



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente DAFNAE

Corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

**Studio dell'evoluzione della riboflavina durante la
rifermentazione con metodo classico**

Relatore
Prof. Simone Vincenzi
Correlatore
Dott. Shuyan Liu

Laureando
Secchi Marco
Matricola n. 2112722

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

“Il Vino è la poesia della Terra

versata in un Calice;

La Beccaccia è la poesia del Bosco

che si libera nel respiro della Foresta”

Indice

Riassunto	1
Abstract	3
1. Introduzione	
1.1. La riboflavina	5
1.2. La riboflavina e il vino	6
1.2.1. La composizione chimica dei mosti	6
1.2.2. La metionina	8
1.2.3. Il gusto di luce	9
1.2.4. Il vino	11
1.2.5. Gli spumanti	12
1.3. Scopo della Ricerca.....	13
2. Materiali e metodi	
2.1. Vino Base	14
2.2. Lieviti utilizzati	14
2.2.1. Preparazione della fermentazione	14
2.2.2. Imbottigliamento.....	15
2.3. Campionamenti	15
2.3.1. Analisi	15
2.3.2. Etanolo	16
2.3.3. Acetaldeide, acido acetico, zuccheri.....	16
2.3.4. Riboflavina	16
3. Risultati e discussione	
3.1. Andamento zuccheri.....	17
3.2. Andamento alcol.....	18
3.3. Andamento acetaldeide	19
3.4. Andamento acido acetico.....	23
3.5. Andamento riboflavina.....	27
4. Conclusione	32
5. Bibliografia	34
6. Sitografia	35

Riassunto

La riboflavina è una vitamina idrosolubile (B2) naturalmente presente nel vino. In enologia, questa vitamina è nota per essere un agente fotosensibile responsabile del "Gusto di Luce". Se esposta a specifiche radiazioni luminose (UV-blu), infatti, la riboflavina innesca reazioni di foto-ossidazione che portano alla formazione di composti solforati maleodoranti, compromettendo il profilo aromatico del vino.

È noto che la fonte principale di riboflavina nel vino è il lievito che la rilascia durante la fermentazione. Ma mentre sono molti gli studi che descrivono l'aumento di riboflavina durante la fermentazione di un vino fermo, non esistono finora molti studi che abbiano valutato il comportamento del lievito nelle condizioni di rifermentazione di un vino spumante.

In particolare, durante la fermentazione di un vino con metodo classico il rilascio di riboflavina potrebbe avvenire sia nella fase di fermentazione vera e propria che nella fase di autolisi del lievito in bottiglia.

Per capire quindi quale può essere l'evoluzione della riboflavina in questa tipologia di prodotto, un vino base è stato rifermentato in bottiglia con 4 diversi lieviti commerciali (2 basso produttori e 2 alto produttori di riboflavina) ed è stata monitorata la concentrazione di riboflavina durante la rifermentazione e durante il processo di sosta sulle fecce prelevando un campione ogni mese per 8 mesi.

I risultati hanno mostrato che durante la fase di rifermentazione la riboflavina non aumenta, probabilmente a causa del ridotto consumo di zuccheri che avviene in questa fase (in genere al massimo 24 g/L) mentre si osserva un aumento graduale della vitamina in soluzione dopo 6-7 mesi, periodo che coincide probabilmente con l'inizio dell'autolisi delle cellule di lievito.

Abstract

Riboflavin is a water-soluble vitamin (B2) naturally present in wine. In winemaking, this vitamin is known to be a photosensitive agent responsible for the "Light struck." When exposed to specific light radiation (UV-blue), riboflavin triggers photooxidation reactions that lead to the formation of malodorous sulphur compounds, compromising the wine's aromatic profile.

It is known that the main source of riboflavin in wine is yeast, which releases it during fermentation. However, while many studies describe increases in riboflavin during the fermentation of still wines, very little studies have evaluated the behaviour of yeast under the conditions of refermentation of sparkling wines.

Specifically, during the fermentation of a classic method wine, riboflavin release could occur both during the fermentation process itself and during yeast autolysis in the bottle.

To understand the evolution of riboflavin in this type of wine, a base wine was refermented in the bottle with four different commercial yeasts (two low- and two high-riboflavin producers). The riboflavin concentration was monitored during refermentation and during the lees aging process, taking a sample every month for eight months.

The results showed that during the refermentation phase riboflavin does not increase, probably due to the reduced sugar consumption that occurs in this phase (generally a maximum of 24 g/L), while a gradual increase in the vitamin in solution is observed after 6-7 months, periods that probably coincide with the beginning of autolysis of the yeast cells.

1. Introduzione

1.1. La Riboflavina

La riboflavina, chiamata anche vitamina B2, è stata isolata parzialmente per la prima volta nel 1879 durante uno studio sulla composizione del latte vaccino eseguita dal chimico inglese A. Wynter Blyth: egli trovò un pigmento di colore giallo brillante, che chiamò lattocromo (Santos de Souza et al., 2005). Questo pigmento ha inoltre la peculiarità di emettere fluorescenza se esposto alla luce.

Il nome di riboflavina venne coniato solamente decenni dopo in seguito al progresso nel campo delle vitamine. All'inizio del '900, infatti, venne scoperta una nuova classe di nutrienti essenziali al fabbisogno umano e, in pochi anni, vennero isolate più di una dozzina di vitamine come sostanze chimiche pure (l'ultima ad essere scoperta è la vitamina B12 nel 1948). Negli anni 30 del 1900 vennero trovati dei pigmenti giallo-verdi simili al lattocromo e uno di questi venne riconosciuto come costituente del complesso vitaminico B. Tra il 1934 ed il 1935, Richard Khun e Paul Karrer verificarono la natura chimica di tali pigmenti, che presentavano tutti il carattere di fluorescenza, per poi scoprire che si trattava di un'unica sostanza, della quale successivamente determinarono la struttura molecolare: la riboflavina. Il nome riboflavina è composto dal suffisso "ribo", indicante il ribitolo, e flavina, dal latino "flavus", giallo: il ribitolo è un alcol polivalente prodotto dalla riduzione del ribosio, le flavine invece sono dei composti organici a base di isoallossazina la quale è una molecola aromatica eterociclica originata dalla pteridina, caratterizzata a sua volta dalla fusione di un anello di pirimidina ed uno di pirazina. La vitamina B2 deve il suo nome al fatto che inizialmente si riteneva che la vitamina B avesse due componenti, una termolabile (B1) ed una termostabile (B2). Successivamente la componente B1 venne identificata come tiamina, mentre si scoprì che la seconda era un complesso di diverse vitamine. Di tale gruppo, la riboflavina è stata la prima ad essere isolata ed ha preso così il nome di Vitamina B2. Si tratta di una vitamina idrosolubile presente in diversi alimenti, tra cui il latte ed i suoi derivati, le uova ed i vegetali, ma si può trovare anche nel fegato animale, nel lievito e nei cereali. L'uomo necessita di assumere questa fonte vitaminica attraverso l'alimentazione, poiché non è capace di sintetizzarla autonomamente (Mauri, , 2006.), mentre i lieviti devono obbligatoriamente produrla in quanto non sono caratterizzati da trasportatori specifici (Moschetti, 2013). Mentre nel mosto i livelli di riboflavina, che sono riconducibili principalmente alla composizione chimica dell'uva, sono piuttosto bassi, questa vitamina è decisamente più abbondante nei vini: è possibile quindi

affermare che la sua presenza, nel prodotto finito, ha natura prevalentemente microbica (Fracassetti, 2021).

1.2. L'origine della riboflavina e i vini

1.2.1. La composizione chimica dei mosti

Le vitamine si trovano in tutte le componenti delle bacche d'uva e in maggior quantità nelle bucce. Il loro ruolo è rilevante nel processo fermentativo dei mosti: esse, infatti, agiscono come fattori di crescita per i lieviti, intervenendo sulla moltiplicazione e le attività cellulari. Il contenuto vitaminico solitamente aumenta con l'approssimarsi della raccolta, tuttavia la presenza di patogeni, come ad esempio gli attacchi fungini, può ridurne la disponibilità (Nicolini, 2018). L'avvicinarsi della vendemmia infatti porta spesso con sé anche un aumento della presenza di vari agenti fungini che possono impattare sul quadro vitaminico delle uve; un esempio classico sono gli effetti depressivi dovuti ad attacchi botritici. Durante la fermentazione alcolica, la componente vitaminica viene rielaborata dai lieviti in maniera diversa in base al comportamento stesso dei lieviti. Alcuni lieviti hanno la capacità di sintetizzare completamente o in parte questi fattori di crescita mentre altri no (Evers, 2021). Ad esempio *S. cerevisiae* non ha una capacità di sintesi vitaminica particolarmente elevata. Per la propria crescita necessita infatti di vitamine che, con diversi sistemi, assorbe dal mezzo: un esempio è la biotina che è l'unica che non è in grado di sintetizzare. Quanto alla tiamina, anche se *Saccharomyces* può sintetizzarla autonomamente, la presenza della stessa nel mezzo favorisce comunque la crescita del lievito (Nicolini, 2018). Le vie di biosintesi delle vitamine sono strettamente correlate al ceppo, ci sono però altre tipologie di lieviti che non sono in grado di fare ciò, e in assenza di questi elementi non possono svilupparsi, è quindi fondamentale la presenza di una sufficiente quantità di vitamine nel mosto. Le vitamine presenti nei mosti sono presenti in diverse quantità in base a diversi fattori, tra cui il grado di maturazione o la tipologia di vitigno (Cappelli e Vannucchi, 2014), è possibile ritrovare quelle del gruppo B (la tiamina, la riboflavina, l'acido pantotenico, la piridossina, la nicotinammide, la biotina, il mesoinositolo, la cobalamina e la colina), l'acido ascorbico (vitamina C) e il beta-carotene (pro-vitamina A). Nel caso specifico, la concentrazione della riboflavina nell'uva non sempre aumenta contemporaneamente alla maturazione del frutto (Nicolini, 2018). Inoltre le quantità riscontrabili nei mosti sono generalmente minori rispetto a quelle presenti nei vini in quanto una notevole quantità viene prodotta e rilasciata dai lieviti durante la fermentazione alcolica

(Ribéreau-Gayon et al., 2017). I lieviti infatti sono noti per contenere un gene, RIB5, che codifica per la formazione dell'enzima riboflavina sintasi, il quale è coinvolto nell'ultima fase della sintesi di riboflavina da parte del lievito (Mislata et al., 2021).

Sempre rimanendo in tema di composizione chimica dell'uva e del mosto, è opportuno discutere brevemente anche il tema delle fonti azotate: infatti, per lo sviluppo del gusto di luce, insieme alla vitamina B2, è importante anche il contenuto dell'amminoacido metionina che è l'accettore finale della reazione di foto ossidazione e il precursore dei composti dall'odore sgradevole (Fracassetti et al., 2021). Il tenore di azoto totale presente nell'uva, che si compone di composti organici ed inorganici, dipende dalla tipologia di varietà coltivata, dalle caratteristiche del portinnesto, dal terreno e dalle pratiche colturali: esso si localizza soprattutto nella buccia degli acini, mentre la polpa ne è relativamente povera (Nicolini et al., 2004). Al momento dell'invasatura è l'azoto organico a prevalere su quello inorganico, in quanto quest'ultimo si riduce in modo rapido, perché utilizzato nell'elaborazione di sostanze complesse. I lieviti utilizzano prevalentemente aminoacidi, peptidi, ioni ammonio (NH_4^+), urea e nitrati. Le prime tre fonti di azoto appena citate sono quelle che sono normalmente presenti nei mosti: il tenore ammoniacale costituisce normalmente 1/3 dell'azoto prontamente assimilabile (APA), mentre i restanti 2/3 sono caratterizzati dalla quota amminoacidica (Margheri, 1986). Diversamente, l'urea non è solitamente presente nei mosti e la sua aggiunta non è permessa nei paesi dell'Unione Europea; i nitrati invece possono essere assimilati solo da pochissime specie enologiche, tra di esse però non troviamo *S. cerevisiae*.

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

Ordine di assorbimento degli aminoacidi da parte dei lieviti (Zambonelli, 2003)

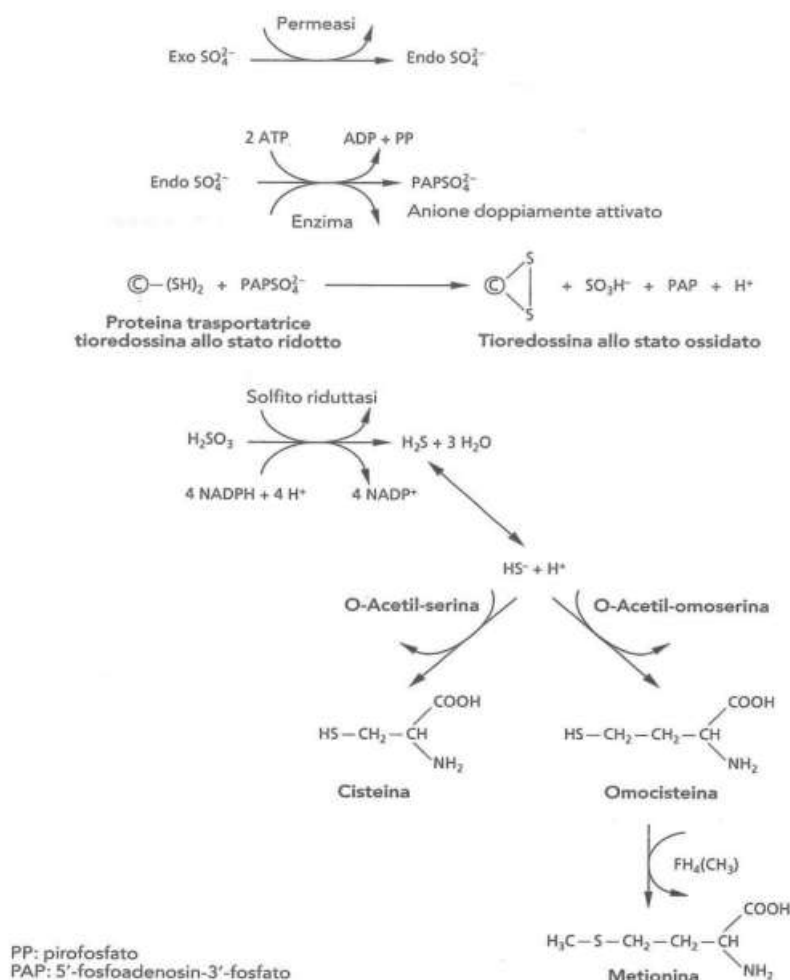
Gli aminoacidi vengono assorbiti con diversa velocità dal lievito. Sulla base di questa evidenza gli aminoacidi sono stati suddivisi in diversi gruppi (A, B, C e D). Nel Gruppo A sono presenti gli aminoacidi che vengono assimilati e metabolizzati rapidamente: arginina, asparagina, aspartato, glutammato, glutammina, lisina, serina e treonina. Del gruppo B fanno parte gli

amminoacidi che hanno una assimilazione più lenta: istidina, isoleucina, leucina, metionina e valina. Nel gruppo C sono presenti gli amminoacidi che vengono assorbiti solo dopo la completa assimilazione del gruppo A: alanina, glicina, fenilalanina, tirosina; triptofano e ammoniaca. Nel gruppo D è presente solo la prolina, poiché non contiene gruppi amminici liberi, non può subire la transaminazione (Lodolo et al., 2008).

Gli aminoacidi vengono quindi assimilati dai lieviti e successivamente per effetto delle trasformazioni metaboliche partecipano alla formazione di composti secondari alla fermentazione.

1.2.2. La metionina

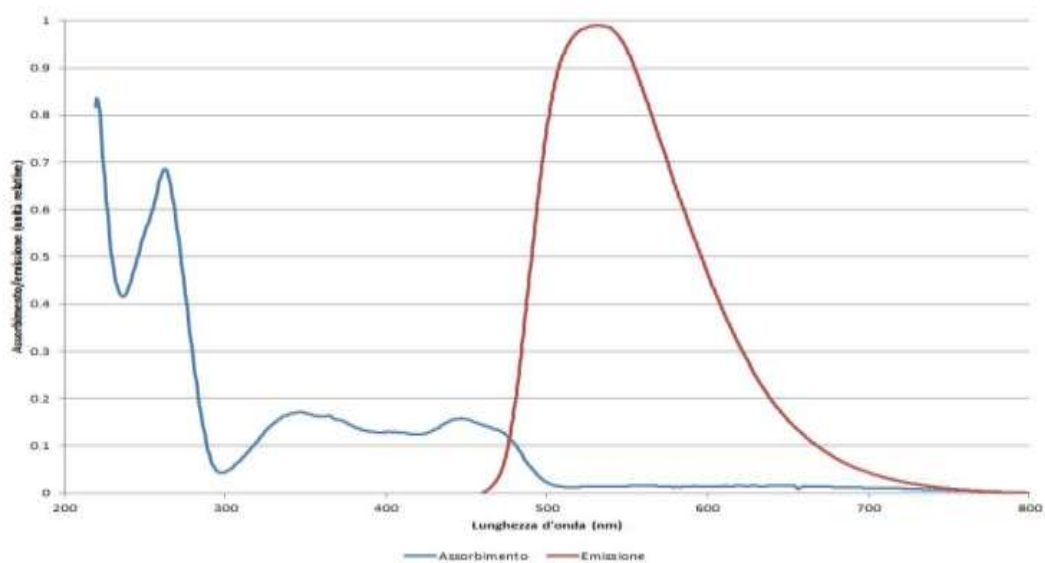
La metionina deriva dall'aspartato, il quale a sua volta proviene dall'ossalacetato. Quest'ultimo è sintetizzato a livello mitocondriale, grazie alla carbossilazione del piruvato, prodotto dalla glicolisi: questa operazione è eseguita dall'enzima piruvato carbossilasi. Per la produzione della metionina è necessario lo ione solfuro che viene generalmente messo a disposizione dai lieviti, i quali sintetizzano una quota di anidride solforosa. I lieviti possono utilizzare lo ione solfato (SO_4^{2-}), portandolo all'interno delle loro cellule grazie alla solfato permeasi; attraverso quindi una serie di reazioni chimiche e l'utilizzo di ATP, viene prodotto lo ione bisolfito (HSO_3^-) il quale, attraverso l'azione dell'enzima solfuro reduttasi, viene trasformato in ione solfuro (S^{2-}): si tratta di una reazione di riduzione molto potente che non potrebbe mai avvenire se il potenziale redox della cellula e del vino non fosse sbilanciato, con un eccesso di NADH. Lo ione solfuro può quindi essere incorporato per la sintesi di cisteina e metionina, come si può vedere dalla figura successiva. In presenza di un eccesso di questo ione, le cellule di lievito possono produrre idrogeno solforato, un composto caratterizzato dal fastidioso odore di uova marce. Senza la necessità di trasportatori, esso viene rilasciato nel vino dove reagisce principalmente con l'etanolo e gli alcoli superiori, dando origine a mercaptani, i quali possono produrre composti più complessi, ossia acidi esteri tioacetici, o disolfuri, responsabili del gusto luce (Andr'es-Lacueva, (1998)) (Maujean, (1978)).



Riduzione dei solfati, con produzione di diossido di zolfo, d'idrogeno solforato e di aminoacidi solforati (Ribéreau-Gayon, 2018)

1.2.3. Il gusto di luce

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



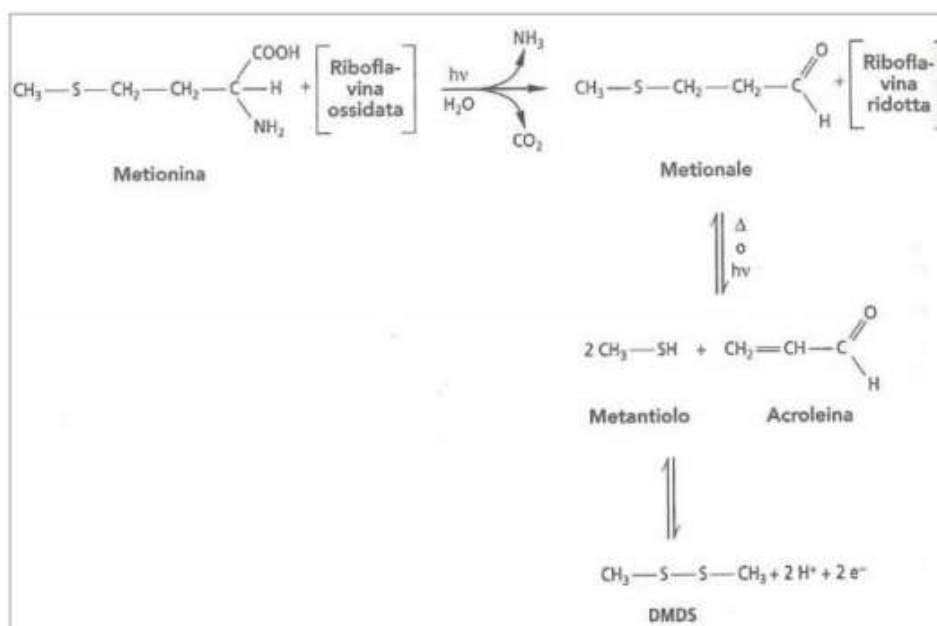
(Bottega, 2022)-Spettro di assorbanza e fluorescenza della riboflavina-

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

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

Nel primo caso, la vitamina B2 può rilasciare energia sottoforma di fluorescenza a circa 530 nm, come si può notare dalla figura. Questa proprietà è solitamente sfruttata per la rilevazione in HPLC o con metodi spettrofotometrici. La riboflavina è inoltre capace di reagire, in qualità di composto ossidante, con la metionina, subendo una fotoriduzione: l'aminoacido solforato dona due elettroni, ossidandosi a metionale, il quale è una molecola a sua volta fotolabile estremamente instabile alla luce, che si scinde in metantiolo (MeSH) ed acroleina. Quest'ultima viene anche chiamata propenale, ed è associata al caratteristico odore del grasso bruciato; in enologia deriva anche dalla degradazione della glicerina, operata dai batteri lattici. Il metantiolo o metilmercaptano, invece, ha un odore molto forte, sgradevole, pungente, di uova marce e cavolo cotto, esso presenta una soglia di percezione molto bassa, 0.3-3 µg/l (Bianco). La reazione di due molecole di questa sostanza porta alla formazione del dimetil disolfuro (DMDS), un composto meno volatile, ma con una soglia di percezione altrettanto bassa,

mediamente 30 µg/l (Fracassetti D. D.). Esso è responsabile della comparsa di puzze riconducibili alla cipolla, all'aglio, al cavolfiore cotto. Generalmente, nei vini, il rapporto stechiometrico RF:Met è superiore all'unità, raggiungendo anche il valore di 1:20; la metionina, quindi, svolge un ruolo rilevante nella comparsa del gusto di luce. A tale proposito però, è stato dimostrato che una concentrazione di vitamina B2 inferiore a 100 µg/l può ridurre il rischio di un'eventuale alterazione nei vini (Mislata, 2021).



Sequenza delle reazioni chimiche implicate nella comparsa del gusto di luce (Ribéreau-Gayon, 2018)

1.2.4. Vino

Il vino è una bevanda di natura idroalcolica, ottenuta dalla fermentazione degli zuccheri del mosto; presenta un pH acido ed una composizione chimica molto elaborata. Alle caratteristiche del prodotto finito concorrono non solo le condizioni dell'uva raccolta, ma anche le tecniche di vinificazione attuate, per non parlare delle cure prestate durante l'affinamento dei vini stessi. La tabella mette alla luce le differenze quantitative relative alla presenza di vitamina B2 nei vini bianchi, rosati e rossi.

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

Quantità di riboflavina nei vini (Nardiello, 2003)

Nei mosti sono presenti circa 3-60 µg/l di riboflavina. Queste concentrazioni aumentano durante la fermentazione alcolica. È facile notare come, nella vinificazione in rosso delle uve, le quantità siano maggiormente elevate: la spiegazione potrebbe essere semplicemente la macerazione a cui sono sottoposti gli acini, che comporta il rilascio di sostanze presenti nelle bucce, tra le quali le vitamine stesse.

1.2.5. Spumanti e la riboflavina

Gli spumanti sono vini speciali caratterizzati dalla presenza di anidride carbonica, che genera le tipiche e affascinanti bollicine (il perlage). Si dividono principalmente in due metodi di produzione: il Metodo Classico, con rifermentazione in bottiglia come per il Franciacorta, e il Metodo Martinotti (o Charmat), con rifermentazione in autoclave, tipico del Prosecco. La scala del gusto varia da Pas Dosé (secchissimo) fino a Dolce, rendendoli incredibilmente versatili a tavola. Non sono solo sinonimo di festa e brindisi, ma anche perfetti compagni per l'intero pasto, dall'antipasto al dessert. In Italia vantiamo un'eccellenza mondiale in questo settore, grazie a una biodiversità vinicola unica che regala sfumature inimitabili.

Per quanto riguarda la quantità e il comportamento della riboflavina negli spumanti le informazioni che abbiamo sono molto poche, un recente studio afferma che la riboflavina all'interno dell'vino non aumenti fino al terzo mese, ma addirittura abbia una diminuzione della stessa all'interno del liquido, successivamente già dal sesto mese in poi si assiste ad un inversione con un aumento progressivo della vitamina B2 che risulterà essere sempre maggiore rispetto al vino base di partenza (Fracassetti et al., 2023).

1.3. Scopo della ricerca

Data la diffusione sempre maggiore di bottiglie in vetro trasparente anche per la produzione di vino, anche grazie all'aumento del consumo di vini rosati, l'incidenza del difetto di gusto di luce sta aumentando. Un sondaggio fatto nel 2020 a livello nazionale su 231 aziende vinicole ha mostrato che il difetto di gusto di luce è stato registrato 1011 volte con una media di 4.4 volte per azienda e ha determinato la decisione di ritiro del vino dal mercato nel 6.5% delle aziende coinvolte (Fracassetti et al. 2021).

I vini più soggetti a questa tipologia di problema sono i vini bianchi, rosati e spumanti perché hanno meno tannini che possono proteggere dal fenomeno dell'ossidazione rispetto ai vini rossi. Inoltre, gli spumanti subiscono due fermentazioni per cui è probabile che il contenuto di riboflavina possa risultare maggiore in questa tipologia di prodotti. Nonostante questo, non esistono attualmente molte ricerche che abbiano studiato l'evoluzione della riboflavina nei vini spumanti (sia con metodo Martinotti che metodo Classico).

Con il presente elaborato, si è voluto approfondire il comportamento di 4 diversi ceppi di lievito durante la rifermentazione in bottiglia monitorando tutta la cinetica di fermentazione e le successive fasi di sosta sui lieviti per una durata di circa 8 mesi.

2. Materiale e metodi

2.1. Vino base

Per la sperimentazione è stato utilizzato un vino base ottenuto dalla fermentazione di mosto di uve varietà Glera con il lievito selezionato DV-10 (Lallemand). I dati analitici del vino base sono riportati nella tabella seguente.

Etanolo %	Acidità titolabile (g/L)	pH	APA (mg/L)
8.95	6.1	3.38	23.5

2.2. Lieviti utilizzati

Per la seconda fermentazione sono stati utilizzati 4 ceppi commerciali di lievito selezionati in base alla loro capacità di sintetizzare riboflavina durante la fermentazione alcolica (sulla base di dati raccolti in una tesi precedente).

- due ceppi di lievito alto produttori che chiameremo Lievito A e Lievito B
- due ceppi di lievito basso produttori che chiameremo Lievito C e Lievito D

2.2.1. Preparazione della fermentazione

Tutti i lieviti sono stati preparati con lo stesso protocollo di acclimatazione all'alcol. I lieviti sono stati preparati per un utilizzo a 20 g/hL.

La preparazione del piede per l'inoculo di 20 litri di base è stata la seguente:

- 4g di lievito + 4 g di attivante di reidratazione Team Active 1 (Vason) sono stati sciolti in 50 ml di acqua e tenuti a 37°C per 30 minuti
- Aggiunta di 80 ml di vino base, 80 ml di acqua, 20 g di zucchero e 0.4 g di nutrimento azotato (Team Active 2, Vason). Incubazione a 24°C per 4 ore
- Aggiunta di 600 ml di vino base, 200 ml di acqua, 50 g di zucchero e 0.4 g di nutrimento azotato (Team Active 2, Vason). Incubazione a 20°C per una notte.

Il lievito così preparato è stato aggiunto ai 20 litri di vino base insieme a 10 g/hL di Team Active 2, 20 g/hL di lisozima per inibire una eventuale fermentazione malolattica e 24 g/L di zucchero per arrivare a 6 atmosfere di pressione.

2.2.2. Imbottigliamento

Per ogni lievito sono state preparate 45 bottiglie da 375 ml che sono state tappate con tappo a corona. Su una bottiglia per ciascun lievito è stato applicato un afometro che permette di misurare l'andamento della pressione durante la fermentazione.

Tutte le bottiglie sono state posizionate in posizione orizzontale in una cella condizionata alla temperatura di 18°C.

2.3. Campionamenti

I campionamenti (tre bottiglie per ogni lievito) sono stati eseguiti a:

- 1 settimana
- 2 settimane
- 4 settimane
- 2 mesi
- 3 mesi
- 4 mesi
- 5 mesi
- 6 mesi
- 7 mesi
- 8 mesi

2.3.1. Analisi

Ad ogni campionamento le bottiglie sono state stappate e sottoposte ad analisi chimiche.

2.3.2. Etanolo

L'etanolo è stato misurato secondo il metodo ufficiale OIV (OIV-MA-AS312-01) basato su distillazione e misura densimetrica del distillato.

2.3.3. Acetaldeide, Acido acetico, zuccheri

Questi parametri sono stati misurati mediante analizzatore enzimatico I-Magic M9 (R-Biopharm) utilizzando i kit specifici forniti dall'azienda. Per l'analisi degli zuccheri è stato utilizzato un kit enzimatico in grado di misurare contemporaneamente glucosio, fruttosio e saccarosio.

2.3.4. Riboflavina

La riboflavina contenuta nei campioni è stata quantificata tramite HPLC a fase inversa. Il sistema è composto da un HPLC Shimadzu Nexera XR, equipaggiato con fluorimetro RF-20AC e caratterizzato da pompe LC-20AD ed autocampionatore SIL20AC. 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 ammonio formiato 20 mM portato a pH 4.5 con acido formico (A) e acetonitrile (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.

3. Risultati e discussione

Il cuore di questo lavoro sperimentale è stato il monitoraggio periodico della cinetica di rifermentazione, con un focus specifico sull'evoluzione della riboflavina. Attraverso le analisi periodiche eseguite durante la presa di spuma, abbiamo voluto mappare precisamente quando e in che misura questa vitamina viene sintetizzata o rilasciata nel mezzo e soprattutto abbiamo voluto monitorare come i 4 ceppi di lievito diversi si comportassero in relazione ad essa.

3.1. Andamento zuccheri

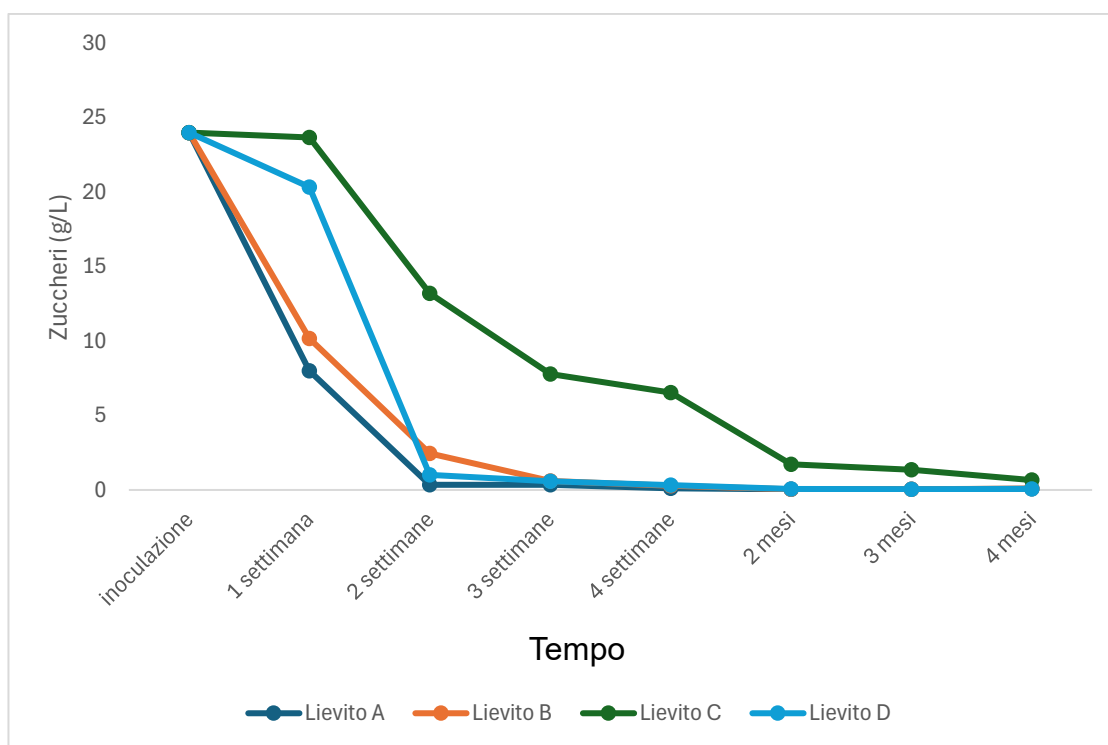


Figura 1. Andamento del consumo degli zuccheri durante la rifermentazione condotta dai 4 ceppi di lievito

Durante le varie analisi è stato subito evidente notare quali fossero i lieviti con cinetiche di fermentazione più rapide e quali invece avessero un andamento più prolungato nel tempo. Possiamo notare bene questa differenza in Figura 1.

È stato riscontrato che il lievito C ha mostrato una maggiore latenza e una iniziale difficoltà nell'avviare la presa di spuma. Questo comportamento, tuttavia, conferma le indicazioni fornite dalla stessa casa produttrice, la quale segnala una limitata vigoria del ceppo se utilizzato in purezza per la rifermentazione, consigliandone l'inoculo in combinazione con un secondo ceppo più vigoroso.

3.2. Andamento alcol

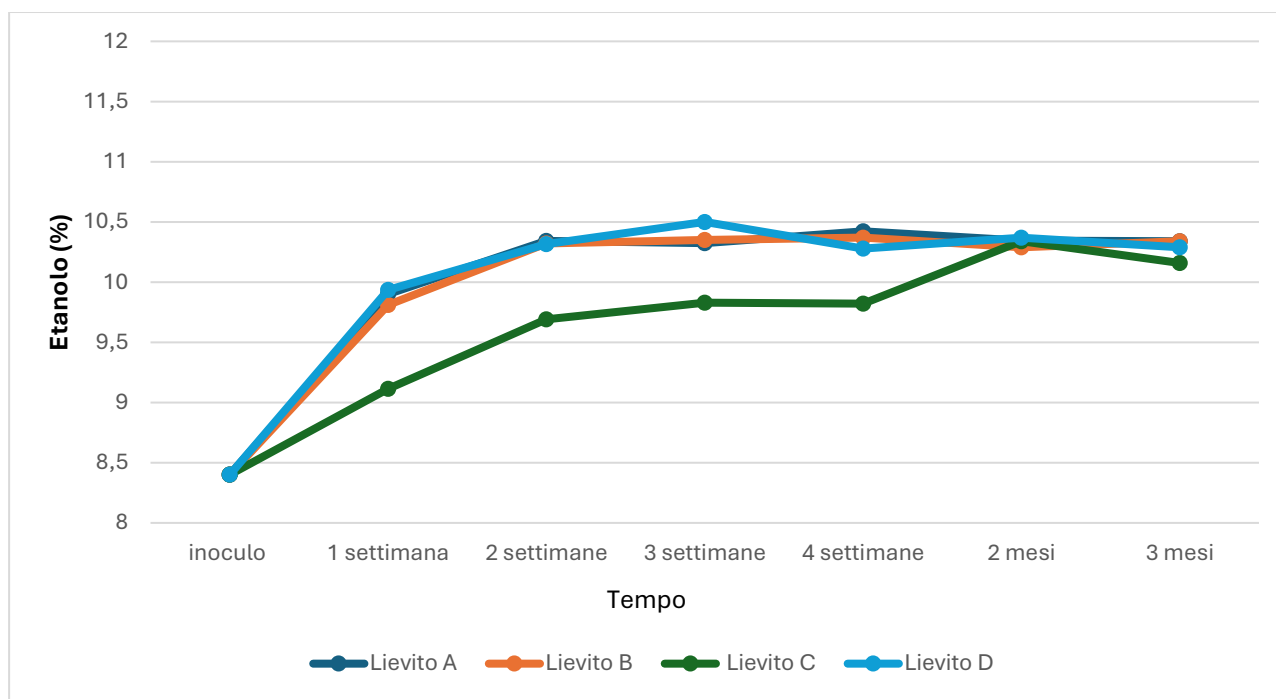
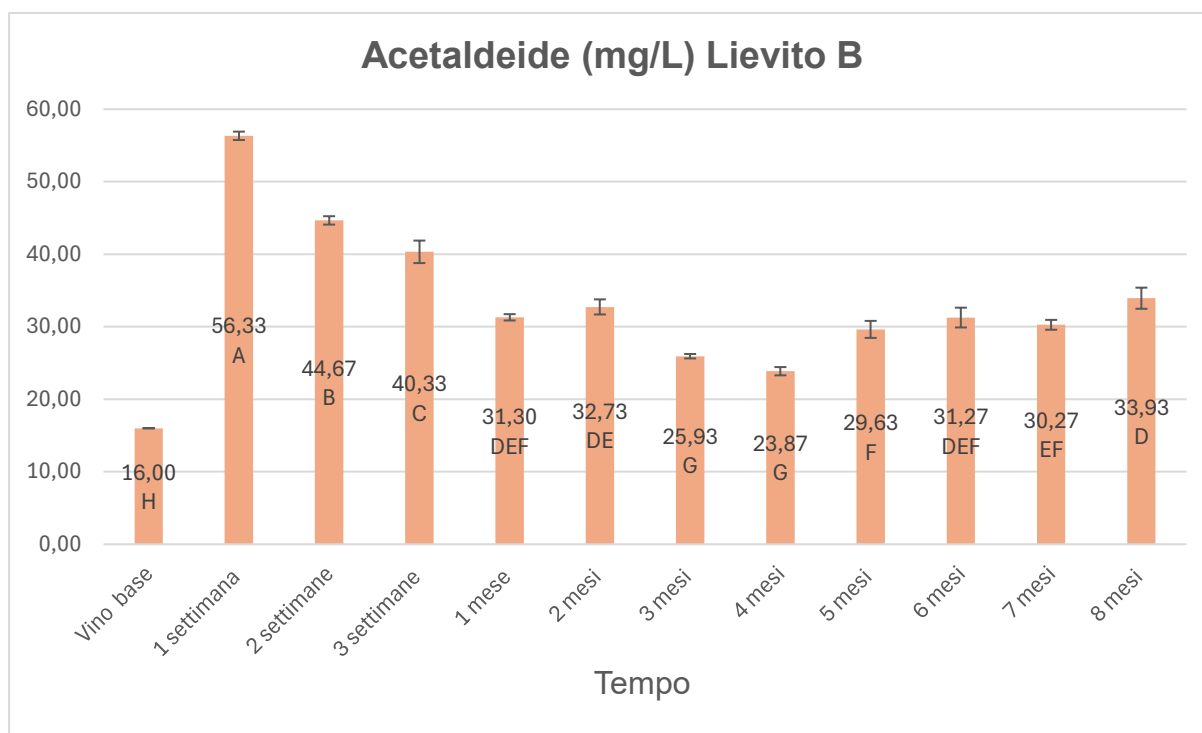
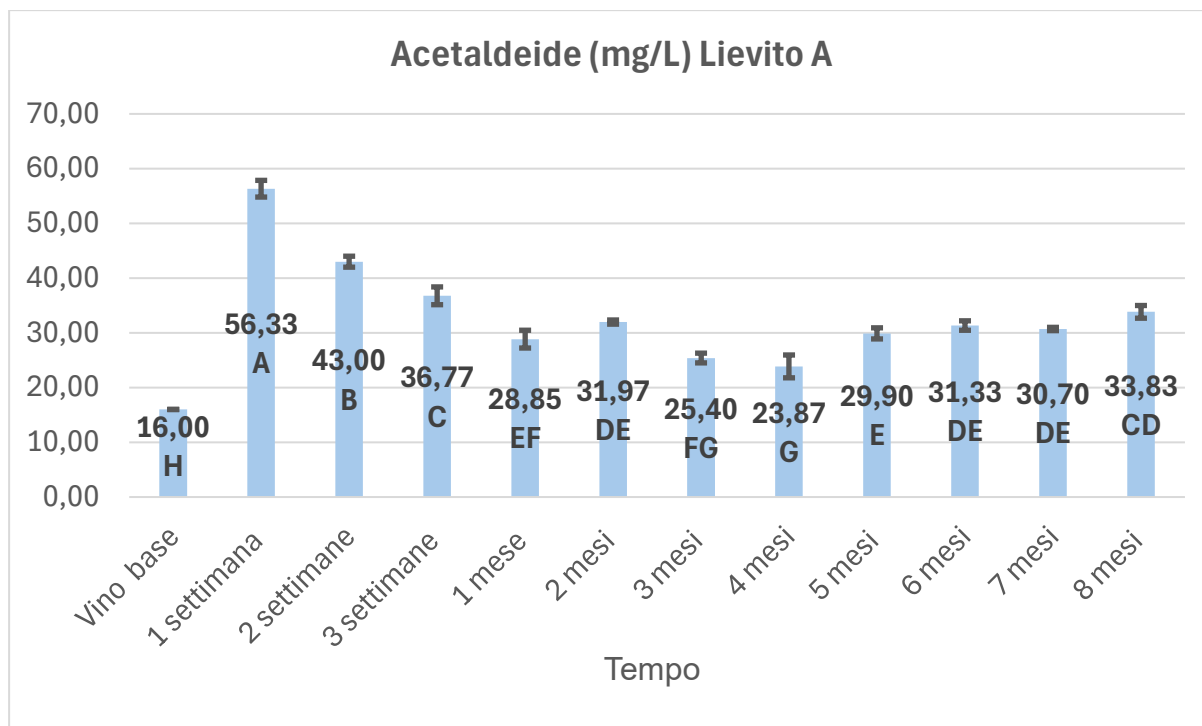


Figura 2. Andamento della produzione di etanolo durante la rifermentazione condotta dai 4 ceppi di lievito.

Anche per quanto riguarda la produzione di etanolo (Figura 2) è stato confermato che il ceppo C ha avuto una cinetica di rifermentazione più lenta, pur arrivando a produrre la stessa quantità di etanolo degli altri ceppi.

3.3. Andamento acetaldeide



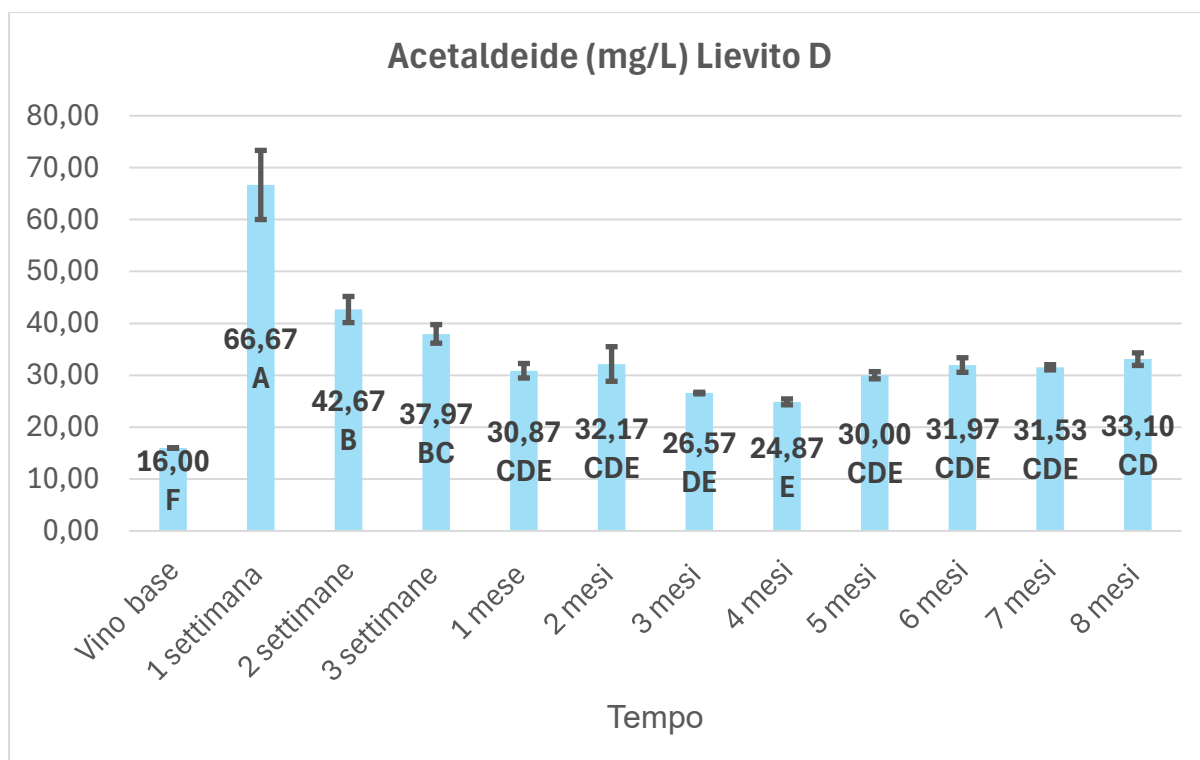
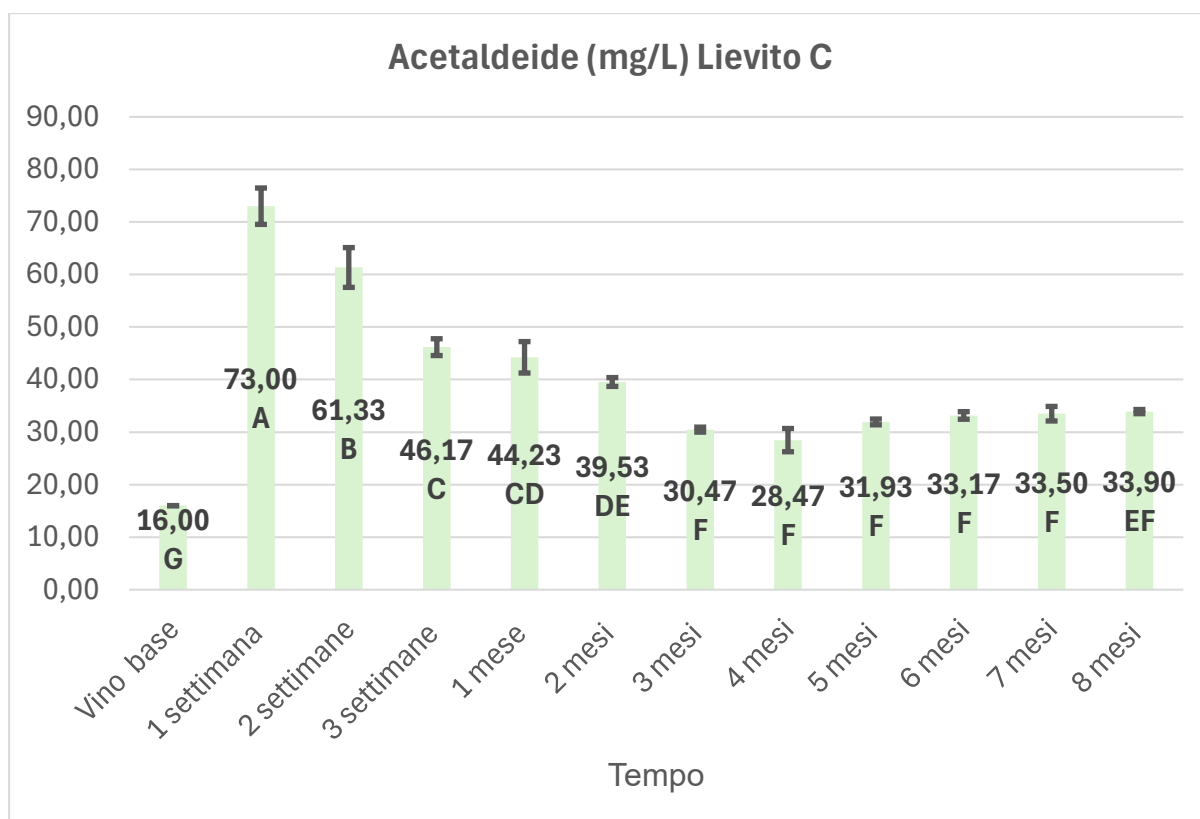


Figura 3 (A-D). Andamento della produzione di acetaldeide durante la rifermentazione nei diversi ceppi di lievito. Lettere diverse indicano la presenza di differenze statisticamente significative ($p < 0.05$).

L'andamento cinetico dell'acetaldeide nel corso della rifermentazione mostra un profilo caratteristico (Figura 3), contraddistinto da un incremento iniziale, seguito da un progressivo decremento in concomitanza con la fase finale del processo, fino al raggiungimento di un plateau di stabilità nel tempo. Questa evoluzione quantitativa è strettamente legata allo stato fisiologico del lievito e alla regolazione del suo corredo enzimatico in risposta alle condizioni ambientali.

Questo processo come spiegato da (Ribéreau-Gayon P. D.-F., 2017) è determinato dall'introduzione del piede di avviamento che comporta un'attivazione repentina della via glicolitica. Il piruvato ottenuto dalla glicolisi viene decarbossilato a opera dell'enzima piruvato decarbossilasi (PDC), portando alla formazione di acetaldeide.

In questo stadio iniziale, la velocità della glicolisi supera la capacità metabolica della cellula di completare la riduzione dell'acetaldeide ad etanolo. Questo fenomeno avviene poiché l'enzima chiave dell'ultimo step riduttivo, l'alcol deidrogenasi (ADH), non è ancora espresso in quantità sufficienti o non ha raggiunto la massima efficienza catalitica nell'ambiente idroalcolico. Di conseguenza, l'acetaldeide si accumula intracellularmente per poi essere rilasciata nel mezzo extracellulare per diffusione, determinando il picco di concentrazione riscontrato analiticamente.

Verso la fine della rifermentazione, con il progressivo esaurimento degli zuccheri fermentescibili, l'attività metabolica del lievito subisce una rimodulazione. Per mantenere il bilancio redox cellulare, nello specifico per rigenerare il pool di NAD^+ fondamentale per il sostentamento della glicolisi stessa, la cellula attiva stabilmente i meccanismi di riduzione.

Il lievito procede quindi al riassorbimento dell'acetaldeide precedentemente rilasciata nel mezzo, utilizzandola come accettore finale di elettroni. L'enzima alcol deidrogenasi riduce l'acetaldeide a etanolo, ossidando il NADH a NAD^+ . Questo consumo metabolico attivo da parte della biomassa spiega la netta flessione della curva di concentrazione dell'analita verso la fine del processo fermentativo.

Dopo che la cinetica fermentativa si azzera a causa del completo esaurimento degli zuccheri, la concentrazione di acetaldeide si stabilizza e rimarrà costante nel tempo poiché non ci sono metabolismi attivi.

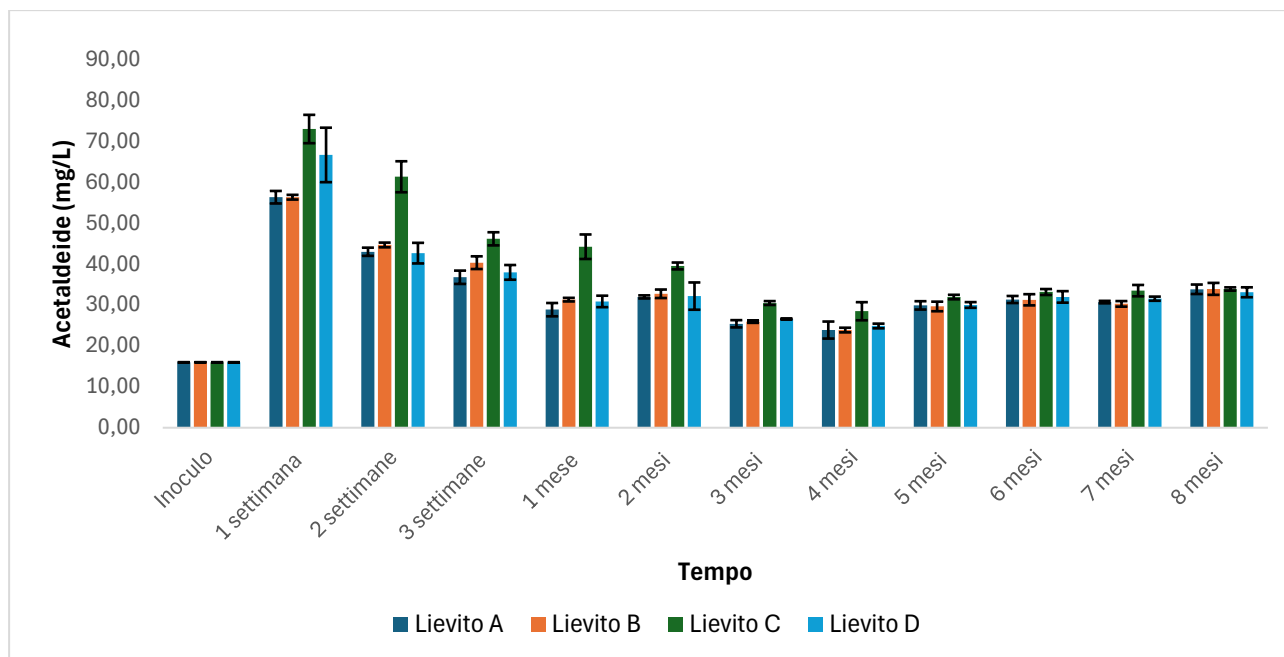
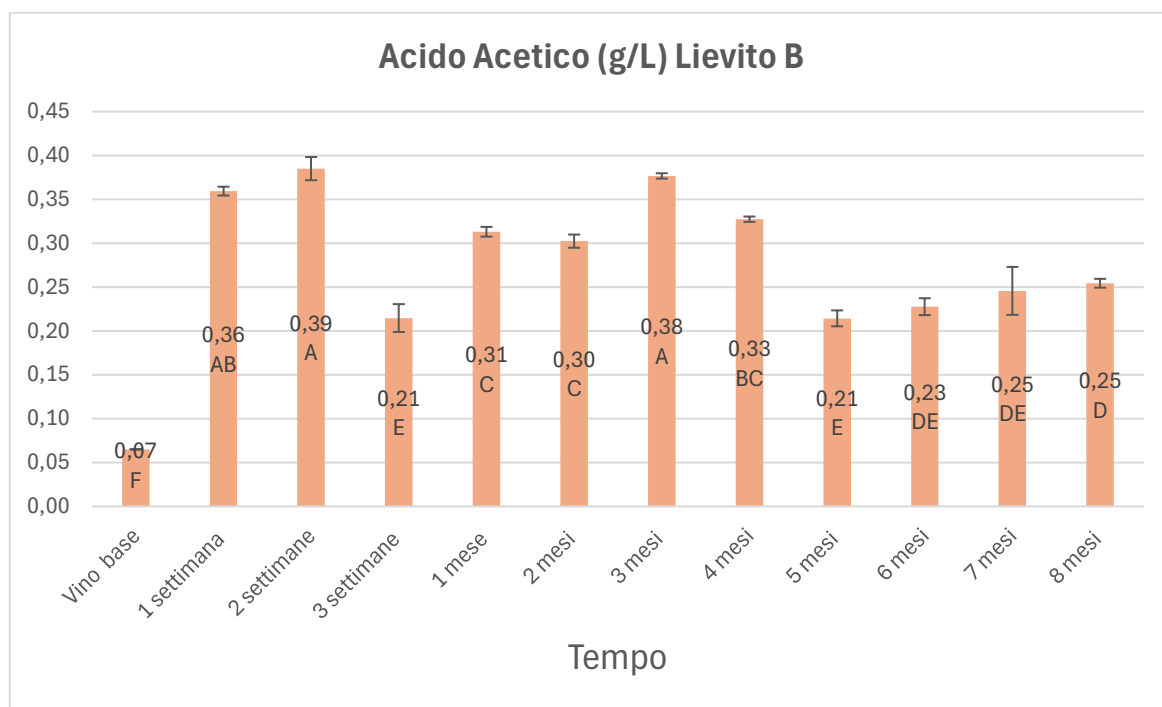
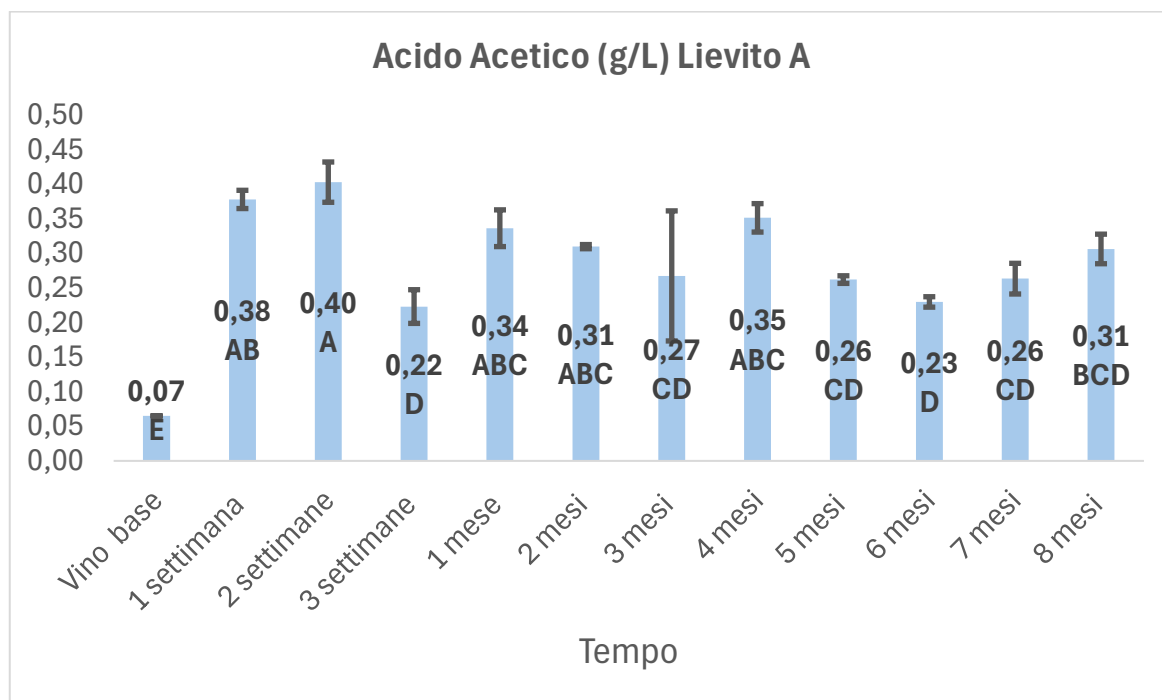


Figura 4. Confronto dell'andamento della produzione di acetaldeide durante la rifermentazione condotta dai 4 ceppi di lievito.

Facendo una comparazione tra i diversi ceppi (Figura 4) si possono notare delle differenze. In particolare, è evidente che i ceppi 3 e 4 producono una maggiore quantità di acetaldeide iniziale: considerando il basso numero di ceppi testati non possiamo però stabilire se questo parametro sia collegato al carattere di minore produzione di riboflavina (vedi Materiali e Metodi) o se sia semplicemente una coincidenza. Tra questi, il ceppo 3 è anche quello più lento a riassorbire l'acetaldeide, e molto probabilmente questo fenomeno è legato alla maggiore lentezza nella rifermentazione.

In ogni caso dopo 5 mesi tutti i lieviti si attestano su un contenuto simile di acetaldeide. Queste osservazioni potrebbero però essere utili nel caso in cui questi ceppi di lievito venissero utilizzati per una rifermentazione con Metodo Martinotti in cui i tempi di elaborazione sono più rapidi (circa 1 mese).

3.4. Andamento acido acetico



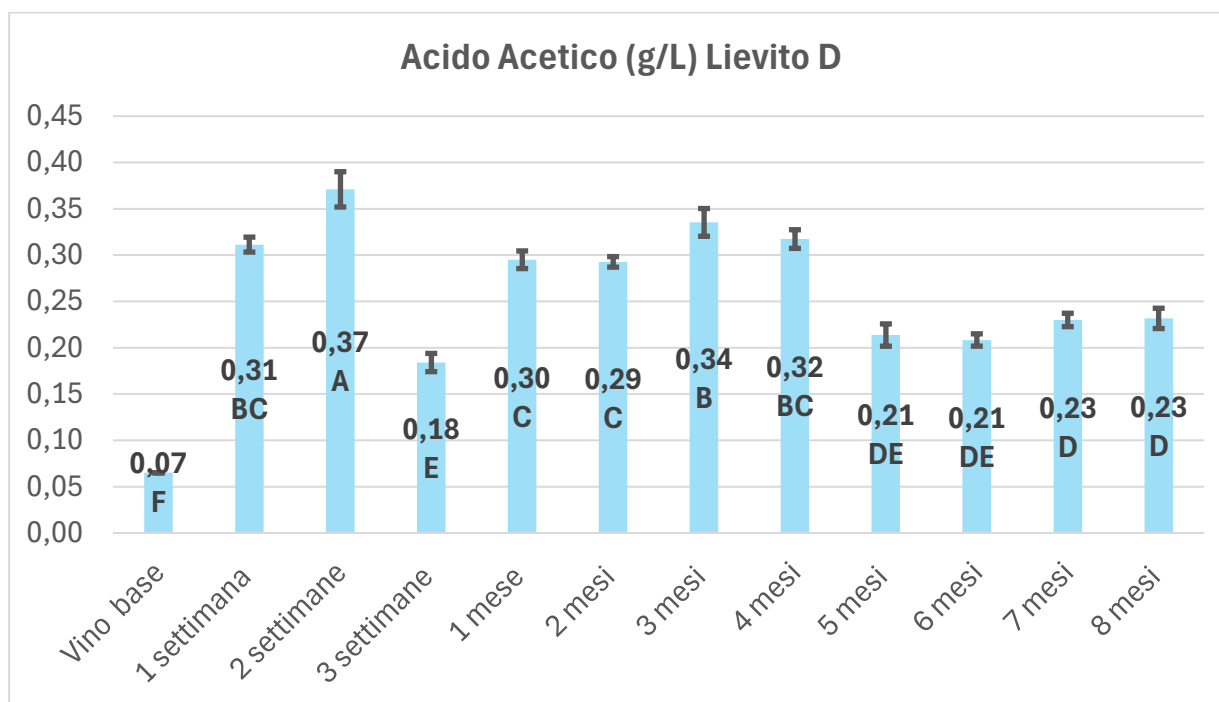
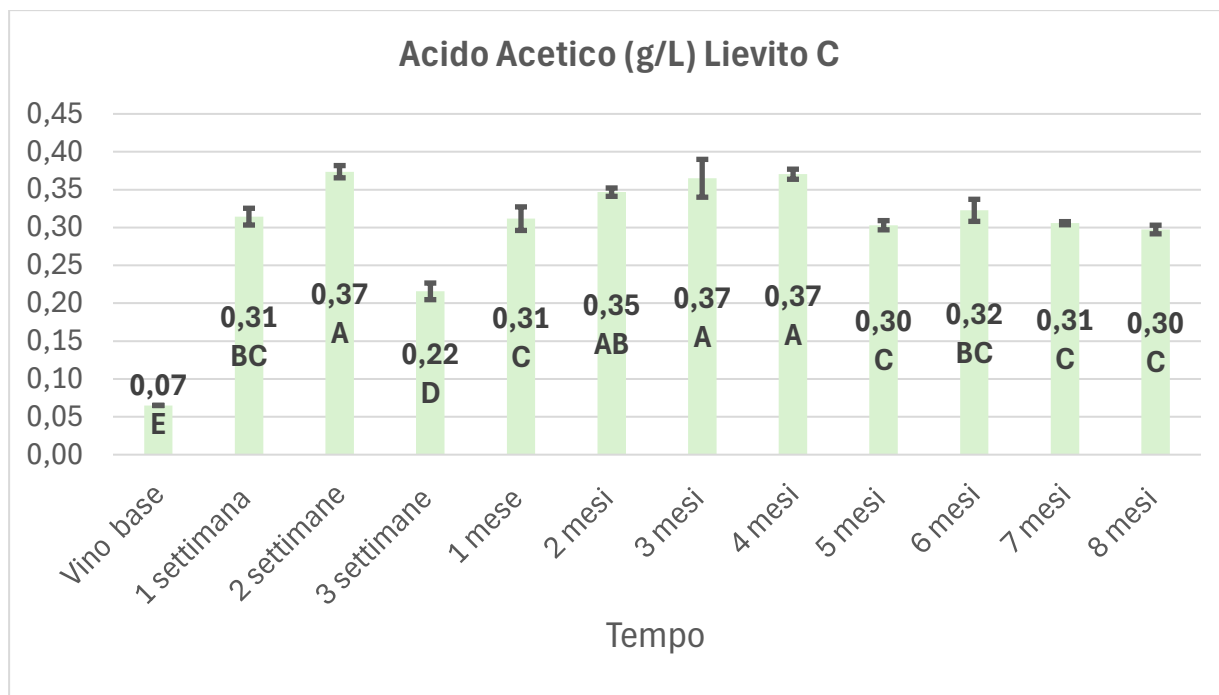


Figura 5 (A-D). Andamento della produzione di acido acetico durante la rifermentazione nei diversi ceppi di lievito. Lettere diverse indicano la presenza di differenze statisticamente significative ($p < 0.05$).

Subito dopo l'inoculo, le cellule di lievito si trovano in un mezzo chimicamente ostile, caratterizzato da una concentrazione di etanolo elevata. Per rispondere a questo stress il lievito attiva una risposta metabolica protettiva.

A livello del citoplasma, l'enzima aldeide deidrogenasi NADP⁺ dipendente ossida l'acetaldeide ad acido acetico. Questa reazione è fondamentale per generare NADPH. Il NADPH è il cofattore riducente essenziale per le vie biosintetiche della cellula e per i sistemi di difesa antiossidante necessari al lievito per avviare la replicazione in un ambiente difficile. Questa iniziale attività biosintetica giustifica il primo incremento riscontrato nella curva dell'acidità volatile (Bely, 2003) (Figura 5).

Man mano che la rifermentazione procede e le cellule si adattano all'ambiente, l'acido acetico libero nel mezzo subisce una riduzione in quanto viene parzialmente riassorbito dal lievito stesso. La cellula, per sopravvivere alla tossicità dell'etanolo e all'aumento della pressione, deve rimodulare la fluidità della propria membrana plasmatica incrementando la sintesi di acidi grassi insaturi e steroli.

Per fare ciò, l'acido acetico intracellulare viene attivato ad Acetil-CoA ad opera dell'enzima acetil-CoA sintetasi (ACS), con consumo di ATP. L'Acetil-CoA così formato funge da mattone da costruzione per la sintesi dei lipidi di membrana. Questo consumo metabolico attivo agisce da sink (pozzo di assorbimento), sottraendo acido acetico al sistema e determinando la prima discesa dei livelli analitici (Ribéreau-Gayon P. D.-F., 2017) (Figura 5).

Inoltre, l'accumulo di acido acetico all'interno della cellula può abbassare il pH intracellulare, inducendo stress da acidificazione e compromettendo la vitalità del lievito. Per difendersi da questo fenomeno, *Saccharomyces cerevisiae* attiva una via di detossificazione accoppiando l'acido acetico all'etanolo presente in abbondanza nel mezzo. Questo processo di esterificazione enzimatica è mediato dall'alcol acetiltrasferasi (ATF1 e ATF2) e porta alla sintesi di acetato di etile, un estere volatile dal tipico sentore di solvente. L'intensità di questa reazione varia in base alla disponibilità di azoto assimilabile e all'espressione genica cellulare nelle diverse sotto fasi della fermentazione, provocando ulteriori cali temporanei nella concentrazione di acido acetico libero (Verstrepen, 2003).

Tuttavia, nelle fasi tardive della presa di spuma, le condizioni estreme di carenza nutrizionale e l'elevata pressione possono causare piccoli fenomeni di stress cellulare o alterazioni della permeabilità di membrana prima della stazionarietà definitiva. Ciò comporta il rilascio passivo

di quote residue di acidi organici liberi nel mezzo extracellulare, prima che il sistema si stabilizzi del tutto con l'esaurimento dei substrati e l'inizio dell'autolisi.

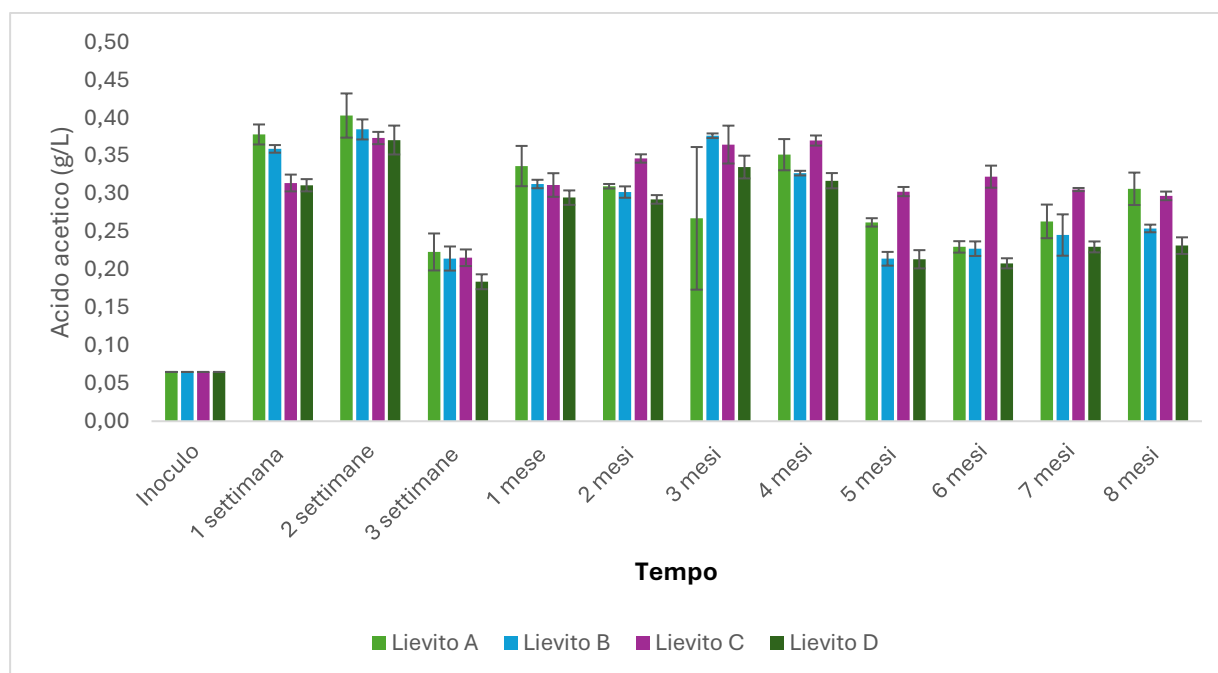


Figura 6. Confronto dell'andamento della produzione di acido acetico durante la rifermentazione condotta dai 4 ceppi di lievito.

Confrontando il comportamento dei diversi lieviti (Figura 6) si può osservare come tutti abbiano praticamente lo stesso comportamento con piccole differenze. Dopo l'aumento di acidità volatile nelle prime due settimane, in tutti si osserva una riduzione alla terza settimana (probabilmente corrispondente alla attivazione dell'enzima acetil-CoA sintetasi precedentemente descritta).

Nei mesi successivi l'acidità volatile tende poi ad avere un andamento variabile. Si può osservare ancora come il lievito C sia quello che mantiene la maggiore acidità volatile anche dopo 7-8 mesi probabilmente a causa della fermentazione più lenta (= maggiore stress). Ma anche il lievito A tende ad avere una maggiore quantità di acidità volatile residua nello stesso periodo, in questo caso forse legato ad una caratteristica specifica del ceppo che è infatti anche quello con la maggiore produzione iniziale di acido acetico.

3.5. Andamento Riboflavina

L'analisi periodica della concentrazione di riboflavina libera nel mezzo liquido, condotta tramite HPLC su un arco temporale di 8 mesi, ha evidenziato un andamento cinetico ben definito e comune a tutte le tesi, seppur con differenze quantitative legate allo specifico ceppo di lievito utilizzato (Figura 7).

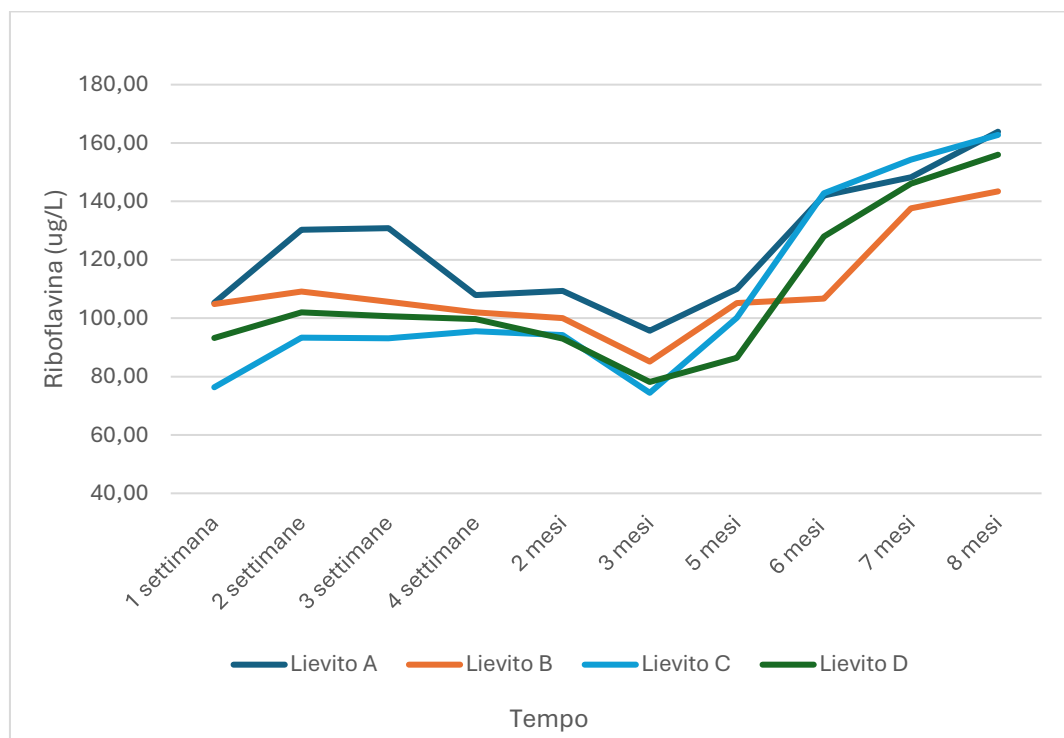
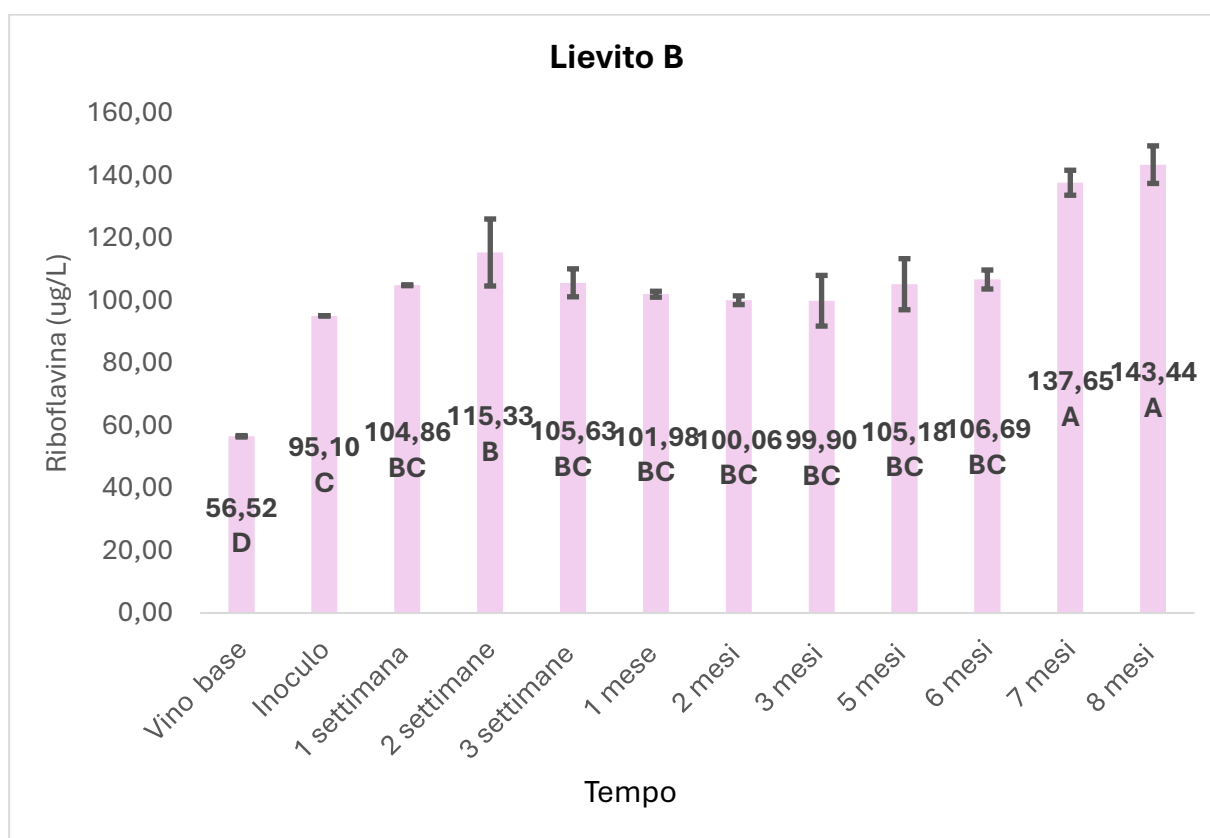
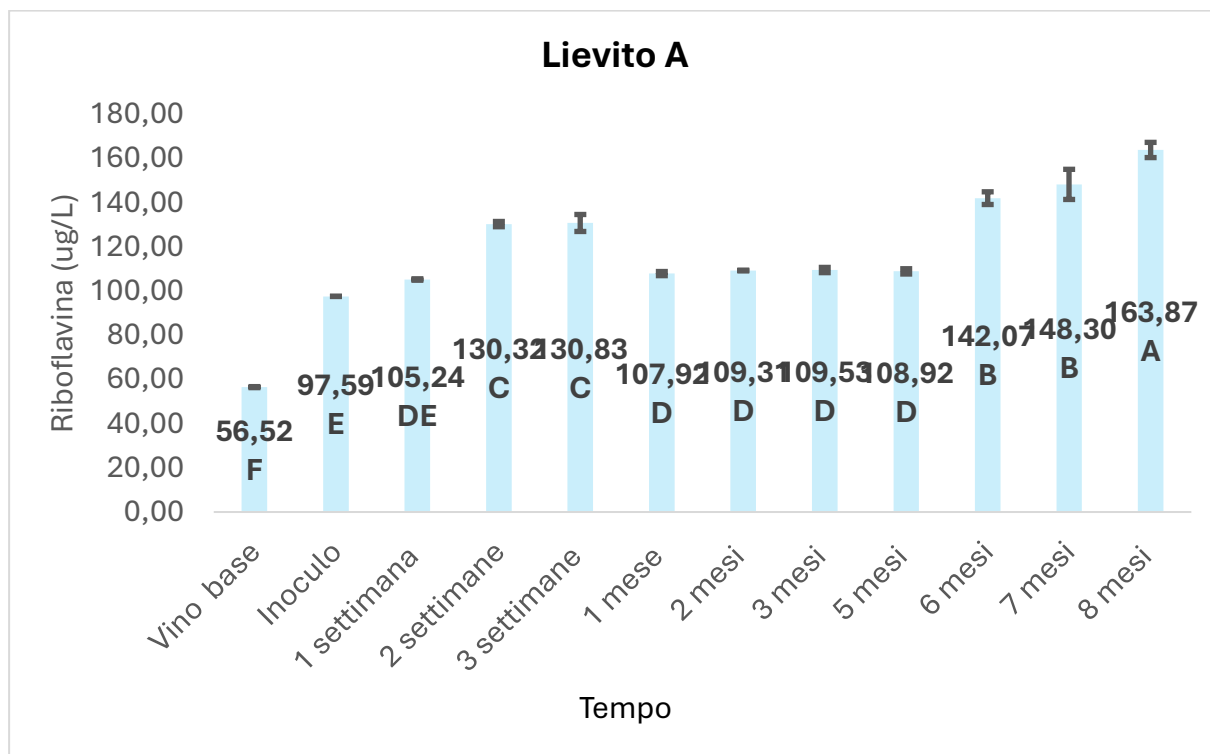


Figura 7. Confronto dell'andamento della produzione di riboflavina durante la rifermentazione condotta dai 4 ceppi di lievito.

In particolare, è evidente come tutti i ceppi abbiano un rilascio di riboflavina che inizia ad essere evidente dopo 5 mesi dall'avvio della rifermentazione.

Di seguito sono riportati anche i grafici dell'andamento nei singoli ceppi di lievito con la relativa analisi statistica (Figura 8).



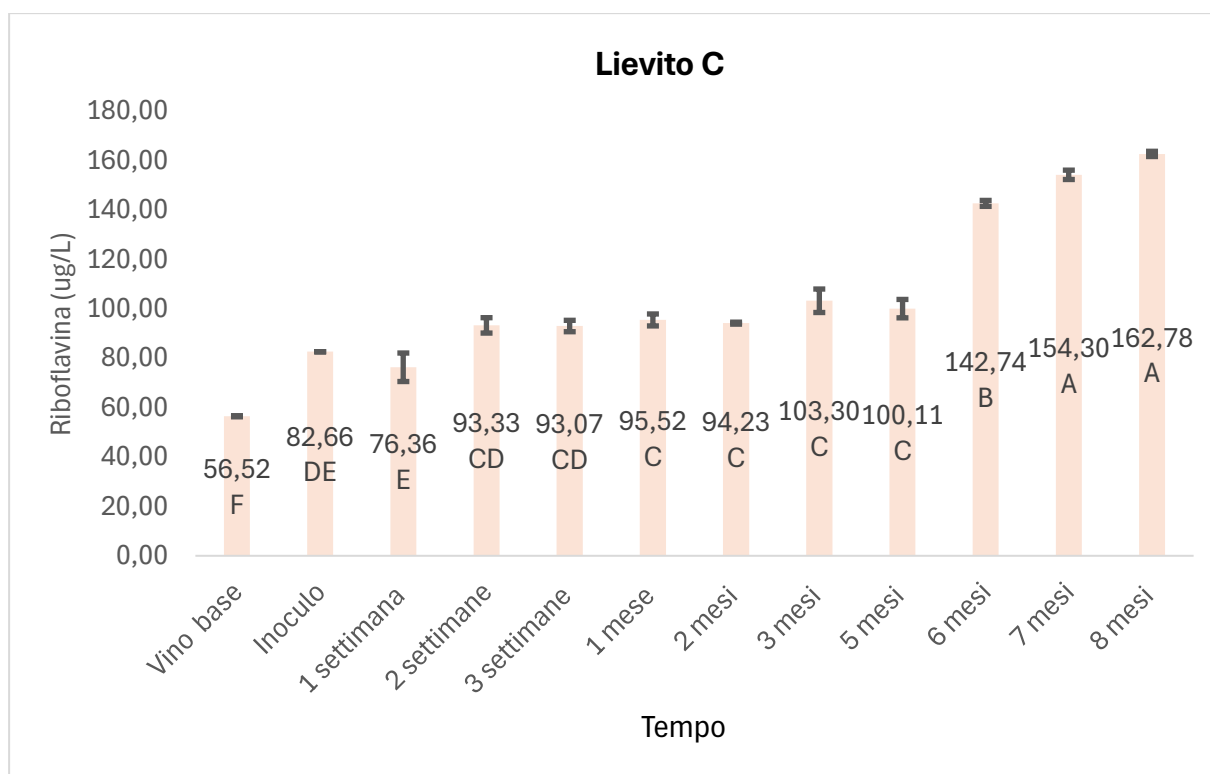


Figura 8 (A-D). Andamento della produzione di riboflavina durante la rifermentazione nei diversi ceppi di lievito. Lettere diverse indicano la presenza di differenze statisticamente significative ($p < 0.05$).

Come è possibile notare si osserva un incremento significativo della concentrazione di riboflavina subito dopo le operazioni di inoculo del piede di avviamento e la contestuale somministrazione dei nutrienti di fermentazione. Nello specifico, i dati analitici evidenziano un aumento significativo compreso tra il 46% e il 77% rispetto ai livelli basali del vino base. Questo aumento è del tutto atteso ed è legato anche all'apporto di nutrimenti azotati per l'avvio della rifermentazione, che essendo a base di estratti di lievito concorrono ad aumentare il contenuto di riboflavina.

Per quanto riguarda l'evoluzione della riboflavina durante il primo mese, cioè durante la fase di rifermentazione vera e propria, si può notare che non c'è un rilascio significativo di riboflavina come ci si sarebbe aspettati da un confronto con una fermentazione alcolica da mosto. Nel confronto Inoculo vs. 1 mese i lieviti B e D non hanno mostrato differenze significative mentre i lieviti A e C hanno mostrato un aumento statisticamente significativo ma modesto dal punto di vista quantitativo (+10 e +15% rispettivamente).

Nei primi mesi successivi non sembra esserci una ulteriore evoluzione del contenuto di riboflavina. Anche se il Grafico 7 sembra mostrare una leggera diminuzione entro i primi 3 mesi, l'analisi statistica ci conferma che in realtà rispetto all'inizio della fermentazione (inoculo) in questo periodo i lieviti B e D mostrano ancora nessuna differenza significativa mentre per i lieviti A e C si osserva un aumento di +25 e +12% rispettivamente. Solo il ceppo C quindi sembra discostarsi come comportamento dagli altri, ma bisogna ricordare che questo lievito è anche quello che ha avuto la rifermentazione più difficoltosa, che potrebbe aver influito sul metabolismo della riboflavina. Questi dati sono in contrasto con quanto osservato da (Fracassetti, et al., 2023) che hanno invece riscontrato una diminuzione significativa della riboflavina nei primi 3 mesi di rifermentazione su 9 vini prodotti con Metodo Classico. In questo lavoro i ricercatori hanno giustificato questa diminuzione ipotizzando un assorbimento di una parte della riboflavina da parte di lieviti durante la fermentazione. Come però riportato anche nell'introduzione di questa tesi il *S. cerevisiae* non ha sei trasportatori specifici per l'assorbimento della riboflavina, per cui si ritiene più logico il comportamento osservato nelle nostre fermentazioni.

Per quanto riguarda i mesi successivi, come già anticipato, la sosta del vino a contatto con i lieviti determina già dal sesto mese un incremento del contenuto di riboflavina in tutte le tesi in studio. Questo incremento ha raggiunto all'ottavo mese un aumento circa del 55% rispetto al

valore quantificato nel vino appena inoculato. Questo aumento è molto probabilmente dovuto ai progressivi fenomeni di autolisi cellulare e conferma, in questo caso, quanto osservato da (Fracassetti, et al., 2023).

I campioni analizzati in questa fase presentano concentrazioni finali comprese tra 140 e 160 µg/l. In letteratura enologica e come riportato nell'introduzione, il valore ritenuto rischioso per lo sviluppo di gusto di luce si attesta sui 100 µg/l, per cui i valori misurati a 8 mesi rendono i vini potenzialmente ad alto rischio per lo sviluppo del difetto.

Per ridurre il rischio che avvenga questo inconveniente alcune aziende adottano già una strategia che consiste nello schermare il prodotto dalle radiazioni ultraviolette e visibili mediante l'utilizzo di carte e film copri-bottiglia oscuranti (manicotti protettivi o *sleeve*), applicati specialmente nel caso in cui il vino venga confezionato in vetro bianco o scarsamente filtrante.

4. Conclusioni

In conclusione, il monitoraggio analitico svolto in questo lavoro ha permesso di delineare con precisione la complessa cinetica della riboflavina durante l'intero ciclo di vita di uno spumante Metodo Classico. I risultati ottenuti evidenziano tre fasi cruciali: un iniziale incremento quantitativo post-inoculo (compreso tra il 46% e il 77%) dovuto all'apporto dei nutrienti di fermentazione; nessun ulteriore aumento né diminuzione sia nella fase di fermentazione che nei successivi primi mesi; e infine un marcato aumento successivo al 6° mese, in cui i fenomeni di autolisi cellulare provocano un innalzamento dei livelli di riboflavina.

Il raggiungimento di concentrazioni finali critiche, comprese tra 140 e 160 µg/l (almeno fino all'8° mese ma si può ipotizzare un ulteriore aumento anche nei mesi successivi), pone il prodotto esaminato in una fascia ad alto rischio per lo sviluppo del "gusto di luce".

Questi dati confermano in parte quanto già osservato nell'ambito della produzione di un vino rifermentato in bottiglia. Rispetto ai dati di letteratura, però, nel presente lavoro è stato fatto un monitoraggio più frequente, focalizzato soprattutto nelle prime settimane di rifermentazione. Quindi questi dati ci permettono di ricavare delle informazioni più generali che possono essere estesi anche alla spumantizzazione con Metodo Martinotti, che condivide con il Metodo Classico proprio le prime fasi di trasformazione.

Di fatto si può affermare che, nonostante la prima fermentazione sia considerata la maggiore fonte di riboflavina nel vino, la seconda fermentazione, intesa solo come attività metabolica del lievito, non apporta un ulteriore aumento di questa vitamina. Questo potrebbe dipendere dalle diverse condizioni in cui avviene la fermentazione (maggiore contenuto alcolico di partenza o presenza di elevate pressioni) o semplicemente al fatto che la produzione di riboflavina potrebbe essere proporzionale alla quantità di zuccheri fermentati. In ogni caso questi risultati ci permettono di ipotizzare che in un vino prodotto con Metodo Martinotti il contenuto finale di riboflavina in bottiglia dipenda quasi esclusivamente dal contenuto di partenza nel vino base. Dei dati preliminari di monitoraggio della riboflavina in autoclave sembrano confermare questo andamento. Da un punto di vista pratico questo è un dato molto utile perché permette di gestire il problema della riboflavina (mediante chiarifica ad esempio) direttamente sul vino base senza doversi preoccupare di eventuali ulteriori rilasci durante la spumantizzazione.

La frequenza dei campionamenti eseguiti in questo lavoro ha anche permesso di capire più dettagliatamente l'evoluzione della riboflavina nel tempo e ha permesso di stabilire che un effettivo aumento di riboflavina può avvenire eventualmente verso i 6 mesi di sosta sui lieviti. Questo tempo può ovviamente variare leggermente in base al ceppo di lievito, alla composizione del vino base o alle condizioni di stoccaggio, ma può comunque garantire a quei produttori di Metodo Martinotti che volessero aumentare la complessità dei loro vini mediante una breve sosta (2-3 mesi) in autoclave, di non incorrere in problemi di gusto di luce.

Diverso è il discorso per i vini prodotti con Metodo Classico, dove le analisi confermano i dati di letteratura secondo cui la lunga sosta sui lieviti, che prevede l'autolisi delle cellule, comporta un aumento della riboflavina e, quindi, del rischio di avere problemi di gusto di luce. A questo si aggiunge l'ulteriore limitazione dovuta al fatto che il metodo di rifermentazione in bottiglia non permette di eseguire delle chiarifiche/stabilizzazioni dopo la presa di spuma, obbligando il produttore a mantenere nel vino tutta la riboflavina eventualmente prodotta durante il processo di trasformazione.

5. Bibliografia

- Andrés-Lacueva, C., Mattivi, F., & Tonon, D. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide in wine and other beverages by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. (1998) *Journal of Chromatography A*, 823, 355–363
- Bely, M. R. . Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. (2003) *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- Bottega, G. (2022). *Il gusto luce nei vini bianchi e rosati: analisi quanti-qualitativa della produzione di riboflavina da parte di alcuni ceppi di lievito* Relatore Prof. Simone Vincenzi Correlatore Dott. Luca Boschian.
- Evers, M. S., Roullier-Gall, C., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., & Alexandre, H. (2021). Vitamins in wine: Which, what for, and how much? *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20 (3), 2991-3035.
- Fracassetti, D., Limbo, S., Messina, N., Pellegrino, L., & Tirelli, A. (2021). *LightStruck Taste in White Wine: Protective Role of Glutathione, Sulfur Dioxide and Hydrolysable Tannins. Molecules*, 26 (17), 1-20.
- Fracassetti, D., Canito, A. D., Altomare, A., Foschino, R., Vigentini, I., & Tirelli, A. *Susceptibility to the light-struck taste of sparkling wine* (2023).
- Fracassetti, D., Limbo, S., & Tirelli, A. (2017). Il gusto di luce nel vino bianco: Meccanismi di formazione e prevenzione. *L'enologo: Vincitore premio assoenologi Versini* 2017, 11, 89-93.
- Margheri, G. I. L'azoto assimilabile e la tiamina in fermentazione, loro importanza quali fattori di qualità dei vini. (1986) *"Vini d'Italia"* .
- Maujean, A., Haye, M., & Feuillat, M. *Contribution `a l`'etude des goûts de lumi`ere dans le vin de Champagne. II.* (1978) Influence de la lumi`ere sur le potentiel d'oxydor`eduction. Corrélation avec la teneur en thiols du vin. *Oeno One*, 12, 277–290

- Mauri, A. M. *Vitamine. Il succo della vita.* (2006)
- Mislata, A. M.-G. *The Light Struck Taste of Wines.* (2021). *Uva e Vino*, 16, 1-20.
- Moschetti, G. N. I lieviti vinari: tassonomia e fattori di crescita." la tipicità attraverso le biotecnologie (2013).
- Nardiello, D., Bufo, S. A., & Cataldi, T. R. I. (2003). *Riboflavin in Dietary Sources: Separation and Detection by CE-LIF.* LC GC Europe, 16 (1), 30-35.
- Nicolini, G.. Vitamine dei vini bianchi: concentrazione e variabilità indotta dai lieviti. (2018) VITE & VINO, 4, 47-57.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, B., Donéche, B., & Lonvaud, A. *Trattato di enologia 1* (2017): *Microbiologia del vino e vinificazioni* (4 th ed.).
- Ribéreau-Gayon, P. G. *Trattato di enologia 2* (2018): *Chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti* (4.ed.).
- Verstrepen, K. J. (2003). Expression and regulation of the yeast alcohol acetyltransferases ATF1 and ATF2. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Zambonelli, C. (2003). *Microbiologia e biotecnologia dei vini: I processi biologici e le tecnologie della vinificazione* (3 ed.).

6. Sitografia

- https://laffort.com/wp-content/uploads/Laffort-Info/Laffort_info_123_Gusto_Luce-1.pdf
- <https://www.torrinomedica.it/approfondimenti/vitamine/vitamina-b2-riboflavina/>
- <https://air.unimi.it/handle/2434/1219795?mode=simple>
- https://laffort.com/wp-content/uploads/Laffort-Info/Laffort_info_123_Gusto_Luce-1.pdf

Ringraziamenti

In primo luogo intendo ringraziare i miei genitori papà Fabio e mamma Francesca, sono la mia fonte di ispirazione, ci sono sempre stati e mi hanno supportato in ogni istante, anche quando era ora di tagliare la legna o sfalciare con il decespugliatore.

Ringrazio le mie due sorelline;

Giulia senza la quale probabilmente non avrei intrapreso il percorso universitario, ti voglio bene!

Elena la piccola e coccolosa della famiglia, te che sei sempre sorridente e altruista, non cambiare mai.

Ringrazio i nonni: Marisa, Tiziana, Luigi e Lorenzo i quali sono ogni giorno il mio esempio ed il mio orgoglio.

A tutta la mia grande famiglia zii e cugini vari, grazie per i momenti di leggerezza e di festa.

Ringrazio inoltre le mie colleghe universitarie Chiara e Rebecca che mi hanno dato una gran mano soprattutto nel ricordarmi le scadenze e nella compilazione di ogni genere di modulo, domanda o questionario.

Un ringraziamento alla mia ragazza, Greta, persona squisita, la quale mi ha supportato e soprattutto sopportato.

Infine ma non per importanza va un ringraziamento speciale ai miei amici di sempre, Tommy “Pit”, Zanka “spanka”, Della, Kecco, Elisa ed Irene con i quali sono cresciuto e ho passato le migliori avventure della mia vita, li ringrazio per “averne bevuto uno insieme ogni tanto” e sono fiero di far parte, assieme a loro, della compagnia del paese più bello del mondo Cozzuolo.

Un ringraziamento cumulativo a tutti coloro che non ho citato esplicitamente, ma che hanno contribuito al mio percorso, considerate questa dimenticanza come il mio personale invito a brindare con me alla mia festa di laurea.

Marco