

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA IN VITICOLTURA ED ENOLOGIA

**CARATTERIZZAZIONE DI VINI BIANCHI TIPICI SICILIANI IN
TERMINI DI PROFILO IN MOLECOLE AROMATICHE E CONTENUTO
DI ETILCARBAMMATO ED AMMINE BIOGENE**

Relazione finale in:

MICROBIOLOGIA ENOLOGICA

Relatore:

Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Presentata da:

Tommaso Russo

Correlatori:

Dott.ssa Francesca Patrignani

Dott.ssa Giulia Tabanelli

Sessione III

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

CAPITOLO 1 – VITIGNI AUTOCTONI SICILIANI A BACCA BIANCA	4
1.1 <u>Vitigni autoctoni siciliani</u>	5
1.2 <u>Catarratto</u>	6
1.3 <u>Grillo</u>	7
1.4 <u>Insolia (Ansonica)</u>	11
CAPITOLO 2 – FERMENTAZIONI E CARATTERI DI SELEZIONE DEI LIEVITI	14
2.1 <u>Fermentazioni spontanee e guidate</u>	15
2.2 <u>Caratteri tecnologici di selezione dei lieviti <i>Saccharomyces</i></u>	17
2.2.1 <u>Attività fermentativa</u>	17
2.2.2 <u>Andamento fermentativo</u>	17
2.2.3 <u>Vigore fermentativo</u>	18
2.2.4 <u>Potere fermentativo</u>	18
2.2.5 <u>Tolleranza all’etanolo</u>	19
2.2.6 <u>Resistenza all’anidride solforosa</u>	19
2.2.7 <u>Modalità di sviluppo</u>	20
2.2.8 <u>Carattere “killer”</u>	21
2.2.9 <u>Influenza della temperatura</u>	22
2.2.10 <u>La produzione di composti solforati</u>	22
2.2.11 <u>La produzione di idrogeno solforato</u>	23
2.2.12 <u>La produzione di glicerolo</u>	23
2.2.13 <u>La tolleranza agli additivi tecnologici</u>	24
CAPITOLO 3 – SOSTANZE INDESIDERATE NEI VINI: AMMINE BIOGENE ED ETILCARBAMMATO	25
3.1 <u>Ammine biogene e loro presenza nei vini</u>	26

3.1.1 Funzione ed importanza fisiologica.....	27
3.1.2 Meccanismo di produzione delle ammine biogene.....	31
3.1.3 Fattori che favoriscono la produzione di ammine biogene.....	32
3.1.4 Tossicologia.....	37
3.1.5 Legislazione.....	38
3.2 <u>Produzione di etilcarbammato</u>	40
3.3 <u>Produzione di Ocratossina A (OTA)</u>	41

CAPITOLO 4 – PROFILI AROMATICI DEI VINI 42

4.1 <u>Quadro aromatico del vino</u>	43
4.2 <u>Alcoli superiori prodotti in fermentazione alcolica</u>	43
4.3 <u>I terpeni</u>	45
4.4 <u>Norisoprenoidi</u>	46
4.5 <u>Metossipirazione</u>	46
4.6 <u>Il 2-3-butandiolo e l'acetoino</u>	46
4.7 <u>Esteri</u>	47
4.8 <u>Aldeidi e chetoni</u>	48

CAPITOLO 5 – OBIETTIVI 49

CAPITOLO 6 – MATERIALI E METODI 54

6.1 <u>Campioni considerati</u>	55
6.2 <u>Determinazione delle ammine biogene</u>	55
6.3 <u>Determinazione dell'etilcarbammato</u>	58
6.4 <u>Determinazione metaboliti volatili</u>	60
6.5 <u>Analisi al naso elettronico</u>	61
6.6 <u>Analisi dei dati</u>	61

CAPITOLO 7 – RISULTATI 62

7.1 <u>Determinazione delle ammine biogene e dell'etilcarbammato in relazione al vitigno e alla cantina di produzione considerati</u>	63
7.2 <u>Profilo in molecole volatili</u>	66
CAPITOLO 8 – CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	74

CAPITOLO 1

Vitigni autoctoni siciliani a bacca bianca

1.1 Vitigni autoctoni siciliani

Il vitigno autoctono è una varietà di vite usata per la produzione di vino, coltivato nella stessa zona storica di origine del vitigno stesso; si tratta quindi di un vitigno non trapiantato da altre aree geografiche. Il termine autoctono (dal greco *autòs* stesso, e *chthòn* suolo/terra) infatti indica l'appartenenza di qualcosa o qualcuno ad un luogo. Ogni vitigno autoctono presenta una sua caratteristica forma e colore del grappolo, del vinacciolo e delle foglie e dà al vino alcune caratteristiche organolettiche precise e tipiche. In Italia ci sono circa 350 vitigni autoctoni registrati ufficialmente e tutte le principali regioni agricole italiane con produzione vinicola hanno un elenco di vitigni autoctoni locali.

Per quanto riguarda la Sicilia, i vitigni autoctoni sono caratterizzati da un'elevata variabilità e sono stati sottoposti negli anni a selezione massale da parte dei viticoltori, che ancora oggi selezionano e moltiplicano gli individui ritenuti migliori. La scelta del vitigno più idoneo alle differenti condizioni pedo-climatiche e al risultato enologico che si vuole raggiungere, rappresenta uno dei parametri principali che non si può ignorare se si vuole puntare ad un miglioramento degli standard qualitativi finali.

Da un punto di vista storico, la viticoltura era già presente nell'isola prima dell'arrivo dei coloni greci. I famosi vini siculi, come il Mamertino, il Tauromenio e l'Inicynio, cessarono quasi di essere prodotti con la conquista romana, epoca in cui la Sicilia fu trasformata nel "granaio di Roma". Furono gli Arabi a riprendere la coltivazione di uva.

I vitigni autoctoni siciliani più diffusi sono il Nero D'Avola e il Nerello Mascalese tra quelli a bacca rossa e il Catarratto, il Grillo e l'Insolia tra quelli a bacca bianca. Esistono poi altri vitigni autoctoni siciliani minori, come il Grecanico e il Damaschino.

La maggior parte dei vitigni autoctoni sono coltivati nella parte occidentale della Sicilia, nella provincia di Trapani, parte di quella di Palermo e parte di quella di Agrigento.

1.2 Catarratto

E' un vitigno autoctono siciliano a bacca bianca molto diffuso, detto anche "Catarratteddu". Viene coltivato moltissimo nelle provincie di Trapani, Palermo e Agrigento ma è comunque presente un po' ovunque.

- **Ambiente:** Coltivato in diversi ambienti e terroir dove la vite trova habitat molto favorevoli.

- **Storia:** E' un vitigno di antichissima coltivazione ed è coltivato da molto tempo in Sicilia. Lo descrive Cupanis nel 1696 e il canonico Geremia nel 1835. Vitigno prevalente nella seconda metà del XIX secolo, ha subito una certa contrazione a inizio '900 nella zona di Trapani a vantaggio della cultivar "Grillo"(particolarmente idonea alla produzione del vino "Marsala"), per recuperare poi nella metà' del secolo scorso.

- **Caratteristiche del vitigno:** Il germoglio ha un apice cotonoso, di colore verde con macchioline arancio rossastre al margine. Le foglioline apicali sono penta lobate, di colore bianco verdastro, pagina superiore cotonosa. Le foglioline basali sono penta lobate, di colore verde giallo con note bronzate, pagina superiore da lanuginosa ad aracnoidea. Il tralcio erbaceo ha gli internodi di colore verde con striature rossastre sulla parte esposta al sole, parte apicale ricurva, contorno da costoluto a un po' striato. I viticci sono bifidi, a volte trifidi, di colore verde con sfumature bronzate. La foglia adulta è di medie a medio-grandi dimensioni, lembo bolloso, denti medi, colore verde intenso, seno peziolare con bordi sovrapposti, pagina superiore da quasi glabra a poco aracnoidea, pagina inferiore lanuginosa tra le nervature, picciolo di colore verde sulla parte non esposta, verde striato di rosso su quella esposta. Il grappolo è grosso e lungo, alato, cilindrico-conico, da medio a compatto, peduncolo di colore verde e legnoso alla base. L'acino è medio-piccolo a medio, pruinoso, sferoidale, di colore verde-grigio. Il tralcio ha sezione trasversale ellittica, superficie striata, internodi di colore nocciola grigiastro, nodi più scuri.

- **Aspetti agronomici e fenologici:** La vigoria è buona. La forma di allevamento è a contro spalliera con potatura mista (Guyot) o corta. La sua moltiplicazione è ottima

con gran parte dei portainnesti. La produttività è buona e costante. Ha buona tolleranza alla peronospora, alla botrite e all'oidio. Germoglia verso fine marzo a metà aprile. Matura verso fine settembre (www.agrinovazione.regione.sicilia.it).

- **Vini DOC:** Alcamo, Contea di Sclafani, Contessa Entellina, Delia Nivolelli, Erice Monreale, Salaparuta, Sambuca di Sicilia, Santa Margherita di Belice.

-**Caratteristiche del vino:** Il vino è di colore giallo paglierino verso il dorato, il profilo aromatico ha lievi sentori fruttati e note floreali, al gusto si caratterizza per l'importante alcolicità e la buona struttura, ha un sapore neutro, mediamente acido e tendente al morbido, retrogusto amarognolo. (www.agrinovazione.regione.sicilia.it)

1.3 Grillo

È un vitigno autoctono siciliano a bacca bianca, molto diffuso, detto anche "Riddu". Viene coltivato principalmente nella provincia di Trapani (zone di Marsala e di Mazara del Vallo), dove costituisce il vitigno base per la produzione del vino DOC "Marsala". È presente nelle provincie di Palermo, Agrigento, Messina e Caltanissetta.

-**Storia:** L'origine di questo vitigno è sconosciuta. Non è tra i vitigni presenti nella collezione del Barone Mendola (1868) e la prima notizia relativa alla sua coltivazione in Sicilia risale nel 1873 (Alagna-Spanò, 1873). Secondo alcuni autori sarebbe stato importato in Sicilia dalla Puglia dopo l'invasione della fillossera. Il Rizzo scrive nel dopoguerra di questo vitigno, molto diffuso nel trapanese già a fine Ottocento.

-**Ambiente:** La parte finale della Sicilia occidentale ha condizioni pedoclimatiche eccezionali, grazie alle significative escursioni termiche fra giorno e notte, molto importanti per lo sviluppo del potenziale aromatico delle uve coltivate.

-**Caratteristiche del vitigno:** Il germoglio ha un apice lanuginoso, di colore verde biancastro con poche macchioline rossastre ai margini. Le foglioline apicali sono pentalobate, pagina superiore cotonosa, di colore verde chiaro biancastro, pagina inferiore cotonosa. Le foglioline basali sono penta lobate, pagina superiore da lanuginosa ad aracnoidea, pagina inferiore da lanuginosa ad aracnoidea. Il tralcio

erbaceo è con contorno da quasi liscio a angoloso, di colore verde con striature rossastre sulla parte esposta al sole, tratto apicale ricurvo. I viticci sono trifidi, lunghi, di colore verde. La foglia adulta è da media a grande, di forma orbicolare o pentagonale, pagina superiore glabra, di colore verde intenso, superficie debolmente bollosa, lembo a coppa con margini molto ondulati, denti pronunciati, irregolari, pagina inferiore di colore verde chiaro con nervature di colore rosso vinoso, pagina superiore glabra, di colore verde intenso. Picciolo è di colore giallo verde sulla parte in ombra e sulla parte basale del lato esposto, di colore vinoso sulla restante parte. Il grappolo è di medie-grosse dimensioni, conico, spesso spargolo, di colore verde rosato. L'acino è di medio-grande o grande dimensioni, rotondo, buccia debolmente pruinosa di colore verde giallo con sfumature rosa aranciate. Il tralcio legnoso ha gli internodi da medio corti a medi, sezione trasversale circolare, superficie un po' di colore nocciola grigiastro, nodi più scuri.

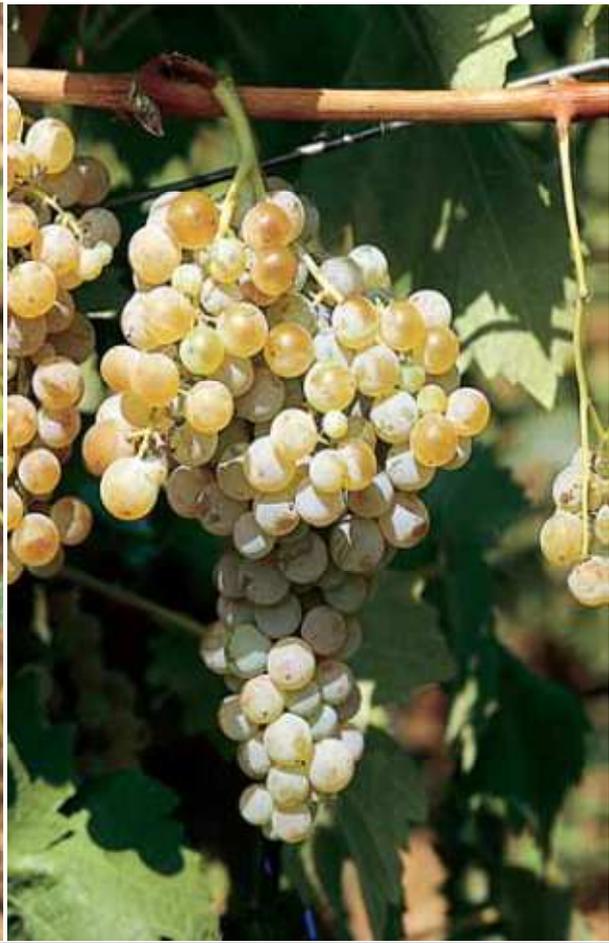
-Aspetti agronomici e fenologici: La vigoria è buona. La forma di allevamento è ad alberello marsalese (senza sostegno), favorisce la potatura mista (Guyot). Ha un'ottima affinità con il portainnesto "420 A". La produttività è media-buona, spesso irregolare. E' mediamente resistente all'oidio, un po' meno alla peronospora. Germoglia verso l'ultima decade di marzo, matura verso la fine di settembre (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it).

-Vini DOC: Alcamo, Contea di Sclafani, Contessa Entellina, Delia Nivolelli, Erice, Mamertino di Milazzo, Marsala, Menfi, Monreale, Salaparuta, Sambuca di Sicilia, Santa Margherita di Belice.

-Caratteristiche del vino: Confluisce alla costituzione dei migliori vini DOC Marsala. Con le sue uve si producono ottimi vini bianchi pronti o adatti all'affinamento. Il suo vino ha colore giallo paglierino carico, buona aromaticità, con sentori erbacei, floreali e note agrumate, il sapore è sapido, buona acidità e di una equilibrata morbidezza, ha un'ottima struttura gustativa (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it).



Foglia di Catarratto



Grappolo di Catarratto



Germoglio di Catarratto



Foglia di Grillo



Grappolo di Grillo



Germoglio di Grillo

1.4 Insolia (Ansonica)

E' un vitigno autoctono siciliano a bacca bianca, molto diffuso. E' iscritto al registro delle varietà di vite come 'Ansonica', ma in Sicilia è conosciuto con sinonimo 'Insolia'. Detto anche 'Nzolia bianca'. Esiste anche a frutto nero, geneticamente differente da quella a bacca bianca. E' coltivato nelle provincie di Trapani, Agrigento e Palermo, ma è presente anche in tutte le altre zone viticole siciliane.

-Storia: E' un vitigno molto antico, lo descrive Capuani (1696), distinguendo tre tipi di "Insolia", di cui due a bacca bianca e una a bacca nera. Acerbi (1825) descrive una "Nzolia bianca" con acino allungato. L'Abate Geremia (1835) riferisce pure di due varietà di 'Insolia', una a bacca bianca e una a bacca nera, distinguendone, all'interno della prima, diversi biotipi. Anche il Barone Mendola (1868) parla di diverse 'Insolie'. Introdotto in Sicilia forse all'epoca della dominazione normanna, si sarebbe da qui diffuso nel continente.

-Ambiente: Preferisce le zone collinari, esposte ai venti, nelle provincie di Agrigento, Palermo e Caltanissetta.

-Caratteristiche del vitigno: Il germoglio ha un apice aracnoideo a quasi glabro, di colore verde, con macchioline rosso bronzate al margine. Le foglioline apicali sono penta lobate, pagina superiore da poco aracnoidea a quasi glabea, di colore verde con zone bronzate, seni molto profondi, pagina inferiore da molto aracnoideo ad aracnoideo sulle nervature, colore verde con sfumature bronzate. Le foglioline basali sono penta lobate, pagina superiore glabra, di colore verde con sfumature bronzate, pagina inferiore glabra, con qualche pelo lungo sulle nervature. Il tralcio erbaceo è di colore verde con striature rossastre. I viticci sono bifidi o trifidi, di colore verde con base rossastra sulla parte esposta. La foglia adulta è di medie o grandi dimensioni, penta lobata o eptalobata, il lembo è lucido con bollosità alla base, con increspature, pagina superiore glabra, di colore verde con punto peziolare rosato, seno peziolare chiuso, con bordi sovrapposti, pagina inferiore glabra, di colore verde-chiaro con sfumature rosso intenso denti di lunghezza variabile, di colore verde-chiaro. Il grappolo è di medie-grande dimensione, piramidale o conico, da spargolo a medio, di

colore verde con sfumature rosate sulla parte esposta, a volte legnoso alla base. L'acino è di medio-grande dimensione, debolmente pruinoso, di forma ellissoidale, buccia di colore giallo-rosa con tonalità aranciate sulle parti esposte al sole, polpa croccante. Il tralcio legnoso ha gli internodi medi, sezione trasversale ellittica, superficie striata, di colore grigio nocciola, tendente al rossastro, con striature più scure.

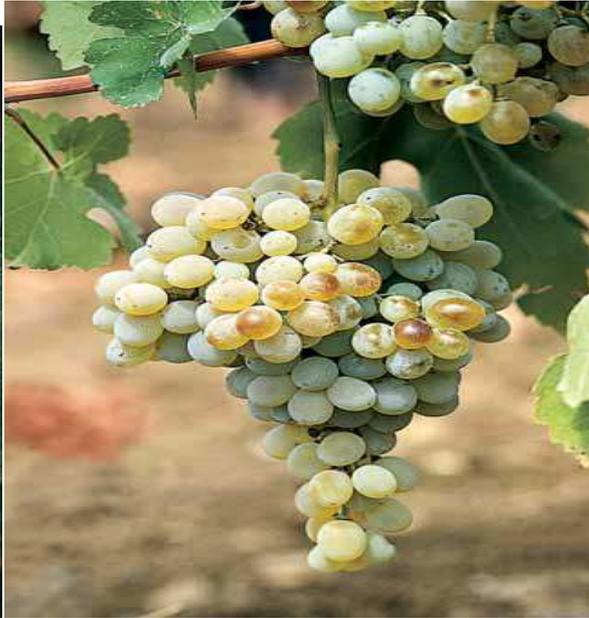
Aspetti agronomici e fenologici: La vigoria è ottima. La forma di allevamento che preferisce sono quelle espanse e a potatura mista (Guyot). Ha una buona affinità con il "140 Ruggeri". E' sensibile all'oidio, un po' meno alla peronospora. Germoglia tra la prima e la seconda decade di aprile, matura verso la fine di settembre (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it).

-Vini DOC: Alcamo, Contea di Sclafani, Contessa Entellina, Delia Nivolelli, Erice, Mamertino, Marsala, Menfi, Riesi, Salaparuta, Sambuca di Sicilia, Santa Margherita di Belice, Sciacca, Vittoria.

-Caratteristiche del vino: Vinificata in purezza dà un vino fine di colore giallo paglierino con riflessi verdolini; profumi caratteristici del vitigno, al gusto ha un sapore neutro, abbastanza sapido, buona componente alcolica, un'equilibrata acidità e morbidezza. Viene spesso utilizzata in uvaggio con il Catarratto (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it).



Foglia di Insolia



Grappolo di Insolia



Germoglio di Insolia

CAPITOLO 2

Fermentazioni e caratteri di selezione dei lieviti

2.1 Fermentazioni spontanee e guidate

La fermentazione dei vini avviene grazie ai lieviti, che sono in grado di trasformare gli zuccheri, presenti nel mosto, in alcol etilico ad opera di due tipi di fermentazione, quella spontanea e quella guidata. La fermentazione spontanea è a carico dei cosiddetti lieviti indigeni naturalmente presenti nell'uva, nel mosto e nel vino e si ha un loro susseguirsi durante il processo fermentativo; in primis i principali lieviti presenti nei mosti sono di forma apiculata, mentre in un secondo momento prendono il sopravvento cellule di forma ovale, ellittica o allungata portando a termine la fermentazione (Lambrechts e Pretorius, 2000). I lieviti apiculati (definiti anche non-*Saccharomyces*) contribuiscono alla fermentazione soprattutto per quanto concerne le proprietà aromatiche e impartendo profili organolettici complessi e nuovi al futuro vino. Essi sono scarsamente alcool tolleranti quindi si trovano nel mosto nelle prime fasi del processo fermentativo mentre, raggiunti i 4% di alcool prendono il sopravvento i *Saccharomyces cerevisiae*, dotati di un buon potere alcoligeno. I ceppi più frequenti appartengono ai generi:

- *Hanseniaspora/Kloekera*
- *Candida* (ad esempio *C. stellata* e *C. pulcherrima*) (Heard e Fleet, 1986),
- *Metschnikowia*
- *Pichia*
- *Kluyveromyces*.

Il lieviti non-*Saccharomyces* non scompaiono, ma alla fine della fermentazione alcolica, se le condizioni lo permettono, possono sviluppare nuovamente. Tradizionalmente la presenza durante il processo fermentativo dei lieviti non-*Saccharomyces* vengono considerati come una contaminazione, poiché portano a note sensoriali sgradevoli causate dalla produzione dei metaboliti secondari ad altre concentrazioni:

- acido acetico
- acetato di etile

- acetaldeide
- acetoino

Solo recentemente diversi studi hanno messo in evidenza che alcune specie di lieviti appartenenti al genere *Candida*, *Kloeckera* e *Hanseniaspora* possono influenzare positivamente l'intero carattere del vino, migliorando le proprietà aromatiche e impartendo profili di flavour complessi e nuovi (Fleet, 2008; Romano, 1997). Durante la fermentazione possono intervenire anche altre specie, ma in misura molto inferiore: *Saccharomyces ludwigii*, *Metschnikowia pulcherrima* e alcune specie del genere *Brettanomyces*.

“*La fermentazione in purezza*” o guidata è quella che avviene inoculando una cultura di lievito puro in un mosto appena spremuto, per far prendere già da subito il sopravvento alla specie inoculata sugli altri microrganismi spontaneamente presenti. Generalmente nelle fermentazioni guidate si procede con l'inoculo di lieviti selezionati di colture di *Saccharomyces cerevisiae*. Questa tecnica porta al controllo microbiologico della fermentazione permettendo così, una migliore gestione della fermentazione alcolica (Kunkee e Bisson 1993; Pretorius, 2000; Fleet, 2008) e delle diverse caratteristiche negative che possono scaturire da essa, svolgendo un ruolo importante sui caratteri del prodotto finale (Pérez-Coello et al., 1999).

I vantaggi della fermentazione guidata su quella naturale sono:

- Un veloce inizio del processo fermentativo poichè i lieviti selezionati prendono il sopravvento sulla flora spontanea del mosto.
- Completo utilizzo degli zuccheri presenti, con conseguente maggiore stabilità microbica, evitano i problemi degli zuccheri residui e l'effetto tossicologico dell'alcol nei confronti della flora spontanea meno alcoltollerante.
- Migliore rendimento della trasformazione dello zucchero in alcol, riducendo il rischio di arresti fermentativi.
- Minore formazione di composti secondari che provocano l'aumento dell'acidità volatile, dovuto alla mancanza di prestazione da parte dei lieviti

apiculati che in assenza di lieviti selezionati, prenderebbero il sopravvento nelle prime fasi della fermentazione alcolica.

- Maggiore possibilità di fermentare anche mosti ottenuti da uve non sane.
- Maggiore stabilità dei vini ottenuti all'ossidazione, minore difficoltà di chiarificazione, controllo dell'acidità fissa.

2.2 Caratteri tecnologici di selezione dei lieviti *Saccharomyces*

I caratteri tecnologici che i lieviti manifestano durante il loro sviluppo permettono, scegliendo accuratamente il ceppo da utilizzare, di guidare e programmare le fermentazioni. Questi caratteri non sono normalmente valutabili in termini di valore assoluto ma, si prestano molto bene per quanto riguarda la comparazione tra i vari ceppi. La competitività di un particolare lievito è molto importante in enologia per fare in modo che il ceppo da noi scelto prenda il sopravvento sulla popolazione naturalmente presente. A questi caratteri, diciamo “classici”, si aggiungono poi una serie di altre proprietà e attività che normalmente non sono ricercate e che possono avere un'incidenza molto elevata sulla qualità del prodotto finale.

2.2.1 Attività fermentativa

Il vigore fermentativo è sicuramente il carattere di base che deve essere ricercato in un lievito, perché essenziale per assicurare un buon andamento del processo. Rappresenta la prontezza con cui il lievito inizia la fermentazione e la rapidità con cui la porta a termine. L'attività fermentativa di un lievito è fortemente condizionata sia da fattori esterni, come le condizioni fisico-chimiche del mezzo, che da fattori interni legati alla specie e al ceppo di lievito. In generale l'attività fermentativa si suddivide in: andamento fermentativo, vigore fermentativo e potere fermentativo. A questa suddivisione si affianca la tolleranza all'etanolo.

2.2.2 Andamento fermentativo

E' rappresentato dalla curva di fermentazione, in termini di consumo di zuccheri, di rendimento in alcol e di velocità del processo. Sono tante le condizioni che lo

influenzano, specialmente le caratteristiche fisico-chimiche del mosto (SO₂, pH, temperatura di fermentazione), ma il parametro principale che regola il processo di vinificazione è proprio la specie di lievito impiegata. Ogni lievito, infatti, presenta una propria curva di fermentazione che sarà leggermente diversa anche a livello di ceppo, rimanendo comunque legata a un modello comune alla specie.

2.2.3 Vigore fermentativo

Esprime la capacità di svolgere pronte e rapide fermentazioni a temperature comprese tra 20 e 30°C anche in presenza di sostanze antimicrobiche e di insetticidi a basse concentrazioni. E' un carattere stabile e legato a diverse attività del lievito. I lieviti del genere *Saccharomyces* della specie *cerevisiae* sono normalmente considerati fra i più vigorosi. Questo permette, unitamente alla loro elevata resistenza alla solforosa, la loro prevalenza sulle popolazioni naturali di lieviti in particolare quelli apiculati.

2.2.4 Potere fermentativo

Come sappiamo l'etanolo prodotto dai lieviti durante la fermentazione, è un composto che esercita un'azione antimicrobica. Come riportato in bibliografia, si definisce "potere alcoligeno" il massimo grado alcolico prodotto da un lievito durante la fermentazione di un mosto contenente zucchero in eccesso. La temperatura e la composizione chimica del mosto sono le condizioni che maggiormente influenzano la capacità di produrre etanolo dei lieviti, che ad esempio ne producono di più a 16 °C che non a 30 °C. La produzione di etanolo è molto variabile e legata alla tolleranza dei vari ceppi nei confronti di questo composto. I lieviti con maggiore potere alcoligeno sono sicuramente quelli sporigeni e in particolare i ceppi vinari della specie *Saccharomyces cerevisiae*, che possiedono per la maggior parte un potere fermentativo attorno ai 14 °C. Numerosi ceppi riescono anche a superare i 18 °C. Un esempio di variabilità di questo carattere è la presenza di ceppi tipici delle regioni meridionali, caratterizzate da uve con maggiore concentrazione zuccherina, con un potere fermentativo maggiore rispetto a ceppi tipici di zone settentrionali.

2.2.5 Tolleranza all'etanolo

I tre caratteri esposti in precedenza, in particolare il potere fermentativo, sono fortemente legati alla resistenza del lievito al principale prodotto della fermentazione: l'etanolo. L'effetto inibitorio dell'etanolo sullo sviluppo dei lieviti, può essere la causa di rallentamenti o di arresti della fermentazione. Questo composto agisce sullo sviluppo dei lieviti, sulla loro vitalità, sull'integrità strutturale delle cellule e sulla permeabilità delle membrane plasmatiche. Modifica i fondamentali sistemi di trasporto della cellula inibendo, in particolare, quello degli zuccheri esosi, dell'ammonio e degli amminoacidi. Le specie non *Saccharomyces*, poco tolleranti all'etanolo, si sviluppano nelle prime fasi di fermentazione per poi andare a eclissarsi con l'aumentare del contenuto alcolico del mezzo. Le specie *Saccharomyces* che sono molto più tolleranti si sviluppano anche in stadi della fermentazione più avanzati prendendo il sopravvento sui lieviti presenti. Le ragioni della tolleranza a questo composto sono legate a meccanismi di difesa della cellula che modifica la fluidità della membrana plasmatica o che produce enzimi detossificanti.

2.2.6 Resistenza all'anidride solforosa

L'aggiunta di anidride solforosa ai mosti durante la vinificazione è una pratica normalissima e ormai consolidata. La capacità del lievito di non modificare la propria attività fermentativa, in relazione alle quantità normalmente aggiunte, è un fattore fondamentale. L'anidride solforosa è utilizzata in enologia per le sue numerose azioni fra cui abbiamo anche quella di agente antimicrobico nei confronti di batteri acetici, batteri lattici indesiderati e per il controllo delle popolazioni di lieviti presenti sulle uve. La frazione di SO_2 che agisce sulla popolazione dei microrganismi è quella libera che è legata principalmente al pH. L'anidride solforosa può avere diversi effetti sull'andamento della fermentazione, può, infatti, aumentare la fase di lag ritardando l'inizio, può diminuire la crescita cellulare aumentando i tempi di fermentazione e può accelerare la fase di declino. L'azione inibente della SO_2 va ricercata principalmente nella reazione con le molecole di glutazione e successivo accumulo di

glutazione ossidato nelle cellule (Gunnison e Palmes, 1973) e nella reazione con acidi nucleici (Shapiro, 1970). La resistenza all' SO₂ è un fattore genetico principalmente legato alla velocità di diffusione differenziale, nonché dalla resistenza della 3-gliceraldeide-3-fosfato idrogenasi delle cellule dei lieviti. Nell'ambito dei *Saccharomyces cerevisiae* circa il 30% dei ceppi è abbastanza tollerante, sviluppando anche in presenza di 150 mg/l di SO₂. I ceppi più sensibili, già alle concentrazioni di 100 ppm, accusano un ritardo nell'avvio del processo fermentativo. I ceppi sensibili sono però in grado di acquisire resistenza verso questo composto, resistenza però che non è stabile e che si perde gradualmente quando il lievito sviluppa in un ambiente privo di antisettico (Zambonelli et al., 2006).

2.2.7 Modalità di sviluppo

Lo sviluppo di *Saccharomyces cerevisiae* in un mezzo liquido può avvenire con diverse modalità. Il tipo di sviluppo ha una fondamentale importanza dal punto di vista tecnologico. Le modalità di sviluppo sono:

- **polverulento**, dopo la gemmazione le cellule figlie si staccano dalla madre e si disperdono nel mezzo provocando una torbidità uniforme di tipo polverulento. Le cellule si depositano lentamente e in seguito ad agitazioni si risospeso ridando origine alla torbidità;
- **a catene di cellule**, a gemmazione ultimata le cellule figlie non si staccano dalle cellule madri e rimangono unite. Se il mezzo è statico si forma un velo ondulato e continuo sul fondo che in seguito ad agitazione può distaccare senza frammentarsi o frammentare senza più ricostruirsi;
- **flocculento**, le cellule dopo la gemmazione si separano per riattaccarsi in seguito in posizione differente. Si formano in questo modo aggregati di grosse dimensioni (fiocchi) che si depositano velocemente sul fondo. In seguito ad una robusta agitazione i fiocchi si frammentano riformandosi velocemente. In questo modo il lievito non intorbidisce mai il mezzo in cui si sviluppa. E' un carattere molto ricercato nel settore della spumantizzazione;

- **schiumogeno**, il potere schiumogeno si manifesta nei ceppi sia polverulenti che flocculenti ed è legato alla idrofobicità delle cellule che tendono a galleggiare. Le cellule si legano alle bollicine di anidride carbonica che risalgono e quando le bolle arrivano in superficie, per un aumento della tensioattività, non si rompono formando una schiuma alta e persistente. Questo determina in primo luogo un problema di spazio, non potendo usare le vasche alla massima capacità, e in secondo luogo un problema di sviluppo negativo di insetti (moscerini). Può essere un carattere ricercato nel caso di rifermentazioni in autoclave;
- **“flor”**, alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* di tipo polverulento, al termine della fermentazione manifestano una tendenza al galleggiamento. In superficie, al contatto con l’aria, ricominciano a sviluppare con meccanismi ossidativi, utilizzando l’etanolo da loro stessi prodotto. I vini prodotti con questo tipo di lieviti presentano caratteristiche particolari e uniche, più o meno gradevoli (Zambonelli et al., 2006). In generale è un carattere poco frequente e conosciuto solo in certe zone (Sardegna, Spagna etc.).

2.2.8 Carattere “killer”

Alla specie *Saccharomyces cerevisiae* appartengono ceppi che hanno la capacità di inibire lo sviluppo di lieviti della stessa specie. Questi ceppi esercitano la loro azione tramite la secrezione nel mezzo di una tossina costituita da una macromolecola formata per il 90% da D-mannosio e per il 10% da una proteina (a cui si attribuisce l’effetto tossico). Dal punto di vista del comportamento nei confronti di questo carattere i lieviti si suddividono in:

- **Ceppi killer:** sintetizzano la proteina killer e sono resistenti alla sua azione;
- **Ceppi neutri:** non sintetizzano la proteina ma sono resistenti alla sua azione;
- **Ceppi sensibili:** non sintetizzano la proteina killer e sono sensibili alla sua azione;

I ceppi che possiedono questo carattere sono numerosi e presenti in quasi tutte le zone viticole. Quando il carattere fu scoperto, si penso che la sua presenza aumentasse la competitività dei ceppi e quindi assicurare lo sviluppo degli starter rispetto ai lieviti selvaggi. Si è poi dovuto ammettere che questo carattere non aumenta poi così tanto la competitività, poiché non agisce sui ceppi neutri o su altri ceppi killer, la proteina non agisce al massimo al pH del vino e i ceppi produttori devono essere già in pieno sviluppo per secernere la proteina.

2.2.9 Influenza della temperatura

La temperatura è uno dei fattori che influisce maggiormente sull'andamento delle fermentazioni e sulla qualità dei vini. Di norma le temperature enologiche sono mantenute a livelli medi, raramente scendono al di sotto dei 10 °C e non salgono oltre i 40 °C.

Saccharomyces cerevisiae è un lievito mesofilo, la cui temperatura ottimale di sviluppo si attesta attorno 31-33 °C, quella massima è superiore a 37 °C e quella minima al di sotto di 0 °C. Una temperatura di 32 °C permette sì un veloce sviluppo iniziale ma anticipa eccessivamente la morte delle cellule e il conseguente arresto della fermentazione. Le temperature in cui la fermentazione è più completa, anche se inizialmente più lenta, sono quelle comprese tra 26 e 28 °C. La capacità di dare buone fermentazioni alle temperature di 10-12 °C è legata al ceppo e in particolare al vigore fermentativo: in *Saccharomyces cerevisiae* non ci sono ceppi crio-tolleranti e quelli che lavorano meglio alle basse temperature sono quelli più vigorosi. Per quanto riguarda le alte temperature, oltre 36 °C, ci sono ceppi termotolleranti che producono inoltre alte quantità di glicerolo e hanno un'intensa attività malo-alcolica.

2.2.10 La produzione di composti solforati

Può incidere negativamente sulla componente aromatica del vino. Questi composti hanno tra loro un diverso punto di ebollizione e hanno diverse soglie di percezione. Come per esempio l'idrogeno solforato (H₂S), responsabile dell'odore di uova

marce, il 2-marcaptoetanolo (aroma di pollame); il 2-metiltioetanolo (aroma di fagioli) e il 4-metiltiobutanolo (aroma di aglio). Queste molecole scaturiscono un insieme di reazioni enzimatiche e non enzimatiche del metabolismo dei lieviti, influenzate dalla temperatura di fermentazione. I principali composti solforati del vino sono soprattutto da solfiti ed idrogeno solforato, che derivano dalla riduzione dei solfati presenti nel mosto per azione dei lieviti, che posseggono la capacità di sintetizzare gli aminoacidi solforati a partire dai solfati (Rauhut, 1993). I solfiti presenti nel mosto vengono assorbiti dalle cellule del lievito attraverso l'enzima permeasi e, poi sono ridotti a solfiti e poi a idrogeno solforato attraverso l'enzima solfito riduttasi.

2.2.11 La produzione di idrogeno solforato

E' il prodotto finale della riduzione dei solfati ad opera della solfato sintetasi ed il prodotto iniziale della seconda fase di biosintesi degli aminoacidi solforati. Solo una piccola parte viene impiegata dai lieviti per la seconda reazione e così nel mezzo resta una parte eccedente. Questo valore varia nel vino in funzione della varietà dell' uva, mentre quantità maggiori riportano il prodotto all'analisi sensoriale sgradevole con sentore di uova marce. La sua presenza nel mezzo dipende dalla varietà delle uve e dalla composizione del mosto e dalle condizioni di fermentazione. *S.Cerevisie* ha ceppi alto produttori di idrogeno solforato fino ad 1 mg/l, causano gravi problemi a livello del profilo aromatico.

2.2.12 La produzione di glicerolo

assume molta importanza come secondo composto dopo l'alcol etilico; prodotto dai lieviti nel corso della fermentazione, contribuisce sulla viscosità e sulla morbidezza del vino con un effetto positivo sul gusto, svolge anche un ruolo importante sul bouquet e il flavour del vino. Il suo contenuto varia tra 1-12 g/l, concentrazioni maggiori sono sinonimo di qualità. Queste concentrazioni derivano dalle condizioni chimico-fisiche del mosto, dalla sua composizione, dal contenuto iniziale degli

zuccheri, dalla temperatura di fermentazione, dal pH, dall'ossigeno, dall'acidità, dalla solfitazione e in modo rilevante dai lieviti che hanno partecipato nella fermentazione. I *S. Cerevisiae*, *S. Ludwigii* e *Z. bailii* sono tra i maggiori produttori di glicerolo, mentre le specie degli apiculati, sono detti bassi produttori per via della loro scarsa capacità di produrre etanolo e completare la fermentazione alcolica.

2.2.13 La tolleranza agli additivi tecnologici

Insieme all'alcol etilico, può influenzare l'attività fermentativa dei lieviti. Tra questi ci sono l'anidride solforosa e i prodotti fitosanitari impiegati nell'agricoltura come il rame e i pesticidi, che possono inibire molto la fase lag dello sviluppo cellulare. *S.Cerevisiae* nel tempo, ha sviluppato una notevole resistenza a questi prodotti.

CAPITOLO 3

Sostanze indesiderate nei vini: ammine biogene ed etilcarbammato

Alcune molecole che possono essere eventualmente presenti in alcuni vini sono sostanze indesiderate che possono avere un effetto nocivo per il consumatore. Si tratta principalmente di Ammine biogene, etilcarbammato ed ocratossina A (OTA).

3.1 Ammine biogene e loro presenza nei vini

Le ammine biogene (AB) sono basi organiche contenenti azoto e possono avere una struttura chimica alifatica (putrescina, cadaverina e le poliammine spermina e spermidina), aromatica (tiramina, 2-feniletilamina) o eterociclica (istamina e triptamina). Sono prodotte dalla decarbossilazione di aminoacidi ad opera di enzimi microbici. Sono presenti anche delle ammine naturali, che devono essere distinte dalle altre ammine, si trovano in molti prodotti, come i vegetali, la carne etc e non hanno effetti tossicologici, quindi non danno preoccupazioni.

Le ammine maggiormente presenti nel vino sono l'istamina (HIS), la putrescina (PUT), la tiramina (TYR) e la cadaverina (CAD) ma sono presenti anche la triptamina (TRY), la 2-feniletilamina (PHE), la spermina (SPM), la spermidina (SPD) e l'agmatina (AGM). Le ammine biogene derivano principalmente dalla decarbossilazione degli aminoacidi precursori, che viene catalizzata da enzimi amminoacido-decarbossilasi di origine endogena e microbica (ten Brink et al., 1990). Ogni ammina ha un amminoacido precursore corrispondente (es. tirosina, istidina, ornitina, lisina, triptofano, fenilalanina e arginina) mentre spermina e spermidina si formano attraverso un'ulteriore degradazione della putrescina. Questi composti possono essere presenti in numerosi alimenti, comprese le bevande fermentate come il vino. In figura 1 vengono riportati gli aminoacidi precursori delle ammine biogene nel vino, dove l'arginina è il principale amminoacido. I Batteri Lattici (LAB) del vino la catabolizzano con l'enzima arginina-deaminasi. Ci sono tre possibili origini di ammine biogene nei vini: possono essere presenti nel mosto, possono essere formati dai lieviti durante la fermentazione alcolica e possono derivare dall'azione dei batteri coinvolti nella fermentazione malolattica.

Le concentrazioni rilevate all'interno del vino sono minori rispetto a quelle rilevate negli altri alimenti fermentati (quali formaggi e salami ad esempio) e variano molto da un vino all'altro. Il contenuto totale di ammine nel vino varia da livelli di tracce a livelli di 130 mg/l (Soufleros et al., 1998). Tra queste sostanze azotate, la più abbondante è di solito la putrescina (Soufleros et al., 1998; Lethonen, 1996). Le ammine non volatili che si ritrovano più frequentemente nel vino sono l'istamina, la tiramina, la putrescina, la cadaverina, la spermina, la spermidina così come sono state sporadicamente riscontrate l'agmatina, la triptamina e la serotonina (Lethonen, 1996; Lehtonen et al., 1992; Busto et al., 1995). Vengono considerate elevate, con possibile rischio per la salute del consumatore, quando sono a 15-20 mg/l; al contrario, se inferiori o uguali a 10 mg/l non danno nessuna preoccupazione sulla salute.

La quantità di ammine biogene varia nei vini a seconda di diversi fattori come la zona di produzione, il tipo di vinificazione, il pH, la temperatura di fermentazione (Lonvaud-Funel, 2001).

3.1.1 Funzione ed importanza fisiologica

Le ammine biogene possono costituire una fonte di azoto e fungere da precursori per la sintesi di ormoni, alcaloidi, acidi nucleici e proteine. Possono essere importanti per la composizione aromatica di alcuni alimenti (Shahidi et al., 1994). Le poliammide sono componenti imprescindibili per tutte le cellule viventi poiché sono indispensabili per dare un normale funzionamento dell'intestino e facilitare il sistema immunitario (Bardócz et al., 1993). Esiste una riserva di poliammine che viene presa dall'organismo quando ne ha bisogno (Bardócz et al., 1993). Alcune classi di ammine, come le catecolamine, indolamine e istamina, presentano una funzione importante sul sistema nervoso e sul controllo della pressione sanguigna (Halász et al., 1994). In particolare, feniletilamina e tiramina provocano un aumento della pressione sanguigna, invece l'istamina la riduce. L'istamina è un importante mediatore primario delle risposte allergiche e per questo motivo le intossicazioni da istamina sono diagnosticate come allergie alimentari (Halasz et al., 1994). La spermina,

spermidina e putrescina, impediscono l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi e questo effetto antiossidante è dovuto al numero di gruppi amminici presenti nella poliamina (Lonvas, 1991). Anche la tiramina ha un effetto antiossidante grazie alla presenza del gruppo idrossilico.

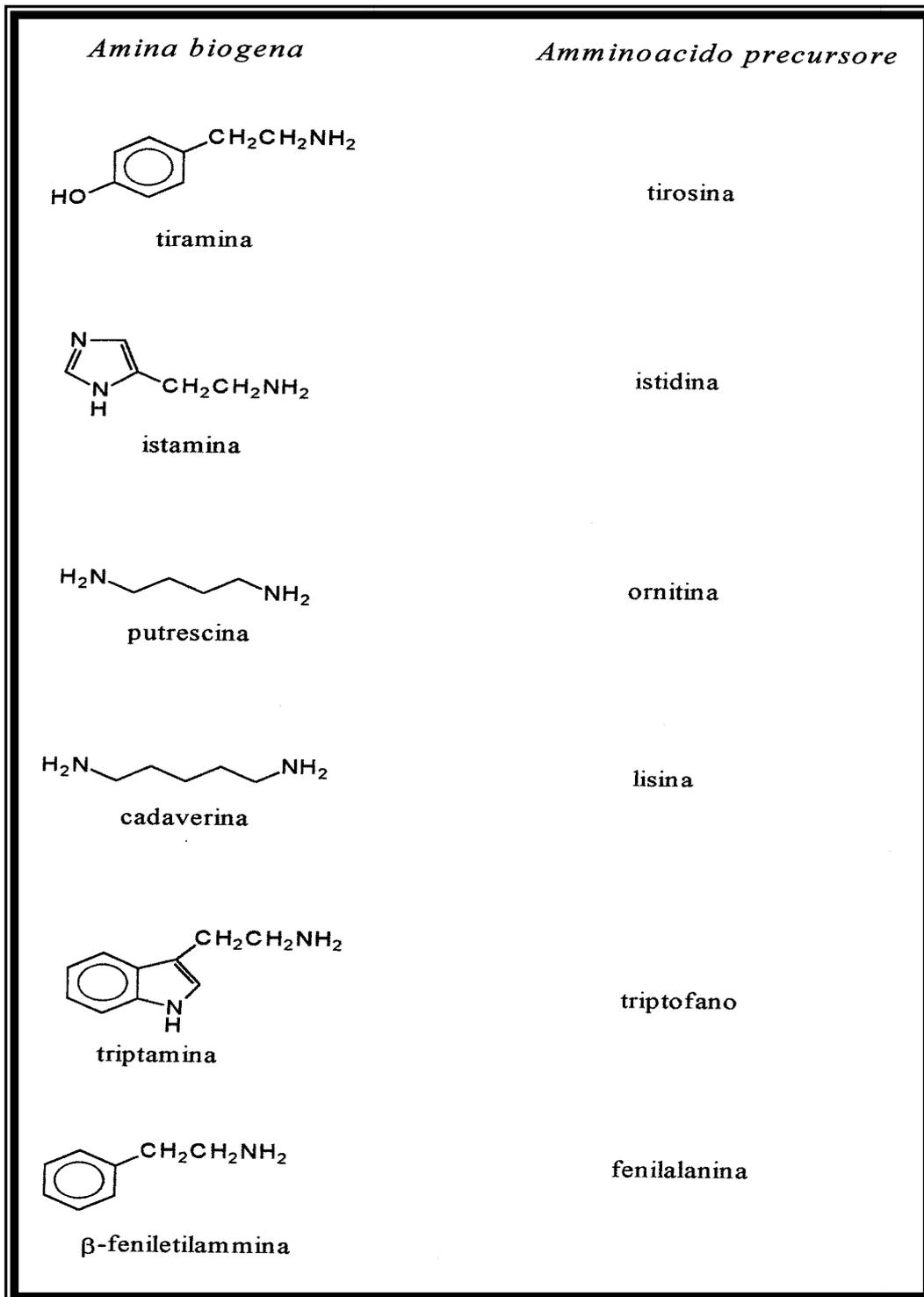


Figura 3.1: Amine biogene e aminoacidi precursori

Per quanto riguarda il ruolo fisiologico rivestito dalle ammine per i microrganismi produttori, bisogna ricordare che il processo di decarbossilazione è un processo energetico che assume molta importanza in ambienti nutrizionalmente poveri. Infatti questo sistema può generare una traslocazione di cariche attraverso la membrana citoplasmatica e ciò modifica il potenziale di membrana con produzione di energia per la cellula (Konings et al., 1997). La possibilità di creare il potenziale necessario per attuare un gradiente ionico elettrochimico sta nella caratteristica permeabilità limitata della membrana cellulare. Il gradiente ionico, più importante, è quello protonico (Mitchell, 1996), per questo motivo la membrana è fornita di pompe protoniche per creare questo gradiente. Il complesso dei gradienti ionici descrive la forza proton-motrice che regola il flusso dei protoni con cui si genera energia ed è un meccanismo della produzione dell'ATP con il sistema ATP-asi. L'ATP prodotto è fondamentale alla cellula per la sintesi di costituenti cellulari, per il mantenimento di altri processi energetici nel citoplasma e nella membrana citoplasmatica e per la creazione della forza protonmotrice (Maloney, 1977).

Il processo di decarbossilazione che porta alla formazione di ammine biogene genera una traslocazione di cariche attraverso la membrana citoplasmatica. Tale traslocazione di carica è generata dall'attività del sistema di trasporto cellulare antiporto, che in presenza di prodotti finali simili strutturalmente ai loro precursori, può agire sia per accumulare i precursori che per allontanare i prodotti finali. Tale meccanismo di trasporto è energeticamente favorevole per cellula, infatti è favorito sia dal gradiente di concentrazione del precursore, tra interno ed esterno, sia da quello dei prodotti finali.

Al fine di ottenere energia tale sistema deve coinvolgere molecole cariche che possano dar luogo ad un differenziale tra le due parti della membrana cellulare, come accade tra aminoacido precursore e amina. Un esempio di tale meccanismo riguarda la formazione di istamina ad opera dell'attività enzimatica di *Lactobacillus buchneri*. Il processo metabolico prende origine dall'assorbimento di istidina neutra per mezzo di un trasportatore specifico che contemporaneamente espelle istamina, carica

positivamente, precedentemente prodotta. La carica dell'istamina rende lo scambio istidina/istamina un processo elettrogenico, con formazione di un differenziale di potenziale. Quest'ultimo insieme al diverso pH dei due mezzi genera una forza protonmotrice. Nella Figura 3.2 viene mostrata una via di conservazione dell'energia metabolica.

Lo stesso processo può essere riscontrato per le altre ammine biogene. Infatti i microrganismi nel loro ambiente di crescita vanno incontro frequentemente a fluttuazioni energetiche nella composizione del loro substrato e possono passare da momenti di gran abbondanza nutrizionale a momenti di carenza e stress. Quando le risorse energetiche scarseggiano, la glicolisi diminuisce velocemente e il processo di scambio amminoacido/ammina diventa un processo elettrogenico, perché lo spostamento di una carica positiva, dall'interno verso l'esterno, crea una differenza di potenziale. Quindi la formazione delle ammine ha una ragione energetica poiché costituisce uno dei tanti metodi secondari di produzione di energia, che si innescano in condizioni di difficoltà nutrizionale. Inoltre i meccanismi energetici secondari sono sfruttati dai microrganismi per espellere dalla cellula composti metabolici che potrebbero accumularsi.

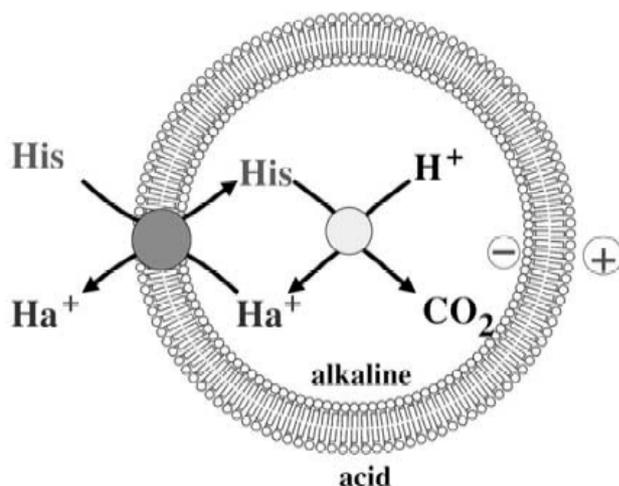


Figura 3.2: Conservazione dell'energia metabolica attraverso lo scambio istidina/istamina dopo decarbossilazione (Konings, 2002).

3.1.2 Meccanismo di produzione delle ammine biogene

Le ammine biogene sono il prodotto finale della decarbossilazione di aminoacidi liberi da parte dell'enzima decarbossilasi specifico, di cui alcuni ceppi microbici sono dotati. Questo processo metabolico viene svolto nel citoplasma della cellula. La capacità di decarbossilare gli aminoacidi è una caratteristica ceppo dipendente piuttosto che una proprietà di specie o genere (Bover – Cid e Holzapfel, 1999). La decarbossilazione implica la rimozione del gruppo α -carbossilico dall'aminoacido per ottenere così l'amina. In figura 3.3 si può vedere un esempio di meccanismo di decarbossilazione della fenilalanina che conduce all'ottenimento di feniletilamina e nella figura 3.4 vengono riassunte le principali ammine biogene e i relativi precursori.

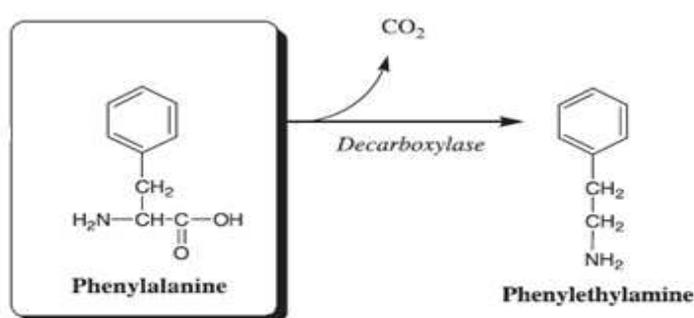


Figura 3.3: Meccanismo di decarbossilazione della fenilalanina

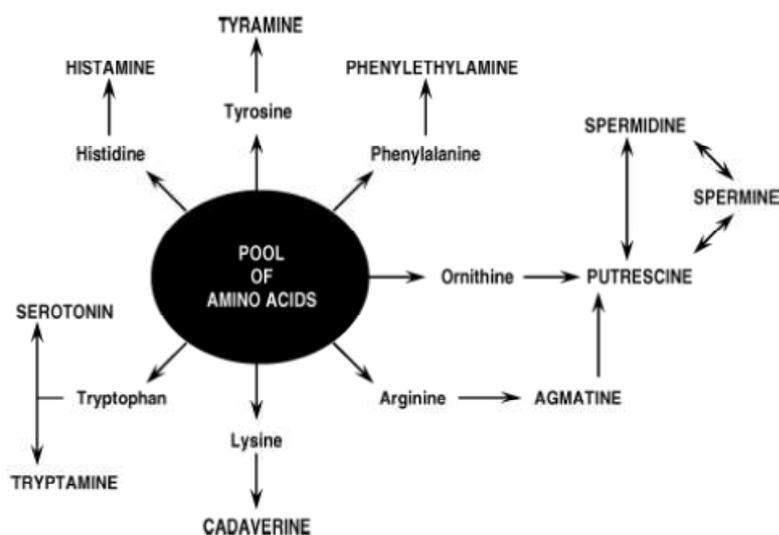


Figura 3.4: Aminoacidi precursori e ammine biogene (Ancin-Azpilicuenta et al., 2008)

Di solito, durante i primi stadi della fermentazione, l'elevato contenuto di nutrienti non porta ad una produzione marcata di ammine biogene. Infatti, questi composti, essendo metaboliti derivanti da meccanismi energetici secondari, vengono prodotti quando le cellule si trovano in condizione di stress nutrizionale (mancanza di fonti azotate e di carbonio) o ambientale (Konings et al., 1997).

La fonte principale di ammonio per i lieviti nel mosto sono gli amminoacidi presenti. Alla fine della fermentazione, quando i nutrienti ad alto contenuto energetico sono esauriti, può aumentare l'attività proteolitica dei microrganismi presenti, quali, ad esempio, *Oenococcus oeni* (Halasz et al., 1994). E' stato riportato che la produzione di istamina aumenta quando lo sviluppo microbico viene limitato da condizioni ostili, quali assenza di carboidrati fermentescibili e presenza di alte concentrazioni di acido malico. Infatti, la decarbossilazione degli amminoacidi è per il microrganismo una via per produrre energia (Konings et al., 1997). Alcuni autori, in contrasto con quanto descritto sopra, hanno dimostrato che la decarbossilazione della tirosina diminuisce molto al termine della fase esponenziale (Moreno-Arribas et al., 2000) mentre è più alta nelle prime fasi di fermentazione.

3.1.3 Fattori che favoriscono la produzione di ammine biogene

Vi sono molti fattori che condizionano l'accumulo di ammine biogene negli alimenti, e quindi nel vino. Ciò comporta un'ampia variabilità nel contenuto totale di ammine nei vini. E' importante sottolineare che, una volta formatesi, è molto difficile eliminare le ammine perciò si raccomanda di controllare, per quanto possibile, i fattori che possono avere un ruolo durante la loro formazione.

Alcuni fattori possono avere un effetto indiretto sulla quantità di ammine accumulate nei vini dovuto all'influenza sulla concentrazione degli amminoacidi precursori della materia prima; altri fattori invece possono avere un effetto diretto sullo sviluppo di microrganismi che possiedono capacità amminogenica. E' importante sottolineare che tutti i fattori coinvolti sono correlati e, di conseguenza è difficile conoscere gli

effetti individuali di ciascuno di loro. Tra i fattori che influenzano la concentrazione delle ammine nel vino possiamo ricordare:

- **composizione della materia prima:** sia nell'uva che nel mosto è presente una bassa concentrazione di ammine, anche se sono state riscontrate diverse concentrazioni di questi composti poiché le ammine, specialmente le poliammine, sono componenti indispensabili di tutte le cellule viventi (Silla-Santos, 1996). Inoltre questi composti possono essere un fattore chiave di protezione per le cellule stressate e alcune ammine, come putrescina, spermidina e istamina, sono, a bassi livelli, normali costituenti delle materie prime (Hajós et al., 2000). E' stato inoltre dimostrato che stress in campo derivanti da cause diverse possono alterare il contenuto delle ammine nelle uve. Infatti Hajos et al. (2000) hanno riportato che alcuni stress biotici, come attacchi di *Botrytis cinerea*, possono alterare la composizione degli acini incrementando il contenuto di ammine. Per quanto riguarda le ammine volatili, queste sono state trovate sia nell'uva che nel mosto (González-Marco et al., 2006).
- **Concentrazioni di amminoacidi:** come scritto in precedenza le ammine biogene vengono formate attraverso una reazione di decarbossilazione dei corrispondenti amminoacidi precursori attraverso l'azione di enzimi decarbossilasi prodotti dai microrganismi (ten Brink et al., 1990). Perciò, requisito fondamentale per la produzione di amine biogene è la disponibilità di precursori. Gli amminoacidi presenti negli acini costituiscono la risorsa principale di azoto assimilabile da parte dei lieviti e sono utilizzati da questi durante la fermentazione alcolica (Tusseau et al., 1989). Inoltre gli amminoacidi costituiscono anche una fonte di nutrimento per i batteri durante le fermentazioni secondarie (Soufleros et al., 2003). La concentrazione degli amminoacidi nel mosto dipende da diversi fattori e per questo molti autori hanno studiato la loro possibile relazione con la produzione di ammine nel vino. Infatti la frazione aminoacidica nel mosto dipende dalla varietà,

dall'origine geografica, dalla fertilizzazione azotata (Spayd e Andersen-Baggie, 1996), dal grado di maturazione delle uve (Millery et al., 1986), dall'annata e dalle condizioni climatiche (Huang e Ough, 1991), dalle tecnologie di vinificazione (come la chiarificazione in prefermentazione) e dalla durata del processo di macerazione (Guitart et al., 1997).

Bertrand et al. (1991) hanno riscontrato che la fertilizzazione azotata nei vigneti di varietà Merlot comportava un aumento di composti azotati nel mosto così come un aumento nella concentrazione di istamina, putrescina, cadaverina e feniletilammina nel vino. Tuttavia nessuna correlazione è stata osservata tra la formazione di ammine biogene nei vini e il consumo da parte dei lieviti degli amminoacidi precursori durante la fermentazione alcolica.

Landete et al. (2005) hanno quantificato la concentrazione di istamina, tiramina, putrescina e feniletilammina in vini prodotti da diverse varietà e hanno riscontrato un'influenza significativa della varietà sulla concentrazione finale delle ammine. Poiché i suoli dove le diverse varietà venivano coltivate presentavano una composizione simile e il mosto veniva sottoposto a processi di vinificazione simili, queste differenze tra le concentrazioni delle ammine biogene possono venire attribuite alla diversa concentrazione degli amminoacidi precursori così come alla diversa capacità amminogenica dei ceppi isolati dai campioni (*Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus brevis*). Per quanto riguarda la relazione tra il consumo di amminoacidi precursori e la formazione delle ammine durante la fermentazione malolattica alcuni autori hanno riscontrato una diminuzione significativa della concentrazione degli amminoacidi e un conseguente incremento del contenuto di ammine biogene (Martin-Alvarez et al., 2006). Inoltre Herbert et al. (2005) hanno studiato la relazione tra la quantità di amminoacidi liberi nel mosto di differenti varietà con la quantità totale di ammine biogene riscontrate in vini rossi sottoposti sia a fermentazione alcolica che a fermentazione malolattica. Essi hanno riscontrato che le varietà

che presentavano una più alta quantità di amminoacidi mostravano le più alte quantità di ammine nei vini. Da questi studi può essere concluso che un'alta quantità di amminoacidi nel mosto può dare origine ad alte quantità di ammine biogene dopo la fermentazione malolattica. Tuttavia in condizioni reali è difficile stabilire una correlazione tra la concentrazione delle ammine e il consumo dei loro amminoacidi precursori durante la fermentazione alcolica. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che durante la fermentazione alcolica i lieviti usano principalmente gli amminoacidi come una fonte di azoto e in misura minore nella reazione di decarbossilazione con cui vengono prodotte le ammine. E' inoltre necessario prendere in considerazione la capacità amminogenica sia dei lieviti sia dei batteri che sviluppano durante le fermentazioni alcoliche e malolattiche (Ancin-Azpilicueta et al., 2008).

- **Fonti di Carbonio:** In presenza di fonti di carbonio, i microrganismi utilizzeranno queste come fonte preferenziale di energia e l'accumulo di ammine biogene sarà ridotto.
- **Influenza delle condizioni di vinificazione:** le condizioni in cui vengono condotte sia la fermentazione alcolica, sia quella malo lattica possono avere una grande influenza sull'accumulo di ammine biogene nel vino. Per questa ragione, molti autori hanno investigato l'influenza di fattori quali pH, temperatura, concentrazione di SO₂, torbidità e acidità volatile. Tutti questi fattori giocano un ruolo diverso poiché possono avere da un lato un effetto diretto sullo sviluppo di microrganismi ad alto potere aminogenico e dall'altro, un effetto indiretto sulla concentrazione degli aminoacidi nel mosto. Inoltre, poiché le condizioni di vinificazione possono essere molto differenti, la relazione tra queste variabili e il contenuto in ammine biogene nei vini non è stata ancora chiarita completamente.

Alcuni autori ritengono che il pH influenzi la formazione delle ammine durante la fermentazione malolattica, così come l'aggiunta di SO₂ a bassi livelli dopo la fermentazione alcolica può favorire lo sviluppo di *Pediococcus*, batteri ad alta

capacità amminogenica (Aerny, 1990). Inoltre Vidal-Carou et al. (1990) hanno riscontrato il più alto contenuto di ammine in vini che presentavano un basso contenuto di SO₂. Sono stati studiati anche gli effetti di altre variabili e altri composti come acido malico, acido citrico, etanolo e zuccheri. Rollan et al. (1995) hanno riscontrato che alti livelli di etanolo (12% v/v), acido lattico e citrico possono ridurre l'attività dell'istidina decarbossilasi di una sospensione cellulare di *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos* 9204). Soufleros et al. (1998) ha trovato una correlazione negativa tra l'accumulo di ammine biogene (ad eccezione della feniletilammina e della putrescina) e la quantità di acido malico e citrico.

Per quanto riguarda la temperatura, essa ha un'azione diretta sullo sviluppo cellulare, ma anche sull'attività degli enzimi, come quelli proteolitici e quelli de carbossilici (Silla Santos, 1996). Anche il pH, come la temperatura, ha un'influenza diretta sullo sviluppo cellulare e sulle diverse attività metaboliche dei microrganismi produttori di ammine. E' noto che ogni microrganismo è caratterizzato da un proprio ottimo di pH e due valori critici. Inoltre il pH influenza anche gli enzimi decarbossilasi. L'istidina e la tirosina decarbossilasi ad esempio hanno un ottimo tra 5.0 e 5.5 mentre a pH maggiori di 6 la loro attività subisce delle modificazioni (Chander et al., 1988).

- **Influenza dei processi di vinificazione:** nella maggior parte degli studi è stato osservato che i vini rossi contengono un quantitativo di ammine biogene maggiore rispetto ai vini bianchi o rosè. Martín-Alvarez et al. (2006), hanno studiato l'influenza di alcune pratiche tecnologiche sull'accumulo di ammine biogene nel vino rosso. Questo studio ha mostrato un'enorme variabilità tra le diverse annate di produzione per tutte le ammine studiate. E' stato dimostrato che un più prolungato tempo di macerazione incrementa la produzione di istamina, tiramina e putrescina mentre l'invecchiamento dei vini porta ad un aumento di putrescina e metilammina. Infatti lunghe macerazioni o un esteso contatto con le fecce e l'evolversi della fermentazione malo lattica ne

favoriscono la formazione (Lonvaud-Funel, 2001). Altri autori hanno dimostrato che il contenuto di ammine biogene nei vini può essere ridotto attraverso l'implementazione di alcune tecniche utilizzate in vinificazione come il trattamento termico dei grappoli dopo pressatura (Inigo e Bravo, 1980) e l'aggiunta di bentonite (Vidal-Carou e Mariné-Font, 1985) che facilita l'adsorbimento delle ammine prodotte dai microrganismi riducendone il loro contenuto nel prodotto finale.

Anche il pH influenza molto l'attività biologica e il tipo di microrganismi presenti nel vino: è riportato che a più alti pH le ammine biogene sono prodotte in alte quantità (Lonvaud-Funel e Joyeux, 1994).

Concludendo, sebbene la formazione di ammine biogene nei vini sia affetta da diversi fattori, spesso correlati tra loro, può essere concluso che si riscontra una maggiore concentrazione di queste sostanze nei vini rossi e che i fattori che potenziano il loro accumulo durante la vinificazione sono un'alta temperatura di fermentazione, un più alto tempo di macerazione, pH non eccessivamente acidi, elevata biomassa dei lieviti, sviluppo della fermentazione malolattica e bassi livelli di SO₂.

3.1.4.Tossicologia

Se le ammine biogene sono presenti in elevate concentrazioni all'interno di un alimento, possono essere causa di effetti tossici sull'organismo del consumatore.. Possono provocare effetti vasoattivi (tiramina, feniletilamina, triptamina), psicoattivi (istamina) o entrambi (istidina). I sintomi di una intossicazione sono molte: nausea, disturbi gastro-intestinali, difficoltà respiratorie, sudorazione, palpitazioni cardiache, mal di testa, orticaria e iper o ipotensione. L'istamina agisce con due diversi tipi di recettori (H1 e H2) e provoca la dilatazione dei vasi sanguigni periferici, dei capillari e delle arterie determinando ipotensione, rossore e mal di testa (Stratton et al. 1991), oltre che una contrazione della muscolatura liscia dell'intestino, causando crampi, diarrea e vomito (Taylor 1986). La putrescina e la cadaverina hanno effetti

tossicologici minori, ma la loro presenza potenzia la tossicità di istamina e tiramina, perchè limitano la loro completa degradazione, interagendo con le ammino ossidasi. Le ammine sono anche possibili precursori di composti mutageni perchè alcune di esse possono essere nitrose e essere precursori di nitrosammine che sono cancerogene e sono un serio pericolo per la salute umana (Shalaby,1996).

Ammina	Effetti farmacologici
istamina	Libera adrenalina e noradrenalina Stimola la muscolatura liscia dell'utero, intestino, tratto respiratorio Stimola i neuroni motori e sensoriali Controlla la secrezione gastrica
Tiramina	Vasocostrittore Aumenta il battito cardiaco Causa lacrimazione e salivazione Aumento della glicemia Causa emicrania
putrescina-cadaverina	Ipotensione Bradycardia Potenziano la tossicità delle altre ammine
β -feniletilamina	Rilascia noradrenalina Aumenta la pressione sanguigna Causa emicrania
Triptamina	Aumenta la pressione sanguigna

Tabella 3.1: Effetti tossicologici delle ammine biogene

3.1.5 Legislazione

Il Decreto Legislativo n. 531 del 30-12-1992, attuativo della Direttiva CEE 91/493, prevede che il valore medio di istamina di nove campioni prelevati da un lotto non deve superare 100 mg Kg^{-1} , che due unità campionarie possono avere un tenore

compreso fra 100-200 mg Kg⁻¹, solo due unità campionarie possono avere tenore superiore a 200 mg Kg⁻¹. Questi limiti si applicano solo ai pesci delle famiglie degli Sgombridi e Clupeidi non trattati con maturazione enzimatica in salamoia; in questo caso i tenori di istamina non devono superare il doppio dei valori precedentemente illustrati.

Livelli di istamina superiori a 500-1000 mg kg⁻¹ di prodotto sono considerati potenzialmente tossici per la salute umana. Gli effetti di istamina in rapporto alla quantità presa nel corso di un pasto, può indurre reazioni deboli (8-40 mg), moderate (70-1000 mg) o importanti (1500-4000 mg) (Ienistea, 1973). In generale, nei prodotti alimentari, dosi di 500-1000 mg kg⁻¹ di istamina sono considerate potenzialmente pericolose. Per le altre ammine non sono ancora note le concentrazioni e i livelli di pericolosità per la salute umana. Il consumo di 6 mg di tiramina può produrre deboli reazioni mentre il consumo di 10-25 mg di questa ammina da parte di pazienti che facciano uso di sostanze mono-ammino ossidasi può essere causa di importanti conseguenze (McCabe, 1986). L'ingestione di 100-125 mg di tiramina può indurre emicrania (Crock, 1981). Per i pazienti sotto trattamento di farmaci inibitori delle MAO sono raccomandati valori massimi di ingestione di tiramina pari a 6 mg (McCabe, 1986; Shalaby, 1993).

Valori soglia di 100 - 800 mg kg⁻¹ per la tiramina e 30 mg kg⁻¹ per la fenilettilamina sono stati riportati come dosi tossiche negli alimenti (Ten Brink et al., 1990). Inoltre, Sandler et al., (1974) hanno riportato che l'assunzione di 3 mg di fenilettilamina causano emicrania in soggetti sotto terapia di farmaci anti-MAO. Anche per l'istamina la soglia di tossicità dipende dalla presenza di farmaci inibitori delle MAO, di alcool e di altre ammine (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina) (Silla Santos, 1996). Così si suggerisce come limite di accettabilità per l'istamina 100 mg/kg di alimento solido e 2 mg/l di bevanda alcolica (Ten Brink et al., 1990; Silla Santos, 1996). Con l'eccezione della quantità di istamina in alcuni prodotti ittici, non esistono attualmente provvedimenti legislativi che ne stabiliscono i limiti di accettabilità negli alimenti.

3.2 Produzione di etilcarbammato

L'etilcarbammato, detto anche uretano o carbammato di etile, è un composto prodotto nei vini nel corso della fermentazione, e possiede un elevato potere cancerogeno. Solo Canada e Stati Uniti hanno limiti legali per le concentrazioni di questo composto: in Canada il limite legale per i vini da tavola commercializzati è di 30 µg/l, invece negli Stati Uniti, la Food and Drug Administration già nel 1988 ha stabilito che i vini con contenuto alcolico ≤14%, devono avere non più di 15 µg/l, mentre i vini con contenuto alcolico >14% non devono superare i 60 µg/l (US FDA 2000). I lieviti *Saccharomyces* possono prendere parte nella sintesi dell'etilcarbammato producendo i precursori, che sono l'urea e l'etanolo.

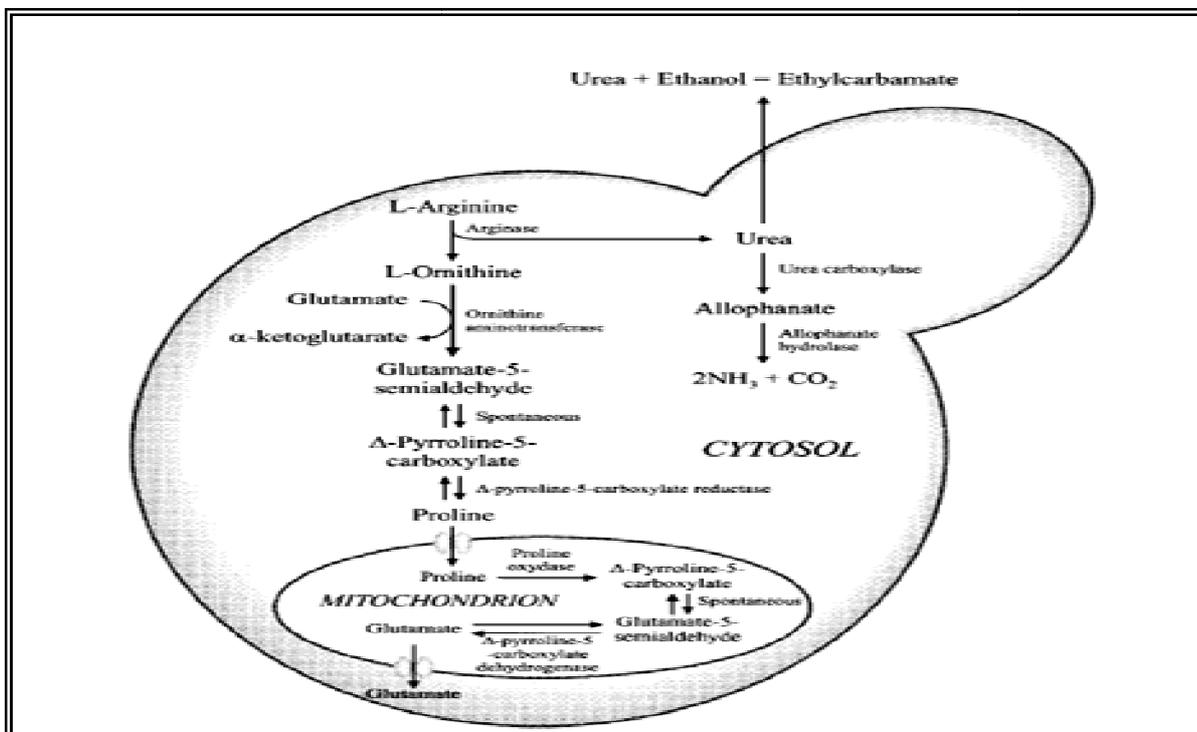
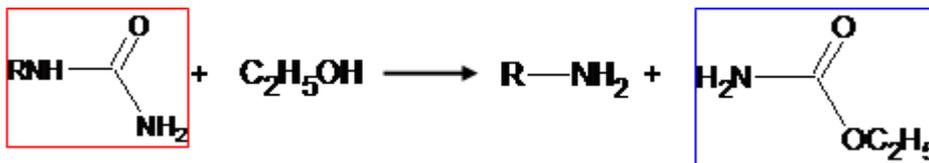


Figura 3.5: Schema della formazione di urea nella cellula di lievito

Questa reazione ha bisogno di precursori come il carbamil-fosfato, citrullina e l'urea. I lieviti possono produrre urea dopo la degradazione dell'arginina, che è l'amminoacido più presente nei mosti e nei vini. Anche i batteri hanno la capacità di produrre etilcarbammato. Con la degradazione dell'arginina, si producono metaboliti precursori di molecole pericolose, si ottengono intermedi come citrullina e carbamil-fosfato, con quest'ultimo composto può combinarsi con l'etanolo per formare etilcarbammato. Importante è la presenza di ammonio nel mezzo, se è elevato, l'urea non viene subito degradata, ma viene rilasciata nel mezzo per essere utilizzata quando l'ammonio è del tutto esaurito, invece se l'ammonio non viene esaurita l'urea rimane nel mezzo, così si combina con l'etanolo. La capacità di escrezione dell'urea è dipendente dal ceppo che conduce la fermentazione alcolica.

3.3 Produzione di Ocratossina A (OTA)

L'ocratossina A è una micotossina, tra le più cancerogene e immunodepressive., ha importanza nel vino perché può essere presente come contaminante dopo lo sviluppo di muffe tossigene presenti sulle uve e sono quelle del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, che sviluppano nelle ultime fasi della maturazione delle uve, in particolare in uve rosse. Questa micotossina può minacciare la salute umana: per questa ragione la Comunità Europea ha fissato per questa sostanza il limite di 2 µg/l nel vino, mentre nell' uva passita la quantità di ocratossina non deve superare 10 µg/Kg. Tecniche di riduzione di questa micotossina sono l'impiego di caseinato di potassio, con carbone attivo o con l'aggiunta di esterasi di origine microbica, capaci di degradarla a fenilalanina e ocratossina- α , sostanze che non presentano tossicità per il consumatore.

CAPITOLO 4

Profili aromatici dei vini

4.1 Quadro aromatico del vino

Il vino non è caratterizzato solo da alcol, ma anche altre molecole che ne descrivono il profilo aromatico. Gli aromi che si sviluppano nel corso della fermentazione e dell'invecchiamento, vengono dall'idrolisi enzimatica e chimica delle molecole odorifere, dalle forme glicosilate e libere che daranno inizio ai precursori dell'aroma. Le uve si distinguono da aromi varietali primari, che provengono dal vitigno e sono molto influenzati dalle condizioni pedoclimatiche. Poi ci sono gli aromi secondari che provengono dalla fermentazione alcolica e malolattica, con odori di fiori, frutta e vegetali. Infine ci sono gli aromi terziari che provengono dalle fasi dell'invecchiamento, con odori di speziato, tostato. L'aroma dei vini è creato da diversi composti volatili e le loro quantità sono molto variabili, il loro impatto olfattivo proviene dalla loro concentrazione e dalla loro struttura. Queste sostanze sono presenti nelle cellule interne della buccia e sono rilasciate nel vino in fase di macerazione e fermentazione. Molte sostanze dell'aroma varietale, come i terpeni e i norisoprenoidi, si trovano nel vino in forma libera, con proprietà odoranti, o in forma glicosilata che non si percepisce all'olfatto perché la molecola attiva è legata a uno zucchero e la rende non volatile. I precursori di aroma sono molto importanti perché le forme inodori dei composti odorosi, sviluppano dopo attività enzimatiche.

4.2 Alcoli superiori prodotti in fermentazione alcolica

Tra i composti più importanti per l'aroma del vino, che derivano dalla fermentazione alcolica sono: gli alcoli superiori, gli esteri etilici degli acidi grassi e i loro acetati e in minore misura l'acetaldeide (Rapp e Versini, 1991; Calleja e Falqué, 2005). I composti primari che derivano dalla fermentazione, ovvero etanolo e CO₂ e il composto secondario principale ossia il glicerolo, contribuiscono anch'essi alla qualità organolettica del vino, soprattutto dal punto di vista del sapore, in misura minore dal punto di vista dell'aroma. Dopo l'acqua, l'alcol etilico è il composto più presente nel vino. L'etanolo proviene essenzialmente dalla fermentazione alcolica realizzata dai lieviti, anche se una piccola quantità può essere formata dalle cellule degli acini in anaerobiosi, attraverso l'attività degli enzimi cellulari. L'etanolo

interviene nel carattere vinoso e nella morbidezza del vino, ma influenzando la solubilità di alcune molecole odorose partecipa, anche se in minima parte, alle caratteristiche aromatiche del prodotto. Gli alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio sono detti alcoli superiori e influiscono maggiormente sull'aroma del vino. Gli alcoli superiori sono classificati in alifatici ed aromatici. Gli alcoli alifatici comprendono 1-propanolo, 2-metilpropan-1-olo (isobutanolo), 2 e 3-metilbutan-1-olo (alcoli isoamilici). Gli alcoli aromatici consistono nel 2-feniletanolo e tirosolo. Generalmente il livello di alcoli superiori è correlato negativamente alla qualità del vino, vari autori riportano che livelli di concentrazione superiori ai 300-400 ppm nel vino ne potrebbero diminuire drasticamente la qualità, soprattutto nei vini bianchi, apportando un odore ed un gusto pungente e/o vinoso, tuttavia livelli di concentrazione <300 ppm possono contribuire anche in maniera positiva all'aroma del vino con note fruttate. Gli alcoli superiori sono prodotti dai lieviti durante la fermentazione alcolica, a partire dagli zuccheri, ma anche dagli amminoacidi attraverso la reazione di Ehrlich. Il 3-metil butanolo (alcol isoamilico), 2-metil butanolo, iso-butanolo (2-metil propanolo) e m-propanolo (1-propanolo) sono i principali alcoli superiori. I lieviti non-*Saccharomyces* producono alcoli superiori in quantità minori rispetto a *S. cerevisiae* sia nei mezzi sintetici (Romano et al., 1992, 1997); sia nei mosti naturali (Ciani, 1997; Ciani e Picciotti, 1995; Comi et al., 2001); comunque mostrano una vasta variabilità a livello di ceppo. Ad esempio Rodriguez et al., (2010) hanno rilevato un aumento di 2- feniletanolo nei vini ottenuti da monocultura di *C. pulcherrima*, che ha dimostrato di produrre elevate quantità di alcoli superiori. Il glicerolo è un poliolo a tre atomi di carbonio ed è il composto secondario di fermentazione maggiormente presente. È prodotto dai lieviti soprattutto nella prima fase di fermentazione, poiché la sua via di formazione (la fermentazione glicerolpiruvica) è l'unico mezzo a disposizione del lievito per la riossidazione del NADH a NAD, fino a quando non si presenta un livello sufficiente di acetaldeide per assicurare la riossidazione del NADH con produzione di etanolo. Anche la solfitazione, che comporta la combinazione dell'etanale con l'anidride solforosa,

porta a un aumento della fermentazione gliceropiruvica. Il glicerolo interviene nella morbidezza e nella sensazione di grasso del vino e inoltre ha un sapore dolce, ma non interviene sull'aroma. Normalmente rispetto a *S. cerevisiae*, i lieviti apiculati producono quantità più basse di glicerolo (2-3.5 g/l), mentre altri lieviti non-*Saccharomyces*, tra cui *Candida stellata*, *Pichia membranefaciens*, *Metschnikowia pulcherrima* ed altre, sono caratterizzati da produzioni più elevate (Ciani e Picciotti, 1995).

4.3 I terpeni

I terpeni costituiscono una vasta famiglia di composti, ne sono stati identificati circa 4000 e sono molto diffusi tra i vegetali. Non tutti questi composti hanno proprietà aromatiche, fra quelli che risultano essere odorosi vi sono i monoterpeni e i sesquiterpeni; i primi sono composti a 10 atomi di carbonio, i secondi a 15 atomi di carbonio. Questi composti odorosi possono trovarsi sotto diverse forme: idrocarburi semplici, aldeidi, alcoli, acidi ed esteri. Nell'uva i composti terpenici più odorosi sono risultati appartenere alla classe degli alcoli e sono, più in particolare, il linalolo, l' α -terpineolo, il nerolo, il geraniolo, il citronellolo e l'ho-trienolo. Le loro soglie di percezione sono molto basse, essendo nell'ordine di qualche decina o centinaia di $\mu\text{g/l}$.

I terpeni possono esistere nelle uve sotto forma di glicosidi, ovvero legati a zuccheri (glucosio, arabinosio, ramnosio, apiosio). Nelle uve spesso le forme glicosilate sono più abbondanti di quelle libere. Solitamente negli acini, la quantità di terpeni legati è simile in tutte le loro parti, mentre le bucce sono più ricche in terpeni liberi. Nell'uva ci sono enzimi capaci di liberare questi terpeni glicosilati, le β -glicosidasi, ma nel processo di vinificazione la loro incidenza è minima, poiché questi enzimi hanno attività ottimale a pH 5 e quindi sono poco attive al pH del mosto, inoltre passaggi tecnici, come la chiarifica, limitano l'attività di questi enzimi. Più attivi sono invece gli enzimi esogeni, ovvero quelli aggiunti dall'uomo e quelli prodotti dai microrganismi: lieviti, ad esempio *C. pulcherrima* o muffe, come *Botrytis cinerea*.

4.4 Norisoprenoidi

Dalla degradazione ossidativa dei carotenoidi (terpeni a 40 atomi di carbonio), si avranno derivati a 9, 10, 11, 13 atomi di carbonio. Fra questi hanno molta importanza i norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio. Si dividono dal punto di vista chimico in: megastigmani e non megastigmani, ognuno ha molti composti volatili. Dei megastigmani ci sono il β -damasceone che dà odori floreali, frutti esotici, confettura di mele e il β -ionone da' odore di violetta. Tra quelli non megastigmani ci sono l'1,1,6-trimetil-1,2-diidonaftalene (TDN) che dà odore di cherosene, invece gli actinidioli e i vitispirani danno odore di canfora e sono negativi al complesso aromatico.

4.5 Metossipirazine

Le metossipirazine sono composti eterociclici azotati e provengono dal metabolismo degli amminoacidi. Conferiscono odore di peperone verde, asparago, pisello, patata e note terrose. Sono molecole che danno' al complesso aromatico soglie olfattive molto basse. Sono tipiche della varietà Cabernet Sauvignon e la loro presenza nel vino dipende dal grado di maturazione delle uve, anche se si è detto che la loro origine abbia provenienza dal metabolismo microbico.

4.6 Il 2-3-butandiolo e l'acetoino

Sono prodotti dai lieviti apiculati rispettivamente in basse quantità e in alte quantità, sia nei mezzi sintetici, sia nel vino. L'acetoino è un composto che deve la sua importanza principalmente alle sue potenzialità organolettiche (Romano e Suzzi, 1996). Dall'acetoino derivano composti, come il diacetile e il 2-3 butilenglicole, che in quantità elevate influenzano fortemente l'aroma delle bevande alcoliche. È stato accertato da tempo che l'acetoino viene prodotto da *S. cerevisiae* all'inizio della fermentazione, raggiunge il massimo della sua concentrazione in piena fermentazione, per declinare poi rapidamente nello stadio finale (Herraiz et al., 1990).

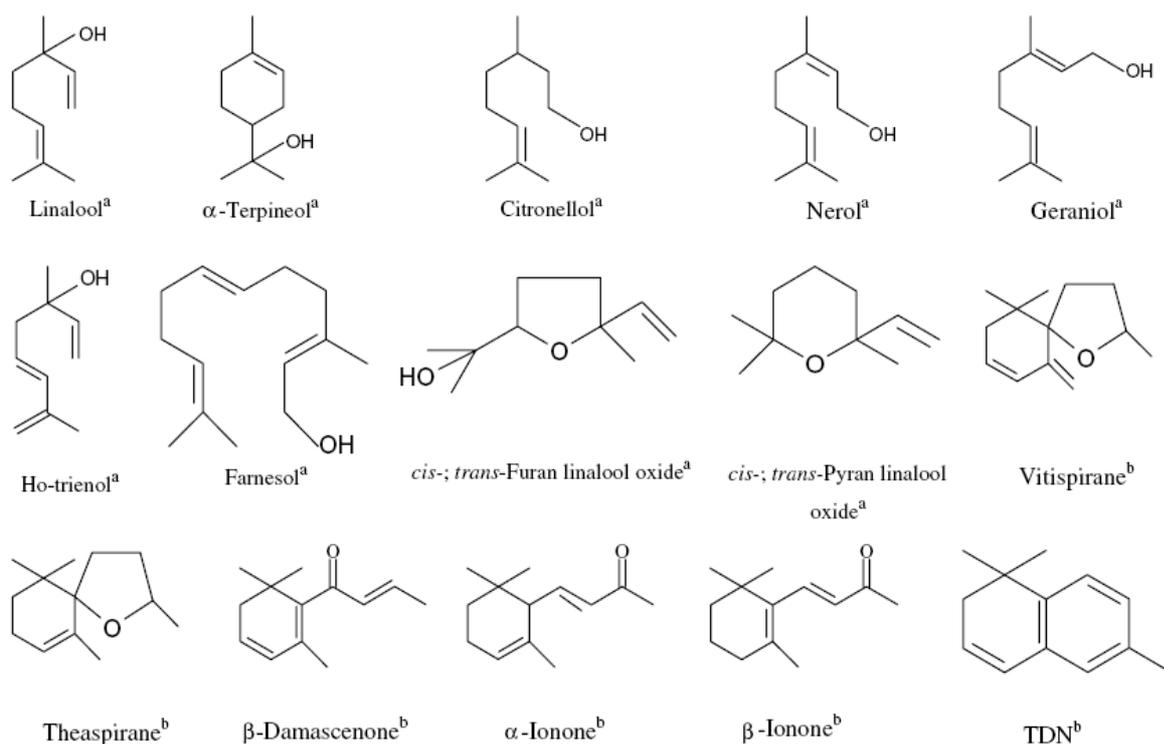


Figura 4.1: Esempio di molecole aromatiche identificate nel vino, a: monoterpeni, b: terpeni

4.7 Esteri

Il carattere fruttato del vino è largamente dovuto alla presenza e all'interazione tra i diversi esteri prodotti dai lieviti durante la fermentazione (Lambrechts e Pretorius, 2000; Lilly et al., 2006). Gli esteri vengono prodotti dai lieviti durante la fermentazione alcolica grazie alla reazione tra gli alcoli e acetyl-CoA, catalizzata dall'alcol acetyl-transferasi e da altri enzimi. L'acetato di etile rappresenta il principale estere del vino; si sono evidenziate differenze nei comportamenti dei lieviti nella produzione di questo estere. Concentrazioni di acetato d'etile che variano da 50 a 80 mg/l possono essere favorevoli, mentre quantità maggiori (120-150 mg/l) ne decrementano la qualità, conferendo una nota pungente e sgradevole al vino. L'acetato di etile può essere sintetizzato dall'alcol mediante l'acetyl-transferasi (condensazione dell'acetyl-CoA con etanolo) o per mezzo di un esterasi isolata in alcuni lieviti. Alcuni studi sulla produzione di esteri da parte di *C. pulcherrima* avevano riscontrato risultati contrastanti; l'abilità di questa specie di produrre basse o elevate quantità di esteri, infatti, è risultata essere legata al ceppo (Zohre and Erten,

2002). Altri esteri presenti nel vino sono quelli degli acidi grassi, che hanno odori piacevoli di cera, miele e gli esteri acetici degli alcoli superiori (acetato di isoamile, acetato 2-feniletile). Questi esteri hanno odori di banana, caramella inglese, mele e partecipano alla complessità aromatica dei vini, ma in concentrazioni eccessivamente elevate il loro odore penetrante può mascherare la finezza aromatica del vino.

4.8 Aldeidi e chetoni

Tra le aldeidi, l'acetaldeide è il composto principale, rappresentando il 90% del totale. È un precursore dell'acetato di etile, acetoino ed etanolo. La sua produzione dipende principalmente dalla microflora coinvolta nella fermentazione, ma anche da altri fattori come la fase di fermentazione (il picco di maggiore produzione è raggiunto quando la fermentazione del lievito è nello stato più vigoroso), la composizione del mezzo, la natura dei materiali insolubili usati per la chiarificazione dei mosti, le condizioni di anaerobiosi, la presenza di anidride solforosa, la temperatura di fermentazione e lo stato di invecchiamento del vino. Nei vini bianchi è presente in quantità maggiore rispetto ai vini rossi ed il tenore di acetaldeide viene usato come indicatore dell'ossidazione. Tra i ceppi di *K. apiculata* è stata trovata una vasta variabilità nella produzione di acetaldeide (Romano et al., 2000), ma il comportamento generale dei lieviti apiculati è di produrne in quantità simili a *S. cerevisiae*. L'acetaldeide, se in quantità eccessive, non viene né combinata con l'anidride solforosa né impiegata per la produzione di etanolo ed altri sottoprodotti, rimanendo così libera: in questi casi conferisce ai vini il carattere di svanito. Nel vino vi sono anche aldeidi superiori che possono contribuire all'aroma di alcuni vini ed aldeidi della serie aromatica, come la vanillina, che però deriva dalla maturazione in fusti di legno. Un chetone presente nel vino è il diacetile, che deriva dal metabolismo dell'acido citrico da parte dei batteri lattici; ha un aroma burroso, di noce e la sua soglia di percezione è di 2 mg/l.

CAPITOLO 5

Obiettivi

Catarratto, Grillo ed Insolia sono vitigni autoctoni siciliani a bacca bianca molto diffusi e coltivati nelle provincie di Trapani, Palermo ed Agrigento. Le uve, ad eccezione di Insolia che presenta vitigni anche a bacca nera, vengono prodotte da vitigni a bacca bianca e vengono raccolte generalmente verso la fine di settembre. Tutti e tre i vitigni hanno origini molto antiche e sono stati descritti da diversi Autori già a partire dalla seconda metà del 1600. Mentre il Catarratto trova habitat molto favorevoli in diversi ambienti, il vitigno Insolia predilige zone collinari, esposte ai venti, mentre Grillo predilige le zone della Sicilia occidentale con significative escursioni termiche fra giorno e notte, molto importanti per lo sviluppo del potenziale aromatico delle uve coltivate.

Le forme di coltivazione più usuali sono quelle a spalliera per il Catarratto, ad alberello marsalese (senza sostegno) per Grillo e coltivazione espansa per Insolia. Tutti i vitigni prediligono la potatura mista (Guyot) ed hanno una buona resistenza alla peronospora e alla botrite.

In generale i vini prodotti a partire dal vitigno Catarratto si presentano di colore giallo paglierino tendente al dorato, con sentori fruttati e note floreali. Si caratterizzano per l'elevato grado alcolico, e la buona struttura con un sapore neutro, mediamente acido tendente al morbido e un retrogusto amarognolo (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it). Dal vitigno Grillo sono prodotti i migliori vini DOC Marsala. Con le sue uve si producono ottimi vini bianchi pronti o adatti all'affinamento. I vini hanno colore giallo paglierino carico, buona aromaticità, con sentori erbacei, floreali e note agrumarie, buona acidità con una equilibrata morbidezza ed un'ottima struttura gustativa (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it). Per quanto riguarda Insolia, le uve vengono vinificate in purezza ottenendo un vino fine di colore giallo paglierino con riflessi verdolini, abbastanza sapido e con una buona componente alcolica, una equilibrata acidità e morbidezza (www.agrinnovazione.regione.sicilia.it). Tra i vini DOC prodotti a partire da questi vitigni vanno ricordati Alcamo, Contea di Sclafani, Contessa Entellina, Delia

Nivolelli, Erice Monreale, Salaparuta, Sambuca di Sicilia e Santa Margherita di Belice.

I vini ottenuti da i vitigni considerati possono essere ritenuti l'emblema, oltre che dello stretto legame che lega il vino al territorio, anche di una tradizione che è in grado di accogliere le innovazioni di processo e di prodotto che il mercato richiede. Infatti un accresciuto "know-how" nella vinificazione (fermentazione alcolica controllata ed un opportuno periodo di invecchiamento in legno), unitamente ad investimenti in marketing e packaging, ne hanno fatto tra i vini più apprezzati della Sicilia, simbolo del possibile connubio tra cultura, tradizioni locali ed esigenze di un mercato sempre più globalizzato e competitivo. Notevoli differenze in ogni caso vengono riscontrate in rapporto non solo alla località di produzione ma anche alla dimensione delle aziende produttrici. Infatti accanto alle grandi cantine, in grado di condurre fermentazioni controllate, soprattutto in termini di temperature e impiego di starter, esistono numerose piccole o piccolissime realtà produttive che effettuano vinificazioni tradizionali destinate prevalentemente al consumo locale. Anche nell'ambito delle cantine più grandi ed attrezzate coesistono processi produttivi molto diversi che prevedono o meno l'utilizzo di colture starter.

Come noto l'impiego di lieviti secchi attivi è pratica ormai comune soprattutto nelle produzioni di massa. Infatti l'uso di colture starter riduce i rischi di alterazione e gli imprevedibili cambiamenti del profilo aromatico del vino, legati soprattutto allo sviluppo incontrollato di lieviti non-*Saccharomyces* o di ceppi enologicamente poco dotati, assicurando generalmente caratteristiche organolettiche più bilanciate e standardizzate. Per contro esso può determinare la perdita di aromi caratteristici (Romano et al., 2003). Dal momento che il ceppo *S. cerevisiae* responsabile della fermentazione gioca un ruolo molto importante per la caratterizzazione del prodotto finale, la diversità degli starter utilizzati dalle diverse cantine o dei ceppi che prendono il sopravvento durante le vinificazioni spontanee indubbiamente contribuiscono alla composizione chimica e alla qualità sensoriale del prodotto. Nonostante l'entità e l'importanza per l'economia, oltre che regionale, nazionale e le

peculiarità dei vitigni e dei processi produttivi, non ci sono studi sul profilo aromatico e sulla concentrazione di sostanze potenzialmente tossiche per il consumatore di questi vini. La sempre maggiore globalizzazione dei mercati, anche di produzioni tipicamente locali, rende necessaria la definizione di concentrazioni di etil carbammato ed amine biogene dal momento che alcune agenzie internazionali impongono dei limiti ben precisi per queste sostanze. In particolare, per i vini da tavola, il Canada, gli USA e la Repubblica Ceca impongono limiti di uretano, rispettivamente, di 30, 15 e 30 ppb. Per quel che concerne le ammine, alcune agenzie nazionali raccomandano limiti per la concentrazione di istamina. Per esempio, la Svizzera non consente vini con livelli di istamina maggiori di 10 ppm. Questo limite è persino più basso in Francia (8 ppm), Belgio (5-6 ppm) e Germania (2 ppm) (Patrignani et al. 2013a; Acin-Azpiculeta et al 2008, Lehtonen, 1996). Tuttavia, è sempre maggiore l'interesse del mercato globalizzato per produzioni tipiche o legate al territorio che, nonostante tutto, devono evidenziare delle peculiarità oggettive e legate all'origine geografica o al processo produttivo. La gas-cromatografia abbinata alla spettrometria di massa (MS) e alla tecnica SPME (Solid Phase Micro Extraction) è risultata una delle tecniche più appropriate per la definizione del fingerprinting in molecole volatili dei prodotti alimentari e dei vini in rapporto alla materia prima e al processo produttivo (Ndajigimana et al., 2006; Vannini et al.; 2008; Patrignani et al., 2013b). Dal momento che il profilo sensoriale di un vino è la risultante, oltre che di un complesso equilibrio quali-quantitativo di numerose molecole (delle quali solo una parte può essere determinata con le tecniche gascromatografiche utilizzate), anche delle interazioni che si vengono a creare tra molecole volatili e non in un sistema complesso come il vino, i prodotti sono stati analizzati anche mediante naso elettronico. Quest'ultimo è in grado di fornire indicazioni sul profilo globale di un vino attraverso l'utilizzo di differenti sonde capaci di rilevare selettivamente classi di composti diverse.

In questo contesto, gli obiettivi principali della mia tesi sono stati:

- 1- Determinare le concentrazioni di ammine biogene ed etil carbammato di vini autoctoni siciliani prodotti a partire da vitigni Catarratto, Grillo ed Insolia prodotti da quattro diverse cantine locali.
- 2- Determinare il profilo in molecole volatili di questi vini mediante la tecnica GC/MS-SPME e il naso elettronico.

CAPITOLO 6
Materiali e Metodi

6.1 Campioni considerati

Sono stati analizzati 14 campioni di vino di diverse varietà (Catarratto, Grillo, Insolia) provenienti da 4 cantine della zona di Mazara del Vallo (TP) (Tabella 6.1). I campioni sono stati analizzati in triplo per la determinazione delle ammine biogene, dell'etilcarbammato e del profilo aromatico.

Codice campione	Vitigno	Cantina	Vasca
1			1
2	Catarratto	Cantina A	2
3			3
4	Grillo	Cantina A	4
5			5
6	Insolia	Cantina A	6
7	Insolia	Cantina B	1
8	Grillo	Cantina B	2
9	Catarratto	Cantina B	3
10	Insolia	Cantina C	1
11	Grillo	Cantina C	2
12	Catarratto	Cantina C	3
13	Grillo	Cantina D	1
14	Catarratto	Cantina D	2

Tabella 6.1: Campioni analizzati per la determinazione delle ammine biogene, dell'etil carbammato e del profilo aromatico.

6.2 Determinazione delle ammine biogene

La determinazione quali-quantitativa delle ammine biogene nel prodotto è stata fatta utilizzando la tecnica di cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). La metodica presenta diverse fasi:

-Derivatizzazione: la reazione di derivatizzazione è stata fatta seguendo la metodica riportata da Martuscelli et al. (2001). In un matraccio da 10 ml (preferibilmente ambrato per preservare i campioni dalla degradazione ad opera della luce) abbiamo aggiunto 1 ml di campione, 300 µl di NaHCO₃ saturo, 100 µl di una soluzione a 500 ppm di standard interno (1,7-diaminoeptano, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) e

una quantità variabile di una soluzione di KOH 1M in modo da portare il campione a un valore di pH di $11,5 \pm 0,01$ (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy).

Poi abbiamo aggiunto 4 ml di soluzione di dansilcloruro, che è l'agente derivatizzante (ottenuta sciogliendo 20 mg di dansilcloruro (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) in 4 ml di acetone per HPLC per ogni campione da derivatizzare). I campioni sono stati chiusi, parafilmati e posti in agitazione in un bagnetto termostato a 40°C per 45 minuti (195 strokes) al buio, protetti dalla luce. Alla fine di questi 45 minuti la reazione viene bloccata con l'aggiunta di 400 µl di una soluzione di ammoniaca (NH₃ 30%). I campioni devono sostare al buio almeno 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente sono portati a volume con acetonitrile per HPLC. I campioni vengono poi agitati per evitare la formazione di un gradiente, filtrati con filtri in nylon (Ø 0,22 µm) per eliminare eventuali impurità e posti in vials, protetti dalla luce a -20°C per non più di 7 giorni. I campioni ottenuti e conservati sono pronti per l'iniezione nello strumento di analisi.

-Analisi HPLC e condizioni cromatografiche: i campioni sono stati iniettati in un sistema HPLC Jasco PU-2089 Plus con iniettore manuale Rheodyne model con loop di 20 µl e da una colonna cromatografica di tipo C18 a fase inversa (WatersSpherisorb ODS-2, 150x4,6 mm, 3 µm) con precolonna (WatersSpherisorb S5 ODS2, 4,6x10mm). La rilevazione avviene tramite l'utilizzo di un detector UV-VIS Jasco UV 2070 Plus a 254 nm. In Tabella 6.2 sono indicati il gradiente di concentrazione degli eluenti utilizzati per l'analisi cromatografica delle ammine biogene. Per tutti i campioni, il tempo di analisi è di 25 minuti, con un tempo di equilibratura di 10 minuti prima di ogni nuova iniezione. I cromatogrammi ottenuti vengono integrati e le aree calcolate vengono rapportate a curve di taratura precedentemente ottenute attraverso l'impiego di soluzioni standard di ammine biogene. Queste soluzioni di standard contengono le ammine biogene rilevanti (istamina, 2-fenilettilammina, tiramina, putrescina, cadaverina, spermina e spermidina) a varie concentrazioni note (20 ppm, 30 ppm, 50 ppm e 75 ppm) e

vengono sottoposte a questa procedura di derivatizzazione. I derivatizzati ottenuti vengono iniettati con la stessa programmata di gradienti. I risultati ottenuti permettono, non solo l'identificazione delle diverse ammine tramite il tempo di ritenzione, ma anche la loro quantificazione mediante apposite rette di taratura.

Tempo (minuti)	CH ₃ CN (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	H ₂ O (%)
0,0	65	35	0
1,0	65	35	0
5,0	80	20	0
5,1	80	0	20
6,0	90	0	10
15,0	90	0	10
20,0	65	35	0
25,0	65	35	0

Tabella 6.2: Gradiente di concentrazione degli eluenti utilizzati per l'analisi cromatografica

-Preparazione della soluzione di standard interno: la soluzione di standard interno viene preparata sciogliendo 25 mg di 1, 7–diaminoeptano in 50 ml di acqua per HPLC (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.). La soluzione così ottenuta ha una concentrazione di 500 ppm e viene conservata a temperatura refrigerata per un periodo di un mese. Questo è fondamentale per verificare se la derivatizzazione è avvenuta correttamente e per svolgere eventuali correzioni dei dati ottenuti, in quanto lo standard interno si derivatizza nello stesso modo delle ammine.

-Preparazione delle soluzioni standard di ammine biogene: Per la costruzione di rette di taratura utilizzate per la quantificazione delle ammine biogene nei campioni analizzati, sono state preparate delle soluzioni standard di ammine biogene a titolo noto (20 ppm, 30 ppm, 50 ppm e 75ppm). Queste soluzioni a titolo noto vengono poi sottoposte alla procedura di derivatizzazione dei campioni e i derivatizzati vengono iniettati con la stessa programmata di gradienti. I risultati ottenuti permettono di identificare, rispetto al tempo di ritenzione, le diverse ammine e quantificarle con le

rette di taratura ottenute. Queste vengono preparate a partire da una soluzione “madre” con una concentrazione di 500 ppm delle diverse ammine di interesse (istamina, tiramina, 2-fenilettilammina, putrescina, cadaverina, spermina e spermidina), che viene diluita per ottenere le diverse soluzioni standard a concentrazione variabile (20 ppm, 30 ppm, 50 ppm e 75 ppm).

-Preparazione degli eluenti per HPLC: gli eluenti utilizzati sono acetonitrile (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.), acqua per HPLC (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) e un tampone fosfato (soluzione di potassio fosfato monoacido a 10 mM, portato a pH 7 attraverso l’aggiunta di HCl 1M (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy). Gli eluenti vengono preventivamente filtrati con filtro a porosità 0,22 µm in nylon (per l’acetonitrile) o acetato di cellulosa (per l’acqua e il tampone acetato). Successivamente vengono sonicati per 10 minuti a 20°C (Starsonic 90, Liarre) prima del loro utilizzo, al fine di eliminare eventuali impurità .

6.3 Determinazione dell’etilcarbammato

La determinazione dell’etilcarbammato nei vari campioni di vino è stata fatta utilizzando il metodo di Whiton e Zoecklein (2002). Tale metodo, basato sulla gascromatografia abbinata sia alla spettrometria di massa, con monitoraggio di ioni selezionati, sia alla microestrazione in fase solida (GC-MS-SIM/SPME), è stato modificato come segue per adeguarlo alle nostre necessità

-Condizioni SPME: A 5 ml di ogni campione di vino posto in contenitori di vetro (vial) del volume di 10 ml sono stati aggiunti 1g di NaCl e 50 µl di standard interno (2mg/l di n-butil carbammato in una soluzione idroalcolica). Il campione è stato poi riscaldato a 40°C per 10 minuti per accelerare il raggiungimento dell’equilibrio liquido-vapore. In seguito è stata inserita nello spazio di testa una fibra di silice fusa ricoperta da una fase polimerica mista di carbowax-polidimetilsilossano (CAR/PDMS, 65m, SUPELCO, Bellefonte, PA, Stati Uniti d’America). Dopo la fase

di assorbimento della durata di 30 minuti, le molecole venivano desorbite in colonna per un tempo di 10 minuti.

-Separazione: Durante lo svolgimento di queste analisi è stato utilizzato un gascromatografo 6890 abbinato allo spettrometro di massa 5970MSD entrambi Agilent Technologies (Palo Alto, CA, Stati Uniti d'America). Per la separazione delle molecole è stata utilizzata una colonna capillare Chrompack CP Wax 52 CB con lunghezza di 50 m, diametro interno 0.32 mm, mentre la fase era di 1.2 μm . La programmata di temperatura era la seguente: 80°C per 5 minuti, incremento di 10°C al minuto fino a 180 °C seguito da un incremento di 4.5°C fino a 220°C e permanenza alla stessa temperatura per un tempo di 12 minuti. L'iniettore veniva tenuto ad una temperatura di 250°C e lavorava in modalità "splitless" utilizzando elio come gas di trasporto con un flusso di 1 ml/minuto.

-Identificazione: Generalmente l'etilcarbammato, quando è presente nei vini, è rilevabile con concentrazione dell'ordine di alcune parti per miliardo (ppb). Così, per la sua identificazione è stato necessario utilizzare il metodo SIM idoneo al monitoraggio dei soli singoli ioni scelti ovvero 62 ($\text{M-C}_2\text{H}_2$)⁺, 74 (M-CH_3)⁺ e 89 (ione molecolare, M^+) in quanto caratteristici della frammentazione di questa molecola. Per l'ottimizzazione del metodo sono stati impostati i parametri di "solvent delay" di 10 minuti e "dwell /ione" di 100ms. Inoltre per rendere più sicura l'identificazione dell'etilcarbammato nei vini, uno standard puro di questa molecola è stato analizzato nelle stesse condizioni. La presenza di etilcarbammato nei vari campioni veniva confermata se lo scarto tra il rapporto delle intensità relative dei 3 ioni caratteristici nel campione e nello standard puro era inferiore o uguale a 20%, come suggerito dalla Normativa Europea N° 761/1999, Annex 3, del 12 Aprile 1999.

-Quantificazione: Per la determinazione della concentrazione dell'etilcarbammato nei diversi campioni di vino, lo standard puro di tale molecola (cinque concentrazioni

diverse) insieme a quello dell'n-butil carbammato (standard interno) sono stati sciolti in una soluzione idroalcolica al 12% addizionata di acido tartarico 1mM e, portato a pH 3. E' stata quindi determinata la retta di regressione lineare a 5 punti mettendo in grafico il rapporto dell'intensità dello ione 62 (misurata come altezza) dell'etilcarbammato/intensità dello stesso ione ma derivante dall'n-butil carbammato con una concentrazione di 50 µg/l in funzione della concentrazione dell'etilcarbammato.

6.4 Determinazione metaboliti volatili

La determinazione dei metaboliti volatili nei campioni da analizzare (sia nel vino prodotto da mosto sintetico che nel vino vero e proprio) è stata fatta mediante gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa e alla tecnica SPME. I campioni sono stati inizialmente preparati aggiungendo, a 5 ml di vino posti in un vial, 1 g di NaCl e 10 µl di 4-metil-pentanololo alla concentrazione di 10000 ppm (standard interno). Il campione così preparato è stato sottoposto a tre fasi di preparazione prima dell'analisi vera e propria:

- 1) riscaldamento con agitazione a 40 °C per 10 minuti per raggiungere un equilibrio fra liquido-vapore;
- 2) assorbimento, sempre a 40 °C, per 30 minuti inserendo nello spazio di testa del vial una fibra di silice fusa ricoperta da una fase polimerica mista di carbowax-polidimetilossano (CAR/PDMS, 65 µm, SUPELCO, Bellefonte, Palo Alto, CA, Stati Uniti d' America);
- 3) desorbimento in colonna per 10 minuti;

Le molecole adsorbite sulla superficie della fibra sono state desorbite in colonna (Varian, 50m x 0.25 µm) per un tempo di 10 minuti. L'analisi è stata eseguita con un gascromatografo Agilent 7890° (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) abbinato a uno spettrometro di massa Agilent 5975C. Il programma di temperature consisteva in una partenza a 50 °C per 1 minuto, aumento di 4.5 °C al minuto fino a 200 °C, permanenza a 200 °C per 5 minuti e ritorno a 50 °C. Flusso gas carrier 1

ml/min. Una durata totale di 39 minuti. Le temperature dell' iniettore, interfaccia e sorgente di ioni erano 250, 250 e 230 °C, rispettivamente.

6.5 Analisi al naso elettronico

Per la determinazione del profilo aromatico globale dei campioni è stato utilizzato un naso elettronico portatile tipo Pen 2 Airsense Analytics. Tutti i campioni ottenuti sono stati testati. Per ogni campione sono stati prelevati 10 ml e sono stati messi all'interno di un contenitore di vetro (vial) del volume di 40ml ermeticamente chiuso con tappo di politetrafluoroetilene. Tali campioni sono poi stati tenuti a una temperatura di 28°C per 30 minuti in modo da raggiungere l'equilibrio liquido-gas. Lo strumento utilizzato era composto da dieci sensori di diversa conducibilità con le seguenti caratteristiche; WMA_CCTO1 (sensore 1); WMA_US5 (sensore 2); WMA_CCTO2 (sensore 3); WMA_US6 (sensore 4); WMA_CCTO3 (sensore 5); WMA_US1 (sensore 6); WMA_CW1 (sensore 7); WMA_US2 (sensore 8); WMA_CW3 (sensore 9); WMA_U3 (sensore 10). Dopo la fase di assorbimento, l'iniezione è avvenuta a 180°C. Tre ripetizioni per ogni campione sono state analizzate seguendo un ordine casuale. Le risposte dei sensori venivano registrate ad intervallo di 1 secondo per una durata totale di 120 secondi ed espresse come rapporto tra il segnale del sensore e il segnale minimo registrato per tale sensore.

6.5 Analisi dei dati

Tutte le analisi gascromatografiche relative alle molecole volatili sono state effettuate in doppio. I risultati riportati sono una media di tali ripetizioni. L'analisi al naso elettronico per la determinazione del profilo aromatico globale è stata ripetuta tre volte seguendo un ordine casuale. I dati ottenuti da tutte le analisi effettuate sono stati elaborati tramite l'analisi delle componenti principali (PCA) mediante statistica per Windows.

CAPITOLO 7

Risultati

7.1 Determinazione delle ammine biogene e dell'etil carbammato in relazione al vitigno e alla cantina di produzione considerati

Al fine di determinare la qualità salutistica dei vini siciliani autoctoni presi in considerazione, sono stati analizzati 14 vini prodotti da 4 cantine differenti. In particolare, sono stati analizzati 6 campioni di Catarratto, 5 di Grillo e 3 di Insolia (tabella 6.1). Ogni bottiglia è stata analizzata in doppio. Sono state rilevate istamina, tiramina, cadaverina, putrescina, spermina, spermidina e 2-feniletilammina. Si tratta delle ammine più frequentemente rilevate nei vini (Lonvaud-Funel et al., 2001). L'ammina rilevata in maggiore quantità è stata la putrescina; per contro la 2-feniletilammina e le poliammine spermina e spermidina sono state rilevate solo sporadicamente e a bassissime concentrazioni. L'istamina, l'ammina ritenuta più pericolosa, è al di sotto del limite di determinazione (0.1 ppm) nei vini della cantina D e nei vini Grillo e Catarratto della cantina C. Anche negli altri campioni analizzati, l'istamina è risultata presente a concentrazioni estremamente basse e sempre inferiori a 2 ppm che è il limite più restrittivo imposto dalla Germania. La determinazione dell'istamina nel vino è di particolare interesse perché la presenza di alcol etilico e di altre ammine promuove il suo effetto inibendo i sistemi di detossificazione dell'organismo umano (Landete et al., 2005). Per quanto concerne la dose tossica non ci sono dati esaustivi in letteratura in quanto fortemente dipendente dalla sensibilità individuale. Tuttavia Soufleros et al., (1998) riportano che vini contenenti 8-20 ppm di istamina esercitano effetti tossici sull'organismo umano quando consumati in elevate quantità. Anche per la 2-feniletilammina e la tiramina non ci sono dati inerenti la tossicità. Quest'ultima è stata rilevata solo in 7 dei vini analizzati a concentrazioni mai eccedenti 1.31 ppm. Dall'analisi dei dati si evince che non ci sono differenze significative fra i diversi vitigni e tra le diverse cantine con l'eccezione dei vini della cantina B che, pur presentando in due campioni delle elevate concentrazioni di putrescina, erano privi di poliammine e tiramina. In ogni caso, le concentrazioni rilevate sono risultate molto al di sotto di quelle riportate in letteratura

per altri vini (Soufleros et al., 1998). È noto che tuttavia la concentrazione di ammine nei vini è molto variabile e dipende da numerosi fattori fra cui i più importanti sono la concentrazione di amminoacidi nel mosto e condizioni di vinificazione (per esempio pH, concentrazione di alcol, temperatura, SO₂ e torbidità del mosto) (Gardini et al., 2005). Comunque sicuramente i fattori più importanti nel determinare la concentrazione di ammine nei vini sono di natura biotica in quanto tali sostanze vengono prodotte sia dai lieviti che dai batteri lattici (Torrea and Ancin, 2002). Pertanto, l'impiego di colture selezionate, anche sulla base del loro potenziale amminogenico, può risultare lo strumento più idoneo per migliorare la sicurezza dei vini prodotti.

		Istamina	Tiramina	Putrescina	Cadaverina	Spermidina	Spermina	2-fenilettilammina
1_Catarratto		1.07	0.20	12.61	0.61	0.60	0.63	2.34
2_Catarratto		0.62	0.39	9.10	0.69	0.42	0.35	n.d.*
3_Catarratto	Cantina	0.56	0.39	9.69	0.63	0.27	0.34	n.d.
4_Grillo	A	0.90	0.13	10.87	0.69	0.47	0.90	n.d.
5_Grillo		0.63	n.d.	13.47	0.97	n.d.	n.d.	n.d.
6_Insolia		0.00	n.d.	14.47	1.53	n.d.	n.d.	n.d.
7_Insolia		0.90	n.d.	10.15	2.10	n.d.	n.d.	n.d.
8_Grillo	Cantina	0.11	n.d.	28.11	1.02	n.d.	n.d.	n.d.
9_Catarratto	B	1.92	n.d.	7.05	1.41	n.d.	n.d.	0.89
10_Insolia		0.42	n.d.	8.47	0.00	n.d.	n.d.	n.d.
11_Grillo	Cantina	n.d.	n.d.	9.83	2.16	n.d.	n.d.	n.d.
12_Catarratto	C	n.d.	0.72	8.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13_Grillo	Cantina	n.d.	0.19	6.07	0.96	n.d.	0.55	n.d.
14_Catarratto	D	n.d.	1.31	7.69	n.d.	n.d.	1.03	n.d.

Tabella 7.1: Determinazione delle principali ammine biogene in relazione al vitigno e alla cantina di produzione considerati. *: Al di sotto del limite di rilevazione (0.1 ppm)

Per quanto concerne la presenza di uretano, i risultati ottenuti sono abbastanza rassicuranti; infatti l'etilcarbammato, come evidenziato dalla tabella 7.2, è risultato sempre al di sotto dei 15 ppb, indipendentemente dal vitigno e dalla cantina di produzione, con l'eccezione dei campioni di Catarratto della cantina D. Diversamente, il vino Grillo proveniente dalla stessa cantina presentava i più bassi valori di etilcarbammato determinato tra i campioni analizzati.

Nei vini l'etilcarbammato si origina principalmente da precursori derivanti dal metabolismo microbico. La produzione di alcuni precursori durante la fermentazione alcolica (es. urea) e la fermentazione malo-lattica (citrullina e carbamil-fosfato) ha portato al chiarimento delle vie metaboliche usate dai lieviti e dai batteri lattici per la produzione dell'etilcarbammato (Uthurry et al., 2004). In particolare i lieviti vinari, dal catabolismo dell'arginina, producono ornitina ed urea. Dal momento che *Saccharomyces cerevisiae* non degrada molto efficientemente l'urea durante la fermentazione alcolica, l'urea secreta reagisce spontaneamente con l'etanolo formando etilcarbammato. La capacità di escrezione dell'urea, dipende oltre che dalle condizioni chimico-fisiche e ambientali, dal ceppo di lievito che conduce la fermentazione alcolica (Uthurry et al., 2004). Anche i batteri lattici responsabili della fermentazione malo-lattica possono rilasciare nel vino precursori dell'etilcarbammato dal metabolismo dell'arginina. In particolare, i microrganismi in grado di effettuare la fermentazione malo-lattica (*Oenococcus oeni*, pediococchi, e diverse specie appartenenti al genere *Lactobacillus*) possono degradare l'arginina attraverso la via catabolica dell'arginino-deaminasi (Liu et al., 1995) i cui prodotti principali sono ammoniacca, ornitina e ATP.

Tuttavia, va precisato che nei vini considerati sono i lieviti a giocare un ruolo preponderante nella produzione di molecole tossiche in quanto non sottoposti a fermentazione malo-lattica. Pertanto le differenze riscontrate nei contenuti di etilcarbammato nei diversi campioni sono imputabili principalmente al diverso metabolismo dell'arginina dei ceppi di lieviti che hanno condotto la fermentazione alcolica. Non bisogna dimenticare che non sempre la capacità di produrre etilcarbammato è incluso come carattere di selezione degli starter per l'industria enologica. Ancora minore attenzione viene posta nella individuazione delle condizioni ottimali per la loro coltivazione massima a livello industriale e per la preparazione delle loro formulazioni da impiegare in cantina. Pertanto se non vi è una accurata selezione dei ceppi ed una attenta messa a punto delle condizioni per la loro

moltiplicazione, l'aggiunta di lieviti selezionati non è di per sé una garanzia di miglioramento delle caratteristiche di salubrità di un vino.

		Etilcarbammato (ppb)
1_Catarratto		7.10 (± 0.90)
2_Catarratto		6.75 (± 0.25)
3_Catarratto	Cantina A	7.50 (± 0.97)
4_Grillo		7.30 (± 0.08)
5_Grillo		7.15 (± 0.15)
6_Insolia		10.30 (± 0.30)
7_Insolia		6.45 (± 0.15)
8_Grillo	Cantina B	5.50 (± 1.50)
9_Catarratto		5.70 (± 1.50)
10_Insolia		6.75 (± 0.75)
11_Grillo	Cantina C	6.65 (± 0.35)
12_Catarratto		12.50 (± 0.01)
13_Grillo	Cantina D	3.85 (± 0.35)
14_Catarratto		15.70 (± 3.10)

Tabella 7.2: Determinazione delle concentrazioni di etilcarbammato in relazione al vitigno e alla cantina considerati.

7.2 Profilo in molecole volatili

Al fine di caratterizzare i vini in termini di profilo in molecole volatili, i campioni sono stati analizzati mediante GC/MS-SPME. In tabella 7.3 sono riportati i risultati delle analisi effettuate e si evince che sono state rilevate ed identificate circa 20 molecole appartenenti a classi chimiche differenti quali esteri, alcoli, aldeidi, acidi e chetoni. Ogni vino era caratterizzato da uno specifico profilo in molecole volatili sia in termini qualitativi che di abbondanza relativa. Dal confronto delle percentuali relative dei composti identificati, risulta che le differenze rilevate per i diversi vini prodotti dalla stessa cantina sono relativamente piccole. Tuttavia è noto che l'impatto sensoriale delle diverse molecole è la risultante di molteplici fattori tra cui giocano, indubbiamente, un ruolo preponderante, oltre alla concentrazione, la soglia di percezione, la volatilità e l'interazione tra i diversi composti e con le macromolecole

del sistema. Al fine di evidenziare meglio le differenze tra i diversi campioni di vino, è stata effettuata un'analisi PCA (Principal Component Analysis). Dalla figura 7.1 si può osservare come i diversi campioni siano raggruppati principalmente per cantina e non in rapporto al vitigno. Infatti, nella proiezione dei diversi campioni sul piano cartesiano definito dalla componenti 1 e 2 in grado di spiegare, rispettivamente, il 46.44 e il 17.52% della varianza, sono individuabili 4 cluster corrispondenti alle 4 cantine di produzione tenute in considerazione. Le cantine B e C sono risultate essere le più distanti lungo la PC1. Per contro le cantine A, D e B si differenziavano soprattutto lungo la PC2. I prodotti derivanti dalle prime due cantine hanno mostrato una variabilità più bassa rispetto agli altri, ricadendo in un unico quadrante.

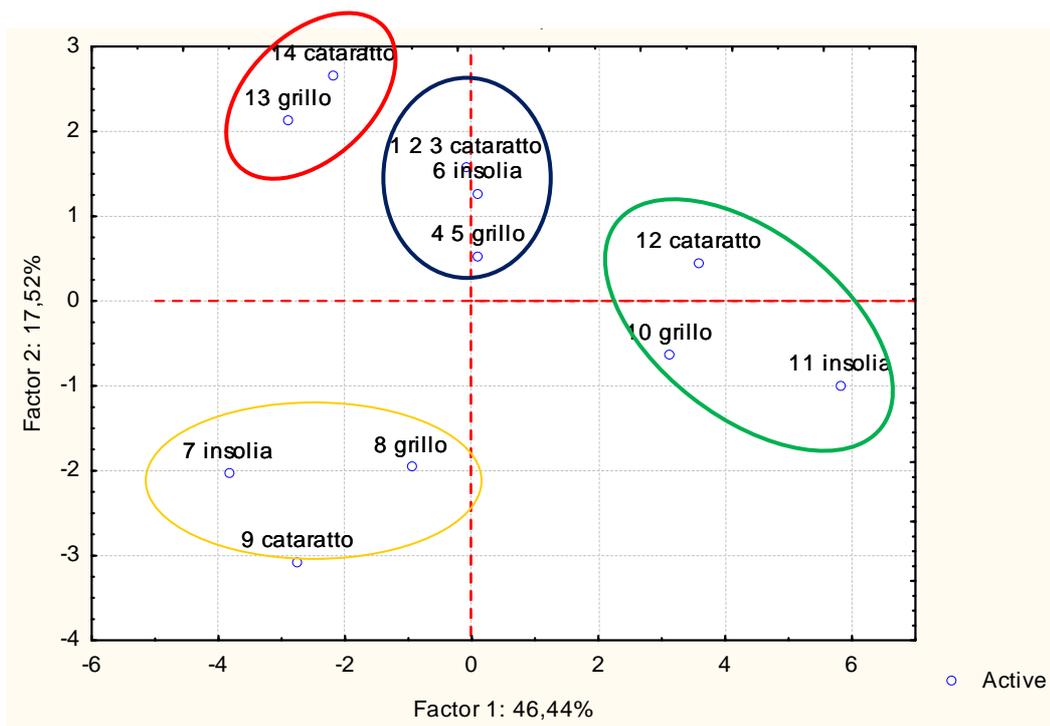


Figura 7.1: Loading plot dei diversi campioni di vino sulle due componenti principali effettuata per quanto riguarda l'analisi SPME-GC/MS

	Cantina A						Cantina B			Cantina C			Cantina D		
	Catarratto			Grillo			Insolia	Insolia	Grillo	Catarratto	Insolia	Grillo	Catarratto	Grillo	Catarratto
	1	2	3	4	5	6									
Etil acetato	8.29	7.85	7.92	8.46	7.23	8.25	7.23	7.52	5.99	7.31	6.26	6.27	11.29	9.16	
Acido butanoico etil estere	2.31	1.99	1.82	1.87	1.87	2.20	1.62	2.35	1.62	1.88	0.98	1.00	1.30	1.57	
1 butanolo-3-metil acetato	11.86	12.23	11.66	11.79	10.54	12.12	12.63	8.41	10.81	8.65	4.66	6.57	10.60	14.03	
Acido esanoico etil ester	11.29	13.01	12.25	13.24	13.12	12.55	12.56	13.62	15.00	10.73	8.18	9.98	10.36	9.89	
Acido pentanoico, 3-metil, etil estere	1.79	2.45	1.70	-*	-	1.95	0.92	1.02	-	-	0.97	1.09	1.27	1.39	
Acido acetico, esil estere	2.72	2.11	2.98	2.53	3.27	3.10	5.71	3.29	5.19	1.21	0.37	0.91	7.77	6.48	
3-esen-1-olo-acetato (Z)	0.11	0.22	0.10	0.13	0.18	0.15	0.73	0.10	0.16	0.08	0.08	0.08	0.47	0.30	
Acido ottanoico, etil estere	18.58	22.07	21.33	19.31	18.25	18.44	12.70	15.74	16.87	19.30	16.91	22.99	15.67	19.70	
Acido decanoico, etil estere	3.34	3.86	3.64	4.24	4.43	3.17	1.91	2.22	2.28	1.94	2.49	2.77	3.08	3.24	
Acido butanoico, dietil estere	0.48	0.39	0.54	0.65	0.73	0.51	0.27	0.44	0.36	1.34	1.81	0.97	0.25	0.27	
Acido acetico, 2-fenil etil estere	0.72	0.86	0.77	0.63	0.91	0.60	1.10	0.54	1.00	0.99	0.47	1.29	1.07	1.41	
1 butanolo, 3-metil formato	14.33	11.43	12.64	14.94	13.88	14.43	11.88	16.02	10.75	19.10	26.06	17.67	10.51	9.73	
Esteri	75.82	78.46	77.35	77.80	74.41	77.45	69.27	71.26	70.03	72.53	69.23	71.58	73.63	77.17	
1 propanolo, 2-metil	1.05	1.04	1.07	1.07	1.14	1.04	0.51	0.92	0.47	1.91	2.93	1.35	0.62	0.57	
2 pentanolo, 4 metil	7.33	6.48	6.47	7.14	6.98	7.16	5.91	7.31	6.23	7.99	8.41	7.63	7.03	5.78	
1-esanolo	1.33	1.19	1.22	1.24	1.47	1.53	1.49	2.08	1.76	1.36	1.39	1.18	1.95	1.52	
Alcol feniletilico	1.71	1.70	1.71	1.71	2.01	1.56	3.10	2.62	3.15	5.36	7.96	7.91	1.74	1.80	
Alcoli	11.42	10.41	10.46	11.16	11.60	11.29	11.01	12.92	11.60	16.63	20.69	18.07	11.35	9.66	
Acido acetico	0.60	0.35	0.48	0.64	0.42	0.39	0.70	0.65	0.32	0.57	0.60	0.34	1.88	1.01	
Acido esanoico	2.47	3.03	2.40	1.99	2.94	2.09	3.58	3.08	3.84	2.21	1.59	1.94	2.52	2.16	
Acido ottanoico	6.74	5.09	6.52	5.37	7.37	5.61	10.71	9.00	10.87	5.64	5.51	5.93	7.40	6.82	
Acido decanoico	0.83	0.80	0.58	0.62	1.04	0.57	1.67	1.03	1.49	0.37	0.60	0.47	1.13	0.90	
Acidi	10.65	9.28	9.98	8.63	11.78	8.67	16.66	13.75	16.51	8.79	8.31	8.68	12.93	10.89	
1,6-ottadien-3-olo, 3,7-dimetil	0.10	0.08	0.11	0.11	0.10	0.10	1.50	0.09	0.13	0.30	0.09	0.12	0.12	0.29	
Aldeidi	0.10	0.08	0.11	0.11	0.10	0.10	1.50	0.09	0.13	0.30	0.09	0.12	0.12	0.29	

Tabella 7.3: Principali composti volatili dei vini analizzati espressi come % dell'area dei picchi del cromatogramma ottenuto tramite la tecnica SPME-GC-MS. Le molecole identificate rappresentano più del 95% dell'area totale e i dati riportati sono la media di tre ripetizioni. La deviazione standard era sempre inferiore al 5% del valore di ogni composto. *: al di sotto del limite di determinazione

Dal momento che il profilo sensoriale di un vino è la risultante, oltre che di un complesso equilibrio quali-quantitativo di numerose molecole (delle quali solo una parte può essere determinata con le tecniche gas-cromatografiche utilizzate), anche delle interazioni che si vengono a creare tra molecole volatili e non in un sistema complesso come il vino, è stata effettuata un'analisi mediante naso elettronico, sfruttando 10 diverse sonde aventi diversa affinità per classi di composti differenti. In particolare, le sonde S1 e S3 sono in grado di rilevare i composti aromatici, S2 è affine alle sostanze azotate, S5 alle sostanze aromatiche poco polari, S7 è in grado di rilevare i composti solforati e terpenici, S9 quelli clorati solforati ed S10 gli idrocarburi alifatici in generale. La Principal Component Analysis relativa ai risultati del naso elettronico, ed in grado di spiegare più del 80% della varianza totale, ha confermato che le maggiori differenze tra i campioni sono determinate dalla cantina di produzione più che dal vitigno utilizzato. Infatti, anche in questo caso i campioni tendono a raggrupparsi per cantina: i vini prodotti dalla cantina A clusterizzano nella parte alta del piano cartesiano mentre quelli della cantina B sono raggruppati nella parte centrale, ad eccezione del campione 7 (Insolia). Questo cluster si contraddistingue per la significatività delle sonde S6, S8 in grado di rilevare metano, alcoli e composti parzialmente aromatici. Per quanto concerne i campioni derivanti dalle cantine C e D non vi sono differenze significative poiché clusterizzano insieme, indipendentemente dal vitigno utilizzato. Favorivano la clusterizzazione di questi campioni le sonde S1, S3, S5 e S7. Anche in questo caso sono poco evidenti le differenze tra vini derivanti dai diversi vitigni nell'ambito della stessa cantina con poche eccezioni. Infatti, si differenziano in maniera significativa i vini Catarratto della cantina A che formano un gruppo a sé. Hanno contribuito alla loro clusterizzazione in particolare le sonde S2, S4, S9, S10 in grado di rilevare i composti azotati, idrogeno, composti aromatici e metano.

Dall'analisi critica dei dati si evince come il processo produttivo adottato influisca in maniera più significativa rispetto al vitigno sulla differenziazione dei profili in molecole volatili determinati sia mediante gascromatografia che naso elettronico. E'

noto infatti che le differenze nei processi produttivi, con le loro innumerevoli variabili (temperatura di fermentazione, starter utilizzato, chiarificazione, SO₂, enzimi pectolitici, mannoproteine ecc..) possano incidere fortemente sulle componenti sensoriali ed aromatiche del vino finale, a discapito del contributo del potenziale aromatico delle uve.

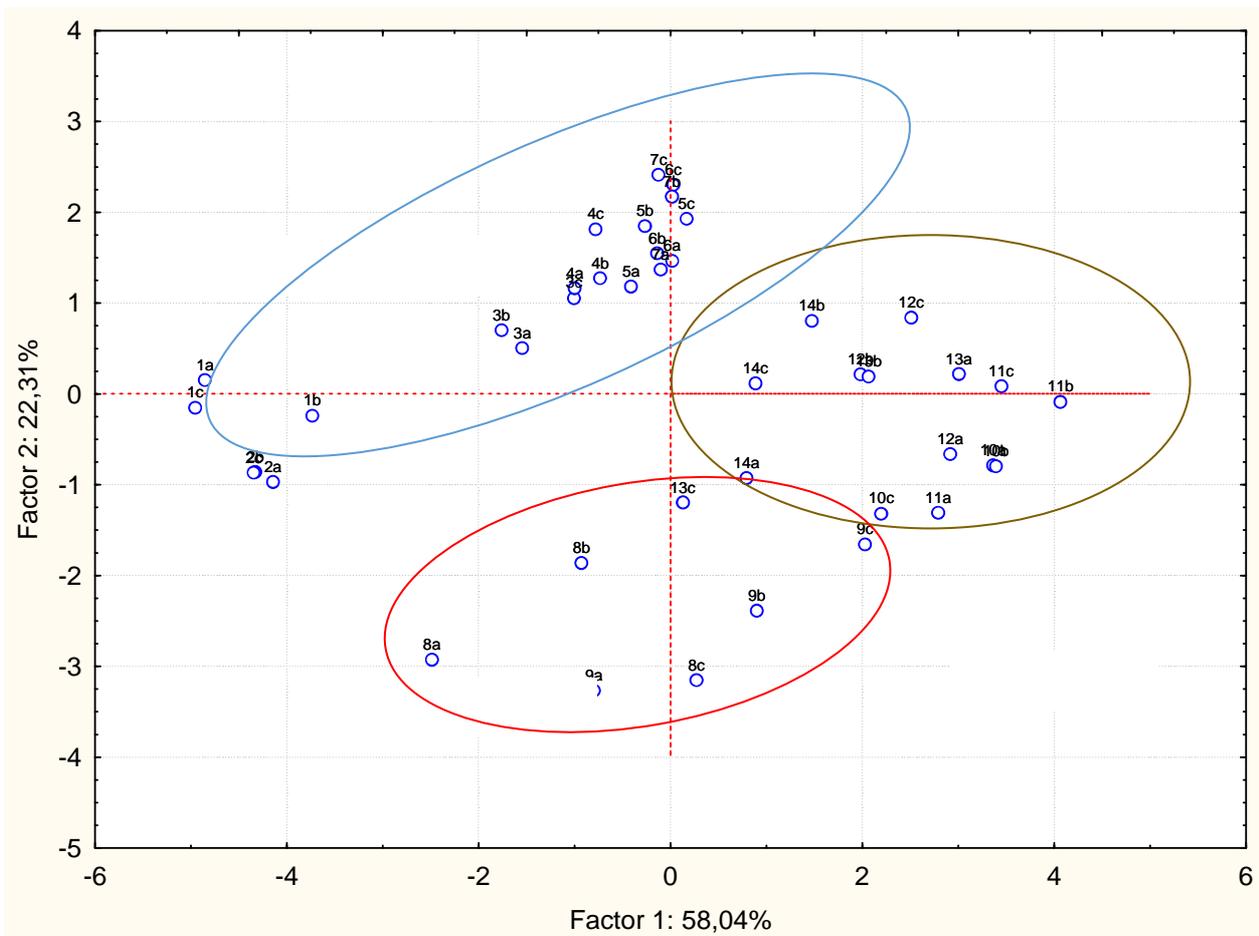


Figura 7.2: Loading plot dei diversi campioni di vino sulle due componenti principali dell'analisi PCA effettuata attraverso il naso elettronico

CAPITOLO 7

Conclusioni

I vini siciliani autoctoni derivanti dai vitigni Catarratto, Insolia e Grillo rivestono una notevole importanza nell'economia della regione Sicilia e, conseguentemente, per l'economia nazionale. Tuttavia la letteratura nazionale ed internazionale su questi vini è assente. Sebbene la zona di produzione della materia prima sia piuttosto ristretta, i risultati della mia tesi hanno evidenziato marcate differenze in termini di profili in molecole volatili tra i vini analizzati solo in rapporto al processo produttivo adottato dalle cantine. E' noto infatti che quest'ultimo può giocare un ruolo chiave nell'esaltare od appiattare le caratteristiche distintive dei singoli vitigni.

D'altra parte, si tratta di vitigni non aromatici cioè caratterizzati da un basso rapporto tra molecole terpeniche libere e legate agli zuccheri. Queste ultime non hanno impatto da un punto di vista sensoriale ma possono rappresentare i precursori di sostanze d'aroma se liberate ad opera di interventi tecnologici (addizione di enzimi ad attività β -glucosidasica) o di microrganismi naturalmente presenti o deliberatamente inoculati aventi specifiche attività enzimatiche.

Per quanto riguarda il contenuto di molecole potenzialmente tossiche per la salute del consumatore, i risultati della mia tesi hanno evidenziato l'ottima qualità dei prodotti considerati. Infatti, tutti i vini analizzati hanno mostrato un bassissimo contenuto in amine biogene ed etil carbammato. Un solo campione di Catarratto appartenente alla cantina D ha fatto rilevare concentrazioni leggermente superiori a 15 ppb che è il limite più restrittivo imposto dagli Stati Uniti per i vini da tavola.

In conclusione, i dati di questa tesi possono rappresentare un primo tassello nella caratterizzazione dei vini autoctoni siciliani. Tale caratterizzazione si rende necessaria nell'ottica dell'ampliamento del mercato di questi vini. Infatti, se a livello nazionale ed internazionale è abbastanza noto il vino prodotto in purezza dalle uve del vitigno Grillo, gli altri vini ottenuti dai vitigni Insolia e Catarratto hanno una diffusione prettamente regionale. Si tratta comunque di vini di pregio derivanti dallo stretto connubio tra tradizione e origine geografica, che sono le basi del concetto di "terroir" che riveste ancora notevole appeal per il consumatore sempre più attratto da

prodotti tradizionali caratterizzati da specifiche peculiarità sensoriali e percepiti come in grado di aumentare il benessere del consumatore.

Bibliografia

- Aerny, J.** 1990. Presence d'histamine et d'autres amines biogenes dans les vins. Off. Int. Vigne Vin, 656–657: 1017–1020.
- Ancín-Azpilicueta, C., González-Marco, A., and Jiménez-Moreno, N.,** 2008. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine'. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 48: 257 – 275.
- Bardocz, S., Grant, G., Brow, D. S., Ralph, A., and Pusztai, A.,** 1993. Polyamines in food-implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, 4: 66 –71.
- Bertrand, A., Ingargiola, M. C., and Delas, J.,** 1991. Effects of nitrogen fertilization and grafting on the composition of must and wine from merlot grapes, particularly on the presence of ethyl carbamate. *Internat. Symp. Nitrogen in Grapes and Wine*, 215–220.
- Bover-Cid S. and Holzapfel W.H.**1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 59: 391– 396.
- Busto, O., Guasch, J., and Borrull, F.,** 1995. Improvement of solid-phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines. *J. Chromatogr.*, 718: 307–317.
- Calleja, A., and Falqué, E.** 2005. Volatile composition of Mencía wines. *Food Chem.*, 90: 357–363
- Chander, H., Batish, V. K., Babu, S., Bhatia, K. L.** 1988. Studies on optimal conditions for amine production by *E. coli*. *Milchwissenschaft* 43: 90 –91.
- Ciani, M., Picciotti, G.,** 1995. The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Lett.* 17: 1247–1250.
- Ciani, M.,** 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. In: Pandalai, S.G. (Ed.), *Recent Res. Develop. Microbiol.*, vol. 1. Research Signpost, Kerala, India, 317– 331.

- Comi, G.**, Romano, P., Cocolin, L., Fiore, C., 2001. Characterization of *Kloeckera apiculata* strains from Friuli region in North Italy. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 391– 394
- Crock, M.** Migraine: a biochemical headache. *Biochem. Soc. Transact.* 1981. 9: 351 – 357.
- Fleet, G.H** 2008. Win yeasts for the future. *FEMS Yeasts Res.*, 8: 979– 995.
- Gardini, F.**, A. Zaccarelli, N. Belletti, F. Faustini, A. Cavazza, M. Martuscelli, D. Mastrocola, and G. Suzzi. 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control* 16:609– 616.
- González-Marco, A.**, Jiménez-Moreno, N., and Ancín-Azpilicueta, C., 2006. Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 2221– 2227.
- Guitart, A.**, Hernandez-Orte, P., and Cacho, J. 1997. Effects of maceration on the amino acid content of Chardonnay musts and wines. *Vitis*, 36: 43– 47.
- Gunnison, A. F.**, and *Palmes, E. D.* 1973. Persistence of plasma 5-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 24: 266– 278.
- Hajos, G.**, Sass-Kiss, A., Szerdahelyi, E., and Bardócz, S., 2000. Changes in biogenic amine content of Tokaj grapes, wines and Aszu-wines. *J. Food Sci.*, 65: 1142– 1144.
- Halász, A.**, Baráth, A., Simon – Sarkadi, L., Holzapfel, W.. Biogenic amines and their production by micro - organisms in food. *Trends Food Scie & Technol.* 1994, 5: 42 – 48.
- Heard, G.M.**, Fleet, G.H., 1986. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. in Australia* 38: 22– 25.
- Herbert, P.**, Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., and Alves, A., 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *J. Food Eng.*, 66: 315– 322.

- Herraiz, T.**, Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., Cabezudo, M., 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 313– 318.
- Huang, Z.**, and Ough, C. S., 1991. Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42: 261– 267.
- Ienistea.** Significance and detection of histamine in food. The microbiological safety of food eds. Hobbs, B. C. and Christian, J.H.B. 1973, 327 – 343.
- Íñigo, B.**, and Bravo, F. 1980. Histaminogénesis en vinos. I. Estudio de vinos de diversas regiones españolas. *Aliment.*, 117: 57– 63.
- Konings, W.N.**, Lolkema, J. S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J.M. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997. 71: 117 – 128.
- Konings W.N.**, 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 3– 27.
- Kunkee, R. E.**, and L. F. Bisson. 1993. “Wine-making yeasts.” In *The Yeasts*, 2nd ed., Vol. 5, A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds., 69– 127. London: Academic Press.
- Lambrechts, M.G.**, Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma. *South African J. Enol. Vitic.* 21: 97– 129.
- Landete, J. M.**, Ferrer, S., Polo, L., and Pardo, I., 2005. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1119– 1124.
- Lehtonen, P.**, Saarinen, M., Vesanto, M., and Riekkola, M. L., 1992. Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatisation with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 194: 434– 437.
- Lehtonen, P.** 1996. Determination of amines and amino acids in wine. A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47: 127– 133.
- Lilly M**, Bauer FF, Lambrechts MG, *et al.* 2006.. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23: 641– 659.

- Liu, S.Q.**, e Pilone G.J., 1995. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 315– 327.
- Lonvaud – Funel, A.**, Joyeux, A. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of histamine – producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J Appl. Bacteriol.* 77: 401– 407.
- Lonvaud-Funel A.**, 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria *FEMS Microbiol. Lett.*, 199: 9– 13.
- Lovaas, E.** 1991. Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*, 68: 353– 358.
- Maloney, P.C.** Obligatory coupling between proton entry and the synthesis of ATP by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 1977. 132: 564– 575.
- Martuscelli, M.**, Crudele, M. A., Gardini, F. and Suzzi, G. 2000 Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 228– 232.
- Martin-A´lvarez, P. J.**, Marcobal, A., Polo, C., and Moreno-Arribas, M.V., 2006. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *Eur. Food Res. Technol.*, 222: 420– 424.
- Mc Cabe, B.J.** Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens. A review. *J. Am. Dietetic Assoc.* 1986. 86: 1059– 1064.
- Millery, A.**, Duteurtre, B., Boudaille, J. P., and Maujean, A., 1986. Différenciation des trois cépages champenois à partir de l'analyse des acides aminés libres des moûts des récoltes 1983 et 1984. *Rev. Fr. Oenol.*, 103: 32– 50.
- Mitchell, P.** Chemiosmotic coupling and energy transductions. Glynn research, Bodmin, 1996. Cornwall, England.
- Moreno-Arribas, V.**, Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 88: 584– 593.

- Ndagijimana M.**, Vallicelli M., Cocconcelli P. S., Cappa F., Patrignani F., Lanciotti R., Guerzoni M. E., 2006. Two 2[5H]-furanones as possible signalling molecules in *Lactobacillus helveticus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6053– 6061.
- Patrignani, F.**, Ndagijimana, M., Belletti, N., Gardini, F., Vernocchi, P., e Lanciotti, R. 2013a. Biogenic amines and ethyl carbamate in primitivo wine: survey of their concentrations in commercial products and relationship with the use of malolactic starter. *J. Food Protection*, 75: 591– 596.
- Patrignani F.**, M. Ndagijimana, P. Vernocchi, A. Gianotti, C. Riponi, F. Gardini, Lanciotti, R. 2013b. High-Pressure Homogenization to Modify Yeast Performance for Sparkling Wine Production According to Traditional Methods”, *Am. J. Enol. Vitic.* 64: 258– 267.
- Perez-Coello, M. S.**, Sanz, J., & Cabezudo, M. D. 1999. Determination of volatile compounds in hydroalcoholic extracts of French and American oak wood. *American J. Enol. Vitic.*, 50: 162– 165.
- Pretorius, I.S.**, 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675– 729.
- Rapp, A.**; Versini, G. Influence of Nitrogen Compounds in Grapes on Aroma Compounds of Wines; Ranta, J. M., Ed.; Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, WA, June 18-19; Am. Soc. Enol. Vitic: Davis, CA, 1991; 156– 164
- Rauhut, D.** 1993. Yeasts—production of sulfur compounds. In: Fleet GH (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, 183– 223.
- Rodríguez, ME**, Lopes CA, Barbagelata, RJ, Barda NB, Caballero AC., 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.*, 31: 138– 140.
- Rollan, G. C.**, Coton, E., & Lonvaud-Funel, A. 1995. Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. *Food Microbiol.*, 12: 455– 461.
- Romano, P.**, Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 126– 130.

- Romano, P.,** Suzzi, G., 1996. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 309– 315.
- Romano, P.,** Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M., 1997b. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 82: 615– 618.
- Romano, P.,** Palla, G., Caligiani, A., Brandolini, V., Maietti, A., Salzano, G., 2000. Evaluation of stereoisomers of 2,3-butanediol and acetoin to differentiate *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* wine strains. *Biotechnol. Lett.* 22: 1947– 1951.
- Romano, P.,** Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 169– 180.
- Sandler, M.,** Youndin, M. B. H., Hanington, E. A phenylethylamine oxidizing defect in migraine. *Nature* 1974. 250: 335 – 336.
- Shahidi, F.,** Pegg, R.B., Sen, N.P. 1994. Absence of volatile N – nitrosoamines in cooked nitrite – free cured muscle food. *Meat Sci.* 37: 327 – 336.
- Shalaby, A.R.** 1993. Survey on biogenic amines in Egyptian foods: sausage. *J. Sci. Food Agric.* 62: 291– 293.
- Shalaby, A.R.** Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Intern.*, 1996. 29: 675 – 690.
- Shapiro, R.,** Servis, R.E., Welcher, M., 1970. Reactions of Uracil and Cytosine Derivatives with Sodium Bisulfite. *J. Am. Chem. Soc.*, 92: 422– 424.
- Silla-Santos, M. H.,** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 213– 231.
- Soufleros, E.H.,** Barrios, M. L., and Bertrand, A., 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49: 266– 278.
- Soufleros, E. H.,** Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C., and Biliaderis, C. G., 2003. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chem.*, 80: 261– 273.

- Spayd, S. E.**, and Andersen-Baggie, J., 1996. Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47: 389–402.
- Stratton, J. E.**, Hutkins, R. W., Taylor, S. L. Biogenic amine in cheese and other fermented foods. *J. Food Protect.* , 1991. 54: 460 – 470.
- Taylor, S. L.** Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. World Health Organization, Geneva. 1986.
- Ten Brink, B.**, Damink, C., Joosten, H. M. L. J., and Huis in 't Veld, J. H. J., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food. Microbiol.*, 11:73– 84.
- Torrea, D.**, and C. Ancín. 2002. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 4895– 4899.
- Tusseau, D.**, Benoit, C., and Valade, M., 1989. Étude de l'évolution des acides aminés au cours de la maturation. *Actual. Oenol.*, 20– 24.
- Uthurry, C. A.**, F. Varela, B. Colomo, J. A. S. Lepe, J. Lombardero, J. R. G. del Hierro. 2004. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chem.* 88: 329– 336.
- Vannini, L.**, Patrignani, F., Iucci, L., Ndagijimana, M., Vallicelli, M., Lanciotti, R. Guerzoni, M.E., 2008. Effect of a pre-treatment of milk with high pressure homogenization on yield as well as on microbiological, lipolytic and proteolytic patterns of “Pecorino” cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 329– 335.
- Vidal-Carou, M. C.**, and Marine-Font, A., 1985. Histamina en vinos. *Rev. Agroquim.Tecnol. Aliment.*, 25: 58– 78.
- Vidal-Carou, M. C.**, Codony-Salcedo, R., and Mariné-Font, A., 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malolactic fermentation intensity. *Food Chem.*, 35: 217– 227.

Whiton R.S., Zoecklein B.W. 2002. Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53: 60– 63.

Zambonelli C. 2006. *Microbiologia e biotecnologia dei vini. Ed agricole.*

Zohre, D.E.; Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Biopr. Biochem.*, 38: 319– 324.

Siti:

http://www.agrinovazione.regione.sicilia.it/reti/Viticultura/pubblicazioni/vitigni_di_sicilia.pdf

<http://www.agrinovazione.regione.sicilia.it/reti/Viticultura/pubblicazioni/allegati/viticultura-enologia.pdf>