

Il contributo dei batteri lattici per la presenza di melatonina nel vino rosso

D. Fracassetti¹, I. Vigentini^{1,a}, A.F.F.L. Faro², R. Foschino¹, A. Tirelli¹, M. Orioli², e M. Iriti³

¹ Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

² Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche ed Odontoiatriche, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

³ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

Sintesi. La melatonina (MEL) è un'indolamina implicata nella regolazione dei cicli circadiani e che possiede attività antiossidante. La presenza di MEL è stata dimostrata nelle piante e negli alimenti con particolare attenzione agli alimenti e bevande fermentati, tra cui il vino. L'uva è una fonte di MEL e nel vino l'attività metabolica del lievito svolge un ruolo cruciale per la produzione di MEL. È stato recentemente suggerito che anche i batteri lattici (LAB) posseggano tale abilità. In questo studio è stata indagata la sintesi di MEL da parte dei LAB in condizioni enologiche e di laboratorio. Sono stati analizzati 8 vini rossi prodotti su scala industriale in 4 cantine. Inoltre, 11 ceppi di LAB sono stati inoculati in terreno sintetico simil-vino. Dai risultati ottenuti è emerso che nei vini prodotti in due delle quattro cantine è stato osservato un aumento di MEL al termine della fermentazione malolattica. Tutti i ceppi oggetto dello studio hanno prodotto MEL in condizioni di laboratorio in quantità variabile a seconda del ceppo. I risultati mettono in evidenza per la prima volta che i LAB sono capaci di rilasciare MEL sia in condizioni di laboratorio che nel vino prodotto industrialmente.

The contribution of lactic bacteria on melatonin in red wine

Abstract. Melatonin (MEL) is an indolamine regulating the circadian rhythms and acting as antioxidant. The presence of MEL has been evidenced in plants and foods with particular attention to fermented foods and beverages, such as wine. Grape is a source of MEL and in wine the metabolic activity of yeast is crucial for MEL production. It has been recently suggested that the lactic acid bacteria (LAB) have also this ability. In this study, the LAB-mediated production of MEL was investigated in both oenological and laboratory conditions. For this purpose, 8 red wines produced in industrial scale in 4 wineries were analysed. Moreover, 11 LAB strains were inoculated in synthetic-wine, a synthetic medium. The results showed that the concentrations of MEL increased in the wines produced in two out of four wineries at the end of the malolactic fermentation. All the investigated strains produced MEL in laboratory conditions at different levels depending to the strain itself. Our results highlighted for the first time the LABs are able to synthesize MEL in both oenological and laboratory conditions.

1. Introduzione

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina; MEL) è un'indolamina principalmente prodotta dalla ghiandola pineale nei vertebrati [1]. La MEL è sintetizzata a partire da L-triptofano, un amminoacido essenziale, via serotonina a seguito di quattro attività enzimatiche [2,3]. Negli animali, la MEL svolge diverse funzioni tra cui la regolazione dei ritmi circadiani, delle funzioni riproduttive, del metabolismo osseo e del turnover cellulare. Inoltre, tale composto possiede una spiccata attività antiossidante dovuta sia alla capacità di sequestrare le specie radicaliche che stimolando l'attività degli enzimi antiossidanti [4]. La MEL è stata rilevata nelle piante edibili [5–7] come fitormone con funzioni di protezione dello stress ossidativo e di regolazione della crescita [8,9]. La MEL è presente anche nelle piante alimentari, tra

cui semi e frutta, e nelle bevande fermentate [8,10,11]. Numerosi autori hanno evidenziato la presenza di MEL nei vini [12–15]. I livelli circolatori di MEL nei mammiferi sono molto bassi (circa 200 pg/mL come massima concentrazione durante la notte ed inferiore a 10 pg/mL durante il giorno) [16] se confrontati con il contenuto di MEL nell'uva e nel vino (circa 1 ng/g nella buccia d'uva e 0.5 ng/mL nel vino). Di conseguenza, l'assunzione con la dieta di tali alimenti assume particolare importanza [13,17]. Il livello di MEL aumenta nel corso della fermentazione del vino e di altre bevande fermentate, indicando l'importante ruolo del lievito nella produzione di MEL [11,18–20]. La via biosintetica della MEL nel lievito non è ancora stata completamente chiarita. Muñiz-Calvo e co-autori [21] hanno suggerito che la produzione di MEL sia simile a quella descritta per i vertebrati. Ciò nonostante, non sono ancora state ottenute evidenze biochimiche e molecolari. Il lievito è capace di sintetizzare anche alcuni isomeri della MEL che differiscono per la posizione della

^a Autore di riferimento: Dr. Ileana Vigentini, ileana.vigentini@unimi.it

catena laterale sull'anello indolico [22]. Recentemente, uno di questi isomeri è stato identificato come estere etilico del triptofano [23, 24].

Il lievito non è il solo microrganismo fermentante del vino, rosso in particolare, in cui la fermentazione malolattica (FML) è desiderata. I batteri lattici (LAB) sono gli agenti fermentati della FML, tra cui i ceppi appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*. Meng e collaboratori [25] hanno recentemente suggerito che i LAB posseggano l'abilità di sintetizzare MEL nel vino durante la FML sulla base di quanto riportato da Rodriguez-Naranjo et al. [26]. L'incremento di MEL è stato descritto nel vino Tempranillo in seguito all'inoculo con *O. lacti*. Dalla letteratura scientifica non emergono ulteriori ricerche focalizzate sulla produzione di MEL a seguito della crescita e delle attività metaboliche del genere *Oenococcus* e di altri LAB. Inoltre, nel vino Tempranillo non è stata determinata la popolazione microbica e, di conseguenza, l'eventuale presenza di altri lieviti o batteri non può essere esclusa [26]. La capacità dei LAB di sintetizzare MEL necessita, pertanto, di essere chiarita.

Lo scopo di questo studio è stato di valutare la produzione di MEL da parte dei LAB a seguito della FML. A tal fine, la MEL è stata determinata in vini rossi prodotti industrialmente al termine della FML. Inoltre, la sintesi di MEL è stata indagata per undici ceppi di LAB, dieci dei quali appartenenti alla specie *O. oeni* ed un ceppo di *L. brevis*, inoculati in terreno di coltura che simula le condizioni enologiche.

2. Materiali e metodi

I campioni di vino rosso analizzati sono stati prodotti su scala industriale in 4 cantine (codificate come cantina #1-cantina #4) della Valtellina (Sondrio, Italia) con uve Nebbiolo nell'annata 2016. La vinificazione è stata eseguita seguendo le pratiche generalmente adottate dalla cantina. La FML è avvenuta spontaneamente ed è stata monitorata mediante le determinazioni di acido malico ed acido lattico. I campioni sono stati prelevati dopo il travaso al termine della fermentazione alcolica e FML. I vini sono stati conservati a 4 °C fino al momento delle analisi microbiologiche e chimiche.

Undici ceppi di LAB (Tabella 1) sono stati valutati sulla base della loro abilità di produrre MEL in condizioni di laboratorio. Il terreno di coltura utilizzato, chiamato "vino-sintetico" e preparato secondo il protocollo OIV [27], ha una composizione chimica definita, simile a quella del vino.

In tutti i campioni di vino rosso e di vino sintetico, la MEL è stata determinata mediante tecnica HUPLC/ESI-QTRAP previa purificazione SPE seconda un protocollo appositamente sviluppato [28].

3. Risultati e discussione

Nei vini rossi oggetto dello studio è stato osservato l'incremento di acido lattico e la diminuzione dell'acido malico, indicando che la FML è avvenuta con durata variabile e pari a 37, 60, 79 e 158 giorni rispettivamente per la cantina #1, #2, #3 e #4. Sono state osservate variazioni minime delle rese di fermentazione (90–96%), eccetto per la cantina #1 (67%). Come atteso, in tutti i vini l'acidità volatile è diminuita ed il pH è aumentato,

Tabella 1. Ceppo, specie ed origine dei ceppi di LAB valutati nello studio [29].

Ceppo	Specie	Origine
UMB434	<i>O. oeni</i>	Vino
UMB436	<i>O. oeni</i>	Vino
UMB438	<i>O. oeni</i>	Vino
UMB462	<i>O. oeni</i>	Vino
UMB469	<i>L. brevis</i>	Feci
UMB471	<i>O. oeni</i>	Vino, Sondrio, Italia
UMB472	<i>O. oeni</i>	Vino, Sondrio, Italia
UMB473	<i>O. oeni</i>	Vino, Sondrio, Italia
UMB474	<i>O. oeni</i>	Vino, Sondrio, Italia
UMB475	<i>O. oeni</i>	Vino, Sondrio, Italia
UMB477	<i>O. oeni</i>	Vino, Sondrio, Italia

portando ai desiderati miglioramenti del vino in termini di rotondità e piacevolezza, tipico risultato della FML. Inoltre, è stato osservato un incremento dell'acidità volatile, in particolare nel vino prodotto dalla cantina #3 (+ 0.60 g/L di acido acetico). La MEL presente nei vini prima della FML era compresa tra $0.009 \pm 0.000 \mu\text{g/L}$ e $0.098 \pm 0.005 \mu\text{g/L}$, confermando l'abilità del lievito *Saccharomyces cerevisiae* di sintetizzare tale composto bioattivo [30]. Al termine della FML sono state rilevate concentrazioni di MEL comprese tra $0.022 \pm 0.001 \mu\text{g/L}$ e $0.212 \pm 0.011 \mu\text{g/L}$. Tali valori sono dello stesso ordine di grandezza rispetto a quanto riportato da Vitalini e collaboratori [31] nei vini rossi commerciali. In particolare, per i vini prodotti dalle cantine #1 e #4 l'incremento di MEL è risultato significativo e pari a $0.11 \mu\text{g/L}$ per entrambi, dimostrando la capacità dei LAB di rilasciare MEL come precedentemente suggerito [25, 26]. I ceppi che hanno condotto la FML nei vini sono stati isolati ed identificati. Tutti i ceppi appartengono alla specie *O. oeni*. I ceppi UMB471 e UMB472 sono stati isolati nel vino prodotto nella cantina #1, il ceppo UMB474 nella cantina #2, UMB474 e UMB475 nella cantina #3 e UMB477 nella cantina #4.

Tutti i ceppi di LAB indagati hanno mostrato di produrre MEL in condizioni di laboratorio in concentrazioni comprese tra $0.0044 \pm 0.001 \mu\text{g/L}$ a $0.0159 \pm 0.010 \mu\text{g/L}$ (Tabella 2). L'ampio range di concentrazione indica che la produzione di MEL è una caratteristica ceppo-dipendente, similmente a quanto è riportato per ceppi di lievito *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* [30]. Sulla base delle quantità di MEL rilasciate, i ceppi di LAB sono stati suddivisi in basso ($\text{MEL} \leq 0.0050 \mu\text{g/L}$), medio ($0.0051 < \text{MEL} < 0.0099 \mu\text{g/L}$) ed alto ($\geq 0.0100 \mu\text{g/L}$) produttori. I ceppi UMB469, 473 e 476 appartengono alla prima categoria; sei ceppi, tra cui UMB436, 438, 462, 471, 474, e 475, sono stati classificati come medio produttori e i ceppi UMB434, 470, 472 e 477 come alto produttori. In particolare, il ceppo UMB472 è risultato il maggior produttore di MEL ($0.0180 \pm 0.005 \mu\text{g/L}$) nelle condizioni sperimentali adottate. Per quanto concerne i ceppi di *O. oeni* rilevati nelle cantine, la FML è stata condotta da ceppi medio-alto produttori per i vini della cantina #1, medio produttore per la cantina #2, basso-medio produttori per la cantina #3 ed alto produttore per la cantina #4. Inoltre, i livelli di MEL trovati in condizioni di laboratorio risultano inferiori rispetto all'incremento di MEL osservato nel vino. Probabilmente, la presenza

Tabella 2. Concentrazione di melatonina (MEL) rilasciata dai ceppi di batteri lattici indagati in terreno sintetico simil-vino.

Ceppo	UFC/mL	MEL (μ g/L)
UMB434	3.1×10^8	0.0110 ± 0.002
UMB436	2.8×10^8	0.0061 ± 0.002
UMB438	2.7×10^8	0.0072 ± 0.001
UMB462	2.0×10^8	0.0099 ± 0.002
UMB469	2.0×10^8	0.0041 ± 0.002
UMB471	2.9×10^8	0.0159 ± 0.010
UMB472	2.2×10^8	0.0057 ± 0.002
UMB473	2.3×10^8	0.0180 ± 0.005
UMB474	3.3×10^8	0.0044 ± 0.001
UMB475	2.5×10^8	0.0051 ± 0.001
UMB477	3.6×10^8	0.0091 ± 0.005

di due ceppi potrebbe portare ad un maggior rilascio di MEL durante la fermentazione malolattica. Non solo, considerando l'etanolo come possibile fattore di stress per i LAB, i vini delle cantine #1 e #4 hanno mostrato la maggiore concentrazione di etanolo, rispettivamente di 13.2% (v/v) e 15.9% (v/v). Di conseguenza, la composizione del vino potrebbe influenzare la produzione di MEL durante la FML.

4. Conclusioni

L'abilità di produrre MEL da parte dei LAB è stata dimostrata sia in condizioni enologiche che di laboratorio. Tale caratteristica è ceppo-dipendente ed alcuni parametri compositivi del vino, tra cui l'etanolo, sembrano influenzare la sintesi di MEL. Studi futuri saranno necessari per meglio comprendere le vie metaboliche nei LAB. La vinificazione e i parametri compositivi del vino saranno considerati al fine di favorire il rilascio di questo composto bioattivo.

Riferimenti

- [1] R.J. Reiter, *Endocr. Rev.* **1**, 109 (1980)
- [2] R.J. Reiter, *Endocr. Rev.* **12**, 151 (1991)
- [3] A. Chattoraj, T. Liu, L.S. Zhang, Z. Huang, J. Borjigin, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **10**, 37 (2009)
- [4] R.J. Reiter, S.D. Paredes, L.C. Manchester, D.X. Tan, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 175 (2009)
- [5] R. Dubbels, R.J. Reiter, E. Klenke, A. Goebel, E. Schnakenberg, C. Ehlers, H.W. Schiwarra, W. Schloot, *J. Pineal Res.* **18**, 28 (1995)
- [6] A. Hattori, H. Migitaka, M. Iigo, M. Itoh, K. Yamamoto, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, T. Suzuki, R.J. Reiter, *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **35**, 627 (1995)
- [7] S.D. Paredes, A. Korkmaz, L.C. Manchester, D.X. Tan, R.J. Reiter, *J. Experim. Bot.* (2009)
- [8] L.C. Manchester, D.X. Tan, R.J. Reiter, W. Park, K. Monis, W. Qi, *Life Sci.* **67**, 3023 (2000)
- [9] D.X. Tan, R. Hardeland, L.C. Manchester, A. Korkmaz, S. Ma, S. Rosales-Corral, R.J. Reiter, *J. Experim. Bot.* **63**, 577 (2012)
- [10] M. Sturtz, A.B. Cerezo, E. Cantos-Villar, M.C. Garcia-Parrilla, *Food Chem.* **127**, 1329 (2011)
- [11] H. Garcia-Moreno, J.R. Calvo, M.D. Maldonado, *J. Pineal Res.* **55**, 26 (2012)
- [12] L. Mercolini, R. Mandrioli, M.A. Raggi, *J. Pineal Res.* **53**, 21 (2012)
- [13] M. Iriti, E.M. Varoni, S. Vitalini, *J. Pineal Res.* **49**, 101 (2010)
- [14] P.W. Stege, L.L. Sombra, G. Messina, L.D. Martinez, M.D. Silva, *Electrophoresis* **31**, 2242 (2010)
- [15] S. Vitalini, C. Gardana, A. Zanzotto, G. Fico, F. Faoro, P. Simonetti, M. Iriti, *J. Pineal Res.* **51**, 278 (2011)
- [16] D. Bonnefont-Rousselot, F. Collin, *Toxicol.* **278**, 55 (2010)
- [17] M. Iriti, S. Vitalini, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **62**, 71 (2012)
- [18] M.I. Rodriguez-Naranjo, A. Gil-Izquierdo, A.M. Troncoso, E. Cantos, M.C. Garcia-Parrilla, *J. Food Compos. Anal.* **24**, 603 (2011)
- [19] P. Mena, A. Gil-Izquierdo, D.A. Moreno, N. Martí, C. García-Viguera, *Food Sci. Technol.* **47**, 13 (2012)
- [20] M.S. Fernandez-Pachon, S. Medina, G. Herrero-Martin, I. Cerrillo, G. Berna, B. Escudero-Lopez, F. Ferreres, F. Martin, M.C. Garcia-Parrilla, A. Gil-Izquierdo, *J. Pineal Res.* **56**, 31 (2014)
- [21] S. Muñiz-Calvo, J.M. Guillamón, I. Domínguez, A. Doménech-Carbó, *Food Anal. Methods* **10**, 1408 (2017)
- [22] G. Spadoni, G. Diamantini, A. Bedini, G. Tarzia, F. Vacondio, C. Silva, M. Rivara, M. Mor, P.V. Plazzi, M. Zusso, D. Franceschini, P. Giusti, *J. Pineal Res.* **40**, 259 (2006)
- [23] C. Gardana, M. Iriti, M. Stuknyte, I. De Noni, P. Simonetti, *J. Pineal Res.* **57**, 435 (2014)
- [24] M. Iriti, I. Vigentini, *Int. J. Tryptophan Res.* **8**, 1 (2015)
- [25] X. Meng, L. Ya, L. Sha, Y. Zhou, R.-Y. Gan, D.-P. Xu, H.-B. Li, *Nutr.* **9**, 367 (2017)
- [26] M.I. Rodriguez-Naranjo, A. Gil-Izquierdo, A.M. Troncoso, E. Cantos-Villar, M.C. Garcia-Parrilla, *Food Chem.* **126**, 1608 (2011)
- [27] OIV Directive 22/06/2012, Appendix I
- [28] D. Fracassetti, I. Vigentini, S. Moiola, R. Foschino, A. Tirelli, M. Iriti, *Macrowine Conference, book of abstract* (2018)
- [29] I. Vigentini, C. Picozzi, A. Tirelli, A. Giugni, R. Foschino, *Food Microbiol.* **136**, 123 (2009)
- [30] I. Vigentini, C. Gardana, D. Fracassetti, M. Gabrielli, R. Foschino, P. Simonetti, A. Tirelli, M. Iriti, *J. Pineal Res.* **58**, 388 (2015)
- [31] S. Vitalini, C. Gardana, P. Simonetti, G. Fico, M. Iriti, *J. Pineal Res.* **54**, 322 (2013)