizzazione (Bartowsky, 2009; Costa et al., 2008). Ad esempio, il livello di alcol e la temperatura agiscono sinergicamente con il DMDC nel ridurre il tempo necessario per uccidere.

Il suo uso in vinificazione è stato approvato dall'Unione Europea nel 2006, con una quantità massima consentita di 200 mg/L, senza residui rilevabili nel vino messo in commercio (Regolamento CE n. 606/2009 e modifiche). Inoltre, il trattamento può essere applicato solo a vini con un contenuto di zucchero non inferiore a 5 g/l, e l'aggiunta deve essere effettuata solo poco prima dell'imbottigliamento. Negli USA può essere utilizzato anche durante la conservazione del vino, fino a una quantità cumulativa di 200 mg/l (Codice dei Regolamenti Federali, 2002).

Nel vino, il DMDC si idrolizza rapidamente in metanolo e anidride carbonica, quindi il suo effetto è istantaneo ed è necessaria un'omogeneizzazione rapida e adeguata per garantirne l'efficacia (Costa et al., 2008). I livelli di metanolo prodotti dall'aggiunta di DMDC non sono tossicologicamente significativi (Divol et al., 2005). Inoltre, è stato dimostrato che il DMDC ed i suoi derivati non alterano le caratteristiche organolettiche del vino (Tedesco et al., 2022).

Le prove scientifiche mostrano che il DMDC da solo non può essere considerato un buon metodo di controllo della contaminazione batterica del vino, anche alla dose massima legalmente consentita. Infatti, sarebbero necessarie dosi elevate e di molto maggiori rispetto a quelle approvate per esercitare un'attività antibatterica (tra 500 e 1000 mg/l) (Tedesco et al., 2022). Inoltre, il DMDC non protegge il vino dall'ossidazione, quindi, il suo utilizzo da solo non è sufficiente per sostituire completamente l'anidride solforosa. Tuttavia, grazie alla sinergia tra SO₂ e DMDC, il loro uso combinato potrebbe essere utile per ridurre le dosi di SO₂ all'imbottigliamento (Lisanti et al., 2019).

1.2.1.4 Acido sorbico

L'acido sorbico è un acido grasso insaturo a catena corta, poco solubile in acqua, ma solubile in etanolo, utilizzato come antimicrobico e antifungino nella conservazione alimentare (Lück, 1990). Nella sua forma non dissociata agisce alterando le funzioni della membrana cellulare. La sua principale applicazione è inibire la rifermentazione da parte di *Saccharomyces cerevisiae* nei vini dolci imbottigliati (Fugelsang, 1997), ma inibisce anche lo sviluppo di lieviti *flor* in grado di svilupparsi sulla superficie del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006), mentre non è efficace nei confronti dei batteri lattici e acetici e dei lieviti contaminanti (du Toit e Pretorius, 2000). La sua efficacia dipende dal pH del vino, dall'etanolo, dalla concentrazione di SO₂ e dalla concentrazione e dal tipo di lieviti. Deve sempre essere utilizzato in combinazione con una dose sufficientemente alta di SO₂ libera per prevenire reazioni ossidative e qualsiasi attività batterica (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Può essere decomposto da quasi tutte le specie di batteri lattici presenti nel vino, producendo composti volatili responsabili del cosiddetto "aroma di geranio" (principalmente dovuto a 2-etossil-3,5-esadiene) (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

In Europa, il suo utilizzo nel vino, aggiunto sotto forma di sale idrosolubile di sorbato di potassio, è consentito con il limite di una concentrazione di acido sorbico nel prodotto immesso sul mercato di 200 mg/L (Regolamento CE n. 606/2009), a causa dei suoi possibili effetti negativi sulla salute umana, essendo mutageno e citotossico (Zengin et al., 2011).

1.2.2 Metodi chimici alternativi

1.2.2.1 Chitosano

Il chitosano è un eteropolisaccaride lineare, derivato dalla chitina mediante deacetilazione, con riconosciuta attività antimicrobica. La chitina è insolubile in solventi comuni, mentre il chitosano è una forma più solubile (Raafat e Sahl, 2009). Il chitosano è solubile in soluzioni deboli di acidi organici a diverse concentrazioni, in base al suo grado di deacetilazione e al peso molecolare (Tedesco et al., 2022). Il chitosano e i suoi derivati hanno alcune caratteristiche biologiche favorevoli, tra cui la biodegradabilità (sono suscettibili a degradazione enzimatica da parte di enzimi non specifici provenienti da diverse fonti), la biocompatibilità (sono ben tollerati dai tessuti viventi) e la non tossicità (dimostrata da studi in vivo) (Raafat e Sahl, 2009).

Le attività biologiche del chitosano, compresa l'attività antimicrobica contro funghi filamentosi, lieviti e batteri responsabili di tossinfezioni alimentari, hanno suscitato notevole interesse per il suo utilizzo come potenziale conservante alimentare di origine naturale (Tedesco et al., 2022).

Sono state proposte diverse teorie per spiegare il meccanismo di azione antimicrobica del chitosano, anche se il meccanismo esatto deve ancora essere chiarito. Nell'ipotesi più accreditata il chitosano, carico positivamente, si lega alla superficie batterica, carica negativamente, portando a una permeabilità alterata della membrana, che provoca la perdita di costituenti intracellulari causando la morte cellulare. È stato ipotizzato che nei batteri Gram-positivi il legame del chitosano agli acidi teicoici porti a una serie di eventi che alla fine conducono alla morte batterica. Al contrario, nei batteri Gram-negativi è stato dimostrato che le microparticelle di chitosano interagiscono specificamente con una proteina di superficie batterica, e questa interazione è collegata all'attività antimicrobica (Jeon et al., 2014).

Recentemente, l'uso del chitosano in enologia è stato autorizzato dalla Commissione Europea (Regolamento CE 606/2009, Regolamento CE 53/2011, Regolamento CE 315/2012) come agente chiarificante, per diversi scopi. In questo settore è ammesso solo il chitosano derivato da *Aspergillus niger*, al fine di evitare eventuali preoccupazioni legate all'allergenicità correlata alla materia prima dei crostacei (infatti altre fonti da cui è possibile ottenere il polisaccaride sono crostacei e insetti).

L'OIV (oiv-eno-338a-2009) ha autorizzato l'uso di chitosano in dosi diverse per le seguenti applicazioni: l'aggiunta di 100 g/hl è autorizzata per prevenire la formazione di torbidità nel vino e per ridurre la concentrazione di metalli pesanti (Fe, Pb, Cd, Cu); dosi di 500 g/hl sono consentite

per ridurre qualsiasi contaminazione da ocratossina A, una micotossina prodotta da funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, classificata come "possibile cancerogeno per l'uomo" dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, che può essere presente nel vino a una dose massima di 2 µg/L (EC 2005); aggiunte di 10 g/hl possono essere utilizzate per ridurre la concentrazione di microrganismi indesiderati, in particolare *Brettanomyces* spp. (Tedesco et al., 2022).

1.2.2.2 Composti fenolici

I principali composti fenolici presenti nei vini sono: acidi fenolici, flavonoidi, tannini, antocianine e stilbeni (resveratrolo). I composti fenolici, o polifenoli, sono molto importanti nel vino poiché sono responsabili di diverse caratteristiche organolettiche, in particolare colore e astringenza (Tedesco et al., 2022). Inoltre, i polifenoli sono anche associati agli effetti benefici legati al consumo moderato di vino, specialmente in relazione alle malattie cardiovascolari e degenerative, grazie ai loro effetti antiossidanti, anticancerogeni e antinfiammatori (Xia et al., 2010).

L'attività antimicrobica dei polifenoli contro batteri lattici e patogeni suggerisce la loro possibile applicazione come nuovi "agenti antimicrobici naturali" in vinificazione contro il deterioramento del vino (Silva et al., 2018). Il meccanismo dell'attività antimicrobica non è chiaro. Alcuni autori suggeriscono che i fenoli possano alterare la permeabilità della membrana citoplasmatica e causare un'alterazione nella composizione degli acidi grassi (Tedesco et al., 2022). Alcuni studi hanno osservato un'inibizione della sintesi del peptidoglicano, un componente essenziale della parete cellulare dei batteri Gram-positivi; inoltre, sono state osservate l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici e le interazioni con enzimi cellulari (Campos et al., 2003; Stivala et al., 2017).

Per quanto riguarda la crescita e il metabolismo dei batteri lattici presenti nella vinificazione, è stato suggerito che i composti fenolici possano agire come attivatori o inibitori della crescita cellulare, a seconda della loro struttura chimica e della concentrazione (García-Ruiz et al., 2008). L'attività antimicrobica dei composti fenolici dipende dalla specie microbica e dalla concentrazione aggiunta. In generale, i composti fenolici sembrano essere inibitori solo a concentrazioni elevate, mentre a basse concentrazioni non hanno alcun effetto sulla crescita o addirittura un effetto stimolante (Alberto et al., 2001).

I composti fenolici o polifenoli sono ammessi in enologia dall'OIV, in seguito alla legislazione dell'UE (Reg. CE n. 606/2009 e successive modifiche), come additivi chimici quando la loro quantità in uve e vini è troppo bassa. Infatti, la concentrazione naturale dei composti fenolici nel

vino dipende da vari fattori legati all'uva (varietà, momento della vendemmia, suolo, clima, ecc.) e alle pratiche enologiche (tempo e temperatura di macerazione, fermentazione con bucce e semi, aggiunta di enzimi, pressatura, fermentazione malolattica, ecc) (Sacchi et al., 2005).

Attualmente, l'aggiunta di composti fenolici in vinificazione come agenti antimicrobici non ha un'applicazione pratica, principalmente perché la loro efficacia antimicrobica nel vino non è stata valutata definitivamente. Inoltre, dovrebbero essere prese in considerazione possibili conseguenze negative a livello sensoriale. Ad esempio, è stato rilevato che aggiunte elevate di tannini influenzano negativamente le caratteristiche sensoriali del vino rosso e gli acidi idrossicinnamici possono essere metabolizzati da alcuni microrganismi per formare etilfenoli responsabili di sgradevoli odori fenolici (Lisanti et al., 2019).

1.2.2.3 Nanoparticelle d'argento

Le proprietà antimicrobiche dell'argento sono note fin dai tempi antichi. Studi recenti hanno mostrato che i nanomateriali d'argento hanno proprietà antimicrobiche su un ampio spettro di batteri Gram-negativi e Gram-positivi e mostrano anche attività antifungine e antivirali (Marambio-Jones e Hoek, 2010). Negli ultimi anni è stato studiato l'uso di nanoparticelle d'argento nel controllo microbiologico del vino.

Sebbene il meccanismo d'azione esatto non sia ancora completamente chiaro, le evidenze sperimentali esistenti supportano diversi meccanismi correlati alle proprietà fisico-chimiche di questi materiali, come dimensioni e superficie, che consentono loro di interagire o attraversare pareti cellulari e membrane, influenzando direttamente i componenti intracellulari. Il primo meccanismo d'azione suggerisce che queste particelle attraversino la membrana esterna, accumulandosi nella membrana interna, dove l'adesione delle nanoparticelle genera destabilizzazione e danni cellulari, e successivamente, la morte cellulare. Il secondo meccanismo propone che le nanoparticelle possano anche penetrare nella cellula, dove interagiscono con gruppi zolfo o fosforo, presenti nel DNA e nelle proteine, alterandone la struttura e le funzioni, e inducono la formazione di specie reattive dell'ossigeno e radicali liberi, generando danni cellulari. Un terzo meccanismo è il rilascio di ioni d'argento dalle nanoparticelle, che possono interagire con componenti cellulari, alterando vie metaboliche, membrane e persino materiale genetico (Tedesco et al., 2022).

La legge europea fissa a 0,1 mg/l il limite massimo per i residui di argento nel vino, a seguito del trattamento con AgCl per eliminare o ridurre gli odori sgradevoli (Regolamento UE 1576/2015).

Sono state sviluppate nanoparticelle d'argento biocompatibili (stabilizzate con polietilene glicole o con glutatione) e si è scoperto che sono efficaci nel controllo della fermentazione malolattica e dei processi di deterioramento nei vini (García-Ruiz et al., 2015).

I risultati scientifici disponibili sull'uso di nanoparticelle d'argento sono promettenti in vista di una riduzione delle dosi di SO₂, specialmente nella produzione di vini rossi; tuttavia, la loro efficacia deve essere definitivamente valutata, così come la loro sicurezza per quanto riguarda i residui di argento nel vino (Lisanti et al., 2019).

1.3 Metodi fisici per la stabilità microbica dei vini

1.3.1 Metodi fisici convenzionali

1.3.1.1 Filtrazione

La filtrazione è un'operazione fisico-meccanica con la quale un liquido in movimento, sotto l'azione di un gradiente di pressione, si separa dalle particelle solide in esso disperse, per effetto della loro ritenzione da parte di un mezzo filtrante poroso attraverso cui il liquido viene fatto passare. Sono disponibili molte forme di filtrazione nell'industria vinicola, principalmente classificate come filtrazione a profondità e filtrazione a membrana. La filtrazione a profondità viene comunemente applicata nelle prime fasi della vinificazione, come la sedimentazione del mosto, la chiarifica e la stabilizzazione, mentre la filtrazione a membrana viene utilizzata alla fine del processo per sterilizzare il vino (Gialleli et al., 2015).

Uno dei metodi fisici più comuni ed efficaci utilizzati per rimuovere i microorganismi dal vino è la microfiltrazione (ovvero la filtrazione con una porosità di membrana compresa tra 0,1 e 10 µm) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Nella microfiltrazione del vino, di solito si impiega una dimensione dei pori di 0,45 o di 0,2 µm (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Tenendo conto del rischio di ri-contaminazione dopo il trattamento, la filtrazione sterile viene effettuata principalmente dopo la stabilizzazione del vino e poco prima dell'imbottigliamento (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

La microfiltrazione di vini di alta qualità, specialmente vini rossi, è sempre stata un argomento controverso per i possibili effetti negativi sulla qualità del vino, in quanto possono parzialmente alcuni componenti desiderabili del vino (Waterhouse et al., 2016). Alcuni studi indicano che vi sono delle diminuzioni piccole ma significative nell'aroma e nel colore, altri suggeriscono che l'impatto sul profilo sensoriale sia minimo (Lisanti et al., 2019).

Questi risultati potrebbero non essere generalizzabili, poiché l'effetto della filtrazione a membrana può variare notevolmente sia in base al mezzo filtrante sia alle caratteristiche intrinseche del vino.

I filtri a membrana basati su porosità molto bassa sono in grado di rimuovere efficacemente le cellule, ma presentano alcuni svantaggi, come l'alto costo dei filtri e della loro gestione, l'occlusione frequente e problemi di rigenerazione; inoltre, la ri-contaminazione del vino deve essere evitata attentamente, ad esempio mediante la sterilizzazione della linea di imbottigliamento (Gialleli et al., 2015; Lisanti et al., 2019).

1.3.1.2 Trattamenti termici

Nonostante la loro ben nota efficacia nell'uccidere i microorganismi, i trattamenti termici non hanno molte applicazioni nella produzione del vino come in altre industrie alimentari (Malfeito-Ferreira, 2011). Le principali preoccupazioni dei produttori di vino riguardano il presunto effetto negativo del calore sulle proprietà sensoriali e sulla longevità del vino (Malfeito-Ferreira, 2011; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Grazie al contenuto alcolico e al basso pH del vino, e considerando la termotolleranza dei microorganismi tipici del deterioramento, un riscaldamento leggero (60 °C circa per 30 secondi fino a pochi minuti) è sufficiente per ottenere la sterilità (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La pastorizzazione è particolarmente utile per stabilizzare i vini dolci, limitando così le dosi di SO₂ (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Tuttavia, a causa delle preoccupazioni sulla qualità, è generalmente utilizzata per stabilizzare vini di media-bassa qualità, nonostante manchino studi consistenti sugli effetti della pastorizzazione sulla qualità del vino.

A causa del rischio di ri-contaminazione, la pastorizzazione del vino è effettuata preferibilmente poco prima dell'imbottigliamento, seguita da una filtrazione sterile per eliminare le cellule morte, o nelle bottiglie stesse (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Inoltre è stato osservato che diversi trattamenti termici utilizzati nella produzione del vino, come la stabilizzazione tartarica a freddo del vino, possono ridurre le popolazioni microbiche nonostante siano eseguiti per altri scopi (Malfeito-Ferreira, 2011).

Uno svantaggio inevitabile è costituito dalla rimozione del colore, di macromolecole e composti aromatici volatili, ed è un aspetto che dovrebbe essere preso in considerazione per preservare l'identità sensoriale del vino e l'autenticità varietale (Lisanti et al., 2019).

1.3.2 Metodi fisici innovativi

Negli ultimi anni sono state utilizzate con successo diverse tecnologie emergenti per eliminare i microorganismi da alimenti e bevande. È stata studiata anche la loro applicazione per rimuovere i

microrganismi indesiderati dal vino. Rispetto agli additivi chimici, l'uso di metodi fisici potrebbe essere più adatto per ridurre l'utilizzo di SO₂ nel vino.

1.3.2.1 Ultrasuoni (US)

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose applicazioni degli ultrasuoni ad alta intensità nella lavorazione degli alimenti, anche come metodo alternativo ai trattamenti termici convenzionali di pastorizzazione e sterilizzazione (Lisanti et al., 2019). Gli ultrasuoni sono onde di pressione con una frequenza di 20 kHz o più (Butz e Tauscher, 2002); gli ultrasuoni ad alta potenza utilizzano frequenze tra 20 e 100 kHz. Queste frequenze si propagano all'interno di un liquido generando fenomeni di cavitazione e piccole bolle che implodono a causa delle variazioni di pressione. Queste microbolle collassano violentemente nei cicli di compressione successivi di un'onda ultrasonica propagata. Il risultato di questo fenomeno è l'aumento localizzato della temperatura (5500 °C) e della pressione (50 MPa) all'interno del prodotto trattato. Di conseguenza, un'intensa energia locale e una pressione elevata provocano un effetto di pastorizzazione localizzato senza causare un aumento significativo della macrotemperatura (Santos et al., 2012). La distruzione dei microrganismi presenti nel mezzo è quindi causata dall'alterazione della loro membrana dovuta a questo aumento di temperatura.

Il meccanismo di uccisione microbica è principalmente dovuto al diradamento delle membrane cellulari, al riscaldamento localizzato e alla produzione di radicali liberi (Chemat et al., 2011). L'effetto antimicrobico del trattamento con ultrasuoni dipende dal tipo di batteri trattati. I microorganismi (specialmente le spore) sono relativamente resistenti agli ultrasuoni, quindi possono essere necessari periodi prolungati di trattamento o l'uso combinato con altre tecnologie o conservanti per raggiungere l'effetto antimicrobico desiderato (Lisanti et al., 2019). Inoltre la composizione del cibo e la temperatura del trattamento influenzano l'efficacia dell'inattivazione microbica.

La tecnologia US è stata applicata al vino, però le proprietà sensoriali del vino sono state notevolmente alterate a causa dall'insorgenza di odori ossidativi, di bruciato e di fumo (Gracin et al., 2016). I trattamenti ad ultrasuoni hanno la capacità di aumentare la quantità di composti fenolici nel vino rosso e di accelerarne l'invecchiamento, aumentando i vantaggi economici dell'uso di questa tecnologia in enologia. Tuttavia, gli studi pubblicati finora richiedono ancora una valutazione pratica della fattibilità della tecnologia ad ultrasuoni per ridurre o sostituire l'uso di anidride solforosa in enologia (Lisanti et al., 2019). La modalità di applicazione del metodo

deve essere studiata attentamente, poiché elevati livelli di potenza inattivano gli enzimi, a causa della denaturazione, mentre bassi livelli di potenza possono indurre la stimolazione degli enzimi, a causa della loro liberazione dalle cellule (Costa et al., 2013).

1.3.2.2 Alta pressione idrostatica (High Hydrostatic Pressure - HHP)

Il trattamento ad alta pressione idrostatica (HHP) è una tecnica non termica che consiste nell'applicare una pressione compresa tra 100 e 1000 MPa a un prodotto, istantaneamente e uniformemente, utilizzando un mezzo liquido trasmettitore di pressione a temperatura ambiente o moderata (Cao et al., 2011). La tecnologia HHP è una delle cosiddette "tecnologie dolci", poiché utilizza l'acqua come mezzo di compressione ed è energeticamente molto efficiente (Hugas et al., 2002).

L'aumento della pressione provoca una diminuzione del volume del prodotto, accelerando le reazioni che comportano un cambio di volume a livello molecolare, determinando così effetti biologici su macromolecole e microrganismi (Hugas et al., 2002). Questi cambiamenti molecolari alterano il ruolo biologico delle biomolecole cellulari, inducendo la morte del microrganismo. L'inattivazione microbica mediante HHP è probabilmente dovuta a numerosi fattori, tra cui cambiamenti nella conformazione delle proteine e interferenze nelle strutture cellulari, come membrane, ribosomi e enzimi, che portano a un'alterazione delle loro funzioni e conseguente danno cellulare (Lisanti et al., 2019). L'effetto dei trattamenti HHP su batteri e lieviti del vino aumenta con la pressione e il tempo di trattamento, e l'impatto sulle proprietà fisico-chimiche e sensoriali è minimo. Nel vino, i batteri aerobi sono stati più suscettibili rispetto ai lieviti e ai batteri lattici (Mok et al., 2006).

L'HHP agisce interrompendo i legami non covalenti dei composti chimici, senza influire sui legami covalenti (Rendueles et al., 2011); per questa ragione, i prodotti trattati mantengono la loro freschezza, sapore, gusto e colore originali. Molecole più piccole come composti volatili, aminoacidi, pigmenti, vitamine e altri composti, responsabili dei benefici sensoriali, nutrizionali e salutari, sono in gran parte conservate (Lisanti et al., 2019).

Uno svantaggio di questa tecnica è l'accelerazione dei fenomeni di invecchiamento del vino; un'altra limitazione è che l'HHP può essere utilizzato solo nell'ultima fase della vinificazione, poiché solo il vino confezionato può essere trattato e solo in confezioni flessibili. Inoltre, non essendo un processo in continuo, la sua integrazione nell'attuale processo di vinificazione è piuttosto difficile. L'uso del trattamento ad alta pressione per la stabilizzazione microbiologica del

vino potrebbe essere considerato anche in associazione con altri metodi alternativi all'anidride solforosa, come lisozima o chitosano, come già proposto per il trattamento di altri alimenti (Lisanti et al., 2019).

1.3.2.3 Campi elettrici pulsati (Pulsed Electric Fields- PEF)

La tecnologia a campi elettrici pulsati è una tecnica rapida, non termica e altamente efficace in grado di inattivare microrganismi patogeni e deterioranti negli alimenti, nonché enzimi (Vega-Mercado et al., 1997). Questa tecnologia presenta diversi vantaggi, come tempi brevi di trattamento (alcuni microsecondi), basso consumo energetico e un processo in continuo. La tecnologia prevede l'applicazione di impulsi brevi (microsecondi) di campi elettrici ad alta intensità (da 5 a 50 kV/cm) a un alimento liquido posto o in movimento tra due elettrodi (Pataro et al., 2010). La breve durata e l'intensità elevata dei campi causano l'elettroporazione delle membrane cellulari e un aumento della loro permeabilità (Toepfl, Heinz e Knorr, 2006). Il campo elettrico applicato genera un potenziale elettrico attraverso la membrana cellulare; al di sopra di un valore critico, questo potenziale provoca la rottura della membrana cellulare (Toepfl et al., 2006).

Negli ultimi anni, le applicazioni del PEF in mosti e vini sono state ampiamente studiate con vari obiettivi, inclusa la stabilizzazione microbiologica. Diversi fattori influenzano l'efficacia dei trattamenti PEF, tra cui l'intensità del trattamento, la specie microbica, il mezzo e la temperatura (Yang et al., 2016). In generale, una maggiore intensità del trattamento PEF induce un'inattivazione microbica più elevata (Yang et al., 2016).

Questa tecnologia è una buona alternativa per ridurre l'anidride solforosa nella conservazione del vino grazie alla capacità di inattivare i microrganismi senza modificare le caratteristiche del vino, di migliorare l'estrazione dei composti fenolici, insieme al basso consumo energetico e ai tempi di lavorazione brevi richiesti (Santos et al., 2012). Tuttavia, alcuni studi suggeriscono che il trattamento PEF potrebbe influenzare i livelli di alcuni composti volatili del vino, come esteri e alcoli; l'effetto del trattamento sui composti volatili del vino, così come sul profilo sensoriale, è però ancora sconosciuto (Lisanti et al., 2019).

1.3.2.4 Luce Ultravioletta (UV)

La tecnologia UV impiega le radiazioni elettromagnetiche a una lunghezza d'onda compresa tra 100 e 400 nm (**Figura 1**). Le lunghezze d'onda più efficaci, dotate di attività antimicrobica, si trovano tra 200 e 280 nm (UV-C).

Negli ultimi anni la tecnologia UV è stata utilizzata come metodo non termico per disinfettare l'acqua, ed è molto efficace per la decontaminazione microbica di superfici e imballaggi nell'industria alimentare (Santos et al., 2012). Sono stati descritti diversi vantaggi associati agli UV: durante il trattamento non si formano prodotti o sottoprodotti tossici conosciuti, può essere utilizzato per distruggere contaminanti organici e il trattamento richiede molto meno energia rispetto ai processi di pastorizzazione termica (Santos et al., 2012).

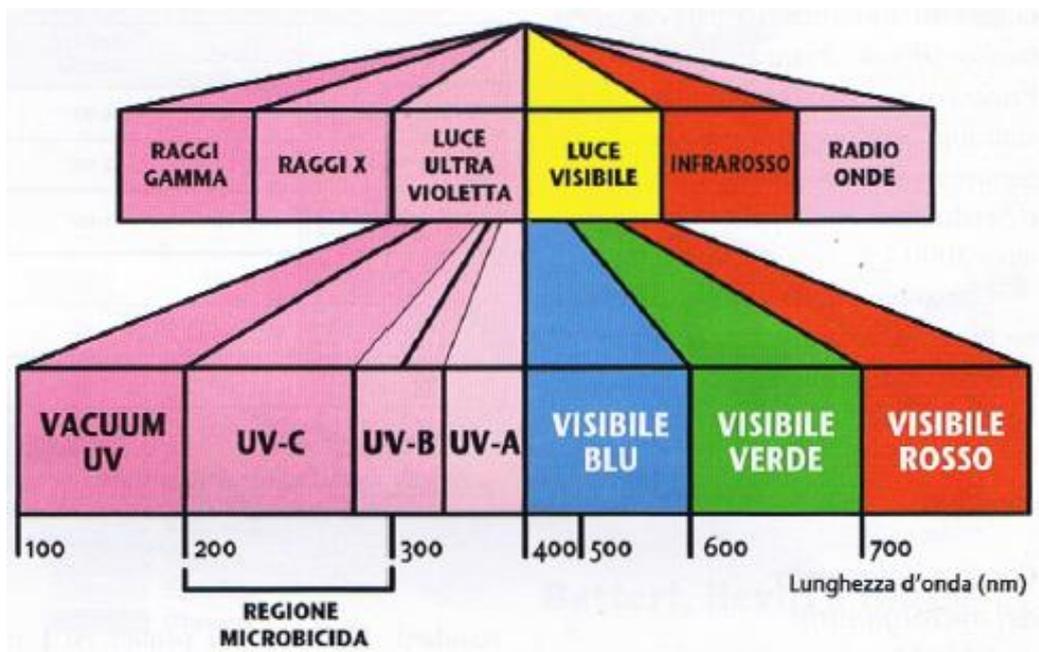


Figura 1. Spettro elettromagnetico.

L'azione antimicrobica dei raggi UV-C è causata da un'alterazione nel DNA dei microrganismi, che blocca la trascrizione e la replicazione del DNA e impedisce la riproduzione microbica (Hijnen et al., 2006). I lieviti mostrano una maggiore resistenza rispetto ai batteri, e tra questi i Gram-negativi sono più sensibili (Thompson, 2003). La capacità di penetrazione e l'efficacia dei raggi UV-C dipendono dall'aspetto e dalle caratteristiche del prodotto, come il colore, la densità, l'assorbanza, i materiali sospesi e i solidi solubili, che possono impedire alla luce UV-C di raggiungere i microrganismi nel mezzo liquido (Santos et al., 2012). Tuttavia, il trattamento con UV-C non provoca cambiamenti nei parametri fisici e chimici come il contenuto alcolico, la densità, il pH, l'acidità totale o l'acidità volatile (Bullè Rego et al., 2022).

Negli ultimi anni l'utilizzo degli UV è stato studiato come tecnologia innovativa che potrebbe contribuire a ridurre la quantità di SO₂ in vinificazione.

Fredericks e colleghi (2011) hanno studiato l'efficacia del trattamento con UV-C (254 nm) in mosti e vini. In questo lavoro sono stati inoculati singolarmente e co-inoculati lieviti, batteri lattici ed acetici in vini bianchi (Chardonnay) e rossi (Pinotage), che sono stati successivamente trattati con UV-C. Il trattamento ha mostrato un ampio spettro di inattivazione dei microorganismi del vino come *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* ed *Oenococcus*, con una correlazione positiva con il dosaggio UV-C. Tuttavia, il grado di inibizione microbica ottenuto nel vino Pinotage è stato molto più basso rispetto a quello riscontrato nel Chardonnay, e questo risultato è stato attribuito al colore del vino, che influisce sull'efficienza del trattamento. Questo risultato potrebbe essere correlato al fatto che i composti fenolici nel vino rosso, principalmente antociani, sono in grado di assorbire la radiazione nella regione UV dello spettro elettromagnetico, impedendo così la trasmissione della radiazione ai microorganismi. Questo risultato apre comunque buone prospettive per l'uso di trattamenti UV per la conservazione del vino bianco e rosato (Fredericks et al., 2011). Inoltre, l'applicazione combinata di radiazione UV-C e SO₂ (20 mg/L di SO₂ libera in Chardonnay e 24 mg/L di SO₂ libera in Pinotage) ha dimostrato la stessa efficacia antimicrobica del solo trattamento UV-C.

Un recente studio su scala industriale ha confermato l'efficacia del trattamento del vino con UV-C (254 nm) contro i microrganismi del vino (lieviti, batteri lattici e batteri acetici), soprattutto nei vini bianchi (Rizzotti et al., 2015).

L'applicazione di questa tecnologia per ridurre le dosi di SO₂ sembra promettente, ma è importante studiare più accuratamente il suo impatto sulle qualità organolettiche dei vini bianchi perché le lunghezze d'onda ultraviolette a minore energia favoriscono la fotodegradazione ossidativa della riboflavina e della metionina, con la produzione finale di dimetil disolfuro, responsabile del “gusto di luce” (Lisanti et al., 2019).

1.4 Scopi della tesi

Il lavoro sperimentale svolto in questa tesi ha valutato l'utilizzo dei raggi ultravioletti (UV) per il controllo dei microrganismi nei vini, da utilizzare come alternativa all'anidride solforosa.

L'anidride solforosa viene utilizzata nei vini per garantirne, tra le altre cose, la stabilità microbica, impedendo che si sviluppino microrganismi in grado di compromettere le sue caratteristiche organolettiche. Negli ultimi anni i consumatori sono sempre più attenti all'utilizzo di additivi

chimici e chiedono la riduzione dei solfiti nei vini, anche in conseguenza al fatto che una piccola percentuale dei consumatori è sensibile all'anidride solforosa.

Il trattamento con raggi ultravioletti è stato utilizzato in questo lavoro di tesi per migliorare la stabilità microbiologica del vino e contemporaneamente ridurre l'uso di solfiti. Infatti l'utilizzo di raggi UV per la disinfezione microbiologica dell'acqua potabile è una pratica consolidata da tempo, e negli ultimi anni è stata studiata anche in enologia come tecnologia alternativa ai solfiti.

Per valutare gli effetti microbiologici ed organolettici dei raggi UV sono state scelte due tipologie di vini: un vino bianco (Prosecco) e un vino rosato (Manzoni Moscato).

I vini sono stati introdotti in un tubo metallico circondato da una lampada a raggi ultravioletti e mantenuti per diversi tempi all'interno del sistema di sterilizzazione. La tecnica potrebbe evolvere in un trattamento continuo, consentendo al vino di fluire attraverso il tubo e regolando il tempo di contatto mediante la modifica della velocità del flusso.

I vini trattati sono stati valutati sia dal punto di vista microbiologico che sensoriale, per valutare se l'esposizione alla luce in presenza di riboflavina (presente naturalmente in entrambi i vini) avesse un impatto sul sapore attribuibile al "gusto di luce".

2. MATERIALI E METODI

2.1 Mezzi colturali e soluzioni

YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) agar

Dosi per un litro:

10 g Estratto di lievito (Oxoid)

20 g Peptone (Difco)

20 g Glucosio (Prolabo)

15 g di Bacto Agar (Difco)

Portare a volume con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Prima di versare il mezzo nelle piastre di Petri è stato aggiunto cloramfenicolo per inibire lo sviluppo di batteri.

PCA (Plate Count Agar)

Dosi per un litro:

17,5 g di Plate Count Agar (Oxoid)

Portare a volume con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Prima di versare il mezzo nelle piastre di Petri è stata aggiunta nistatina per inibire lo sviluppo di lieviti e muffe.

Il mezzo contiene: Peptone, Estratto di lievito, Glucosio e Agar.

MRS (Man, Rogosa E Sharpe) agar

Dosi per un litro:

62 g di MRS Agar (Oxoid)

Portare a volume con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Prima di versare il mezzo nelle piastre di Petri è stata aggiunta nistatina per inibire lo sviluppo di lieviti e muffe.

Il mezzo contiene: Peptone, Estratto di carne, Estratto di lievito, Potassio fosfato biacido, Diammonio citrato, Glucosio, Tween80, Sodio acetato, Magnesio solfato, Manganese solfato e Agar.

Soluzione di Ringer

Sciogliere una tavoletta in 500 ml di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

La soluzione di Ringer è una soluzione salina per diluizioni microbiologiche che contiene cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio e bicarbonato di sodio.

2.2. Analisi microbiologiche

Al termine di ogni trattamento la quantificazione della carica microbica è stata eseguita mediante conta su piastra per spatolamento superficiale.

Sono stati utilizzati mezzi colturali diversi a seconda dei microrganismi che si volevano determinare: per la conta dei lieviti è stato usato il mezzo di coltura YPD agar, per i batteri totali il mezzo PCA mentre per i batteri lattici il mezzo MRS incubato in condizioni di aerobiosi.

Le diluizioni decimali dei campioni sono state eseguite in soluzione di Ringer e spatolate sulla superficie delle piastre.

Le piastre sono state incubate a 30 °C per 7 giorni prima della conta delle colonie.

2.3 Misura della torbidità

La torbidità dei vini è stata determinata mediante lettura con il nefelometro (Hach 2100P turbidimeter) che misura la limpidezza di un liquido in NTU (unità di torbidità nefelometrica).

Questo parametro è dovuto ad un fenomeno ottico provocato dalla presenza di particelle in sospensione che deviano la luce dalla sua traiettoria abituale, fenomeno conosciuto con il nome di effetto Tyndall. La misurazione della limpidezza è, dunque, in relazione alla valutazione della torbidità, funzione del numero e delle dimensioni delle particelle in sospensione (Ribéreau-Gayon, 2006).

2.4 Intensità e tonalità del colore

Dopo ciascun trattamento è stato misurato il colore dei vini utilizzando uno spettrofotometro (Amersham Ultrospec 2100 Pro). L'intensità del colore è stata misurata registrando i valori di assorbanza a 420 nm per il vino bianco e a 420 nm e 520 nm per il vino rosato. Nell'ultimo caso l'intensità del colore è stata calcolata come somma dei due valori. Anche la tonalità è stata calcolata utilizzando la seguente formula: Tonalità = Assorbanza a 420 nm / Assorbanza a 520 nm.

2.5 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.

2.6 Test triangolare

Il test triangolare è un test analitico (o di laboratorio) di analisi sensoriale del tipo discriminante qualitativo, ovvero che stabilisce se esiste una differenza sensoriale statisticamente significativa tra i campioni. Questa tecnica viene definita dalla norma UNI EN ISO 4120:2008.

I test discriminanti qualitativi mirano a stabilire se esistono tra due o più prodotti delle differenze riconoscibili. L'utilizzo di tali tipi di test è molto frequente grazie all'applicabilità del metodo, alla rapidità con cui si ottengono le informazioni e all'attendibilità dei risultati.

Il test triangolare è il più usato fra tutti i test discriminanti. Esso fornisce informazioni solo sulla presenza o meno di determinate differenze e non sulla loro qualità o quantità, ed è pertanto un metodo adatto quando si suppone che ci siano delle differenze, ma queste non sono notevoli e non se ne conosce la loro natura.

Tale metodo è efficace per: determinare se esiste una differenza percettibile tra due prodotti; determinare se non si nota alcuna differenza in seguito a un cambiamento degli ingredienti, del tipo di confezione, del processo di lavorazione o delle condizioni di stoccaggio; selezionare, addestrare e mantenere allenati gli assaggiatori.

Il numero di assaggiatori viene scelto in base al livello di sensibilità desiderata per il metodo, che è definita rigorosamente in termini statistici.

Ad ogni membro del panel vengono presentati tre campioni codificati diversamente, di cui due identici e uno diverso. L'assaggiatore deve identificare il campione differente, e anche se non è in grado di farlo, deve comunque dare una risposta (scelta forzata).

I due campioni da confrontare A e B vengono distribuiti all'interno del panel, in modo tale che alcuni ricevano due contenitori con il campione **A** e un contenitore con il campione **B**, e gli altri ricevano due contenitori con il campione **B** ed uno con il campione **A**.

I tre campioni vengono presentati accompagnati da una scheda nella quale vengono fornite le istruzioni per l'esecuzione del test. I dati vengono raccolti in una scheda generale dove sono riportati accanto al numero di set, il corrispondente ordine di presentazione dei campioni e i relativi codici, la risposta fornita da ciascun giudice, quella esatta e il totale delle risposte giuste.

Per l'analisi dei risultati occorre utilizzare una tabella di riferimento necessaria per stabilire l'esistenza di una differenza significativa tra i due prodotti. Se il numero di risposte esatte è maggiore o uguale al numero riportato nella tabella si può concludere che esiste una differenza significativa tra i campioni; viceversa, se è minore si deve concludere che i due campioni sono simili.

Il test è stato utilizzato per confrontare il vino non trattato e il vino trattato per un tempo più lungo (10 minuti). Per il panel sono stati scelti 20 assaggiatori.

2.7 Analisi statistiche dei dati

L'analisi statistica comparativa tra i vari gruppi di campioni nelle diverse prove è stata condotta mediante il software XLStat, vers. 2016.02, Addinsoft (Paris, France), utilizzando l'analisi di varianza semplice (one-way ANOVA), seguita dal test di Tukey come "post-hoc" test. L'analisi è stata condotta confrontando le medie di tre repliche indipendenti e le differenze sono state considerate statisticamente significative per p -value minori di 0,05.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per valutare l'effetto del trattamento con UV-C su vino sono stati utilizzati due diversi vini, uno bianco (Prosecco) e uno rosato (Manzoni Moscato). Queste tipologie di vini sono state scelte perché sono più suscettibili, rispetto ai vini rossi, alla comparsa del “gusto di luce” se esposti alla luce naturale o artificiale per qualche ora o pochi giorni.

La prova si è svolta utilizzando un tubo metallico all'interno del quale era stata installata una lampada UV-C (254 nm). Il vino è stato inserito all'interno del tubo (diametro 3 cm) fino a riempire l'intero volume, in modo tale che il liquido fosse a contatto con la lampada, e le due estremità sono state chiuse. Il liquido è stato quindi irradiato con la lampada UV-C in modo statico.

Sono stati testati diversi tempi di esposizione per valutare quanto a lungo il liquido deve stare a contatto con i raggi UV-C per abbassare la carica microbica. I tempi di esposizione applicati sono E0 – 0 minuti, E1 – 1 minuto, E2 – 2 minuti, E5 – 5 minuti, E10 – 10 minuti.

Da un punto di vista microbiologico sono state valutate le cariche microbiche di lieviti, batteri totali e batteri lattici nei campioni trattati rispetto al vino non trattato.

Inoltre sono stati determinati torbidità, intensità del colore e temperatura dei vini dopo i diversi trattamenti per verificare se la durata del trattamento possa influire su questi parametri.

Infine è stata misurata la quantità di riboflavina, composto naturalmente presente nel vino, per determinare se il trattamento con raggi ultravioletti è in grado di determinarne la fotoriduzione responsabile del “gusto di luce”. I vini sono stati sottoposti anche ad un'analisi sensoriale per verificare se l'esposizione alla luce UV fosse tale da determinare la comparsa del “gusto di luce”.

3.1 Trattamento con UV-C su vino bianco

3.1.1 Valutazioni microbiologiche

Per il vino bianco (Prosecco) sono state valutate le cariche microbiche di lieviti, batteri totali e batteri lattici nel vino dopo ciascun tempo di trattamento, rispetto al vino non trattato, mediante conta su piastra utilizzando terreni specifici (**Figura 2**).

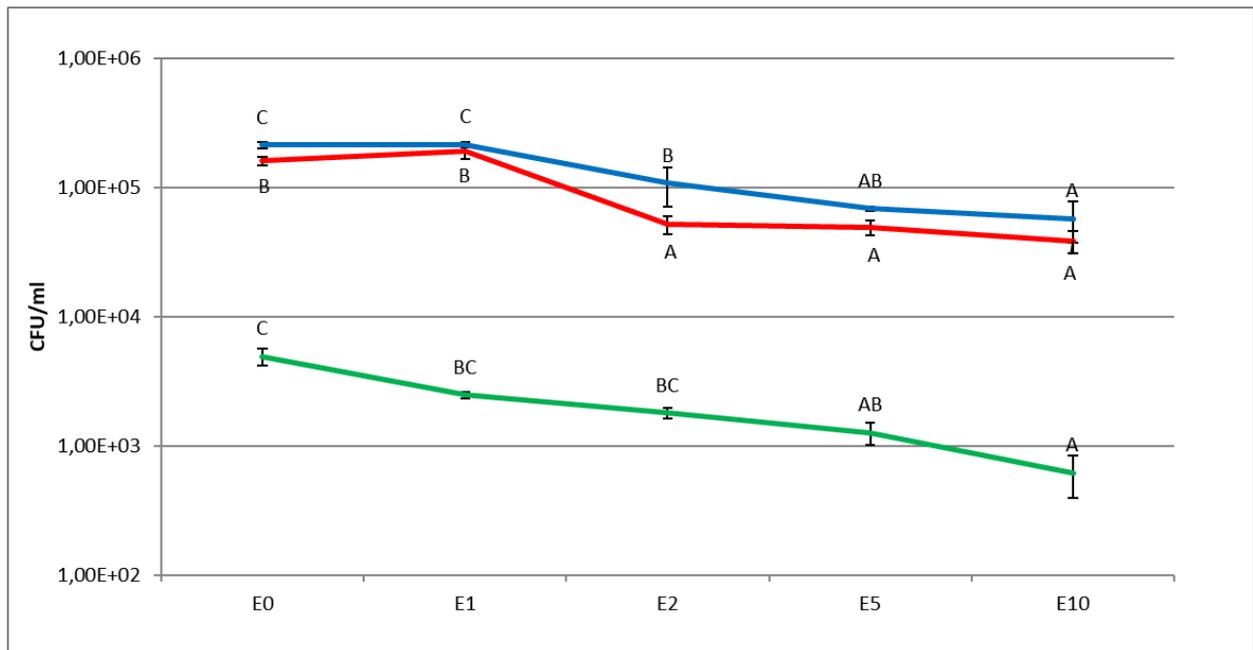


Figura 2. Concentrazione di ● lieviti, ● batteri totali e ● batteri lattici nel vino Prosecco dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

Nel vino Prosecco i batteri erano presenti in concentrazione maggiore rispetto ai lieviti (**Figura 2**).

La popolazione totale vitale dei lieviti nel vino non trattato era di $4,95 \times 10^3$ CFU/ml e cala significativamente nel caso dei trattamenti della durata di 5 (E5) e 10 minuti (E10), arrivando rispettivamente ad una concentrazione di $1,27 \times 10^3$ CFU/ml e $6,2 \times 10^2$ CFU/ml. Un trattamento di almeno 5 minuti con UV-C è in grado quindi di ridurre significativamente la carica dei lieviti presenti nel vino.

La concentrazione di batteri totali nel vino non trattato era di $2,14 \times 10^5$ CFU/ml mentre quella di batteri lattici era di $1,61 \times 10^5$ CFU/ml. In entrambi i casi la popolazione cala significativamente già dopo 2 minuti di trattamento (E2), arrivando rispettivamente ad una concentrazione di $1,08 \times 10^5$ CFU/ml e $5,17 \times 10^4$ CFU/ml. Nel caso dei batteri totali un trattamento con UV-C protratto più a lungo (10 minuti) è in grado di ridurre ulteriormente in modo significativo il numero di batteri totali presenti nel vino ($5,77 \times 10^4$ CFU/ml).

Il trattamento con raggi UV-C sembra quindi una tecnologia promettente per garantire la stabilità microbica dei vini bianchi, risultando efficace sia contro i batteri che contro i lieviti. Ulteriori prove sperimentali potrebbero consentire di ridurre l'utilizzo dell'anidride solforosa nei vini.

3.1.2 Valutazione del colore, della torbidità e della temperatura dei vini trattati

Da un punto di vista chimico-fisico i parametri che sono stati valutati, in relazione all'esposizione ai raggi UV-C per un tempo più o meno prolungato, sono stati il colore, la torbidità e la temperatura del vino. Infatti i raggi UV-C potrebbero interagire con le molecole presenti nel vino modificando il colore e la torbidità dello stesso e un'esposizione prolungata ai raggi UV potrebbe portare ad un aumento della temperatura.

3.1.2.1 Colore

L'intensità del colore rappresenta la quantità di colore. I dati registrati, misurati come OD 420 nm, sono riportati nella **Figura 3**.

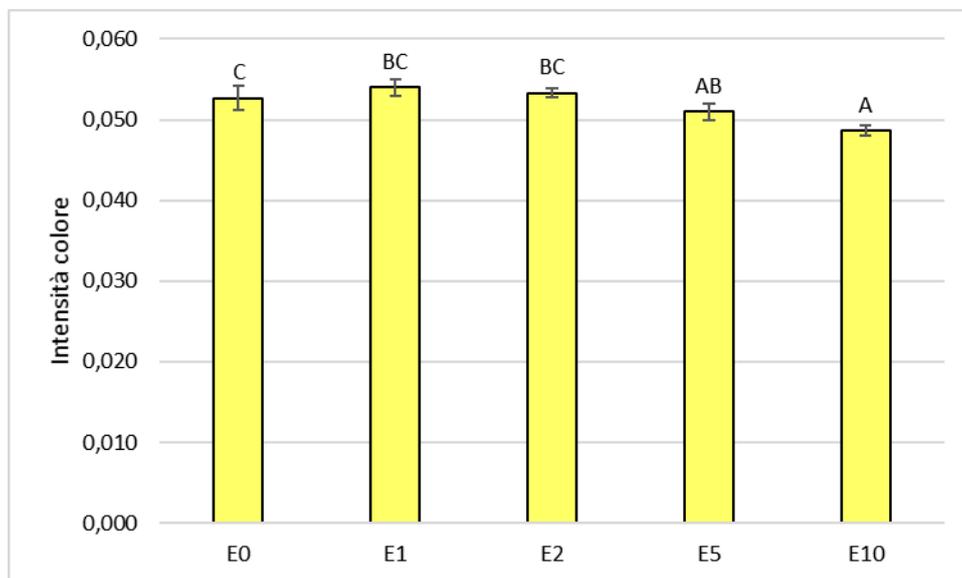


Figura 3. Intensità del colore del vino Prosecco dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

L'intensità del colore risulta minore nel caso dei trattamenti con UV-C della durata di 5 (E5) o 10 (E10) minuti, rispetto al vino non trattato. Il calo di assorbanza è comunque molto limitato, passando da 0,053 nel vino E0 a 0,049 nel vino E10.

3.1.2.2 Torbidità

La torbidità dei vini è un aspetto generalmente non apprezzato dal consumatore, che preferisce vini limpidi. Per verificare se gli UV-C sono in grado di aumentare la torbidità del vino sono state eseguite delle misure delle NTU, riportate nella **Figura 4**.

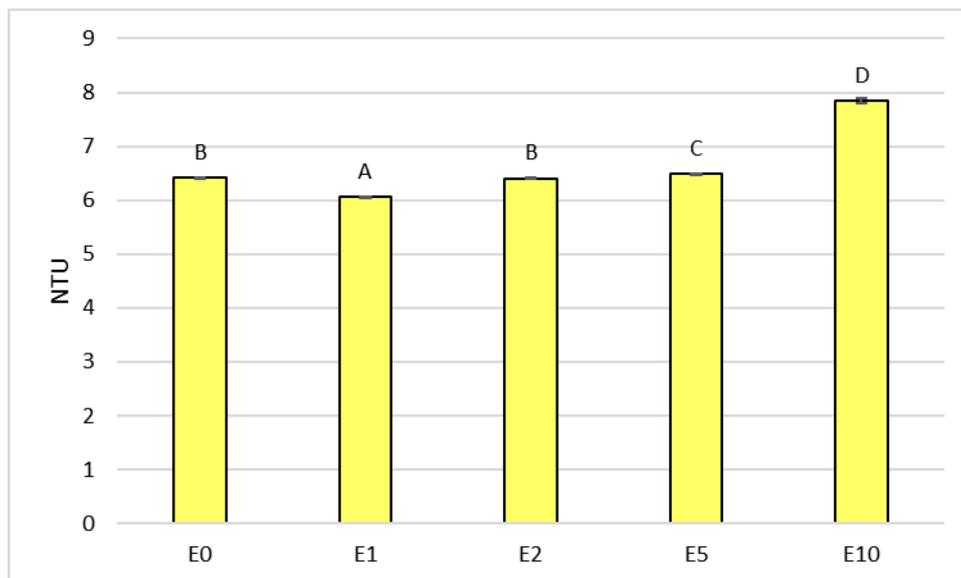


Figura 4. Torbidità del vino Prosecco dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

La torbidità del campione iniziale era di 6,41 NTU e nel caso del campione trattato per un tempo più lungo arriva a 7,85 NTU. Un tale aumento di torbidità, pur risultando statisticamente significativo, non è da considerarsi inaccettabile per un vino bianco.

3.1.2.3 Temperatura

La temperatura del vino è stata misurata prima e dopo il trattamento con UV-C per determinare la differenza di temperatura e verificare se i raggi ultravioletti sono in grado di riscaldare il vino. La temperatura del vino iniziale era di 8,1 °C. I dati sono riportati nella **Tabella 1**.

Campione	Differenza temperatura
E1	3,6 °C
E2	2,9 °C
E5	3,5 °C
E10	5,7 °C

Tabella 1. Differenza di temperatura del vino Prosecco dopo 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

Dai dati raccolti si osserva che un trattamento prolungato (10 minuti) aumenta di oltre 5 °C la temperatura del vino. Considerata la temperatura iniziale del vino l'incremento è notevole (più del

50%), e se questo tempo di trattamento dovesse essere scelto per ridurre la carica microbica dei vini sarebbe opportuno valutare di aggiungere un sistema di raffreddamento per evitare che il vino possa surriscaldarsi.

3.1.3 Valutazione della riboflavina

Il “gusto di luce” è un difetto che si può riscontrare nei vini bianchi e rosati imbottigliati in vetro incolore ed esposti a radiazione luminosa (naturale o artificiale) (Clark et al., 2011). La causa di questo problema è la fotoriduzione che avviene a carico della riboflavina (o vitamina B₂), la quale deriva principalmente dal metabolismo dei lieviti. 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). Il fenomeno si verifica attraverso alcune reazioni biochimiche che coinvolgono la riboflavina e la metionina: queste provocano la formazione di metantiolo e dimetil disolfuro, composti solforati caratterizzati molto forte, sgradevole, pungente, di uova marce e cavolo cotto, di aglio, cipolla 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.

La riboflavina contenuta nell’uva è generalmente inferiore a poche decine di µg/l, ma aumenta durante la vinificazione per l’attività metabolica di *Saccharomyces cerevisiae* (Santos et al., 1995). Molti vini bianchi hanno mostrato la tendenza a sviluppare il difetto che viene ricondotto alla presenza di riboflavina. Precedenti studi riportano che una concentrazione di vitamina B₂ inferiore a 100 µg/l può ridurre il rischio di un’eventuale alterazione nei vini. (Pichler, 1996).

Per tale motivo, nel vino non trattato e nei vini trattati, è stata misurata la concentrazione di riboflavina (**Figura 5**) per verificare se il trattamento con raggi UV-C sia in grado di causarne la fotoriduzione e l’eventuale comparsa di “gusto di luce”.

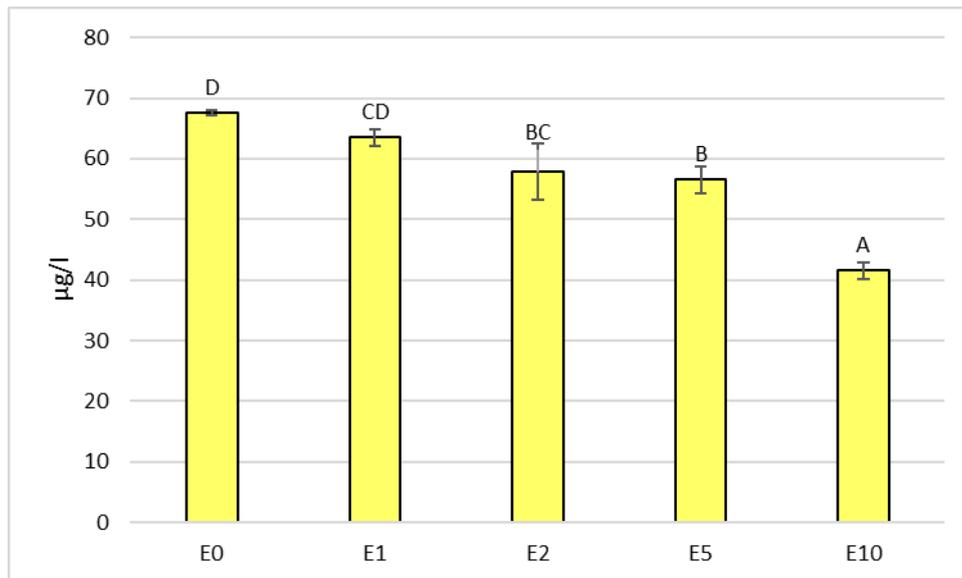


Figura 5. Concentrazione di riboflavina nel vino Prosecco dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

La concentrazione di riboflavina nel vino non trattato era 67,57 µg/l. Questa quantità diminuisce in modo significativo già dopo 2 minuti di trattamento (E2), dove risulta essere inferiore di quasi 10 µg/l (57,87 µg/l). Più a lungo dura il trattamento con UV-C del vino, maggiore è la diminuzione della quantità di riboflavina presente, infatti nel campione E10 la concentrazione è di 41,55 µg/l. Anche se la concentrazione iniziale nel vino non trattato era inferiore al valore soglia di 100 µg/l, questa riduzione della quantità di riboflavina nel vino trattato potrebbe essere associata alla comparsa del “gusto di luce”.

3.2 Trattamento con UV-C su vino rosato

3.2.1 Valutazioni microbiologiche

Per il vino rosato (Manzoni Moscato) sono state valutate le cariche microbiche di lieviti, batteri totali e batteri lattici nel vino dopo ciascun tempo di trattamento, rispetto al vino non trattato, mediante conta su piastra utilizzando terreni specifici (**Figura 6**).

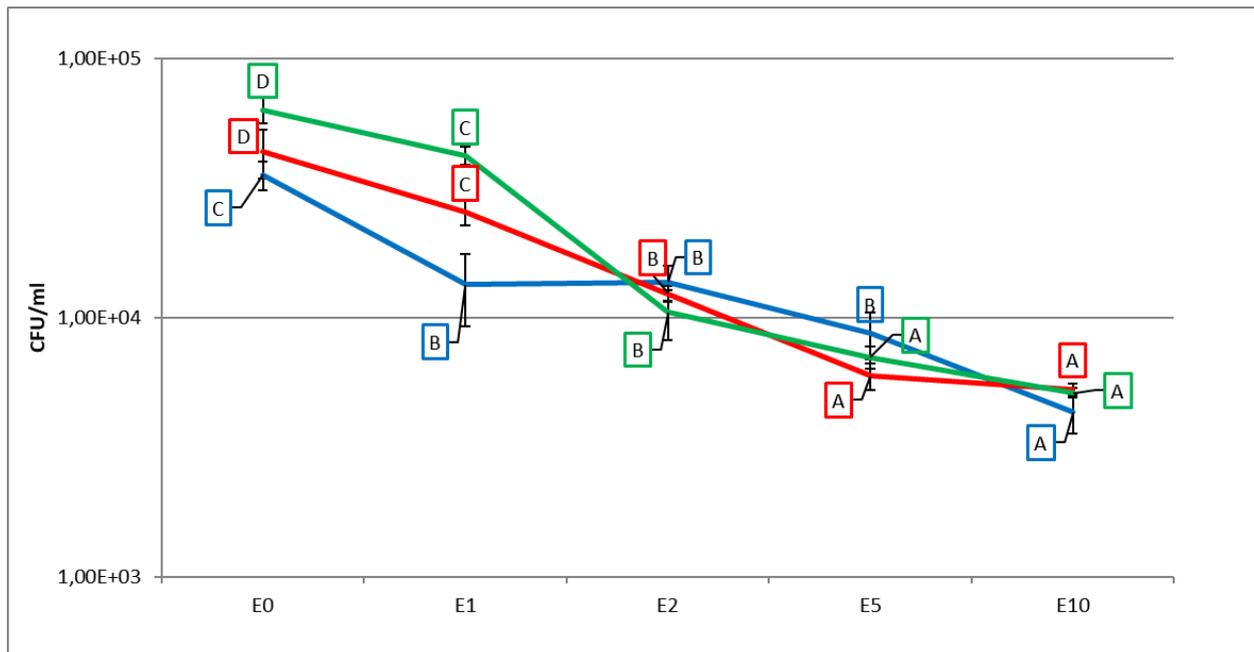


Figura 6. Concentrazione di ● lieviti, ● batteri totali e ● batteri lattici nel vino Manzone Moscato dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

La popolazione totale dei lieviti nel vino non trattato era di $6,33 \times 10^4$ CFU/ml e cala significativamente già nel caso del trattamento da 1 minuto (E1), arrivando ad una concentrazione di $4,22 \times 10^4$ CFU/ml. Più a lungo dura il trattamento con UV-C del vino, maggiore è la diminuzione della concentrazione dei lieviti nel vino, che arriva a $5,13 \times 10^3$ CFU/ml nel campione E10.

La concentrazione di batteri totali nel vino non trattato era di $3,57 \times 10^4$ CFU/ml mentre quella di batteri lattici era di $4,37 \times 10^4$ CFU/ml. In entrambi i casi la popolazione cala significativamente già dopo 1 minuto di trattamento (E1), arrivando rispettivamente ad una concentrazione di $1,34 \times 10^4$ CFU/ml e $2,55 \times 10^4$ CFU/ml. Anche in questo caso, come per i lieviti, più a lungo dura il trattamento con UV-C del vino, maggiore è la diminuzione della concentrazione dei batteri presenti, che arriva a circa $4,3 \times 10^3$ CFU/ml di batteri totali nel campione E10.

Anche nel caso del vino rosato il trattamento con raggi UV-C sembra una tecnologia promettente per garantire la stabilità microbica, in quanto anche in questo caso risulta efficace sia contro i batteri che contro i lieviti.

3.2.2 Valutazione del colore, della torbidità e della temperatura dei vini trattati

Anche nel caso del vino rosato Manzone Moscato sono stati valutati il colore, la torbidità e la temperatura del vino. In questo caso, oltre all'intensità del colore è stata valutata anche la tonalità,

in quanto un vino rosato potrebbe avere un contributo dato anche dal colore rosso (Assorbanza 520 nm) oltre che dal giallo (Assorbanza 420 nm).

3.2.2.1 Colore

L'intensità del colore tiene conto dei contributi del rosso (Assorbanza 520 nm) e del giallo (Assorbanza 420 nm) al colore complessivo.

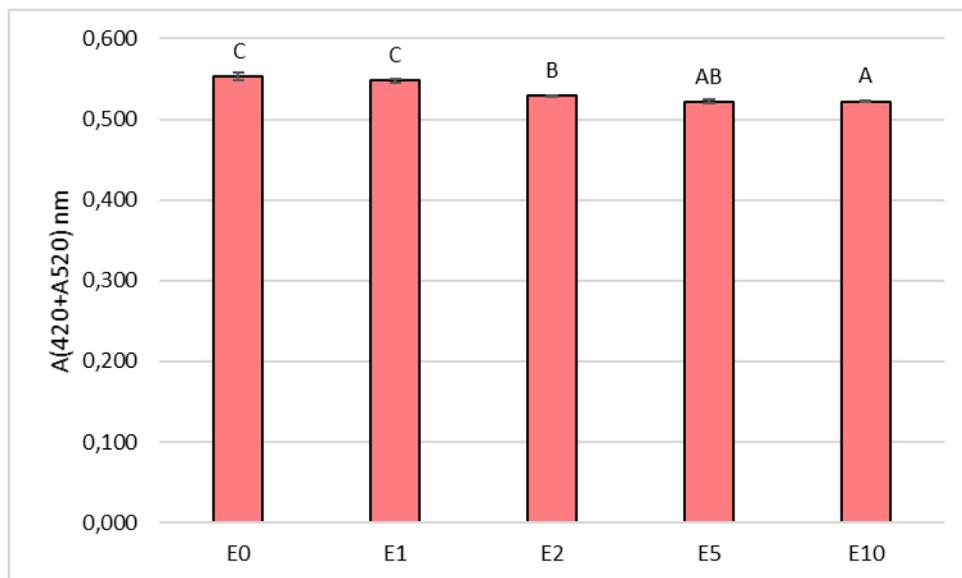


Figura 7. Intensità del colore del vino Manzoni Moscato dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

L'intensità del colore risulta minore nel caso dei trattamenti con UV-C della durata di 2 (E2), 5 (E5) o 10 (E10) minuti, rispetto al vino non trattato. Il calo di assorbanza è comunque molto limitato, passando da 0,055 nel vino E0 a 0,052 nel vino E10.

La tonalità indica lo sviluppo di un colore verso l'arancione. I dati misurati, riportati come rapporto tra Assorbanza 420 nm e Assorbanza 520 nm, sono riportati nella **Figura 8**.



Figura 8. Tonalità del colore del vino Manzioni Moscato dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

La tonalità risulta aumentata nel caso del trattamento con UV-C della durata 10 (E10) minuti, rispetto al vino non trattato. Questo aumento è molto limitato, infatti nel vino E0 la tonalità era pari a 0,97, nel vino E10 pari a 1. Tuttavia non c'è un aumento di tonalità proporzionale alla durata del trattamento con UV-C, quindi la differenza non sembra imputabile al trattamento.

3.2.2.2 Torbidità

Anche nel vino rosato è stata misurata la torbidità del vino non trattato e dei vini trattati (**Figura 9**).

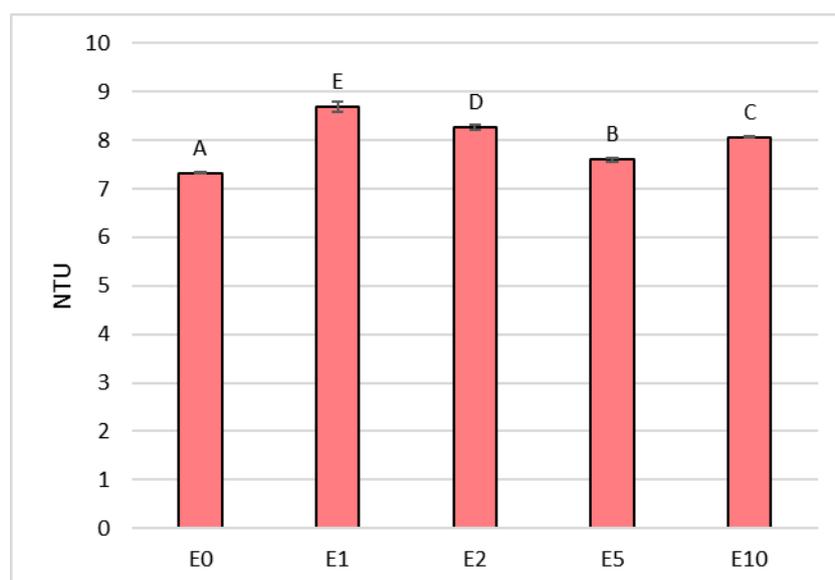


Figura 9. Torbidità del vino Manzoni Moscato dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

La torbidità del campione iniziale era di 7,32 NTU. Nei vini trattati la torbidità aumenta in modo statisticamente significativo, ma non è proporzionale alla durata del trattamento con UV-C quindi la differenza non sembra imputabile al trattamento. Inoltre, la torbidità arriva al massimo a 8,68 NTU, e un simile aumento di torbidità non è da considerarsi inaccettabile per un vino rosato.

3.2.2.3 Temperatura

La temperatura del vino è stata misurata prima e dopo il trattamento con UV-C per determinare la differenza di temperatura e verificare se i raggi ultravioletti sono in grado di riscaldare il vino. La temperatura del vino iniziale era di 10,4 °C. I dati sono riportati nella **Tabella 2**.

Campione	Differenza temperatura
E1	4,3 °C
E2	4,3 °C
E5	5,4 °C
E10	6,4 °C

Tabella 2. Differenza di temperatura del vino Manzoni Moscato dopo 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

Dai dati raccolti si osserva che un trattamento prolungato (10 minuti) aumenta di oltre 6 °C la temperatura del vino. Considerata la temperatura iniziale del vino, anche in questo caso l'incremento è notevole (più del 50%), e potrebbe essere opportuno avvalersi di un sistema di raffreddamento.

3.2.3 Valutazione della riboflavina

L'interesse a contrastare il "gusto di 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.

Per tale motivo, anche nel vino rosato è stata misurata la concentrazione di riboflavina (**Figura 10**), nel vino non trattato e nei vini trattati, per verificare se i raggi UV-C fossero in grado di causarne la fotoriduzione e l'eventuale comparsa di "gusto di luce".

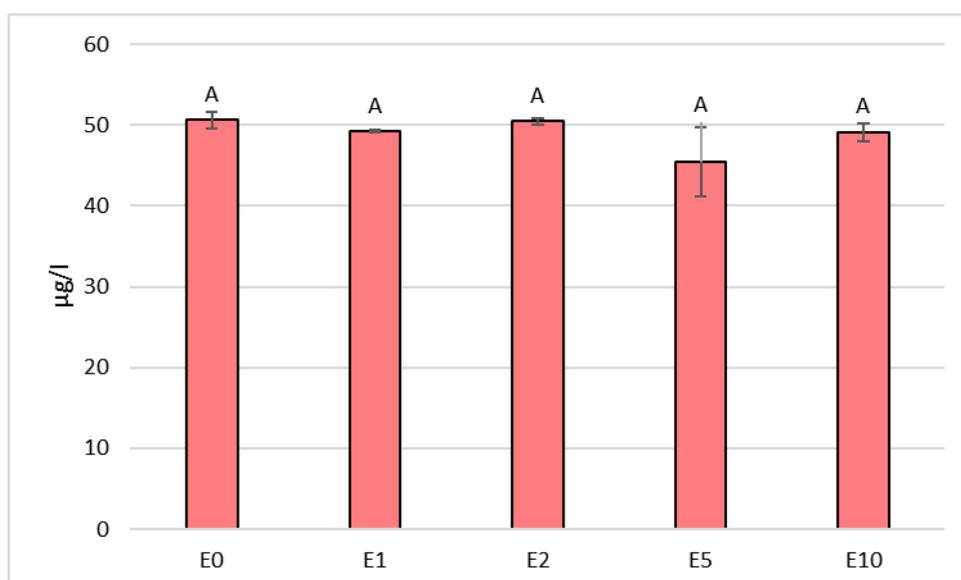


Figura 10. Concentrazione di riboflavina nel vino Manzioni Moscato dopo 0 (E0), 1 (E1), 2 (E2), 5 (E5) e 10 (E10) minuti di trattamento con UV-C.

La concentrazione di riboflavina nel vino non trattato era 50,67 µg/l. La quantità misurata nei vini dopo i diversi tempi di trattamento non risulta significativamente diversa, lasciando supporre che in questi vini non ci sia stata comparsa del “gusto di luce”.

3.3. Analisi sensoriale dei vini

3.3.1 Test triangolare

I campioni sono stati degustati al fine di valutare la comparsa del difetto di luce in seguito al trattamento con UV-C.

Il test utilizzato è il test triangolare, che mira ad individuare eventuali differenze o similitudini percepite tra due campioni mediante un confronto. Questa tecnica richiede al valutatore sensoriale una scelta forzata e viene applicata per prodotti abbastanza omogenei.

Principalmente si adotta questa tecnica per determinare se ci sono somiglianze o differenze tra due campioni. Il test viene eseguito presentando agli assaggiatori contemporaneamente un gruppo di tre campioni, due dei quali uguali, e chiedendo di individuare il campione uguale o differente.

Il test triangolare è stato eseguito per differenza, ovvero al valutatore è stato chiesto di determinare se c'era una differenza percettibile tra tre campioni in analisi. Il panel era composto da 20 giudici addestrati.

Il test è stato utilizzato per confrontare il vino non trattato con il vino trattato per un tempo più lungo (10 minuti).

Con un numero di 20 degustatori e un intervallo di confidenza dello 0,05%, per considerare statisticamente diverso un vino il numero di risposte che possiamo definire corrette (cioè la sommatoria di risposte in cui si è riuscito ad indicare correttamente il vino diverso tra i 3 proposti in una singola combinazione) deve essere almeno di 11. Se inferiore a questa soglia non si può affermare che ci sia una differenza statisticamente significativa tra i due vini confrontati.

Nella **Tabella 3** sono riportati i risultati del test triangolare.

Confronto vini	Risposte corrette
Vino Prosecco	12/20
Vino Manzoni Moscato	8/20

Tabella 3. Risposte corrette registrate per ogni confronto.

Dai risultati riportati nella tabella si evince che la soglia statisticamente significativa di 11 risposte su 20 è stata raggiunta solo nel confronto del vino Prosecco: in questo confronto nel vino trattato con UV-C per 10 minuti è stata percepita una differenza significativa rispetto al vino non trattato. Questa differenza potrebbe dipendere da una fotoriduzione della riboflavina con conseguente comparsa del “gusto di luce”.

3.3.2 Valutazione della riboflavina

Le concentrazioni di riboflavina nei vini degustati sono state determinate per verificare se la differenza percepita al test triangolare nel vino Prosecco fosse dovuta alla sua fotoriduzione. I dati sono riportati nella **Figura 11**.

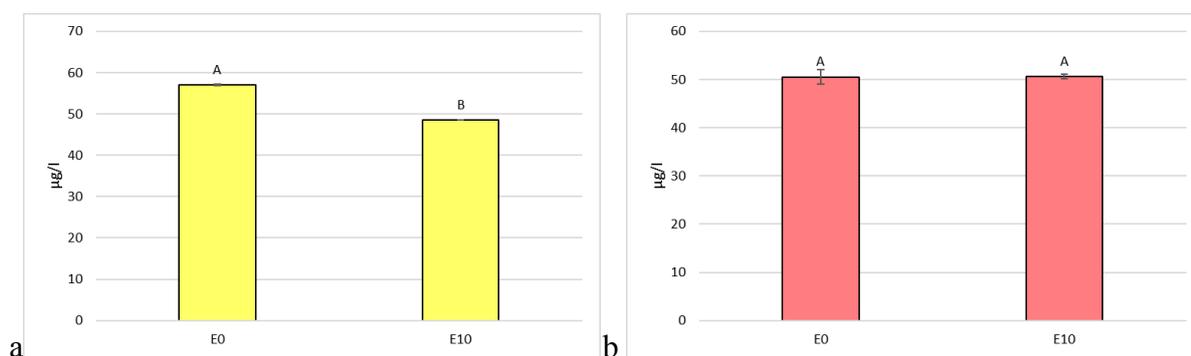


Figura 11. Concentrazione di riboflavina nei vini degustati: a) vino Prosecco b) vino Manzoni Moscato.

La concentrazione di riboflavina nel vino bianco non trattato (**Figura 11 a**) era 57,01 µg/l, mentre nel vino trattato per 10 minuti diminuisce in modo significativo arrivando a 48,53 µg/l. Considerando che anche all'analisi sensoriale questi due vini risultavano significativamente diversi, questo calo potrebbe indicare che nel vino trattato è stato individuato il “gusto di luce”. Nel caso del vino rosato (**Figura 11b**) la concentrazione di riboflavina rimane la stessa (50,55 µg/l nel vino non trattato e 50,65 µg/l nel vino trattato). Questo risultato è in linea con il risultato del test triangolare nel quale i degustatori non hanno individuato differenze statisticamente significative tra i 2 vini.

3.4 Conclusioni

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare l'utilizzo dei raggi ultravioletti per il controllo dei microrganismi nei vini, da utilizzare come alternativa all'anidride solforosa. Infatti negli ultimi anni i consumatori chiedono sempre più insistentemente la riduzione dei solfiti nei vini, anche in conseguenza al fatto alcuni di essi sono sensibili all'anidride solforosa.

Per valutare gli effetti microbiologici ed organolettici dei raggi UV sono state scelte due tipologie di vini: un vino bianco (Prosecco) e un vino rosato (Manzoni Moscato).

Dal punto di vista microbiologico il trattamento con raggi UV, soprattutto per un tempo più prolungato, ha dimostrato una riduzione della carica microbica, e quindi una maggiore stabilità microbiologica, in entrambi i vini. Inoltre il trattamento si è rivelato efficace nel ridurre di quasi un logaritmo sia i batteri che i lieviti presenti nel vino iniziale.

Il trattamento con raggi UV-C non ha modificato il colore e la torbidità dei vini, mentre un trattamento più prolungato ha portato ad un aumento della temperatura del vino che potrebbe essere ovviato applicando un sistema di raffreddamento.

Per quanto riguarda la concentrazione di riboflavina nei vini trattati, nel caso del vino bianco risultava inferiore rispetto al vino non trattato, lasciando supporre che in questo vino potesse essere comparso il “gusto di luce”.

I vini sono stati sottoposti all'analisi sensoriale per verificare se l'esposizione alla luce in presenza di riboflavina (naturalmente presente in entrambi i vini) fosse tale da determinare la comparsa del “gusto di luce”. I dati ottenuti hanno evidenziato che la quantità di energia utilizzata in questi esperimenti ha apportato modifiche statisticamente significative solo nel vino bianco, e questo

dato era supportato dalla diminuzione di riboflavina nel vino trattato, probabilmente a causa della sua fotoriduzione.

Sono necessari ulteriori studi per verificare la reale applicabilità del metodo anche in condizioni reali di cantina. Tra le possibilità da testare vanno sicuramente inclusi il trattamento in flusso continuo di vino, provando a regolare la velocità del flusso ed il tempo di contatto del vino con i raggi UV. Per aumentare la potenza di penetrazione dei raggi UV il sistema potrebbe avere una forma elicoidale anziché lineare, per aumentare il contatto tra la radiazione UV e il vino.

Allo stato attuale l'applicazione di raggi UV per controllare le contaminazioni microbiche dei vini sembra essere incoraggiante nell'ottica della riduzione delle dosi di anidride solforosa.

BIBLIOGRAFIA

Alberto, M. R., Fariás, M. E., Manca de Nadra, M. C. (2001). Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4359–4363.

Bartowsky, E. J., Costello, P. J., Villa, A., Henschke, P. A. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 143–150.

Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 149–156.

Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Research International*, 35, 279–284.

Campos, F. M., Couto, J. A., Hogg, T. A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 167–174.

Cao, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Y., Yi, J., Liao, X. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 877–885.

Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.

Clark A.C., Dias D.A., Smith T.A., Ghiggino K.P., Scollary G.R. (2011). Iron(III) tartrate as a potential precursor of light induced oxidative degradation of white wine: Studies in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3575-3581.

Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25, 422–427.

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., de Jesus, A. L. T., Almeida, F. D. L., de Miranda, M. R. A., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S. (2013). High-intensity ultrasound processing of pineapple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 997–1006.

Daudt, C. E., Ough, C. S. (1980). Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31, 21–23.

Divol, B., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22, 169–178.

Du Toit, M., Pretorius, I. S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons from nature's own arsenal—a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 74–96.

Fredericks, I. N., du Toit, M., Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, 28, 510–517.

Fugelsang, K. C. (1997). *Wine microbiology*. New York, NY: Chapman & Hall.

García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19, 835–841.

García-Ruiz, A., Crespo, J., López-de-Luzuriaga, J. M., Olmos, M. E., Monge, M., Rodríguez-Álvaro, M. P., ... Moreno-Arribas, M. V. (2015). Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control*, 50, 613–619.

Gialleli, A. I., Kallis, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A. A. (2015). Continuous cold pasteurisation of contaminated wine using nano-and micro-tubular cellulose. *Food and bioprocess technology*, 8, 539-547.

Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143–147.

Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F., Medema, G. J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*, 40, 3–22.

Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359–371.

Jeon, S. J., Oh, M., Yeo, W-S., Galvao, K. N., Jeong, K.C. (2014). Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. *PLoS ONE*, 9, e92723.

Lester, M.R. (1995) Sulfite sensitivity: Significance in human health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 14, 229–232.

Liburdi, K., Benucci, I., Esti, M. (2014). Lysozyme in wine: An overview of current and future applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 1062–1073.

Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., Moio, L. (2019). Alternative methods to SO₂ for microbiological stabilization of wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 455-479.

López, I., Santamaría, P., Tenorio, C., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., López, R. (2009). Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 1005–1012.

- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23–50
- Lück, E. (1990). Food applications of sorbic acid and its salts. *Food Additives & Contaminants*, 7, 711–715.
- Malfeito-Ferreira, M. (2011). Yeasts and wine off-flavours: A technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61, 95–102.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531–1551.
- Mok, C., Song, K. T., Park, Y. S., Lim, S., Ruan, R., Chen, P. (2006). High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *Journal of Food Science*, 71, 265–269.
- Pataro, G., Ferrentino, G., Ricciardi, C., Ferrari, G. (2010). Pulsed electric fields assisted microbial inactivation of *S. cerevisiae* cells by high pressure carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 54, 120–128.
- Pichler U. (1996). Analisi della riboflavina nei vini bianchi e influenza della sua concentrazione. *Enotecnico*, 32, 57-62.
- Portillo, M. C., Mas, A. (2022). Microbiological control of wine production: new tools for new challenges. In *Improving Sustainable Viticulture and Winemaking Practices* (pp. 239-258). Academic Press.
- Raafat, D., Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential: A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2, 186–201.

Rêgo, E. S. B., Santos, D. L., Hernández-Macedo, M. L., Padilha, F. F., López, J. A. (2022). Methods for the prevention and control of microbial spoilage and undesirable compounds in wine manufacturing. *Process Biochemistry*.

Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1251–1260.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (2006) *Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications*, vol 1, 2nd edn. Wiley, Chichester

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006) *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments*, vol 2, 2nd edn. Wiley, Chichester

Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control*, 47, 407–412.

Ruiz-Rico, M., García-Ríos, E., Barat, J. M., Guillamón, J. M. (2021). Microbial stabilisation of white wine by filtration through silica microparticles functionalised with natural antimicrobials. *LWT*, 149, 111783.

Sacchi, K.L.; Visón, L.F.; Adams, D.O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 5, 56, 197–205.

Santos M.A., García-Ramírez J.J., Revuelta J.L. (1995). Riboflavin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 270, 437-444.

Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra M.A. (2012) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur Food Res Technol* 234, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6>

Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M., ... Poeta, P. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92, 516–522.

Stivala, M. G., Villecco, M. B., Enriz, D., Fernandez, P. A. (2017). Effect of phenolic compounds on viability of wine spoilage lactic acid bacteria. A structure-activity relationship study. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68, 228–233.

Stratford, M.; Rose, A.H. (1986). Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 132, 1–6.

Tedesco, F., Siesto, G., Pietrafesa, R., Romano, P., Salvia, R., Scieuzo, C., ... Capece, A. (2022). Chemical methods for microbiological control of winemaking: An overview of current and future applications. *Beverages*, 8(3), 58.

Thompson, F. (2003). Ultraviolet light. In L. Trugo & P. M. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 5885–5889). London, UK: Elsevier Science Ltd.

Toepfl, S., Heinz, V., Knorr, D. (2006). Applications of pulsed electric fields technology for the food industry. In *Pulsed electric fields technology for the food industry* (pp. 197–221). Springer, US.

Vally, H., Misso, N. L., Madan V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39, 1643–1651.

Vally, H., Thompson P. (2003). Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addiction Biology*, 8, 3–11.

Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons.

Xia, E.Q.; Deng, G.F.; Guo, Y.J.; Li, H.B. (2010) Biological activities of polyphenols from grape. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 622–646.

Yang, N., Huang, K., Lyu, C., Wang, J. (2016). Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review. *Food Control*, 61, 28–38.

Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 763–769.