UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

CAMPOBASSO

FACOLTÀ DI AGRARIA
XXVII CICLO DI DOTTORATO IN
BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI

" Influenza del pH sulla fermentazione malolattica in vini dell'Italia meridionale"

Scienze e Tecnologie Alimentari (AGR/15)

Coordinatore Tutor
Prof. Emanuele Marconi

Prof. Luciano Cinquanta

dottoranda **Dora Formato**
matr.146229

INDICE

RIASSUNTO **5**

INTRODUZIONE **8**

1. OBIETTIVI DELLA RICERCA **9**

2. CARATTERISTICHE AMPELOGRAFICHE DEI VITIGNI FALANGHINA E TINTILIA **10**

3. FERMENTAZIONE SPONTANEA E FERMENTAZIONE INDOTTA **14**

4. COMPOSTI DELL'UVA E PRODOTTI SECONDARI DELLA FERMENTAZIONE E QUALITA' DEL VINO **17**

4.2 - Gli alcoli superiori 19

4.3- I terpenoli 21

4.4 - I Polioli 23

4. 5 - L'acido citrico e il suo metabolismo 25

4.6 - Gli acidi grassi alifatici 28

4.7 - Gli esteri 28

5. LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA NEL VINO **29**

6. I MICRORGANISMI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA **37**

7. EFFETTI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA SULLA QUALITA' DEI VINI **41**

8. I COSTITUENTI DEL VINO COINVOLTI NELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA **43**

8.1 - Principali acidi organici dell'uva 43

8.2 - Principali acidi organici di fermentazione 45

8.3 - Le diverse forme di acidità 47

9. L' ANALISI SENSORIALE **49**

9.1 - Cos'è 49

9.2 - Selezione ed addestramento del panel 50

9.3 - Dalla percezione dello stimolo al riconoscimento 52

10. AMMINE BIOGENE NELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA **59**

SPERIMENTAZIONE **65**

1. **MATERIALI E METODI** **66**
1. 1 - Uve e vini impiegati nella sperimentazione 66
1.2 -Trattamento dei vini per la fermentazione malo-lattica 67

2. METODI DI ANALISI CHIMICO, FISICHE E SENSORIALI **71**
2.1 - Il colorimetro 72
2.2 - I biosensori 73
2.3 - Determinazione immuno-enzimatica delle ammine biogene 80

RISULTATI **92**

1. IL COLORE DEL VINO **95**

2. GLI ACIDI DEL VINO **106**
2.2 - Evoluzione degli acidi nella *Tintilia* 111

3. I BIOSENSORI **116**

4. CONTENUTO IN ISTAMINA DEI VINI **118**

5. ANALISI SENSORIALE DEI VINI **121**
5.1 – Analisi sensoriale della Falanghina 121
5.2 - Analisi sensoriale della *Tintilia* 123

CONCLUSIONI **126**
1. FALANGHINA 127
2. TINTILIA 128

BIBLIOGRAFIA **131**

RIASSUNTO

La presente tesi mira a valutare l'influenza del pH sulla fermentazione malolattica (FML), in vini ottenuti da uve tipiche dell'Italia meridionale *Falanghina* e *Tintilia*, quest'ultima autoctona del Molise.

Le prove sono state condotte in laboratorio, inoculando gli stessi vini, dopo averne modificato il pH (3,2; 3,4 e 4,1), con due diverse specie di batteri lattici: uno omofermentante (*Oenococcus oeni*) e l'altro eterofermentante (*Lactobacillus plantarum*). Nella *Falanghina* la fermentazione malolattica si è conclusa, dopo 27 giorni, utilizzando *O. oeni* a pH 3,8, mentre è terminata dopo circa due mesi con *L. plantarum* a pH 3,4.

Il pH ha influenzato in modo significativo la FML, tanto che a valori di pH 3,4è risultata molto rallentata, mentre a pH 3,2 è avvenuta solo parzialmente con entrambi i batteri.

Nella *Tintilia*, si sono considerate anche le variazioni di colore avvenute durante la FML. Come prevedibile, si è registrata una diminuzione del colore rosso (+a*) e del giallo (+b*) al termine della FML, di conseguenza anche i valori di intensità del colore sono diminuiti in tutti i campioni.

Nei campioni di vino *Tintilia,* si è scartata l'acidificazione a pH 3,2 in quanto a questo valore i batteri non sono stati in grado di svolgere la FML nella *Falanghina*, in aggiunta è stato preso in considerazione anche un mix dei due microrganismi.

Nella *Tintilia*, l'acido malico si è degradato in tutti i campioni e ad entrambi i pH scelti, impiegando circa trenta giorni per la degradazione usando l'inoculo mix di microrganismi a pH 4,1, mentre sono stati necessari più di trenta giorni a pH 3,4.

Anche l'acido citrico si è ridotto durante la FML con un andamento opposto alla acidità volatile. Con l'obiettivo di testare un metodo rapido e continuo per valutare la FML, è stato utilizzato anche un biosensore amperometrico per la determinazione dell'acido lattico in un campione di vino *Tintilia*, inoculato con *O. oeni*, dopo pastorizzazione.

L'acido lattico ha mostrato una cinetica di formazione pressoché lineare durante tutta la FML, completata dopo soli 12 giorni; ciò ad indicare che l'effetto della competizione microbica influisce notevolmente sul tempo di svolgimento della FML.

È stata poi effettuata un'analisi sensoriale sui diversi vini da parte di un gruppo di esperti assaggiatori.

Dalla degustazione effettuata sui campioni di *Falanghina* e *Tintilia* è risultato che i vini presentavano un profilo sensoriale simile ma con valori di intensità più marcati a pH maggiore e, in particolare, nei vini in cui è stato usato l'inoculo mix di *O. oeni* e *L. plantarum*. Notevole risultano le percezioni di note di burro.

Inoltre, tra i tre inoculi, nettamente superiore è l'intensità rilevata nel mix, segno evidente che i due batteri lattici hanno lavorato in maniera sinergica non solo nel portare a termine la fermentazione malolattica ma

concorrendo anche nel dare una connotazione più intensa agli aromi prodotti.

A conclusione delle sperimentazioni effettuate, sono stati determinati i contenuti di istamina prodotta durante la FML, poiché particolarmente importante per la loro tossicità.

La produzione di istamina è stata maggiore nei vini che hanno terminato la FML grazie ad un pH ottimale per lo sviluppo dei batteri lattici. Nel caso della *Falanghina*, la produzione di istamina si è avuta maggiormente a pH 3,4 utilizzando *L. plantarum*; nel caso della *Tintilia* a pH più alto (pH 4,1) inoculando con *O. oeni*.

Nei campioni con FML spontanea, si è osservata una maggiore produzione di istamina a conferma che batteri spontanei producono maggiori quantità di ammine biogene, rispetto a quelli selezionati.

INTRODUZIONE

1. OBIETTIVI DELLA RICERCA

La presente tesi mira a valutare l'influenza del pH sulla fermentazione malolattica in vini ottenuti da uve tipiche dell'Italia meridionale, per migliorarne le caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche. A tal fine sono stati utilizzate uve *Falanghina* e *Tintilia*, quest'ultima autoctona del Molise.Le prove sono state condotte inoculando i vini con due diverse specie di batteri lattici: uno omofermentante (*Oenococcus oeni*) e l'altro eterofermentante (*Lactobacillus plantarum*), per evitare gli effetti negativi sulla qualità del vino legati alla fermentazione malolattica spontanea.

I vini sono stati valutati analizzando i principali parametri qualitativi nel corso della FML. Oltre ai metodi enzimatici sono stati utilizzati anche biosensori per la determinazione dell'acido lattico. Per la valutazione della qualità dei diversi vino prodotto è stata effettuata un'analisi sensoriale da parte di un gruppo di esperti assaggiatori.

Inoltre, è stato valutato il contenuto in ammine biogene prodotte durante la fermentazione malolattica.

2. CARATTERISTICHE AMPELOGRAFICHE DEI VITIGNI FALANGHINA E TINTILIA

La *Falanghina* (foto 2.1) è un vitigno molto antico, ma con buona certezza si può ritenere che fosse coltivata già ai tempi dei Romani.

Attualmente viene coltivata nei campi Flegrei e nel Sannio.

Dopo essere stata dimenticata per molto tempo, è stata riscoperta tanto da diventare un sinonimo di qualità per la Campania.

Il nome deriverebbe dal latino *phalanx*, o *palo*, al quale le viti erano sostenute secondo il sistema di allevamento puteolano, tuttora diffuso, tipico degli antichi campi ardenti dei greci, sfondo dell'epica Gigantomachia.

Foto 2.1 – *Falanghina*.

Il vitigno ha foglia media o piccola, cuneiforme, raramente orbicolare, trilobata e meno spesso pentalobata; si presenta con grappoli di medie

dimensioni, lunghi e compatti a forma cilindrica o conica e alati su un lato. Gli acini hanno dimensioni medie, sono di forma sferica e regolare; la buccia spessa e consistente, di colore grigio-giallastro, con buona presenza di pruina.

La vigoria è buona e la produttività media e costante; matura nella seconda metà di settembre.

A partire dagli anni '70, i sistemi di allevamento hanno abbandonato il sistema delle viti legate al palo ed oggi vengono usate potature drastiche e corte in modo da avere solo 8 gemme per pianta (contro le 16 del passato), sfruttando il guyot basso che riduce le rese ed arricchisce gli acini in aromi e zuccheri.

La *Tintilia* (foto 2.2), vitigno autoctono del Molise, per secoli è stato considerato dalla popolazione locale il vitigno di eccellenza qualitativa. Esso era coltivato nelle aree interne della regione e vinificato per quasi due secoli fino poi a rischiarne la scomparsa in seguito all'introduzione di vitigni più produttivi, in relazione alla sua caratteristica di una resa piuttosto bassa.

In seguito all'uso dei vecchi metodi di caratterizzazione del vitigno basate su analisi morfologiche caratterizzate dall'esperienza e dalle conoscenze degli operatori, si è incorsi facilmente incontro ad errori; questo è stato ciò che è accaduto alla *Tintilia* così come a tanti altri vitigni. In seguito a questa imprecisione, essa è stata considerata per anni un equivalente del Bovale Grande, varietà sarda.

Tale imprecisione ha fatto sì che tale vitigno, per lunghissimo tempo, è stato ritenuto essere solo un clone di una varietà sicuramente più nota di una zona che non aveva nulla a che vedere con il Molise.

Solo l'introduzione di metodi analisi genetica ha permesso di identificare diversi vitigni tra cui , appunto, la *Tintilia*.

Il DNA della *Tintilia* è stato confrontato con campioni di *Bovale Grande*, *Bovale Sardo*; *Aglianico* ed anche con varietà di *Tintilia spagnola* (*Muristell*, *Morastell*, *Tintilla de Rota*, *Salceňo negro*), queste ultime scelte sia per la loro morfologia che per il fatto che si suppone che le origini della *Tintilia* siano spagnole (l'etimo è di chiara origine spagnola, dove *tinto* indica il rosso intenso dell'uva e del vino che ne deriva).

Il risultato ottenuto è stato quello che le viti campionate in Molise sono riconducibili ad un unico clone diffuso in Regione (*Tintilia del Molise* – Assessorato all'Agricoltura e Foreste 2009).

Inoltre, la *Tintilia* del Molise è risultata diversa dalla *Tintilla de Rota* proveniente dalla Spagna ed anche che la *Tintilia* ed il *Bovale* hanno impronte genetiche sicuramente diverse.

Le varietà spagnole sono sicuramente più vicine al *Bovale* ma resta comunque valida l'ipotesi di una origine iberica anche per la nostra *Tintilia*. Si può, quindi, affermare "*la Tintilia è un vitigno con una sua peculiare identità genetica, esclusivo se non anche autoctono della regione Molise*" (*Tintilia del Molise* – Assessorato all'Agricoltura e Foreste, 2009).

Foto 2.2 -*Tintilia*.

I grappoli (detti *pigna*) della *Tintilia* sono di dimensione medio-piccoli, di forma cilindrica o leggermente piramidale, spesso alati e non molto compatti. Gli acini sono piccoli e con buccia piuttosto spessa e pruinosi.

A maturazione completa il colore è blu scuro. Gli acini a maturazione si staccano con facilità permettendo una buona diraspatura, mentre quelli immaturi restano ben attaccati. L'epoca di vendemmia, a seconda dell'andamento stagionale e della zona in cui è coltivata, inizia a metà settembre per concludersi a metà ottobre.

3. FERMENTAZIONE SPONTANEA E FERMENTAZIONE INDOTTA

La fermentazione alcolica (FA) porta alla formazione, secondo l'eq. di Gay-Lussac, di etanolo e anidride carbonica con un rendimento in etanolo

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

di poco superiore al 60% in quanto parte del glucosio è utilizzato dal lievito per la sua moltiplicazione e che oltre all'etanolo ci sono altri composti che prendono vita dalla FA, come ad esempio, glicerina, acido succinico e anidride carbonica. Gli altri sottoprodotti sono acido acetico, aldeide acetica, acido piruvico. Altre sostanze, come ad esempio, gli alcoli superiori, sono prodotti direttamente dai lieviti non da trasformazioni del glucosio ma da composti azotati.

Al momento della raccolta dell'uva, il numero di microrganismi presenti su un acino è compreso fra 10^3 e10^5, nel mosto arriva a 10^6, a seconda delle condizioni climatiche di maturazione, dello stato sanitario dell'uva e dei trattamenti effettuati.

La FA può essere effettuata sia con inoculi selezionati che con una fermentazione spontanea lasciando operare i microrganismi presenti sull'uva.

I lieviti presenti sull'acino appartengono prevalentemente, alle specie apiculate (*Kloechera apiculata* e la sua forma sporigena *Hanseniosporauvarum*) rappresentando il 99%. La presenza di *S. cerevisiae* e *S. bayanus* sull'uva è rara ma non assente (Ribéreau-P.Gayon, 2010).

Tuttavia, a metà fermentazione *S. cerevisiae* rappresenta la quasi totalità dei lieviti.

Nel caso di scelta di una FA indotta da lieviti secchi attivi (LSA) normalmente *S. cerevisiae,* i lieviti selvaggi di una FA spontanea saranno sostituiti totalmente addizionando al mosto appena pigiato, una abbondante quantità di LSA previa solfitazione del mosto.

Molti sono i vantaggi della fermentazione con LSA; in primis, si ha una fermentazione completa ossia si riesce a portare a secco il vino con risultati costanti. L'impiego di LSA è sempre vantaggioso, anche quando il mosto la fermentazione è già partita in modo spontaneo proprio per garantire una completa FA. L'uso di *S. cerevisiae* dà fermentazioni pulite cioè con poca produzione di prodotti indesiderati (acido acetico, aldeide acetica,idrogeno solforato) di cui gli apiculati (indigeni) sono,al contrario, grandi produttori; questo si ripercuote sull'aspetto sensoriale del vino, che avrà una maggiore serbevolezza sia all'olfatto che al gusto delineando così un profilo più pulito.

Altro vantaggio degli LSA è la standardizzazione delle produzioni.

Analogamente a ciò che avviene per i lieviti in FA, lo stesso si ha per i batteri lattici nella fermentazione malolattica. Anche in questo caso si può scegliere tra l'inoculo di batteri lattici scelti e l'avvio spontaneo di tale disacidificazione biologica.

I vantaggi dell'inoculo selezionato possono essere, ad esempio, dare un imprinting sia a livello sensoriale che per la selezione specifica su alcuni fattori specifici. Le note indesiderate di burro, formaggio, latte, metallico

e terroso, così come eccessivi contenuti in acido acetico, sono normalmente associati a fermentazioni malo lattiche che avvengono a pH sopra 3,5, e che sono state svolte da pediococchi o lattobacilli, quindi l'uso di batteri selezionati può ridurre questo problema; ed ancora il loro uso può essere mirato alla scelta di batteri lattici che producano basse quantità di ammine biogene.

4. COMPOSTI DELL'UVA E PRODOTTI SECONDARI DELLA FERMENTAZIONE E QUALITA' DEL VINO

4.1 - Gli alcoli e le altre sostanze volatili

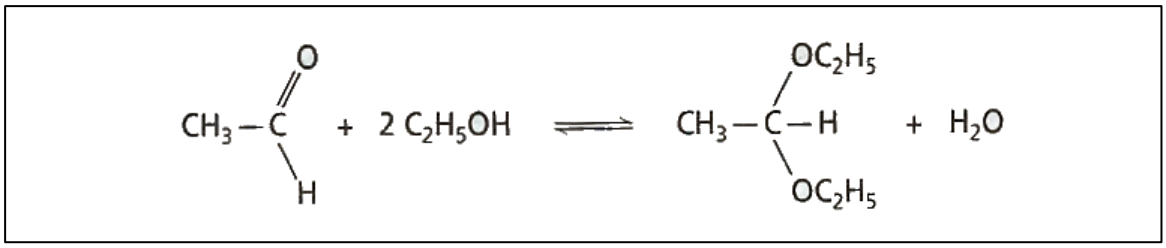
L'etanolo ha proprietà disidratanti e antisettiche. La sua azione insieme a quella dell'acidità, permette che il vino sia conservabile per lungo tempo. Tuttavia, esso è anche tossico per il sistema nervoso e per il fegato.

Ha anche un potere solvente che consente la dissoluzione dei composti fenolici delle parti solide dell'uva durante la vinificazione. Inoltre, si esterifica con gli acidi tartarico e lattico, interviene nella solubilizzazione di molte molecole odorose e ovviamente partecipa all'espressione delle caratteristiche sensoriali del vino.

L'etanolo può reagisce con le aldeidi, in particolare con l'etanale, in funzione della sua disponibilità in quanto quest'ultimo può essere totalmente o in parte legato alla SO_2.

Dalla reazione alco-etanale si ha un acetale: l'*1,1-dietossietano* (fig 4.1.1).

Figura4.1.1- Acetalizzazione dell'etanale e formazione di 1,1 dietossietano



Se reagisce con il solfuro di idrogeno prodotto dai lieviti in fermentazione, la reazione dà l'*etantiolo* (fig. 4.1.2); questo composto ha un odore molto sgradevole ed essendo meno volatile del H_2S difficile da

eliminare. Ciò porta a suggerire di travasare i vini solo alla fine della fermentazione alcolica o FML, in quanto anche i batteri lattici possono produrre H_2S.

Figura4.1.2- Reazione del solfuro di idrogeno con l'etanolo

$$CH_3-CH_2OH + H_2S \rightleftharpoons CH_3-CH_2-SH + H_2O$$

Per ossidoriduzione, l'etandiolo può evolvere in *dietil disolfuro* determinando in degustazione un giudizio nettamente negativo a causa del suo cattivo odore.

L'alcol metilico è presente nei vini in piccola quantità(60-150 mg/l) e non ha alcuna influenza sensoriale. Esso non deriva dalla fermentazione ma esclusivamente dall'idrolisi enzimatica dei gruppi metossilici delle pectine che vengono trasformate in acidi pectici:

$$_ OCH_3 + H_2O \rightarrow _OH + CH_3OH$$

Il contenuto in metanolo è funzione della durata della fermentazione alcolica in presenza delle parti solide dell'uva, in particolare delle bucce ricche in pectine; per questo motivo i vini rossi ne sono più ricchi (152 mg/l) rispetto ai rosati (91 mg/l) e ai bianchi (63 mg/l) (Ribèreau - Gayon et al. 1982).

Anche l'uso in vinificazione di enzimi pectolitici può aumentare il contenuto in metanolo.

4.2 - Gli alcoli superiori

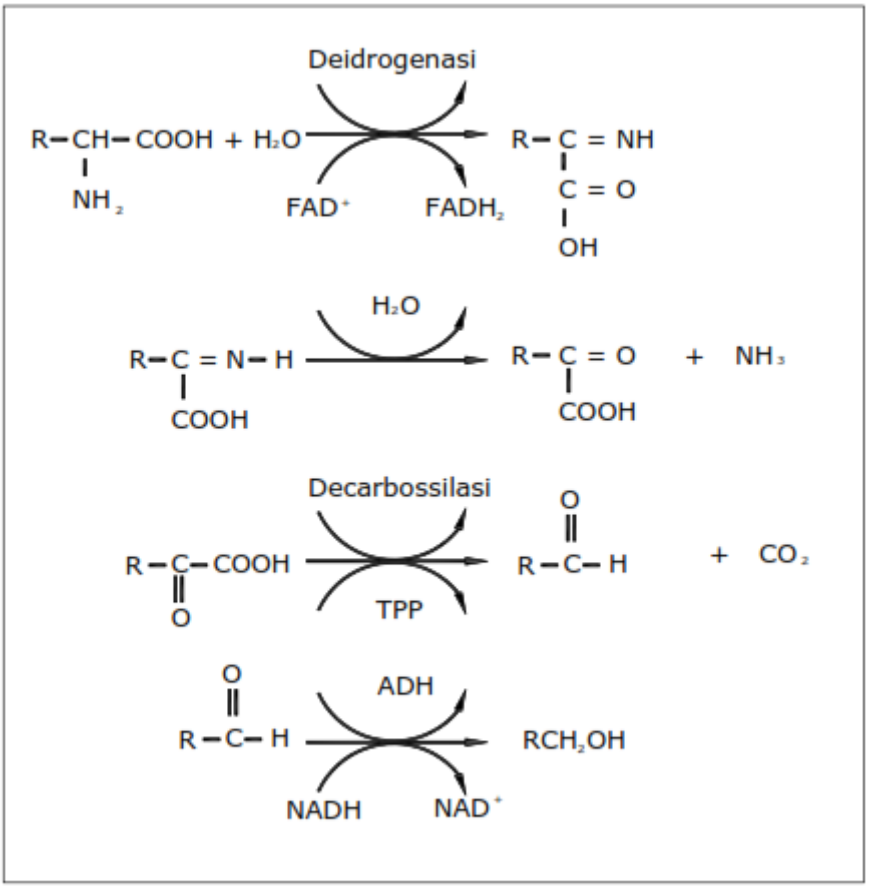
Gli alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio sono detti alcoli superiori (Tab. 4.2.1). Essi sono prevalentemente di origine fermentativa. Come i loro esteri possiedono odori intensi fondamentali per il bouquet dei vini se presenti in basse concentrazioni, in quantità più elevate, a causa dell'odore penetrante, possono inficiare la qualità aromatica del vino. I principali sono l'alcol isobutilico (2-metil- butan-1-olo) e gli alcol amilici (2-metil-butan-1-olo e 3-metil-butan-1-olo) sono i principali responsabili delle note di banana nei vini bianchi.

Tabella 4.2.1- Gli alcoli semplici di origine vegetale e fermentativa.

Nome	g/l	Note
Metanolo	0.1	Proviene dall'idrolisi delle pectine e non dalla fermentazione alcolica
Etanolo	100	
1-propanolo	0.03	
2-propanolo	tracce	Alcol isopropilico
1-butanolo	tracce	
3-metil-propanolo 1	0.1	Alcol isobutilico
2-metil-propanolo-2		
2-butanolo	tracce	
2,3-butandiolo	1	
1-pentanolo	Tracce	
2-pentanolo	Tracce	
3-pentanolo		
3-metil-butanolo-1	0.2	Alcol isoamilico
2-metil-butanolo-1	0.05	Alcol amilico attivo
3-metil-butanolo-2		
Cis-3-esen-1-olo		Odore erbaceo
1-esaolo	0.01	
2-esanolo		
1-eptanolo		
2-eptanolo		
1-ottanolo		
2-ottanolo		
1-nonanolo		
2-nonanolo		
1-decanolo		
2-feniletanolo	0.05	Odore di rosa
Tirosolo		
1-octen-3-olo		Odore di fungo, la cui presenza è legata alla *Botrytis cinerea*

Gli alcoli superiori sono prodotti da lieviti, sia a partire da zuccheri che di amminoacidi dell'uva attraverso la via biosintetica di Ehrlich (Fig. 4.4.2) grazie all'attività di una deidrogenasi che necessita di coenzima FAD^+ che poi, dopo idrolisi ad chetoacido, subisce una decarbossilazione il cui coenzima è la tiamina pirofosfato (TPP). In questo modo la leucina porterà all'alcol isoamilico e l'isoleucina all'alcol amilico.

Figura 4.4.2- Via biosintetica degli alcoli superiori secondo Ehrlich.



I contenuti in alcoli superiori saranno funzione sia delle condizioni di fermentazione (aumentando la velocità di fermentazione aumentano i contenuti in alcoli superiori), sia del ceppo di lievito. In caso di alterazioni

microbiche (da lieviti e batteri) la quantità di alcol amilico può diventare talmente elevata da compromettere la qualità organolettica.

Esistono,poi, altri alcoli a 6C, l'esanolo e gli esanoli, che si formano al momento della disorganizzazione cellulare dei tessuti vegetali e sono responsabili degli odori erbacei nei vini prodotti da uve non ancora mature.

4.3- I terpenoli

I terpeni sono una famiglia di molecole (circa 4000) del regno vegetale, la cui unità base è l'isoprene.

Nell'uva sono stati individuati una quarantina di composti terpenici, i più odorosi dei quali appartengono alla classe degli alcoli monoterpenici, in particolare, il linalolo e il citronellolo che riconduce al floreale, e nello specifico alla rosa (fig. 4.4.1).

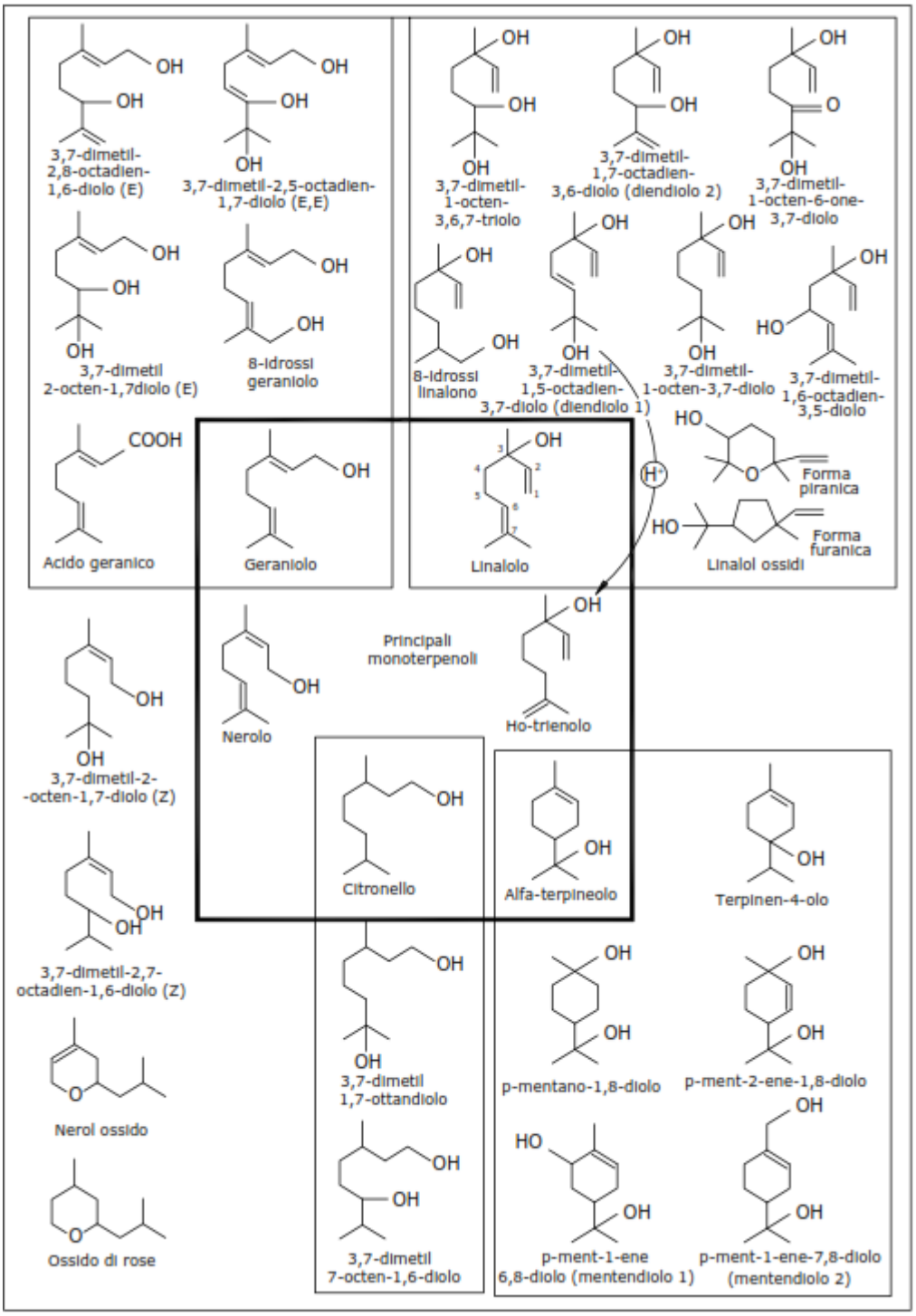
Il livello di linanolo è stato riscontrato più alto nei campioni inoculati con *O. Oeni,* il citronellolo non è stato trovato in assenza di batteri, ciò a conferma che queste molecole si formano solo dal metabolismo batterico da altri precursori terpenici *(Garcia – Moruno et al., 2002 – Gramatica et al., 1982 – Vaudano et al., 2004).*

Le soglie di percezione olfattiva sono molto basse, inoltre la loro concentrazione può essere nettamente superiore alla soglia di percezione olfattiva.

I polioli terpenici (dioli e trioli) sono presenti nei vini fino a concentrazioni superiori a 1 mg/l, essi sono poco odorosi ma per idrolisi possono dar luogo a monoterpeni più profumati.

La collocazione di tali molecole nell'uva è diversa, si trovano sia nella buccia che nel succo; ad esempio, gerianolo e nerolo sono maggiormente presenti nella buccia rispetto a polpa e succo.

Figura 4.3.1 – I terpeni.



4.4 - I Polioli

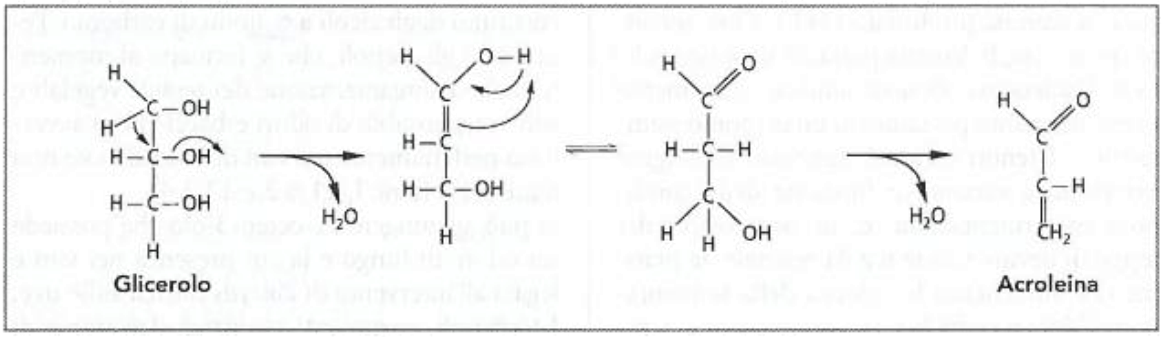
I polioli sono caratterizzati dalla presenza di diversi radicali idrossili nella stessa molecola, sia essa lineare o ciclica. All'aumentare dei radicali idrossili si ha un aumento sia del punto di ebollizione che della viscosità, inoltre allo stesso modo aumenta la solubilità ed il sapore dolce.

Il più importante poliolo nel vino è il glicerolo. Dopo l'etanolo è il maggiore prodotto secondario della fermentazione alcolica. Il suo contenuto varia da 5 g/l a 20 g/l.

Il glicerolo è prodotto dai lieviti all'inizio della fermentazione alcolica. La via di formazione prende il nome di fermentazione gliceropiruvica; il modo che il lievito utilizza per assicurarsi la riossidazione del coenzima NADH + H^+ a NAD per riduzione del didrossiacetone a glicerolo.

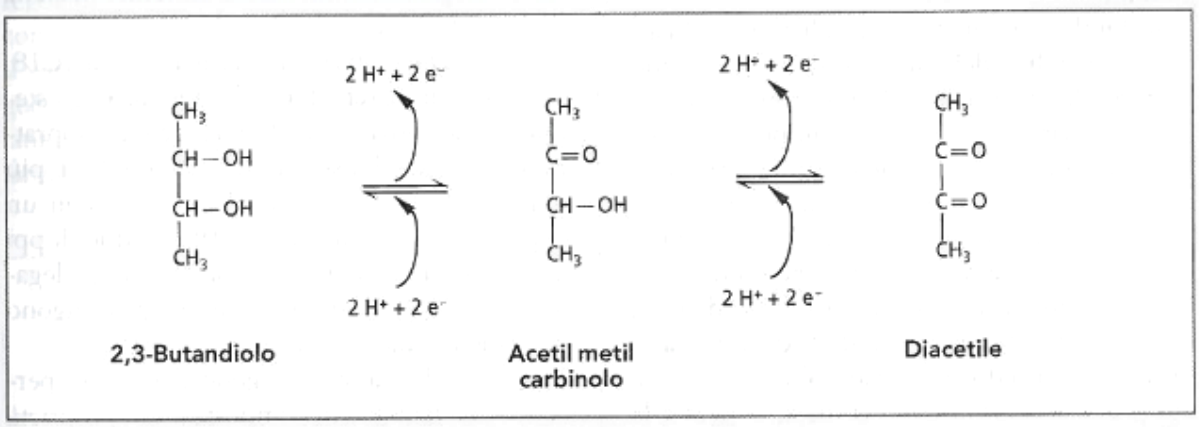
Il glicerolo può servire come fonte di carbonio sia ai lieviti flor, sia ai batteri responsabili di alterazioni che lo degradano con una doppia disidratazione formando acreolina (Fig. 4.4.1) che, insieme ai tannini, accentua la sensazione di amaro.

Figura 4.4.1-Meccanismo della formazione di acreolina per doppia disidratazione del glicerolo.



Il 2,3-butandiolo è sia un prodotto secondario della fermentazione alcolica, sia un prodotto della fermentazione malolattica (fig. 4.4.2).

Figura 4.4.2- Equilibri di ossidoriduzione del 2,3 butandiolo.



Il 2,3-butandiolo si forma per riduzione dell'acetoino proveniente dalla condensazione di due molecole di etanale.

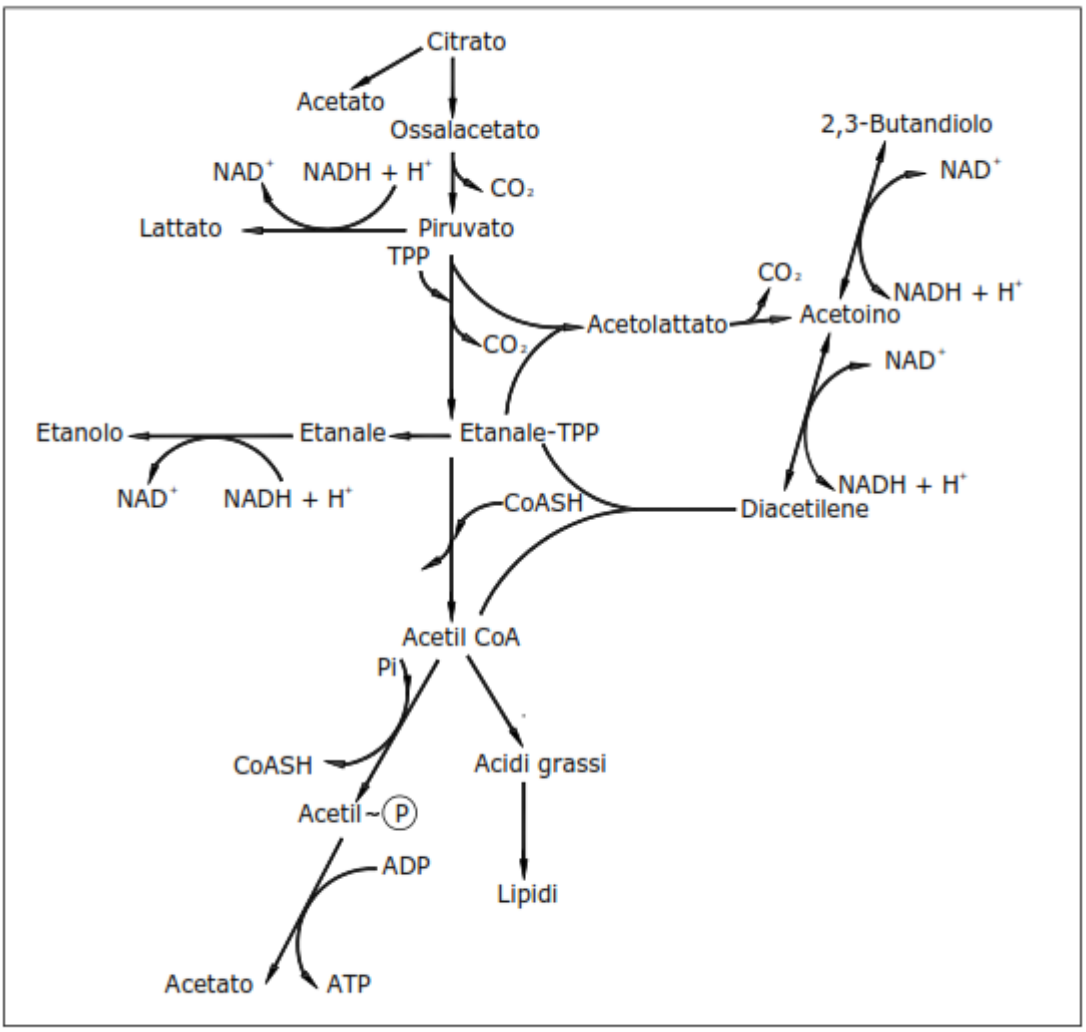
L'acetoino ha un leggero odore di latte ed è presente nei vini in quantità pari a 10 mg/l; il diacetile invece si aggira su valori di 0.3 mg/l ed ha una piacevole nota di burro e di noci che si avverte con valori prossimi a 2 mg/l, tuttavia esso è una molecola che solo in piccole quantità è ritenuto gradevole ed apprezzabile in un vino, in quantità maggiori diventa un difetto.

4. 5 - L'acido citrico e il suo metabolismo

L'acido citrico viene degradato dai batteri lattici. Tra le specie che degradano l'acido citrico ci sono *L. plantarum*, *L. casei*, *O. oeni*, *L. mesenteroides*, *Pediococcus* e *L. brevis*.

L'acido citrico è scisso dalla liasi batterica in ossalacetato ed acetato (Fig. 4.5.1).

Figura 4.5.1 -Metabolismo acido citrico



La proteina è attiva in forma acetilata; la forma deacetilata, inattiva, può essere riacetilata *in vivo* per azione della citrato liasi ligasi, con l'acetilCoA o l'acetato o l'ATP.

Questa prima fase porta alla formazione di una molecola di acetato per ogni molecola di substrato. L'ossalacetato può diventare piruvato o succinato in relazione al tipo di batterio lattico che effettuerà la trasformazione.

Il piruvato è all'origine dei composti acetoinici: diacetile, acetoino e 2,3 butandiolo importanti organoletticamente in quanto responsabili dell'aroma di burro. I valori di diacetile di desiderabilità variano a seconda dei vini ma in genere livelli maggiori di 5mg/l sono considerati indice di alterazione *(Vincenzini et al., 2005);* la soglia di percezione è molto bassa (0,1-2mg/l).

Ci sono poi altri prodotti che si formano a partire dal citrato. Il piruvato che si forma dal citrato partecipa alla sintesi degli acidi grassi e dei lipidi; si forma una sola molecola di acido acetico per ogni molecola di substrato. In condizioni di stress dovute a limitazioni di glucosio, di pH basso e con inibitori di crescita, l'acido citrico conduce preferenzialmente alle sostanze acetoiniche *(Ribéreau – Gayon et al. 2010).*

Le condizioni sono tali da non orientarsi verso la sintesi di materiale cellulare, né verso il lattato o l'etanolo, ma verso le sostanze acetoiniche che sono considerate un processo di detossificazione cellulare che deve eliminare il piruvato per mantenere il pH intracellulare adeguato.

Inversamente, quando è facilitata la crescita, il piruvato è utilizzato nelle vie di sintesi degli acidi grassi e l'acido acetico viene prodotto in maggiore quantità. Quindi, in un mezzo di laboratorio, gli *O. eoni* formano, a partire da una molecola di acido citrico, più di due molecole di acido acetico a pH 4,8 e solamente 1,2 molecole di acido acetico a pH 4,1; il rendimento in molecole acetoiniche è, invece, quattro volte più elevato *(Lonvaud - Funel et al., 1984).*

Le condizioni e la gestione della FML determinano quindi le quantità delle diverse molecole di diacetile e di acido acetico prodotti. Tuttavia, il diacetile è sintetizzato anche dai lieviti durante la FA a partire dagli amminoacidi, per cui si avranno due valori massimi rispettivamente alla fine della FA e durante la degradazione dell'acido citrico; diminuisce invece alla fine della FA e della FML ed anche con la fase dell'affinamento sulle fecce *(De Revel et al. 1989).*

La degradazione del citrico inizia in contemporanea con la degradazione dell'acido malico durante la FML ma è molto più lenta, in questo modo a FML ultimata ci sarà ancora traccia dell'acido citrico.

La presenza di citrico in un vino favorisce, quindi, la crescita e la sopravvivenza batterica soprattutto in presenza di zuccheri residui.

Il metabolismo del malico come quello del citrico fanno sì che il vino raggiunga la stabilizzazione microbica.

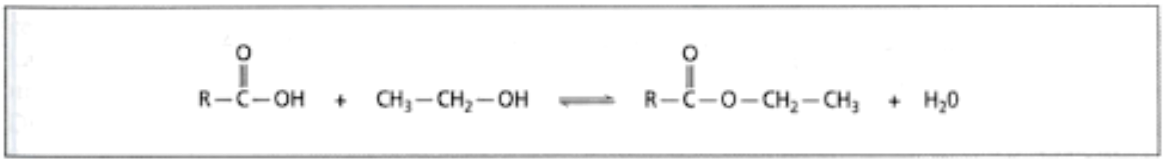
4.6 – Gli acidi grassi alifatici

Tra gli acidi grassi alifatici si ha l'acido acetico, componente essenziale dell'acidità volatile, il cui tenore è indice delle alterazioni batteriche. Tutti i vini contengono acidità volatile in quanto i lieviti ne producono piccole quantità, tuttavia valori superiori sono imputabili a contaminazioni batteriche (batteri acetici). Anche l'acido propionico (3C) e butirrico (4C) sono associati a produzioni batteriche.

4.7 - Gli esteri

Gli esteri si formano dalla reazione di una funzione alcolica con una funzione acida con successiva eliminazione di una molecola di acqua (Fig. 4.7.1).

Figura 4.7.1 – Equilibrio di esterificazione di un alcol.



5. LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA NEL VINO

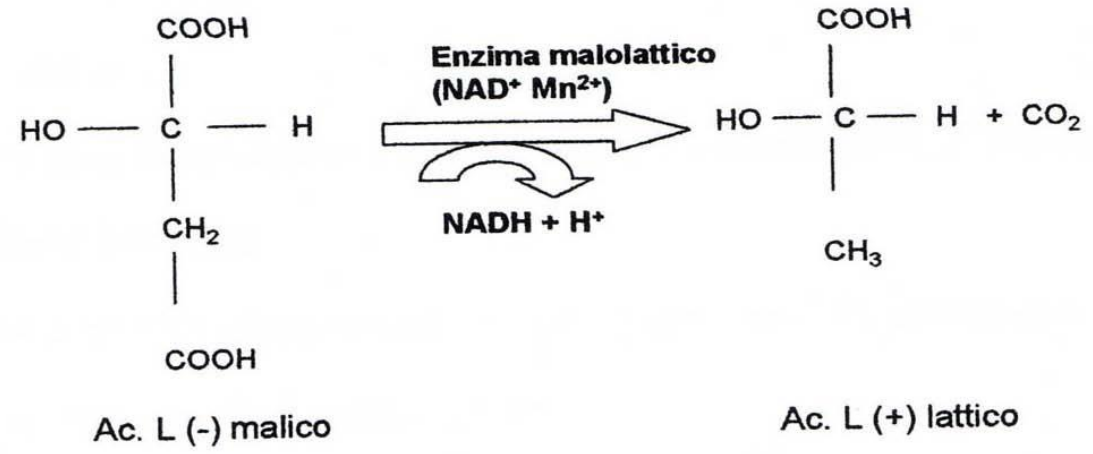
La vinificazione prevede normalmente due processi di fermentazione: una fermentazione alcolica condotta da lieviti e una fermentazione malolattica (FML) eseguita dai batteri lattici (LAB).

I batteri lattici del vino trasformano l'acido L- malico esclusivamente in acido L- lattico (Fig 3.1).

La reazione della trasformazione malolattica dei batteri presenti in vinificazione si svolge secondo l'equazione di Seifert (1901):

acido malico $\longrightarrow$ acido lattico + CO_2

Figura. 3.1 – Reazione malolattica



La stereochimica della trasformazione è stata studiata sia attraverso i metodi enzimatici, che quantificano gli stereoisomeri, che studiando i prodotti di fermentazione del glucosio e dell'acido malico, marcati radioattivamente *(Alizade e Simon, 1973).*

Gli enzimi in grado di fissare e catalizzare una reazione in cui il substrato è l'acido L- malico, sono la malato deidrogenasi (MDH) e l'enzima malico. Il primo catalizza una reazione in cui dall'acido L- malico si forma ossalacetato, mentre il secondo una reazione in cui dall'acido L- malico si forma piruvato.

- MDH

L- malico + NAD + (Mn 2+) « ossalacetato + NADH + H^+

- Enzima malico

L- malico+ NAD + « piruvato + CO_2 + NADH + H^+.

Come noto, l'ossalacetato è facilmente decarbossilato a piruvato, per cui entrambe le reazioni portano al piruvato. Quindi, per deduzione, siccome il prodotto finale della trasformazione malolattica nel vino è l'acido L-lattico, la MDH e l'enzima malico dovrebbero essere associate ad una lattato deidrogenasi (LDH) catalizzante la riduzione del piruvato a L-lattico, Tuttavia, tutti gli studi e le evidenze sperimentali, hanno dimostrato che, almeno per i batteri del vino, ciò non avviene. Infatti, in questo caso, i batteri possiedono solo una D-LDH, per cui l'acido malico può portare solo all'acido D-lattico.

E' stato dimostrato, inoltre, che gli *Oenococcus*, siano essi abbondanti o unici nella vinificazione, formano, da una parte, solo acido D-lattico a partire dal glucosio e dall'altra esclusivamente l'acido L-lattico a partire dall'acido L-malico. Questa osservazione consente di rafforzare la tesi

che la trasformazione dell'acido malico non passa attraverso l'intermedio acido piruvico. Grazie a questa osservazione, nel 1968, Peynaud arrivò a concludere che la FML altro non è che una decarbossilazione diretta del substrato.

Questa particolarità dei batteri del vino ha fatto ipotizzare l'esistenza di un enzima catalizzante la decarbossilazione diretta. Tale enzima, chiamato "enzima malolattico" è stato purificato per la prima volta in *Lactobacillusplantarum (Lonvaud, 1975; Schutz e Radler, 1974).*

La questione ancora aperta riguarda, invece, il ruolo del coenzima NAD^+all'interno della FML.

Si può, quindi, riassumere che, da un punto di vista stereochimico, la FML si traduce come una semplice decarbossilazione che provoca la perdita di una funzione acida. Pur nella sua semplicità, si tratta di un fenomeno di così grande importanza pratica che non esiste tecnica di vinificazione o di conservazione che non debba tener conto della sua esistenza.

In realtà, però, non si tratta solo di una trasformazione chimica, ma di un fenomeno su cui si sono espressi i più importanti studiosi di enologia, fin dal XIX secolo, e che ha visto il susseguirsi di diverse teorie circa le sue azioni e i fattori che la influenzano. Le ragioni che spiegano la difficoltà di comprensione della FML sono molteplici. Prima di tutto, la variabilità delle condizioni che ne rendono difficile la manifestazione; poi il fatto che essa si accompagna all'intervento dei batteri lattici, responsabili di malattie. Proprio per questo motivo, per anni, si è pensato che la sua presenza nei

vini rossi corrispondesse ad un inizio di alterazione, tanto che in Francia, negli anni ’50, si cercò ad ogni costo di evitare la presenza dei batteri ricorrendo ad un’eccessiva solfitazione del mosto. Successivamente, si è scoperto, invece, che la FML, se ben controllata, apporta numerosi vantaggi al vino.

La FML è favorita nei vini con alti livelli di acido malico, nell’ invecchiamento in botti di rovere e affinamento in bottiglia (Bauer e Dicks, 2004).

Alcune recenti teorie sostengono che il miglioramento qualitativo dei vini rossi è maggiore se la fermentazione malolattica si sviluppa in barrique.

In questo caso, infatti, la FML esalta il bouquet e rende più ampi e vellutati i tannini.

Quando però le uve non sono sufficientemente mature, quindi ricche di acido malico, la FML è più difficile da ottenere. All’opposto, con uve mature, con bassa acidità, gli effetti a livello gustativo sono meno rilevanti, ma è più facile ottenere la FML. Anche se in quest’ultimo caso sono più alti i rischi di un’alterazione batterica accidentale.

Lo sviluppo di batteri lattici nel vino deve essere mantenuto rigorosamente sotto controllo, per garantire che possano crescere solo le specie batteriche desiderate, evitando i rischi di produzione di difetti sensoriali o di composti nocivi. Infatti, quest’ultimi sono responsabili della comparsa delle malattie del vino (amaro, girato, etc). Di regola, è importante che la FML sia completata rapidamente per raggiungere la stabilità del vino. La FML influenza tre diversi aspetti di qualità del vino,

che sono collegati tra loro: acidità, stabilità microbica e complessità sensoriale del vino. Questi contributi sono in grado di migliorare la qualità dei vini. Il successo della FML è influenzata da diversi parametri enologici, quali temperatura, pH, grado alcolico (Henick-Kling et al., 1993).

Una temperatura elevata (>30°C) durante la macerazione può influire negativamente sulla crescita dei batteri. L'effetto della temperatura sulla crescita batterica è in funzione del grado alcolico, ma in linea generale, si può affermare che *optimum* è compreso tra i 20 e i 25°C. La FML rallenta, invece, per valori di temperature intorno ai 30°C. Queste temperature sono consentite solo se il grado alcolico è compreso tra 0 e 4% vol. di etanolo. Invece, temperature comprese tra i 18 e i 25°C prevedono che il tenore di etanolo sia compreso tra 10 e 14% vol.. Ecco perché nelle pratiche di cantina è sempre consigliabile mantenere i vini ad una temperatura minima di 18°C.

Condurre la FML entro i limiti previsti consente di limitare la produzione di acidità volatile.

Il pH del vino gioca un ruolo importante nel determinare quali specie di batteri lattici sopravviverà. Nel caso in cui il vino abbia un valore di pH inferiore a 3,2, quindi un vino molto acido, l'attivazione della fermentazione malolattica sarà molto difficoltosa e con molta probabilità non si verificherà affatto. Con valori di pH superiori a 4,5 la fermentazione malolattica avrà uno svolgimento molto lento. Il valore ottimale di pH è di 4,2-4,5. Tuttavia, valori di circa 3,4 sono già

favorevoli *(Kunkee, 1967).* Quando il pH è eccessivamente basso, è possibile facilitare la partenza con l'aiuto di una leggera disacidificazione, il cui scopo è quello di correggere il pH senza portare via quantità eccessive di acido tartarico.

La presenza di un pH basso (3,0) e di una concentrazione di alcol elevata rappresentano due fattori di stress che se combinati con altri parametri, influenzano la sopravvivenza dei batteri lattici, e di conseguenza la FML. Poco si sa circa l'influenza dello stress causato da valori di pH estremi sulla produzione di emissioni di composti aromatici del LAB nel vino (Knoll et al., 2011). Oltre a produrre acido lattico, come prodotto principale del catabolismo dell'acido malico, è noto che i batteri lattici sono in grado di produrre altri composti importanti dal punto di vista sensoriale, quali: acetaldeide, acido acetico, diacetile, acetilmetilcarbinolo e 2,3-butandiolo. Gli ultimi tre composti si originano dal consumo di acido citrico e svolgono un ruolo importante per i profili sensoriali di vino *(Bartowsky et al., 2002).*

A concentrazioni superiori a 5 mg/l, il diacetile può essere eccessivo, conferendo al vino note burrose e di frutta secca (Henick-Kling et al., 1993). Un'altra trasformazione imputabile ai batteri lattici è la decarbossilazione dell'istidina in istamina, che è una sostanza tossica. Inoltre, la FML si accompagna sempre alla modifica del colore dei vini rossi, con perdita di intensità e attenuazione della tinta rossa. A seconda del pH e del potenziale redox del vino, l'acido acetico può rappresentare un altro metabolita derivato dalla degradazione di acido citrico dai batteri

malolattici. Nei vini sottoposti a FML sono stati osservati anche livelli più elevati di esteri volatili, alcoli superiori e lattato di etile. Ci sono molte prove circa la capacità della FML di migliorare le sensazioni gustative e la struttura del vino. La FML non solo cambia l'acidità percepita e le sensazioni tattili simili all'acidità, ma aumenta anche la percezione degli attributi, come nel caso della morbidezza *(Henick-Kling, 1995).* I vini perdono così il loro carattere ruvido e acido e diventano più morbidi e corposi.

La FML comporta anche un sensibile miglioramento delle caratteristiche organolettiche del vino, infatti, conferisce una maggiore complessità ai profumi del vino. Profumi che sono composti da una grande varietà di elementi con differenti proprietà aromatiche. Esso comprende composti aromatici provenienti dalle uve (aroma varietale), composti che si formano durante le operazioni di estrazione e condizionamento del mosto (aromi prefermentativi), altri composti prodotti da lieviti e batteri proprio durante la fermentazione alcolica e malolattica (aromi fermentativi) e composti che appaiono durante il processo di invecchiamento (aromi post-fermentativi) *(Romano et al., 2003).*

Le interazioni tra le specie (o ceppi) di batteri lattici, le caratteristiche delle proprietà sensoriali dell'uva e del vino sono ancora da studiare con attenzione.

Proprio su quest'ultimo aspetto, alcune recenti teorie, sostengono che una FML che si sviluppa in barrique conferisce al vino una maggiore complessità sensoriale (bouquet più fine, tannini più vellutati, etc.), che

tende, però, a sfumare leggermente al momento dell'imbottigliamento. Sulla scorta di queste deduzioni,sono stati affinati diversi accorgimenti tecnici nel lavoro di cantina, volti a migliorare proprio la conduzione della FML in barrique. Le maggiori difficoltà, infatti, consistono nel dosaggio chimico dell'acido malico. In passato, si utilizzava come parametro l'acidità totale, con il rischio, però, di confondere il suo abbassamento con quello risultante da una precipitazione dell'idrogenotartrato di potassio. Successivamente, è stata introdotta la cromatografia su carta, che visualizza semplicemente la sparizione dell'acido malico. Questo metodo, facilmente utilizzabile in cantina, ha contribuito ad incentivare una grande diffusione della pratica della FML. Tuttavia, anche questo metodo necessita di alcuni accorgimenti tecnici per non incorrere in gravi errori di valutazione. Normalmente il controllo della FML si effettua dopo la svinatura, quando la fermentazione alcolica è finita. Tuttavia, bisogna stare molto attenti ad un eventuale inizio prematuro della FML imputabile ad una insufficiente solfitazione del mosto o ad un inoculo batterico prima della fermentazione alcolica.

6. I MICRORGANISMI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

I batteri lattici dei mosti d'uva e dei vini appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus oeni,* e *Pediococcus*. Oltre alla morfologia, cocchi e bastoncelli, per distinguerli si ricorre al carattere omofermentativo o eterofermentativo. I primi producono più dello 85% di acido lattico a partire dal glucosio; i secondi producono, oltre all'acido lattico, anidride carbonica, etanolo e acido acetico.

Tra i lattobacilli eterofermentativi facoltativi (gruppo II) più diffusi nei mosti d'uva e nei vini troviamo *Lactobacillus plantarum*, che, in coltura con glucosio, ha un metabolismo omofermentativo per il glucosio, mentre tra i cocchi etero fermentativi *Oenococcus oeni* (ex *Leuconostoc oenos*), che è conosciuto per realizzare soprattutto la fermentazione malolattica.

Il primo, è un batterio vigoroso e diffuso nei prodotti alimentari fermentatie non, fermenta il glucosio, il fruttosio, il saccarosio e altri mono e disaccaridi (l'arabinosio e lo xilosio possono essere fermentati solo da alcuni ceppi); il secondo fermenta l'acido malico, il glucosio, il fruttosio e il trealosio.

Oenococcus oeni è senza dubbio il più importante agente della FML, anche se altri batteri lattici, come ad esempio *Lactobacillus plantarum*, sono capaci di fermentare l'acido malico e di tollerare bassi valori di pH. *Lactobacillus plantarum* è meno acidofilo di *Oenococcus oeni*, ma è molto più versatile e resistente all'azione combinata di fattori negativi.

Per questo, si è ipotizzato che *L. plantarum* sia più idoneo del primo nelle prime fasi di fermentazione. Tuttavia, *O. oeni* è sempre stato ritenuto il batterio più importante nella FML, tanto da essere considerato, fra i batteri lattici, l'equivalente di *Saccharomyces cerevisiae* fra i lieviti.

Secondo *Lafon-Lafourcade et al. (1983),* però, durante la fermentazione alcolica il numero di batteri lattici normalmente presenti nei mosti d'uva e nei vini cala considerevolmente e alla fine l'unico batterio lattico di cui è ancora rilevabile la presenza è *Oenococcus oeni*. Addirittura il suo numero tende a crescere con le operazioni successive, probabilmente per contaminazione delle attrezzature di cantina. Sempre secondo gli autori precedenti *Oenococcus oeni* deve essere considerato l'unico responsabile della FML spontanea, mentre le altre specie non svolgerebbero alcun ruolo primario, forse a causa della loro scarsa alcool-tolleranza.

Per questo, *O. oeni* viene selezionato per realizzare colture commerciali da inoculare nei mosti e nei vini. Tuttavia, nonostante si tratti di una pratica di indubbio interesse, questa presenta ancora qualche difficoltà. Per molto tempo, infatti, l'inoculo con ceppi di *Oenococcus oeni* ha portato a continui insuccessi, perché i batteri introdotti non riuscivano a svilupparsi, ma anzi a popolazione inoculata regrediva fino alla morte delle cellule.

Questo insuccesso è dovuto al fatto che i batteri industriali vengono coltivati su substrati ideali per la loro crescita. Quando passano nel vino, invece, mezzo meno favorevole, essi subiscono un adattamento tanto più

difficile, quanto più diverso è il mezzo di partenza rispetto a quello di inoculo.

Per superare questa difficoltà, sono state ipotizzate diverse soluzioni.

La precoltura di *Oenococcus oeni*, spesso arricchita di un mezzo nutritivo disidratato, può essere aggiunta in tre momenti diversi della vinificazione:

- ai mosti prima della fermentazione alcolica e contemporaneamente ai lieviti selezionati;
- ai mosti, nel pieno della fermentazione alcolica;
- ai vini, dopo che la fermentazione alcolica è terminata.

Secondo *Beelman (1982)* e *BeelmaneKunkee (1985),* l'inoculazione delle colture ai mosti è conveniente perché consente un miglior adattamento delle cellule dei batteri lattici le quali, trovandosi in un mezzo privo di etanolo e ricco di nutrienti, cominciano a moltiplicarsi. A questa tesi, però, si contrappongono *Lafon-Lafourcade et al. (1983)* che ritengono che lo sviluppo dei batteri lattici a spese degli zuccheri porti ad un incremento dell'acidità volatile. La maggior parte degli autori è, però, favorevole all'aggiunta di batteri lattici al termine della fermentazione alcolica, perché è in questa fase che si ottengono i risultati migliori. Alcuni autori concordano sul fatto che la moltiplicazione in vino sia la più efficace, sia per quanto riguarda la velocità di pre-moltiplicazione dei batteri, che per la sopravvivenza degli stessi dopo l'inoculo.

La sempre maggiore consapevolezza dell'influenza della FML sulla qualità del vino ha portato gli enologi a cercare un migliore controllo sull'avvio e sullo svolgimento della stessa. L'inoculo con determinate colture starter, riduce il rischio di contaminazione da parte di batteri lattici e/o batteriofagi, assicurando in questo modo un avvio rapido della FML ed una migliore gestione della produzione di composti aromaticamente rilevanti e sul gusto del vino.

Sono state messe a punto numerose colture starter di batteri malolattici. Questi ceppi sono stati selezionati a partire da fermentazioni malolattiche spontanee, sulla base delle loro buone cinetiche, del loro comportamento in condizioni difficili, e della loro capacità di conferire caratteri organolettici positivi. Essi possono tollerare le condizioni di difficile crescita e sopravvivenza di certi vini e non producono metaboliti pericolosi. Non generano composti che conferiscono al vino note negative, ed al contrario, sono dotati della capacità di apportare caratteri favorevoli.

7. EFFETTI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA SULLA QUALITÀ DEI VINI

Gli effetti della fermentazione malolattica sul vino sono principalmente la riduzione dell'acidità, l'aumento della stabilità microbiologica e il miglioramento delle proprietà organolettiche. Tradizionalmente le pratiche enologiche consigliano di favorire la fermentazione malolattica nei processi di vinificazione della maggior parte dei vini rossi e anche in alcuni bianchi soprattutto quelli con acidità elevata.

Per quanto riguarda il colore, la disacidificazione comporta una diminuzione dell'intensità a causa del cambiamento del rapporto tra le forme colorate e non colorate degli antociani. L'astringenza diminuisce grazie alla reazione di legame tra tannini e antociani che riduce la quantità di antociani liberi.

La FML in un vino si accompagna sempre, in primis, ad una modifica del colore dei vini rossi: esso perde in intensità ed il rosso, dapprima violaceo, tende a virare verso i colori più granati.

Ciò è dovuto, prevalentemente, ad una perdita di colore degli antociani per effetto del pH che aumenta, ed anche alla condensazione antociani-tannini che stabilizzano il colore e a livello gustativo si traduce in una diminuzione dell'astringenza del tannino stesso.

Un vino che subisce la FML sicuramente acquisisce connotazioni qualitative positive soprattutto perché aumenta la complessità aromatica grazie all'aumento delle note fruttate dovute al complesso metabolismo batterico.

Ovviamente, le condizioni di FML devono essere controllate e studiate in quanto una FML con deviazioni di percorso possono portare a note aromatiche negative (es. eccesso di diacetile che apporta connotazioni burrose troppo elevate).

Inoltre, a livello gustativo i vantaggi della fermentazione malolattica risultano maggiori se il contenuto in acido malico nel vino di partenza è molto elevato e quindi la disacidificazione è più evidente.

Il vino, trasformando l'acido malico in lattico perdendo una funzione acida, diventa più morbido e la sostituzione dell'anione malico con l'anione lattico porta ad una sensazione meno aspra: in bocca si passa dall'aspro della mela immatura all'acido del latte meno aggressivo. In questo modo il vino in bocca passa dalla sensazione di durezza e spigolosità alla rotondità.

Inoltre, se la FML avviene in botte, il vino ne guadagna in ulteriori profumi e in un tannino più elegante.

8. I COSTITUENTI DEL VINO COINVOLTI NELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

8.1 - Principali acidi organici dell'uva

Gli acidi organici contribuiscono in modo determinante alla composizione, alla stabilità microbiologica e chimico-fisica ed alle qualità sensoriale dei vini.

In particolare, è noto che i vini bianchi che non hanno subito disacidificazione biologica sono più stabili nei confronti delle precipitazioni di bitartrato di potassio (KHT) e di tartrato di Calcio (CaT).

I vini rossi, invece, possono avere acidità più basse in quanto i composti fenolici,in essi presenti, contribuiscono a garantire la longevità e la stabilità del vino stesso.

I principali acidi organici dell'uva sono l'acido tartarico, l'acido L- malico, l'acido citrico; mentre quelli di fermentazione sono l'acido succinico, l'acido acetico, l'acido lattico, l'acido ossalacetico, l'acido fumarico.

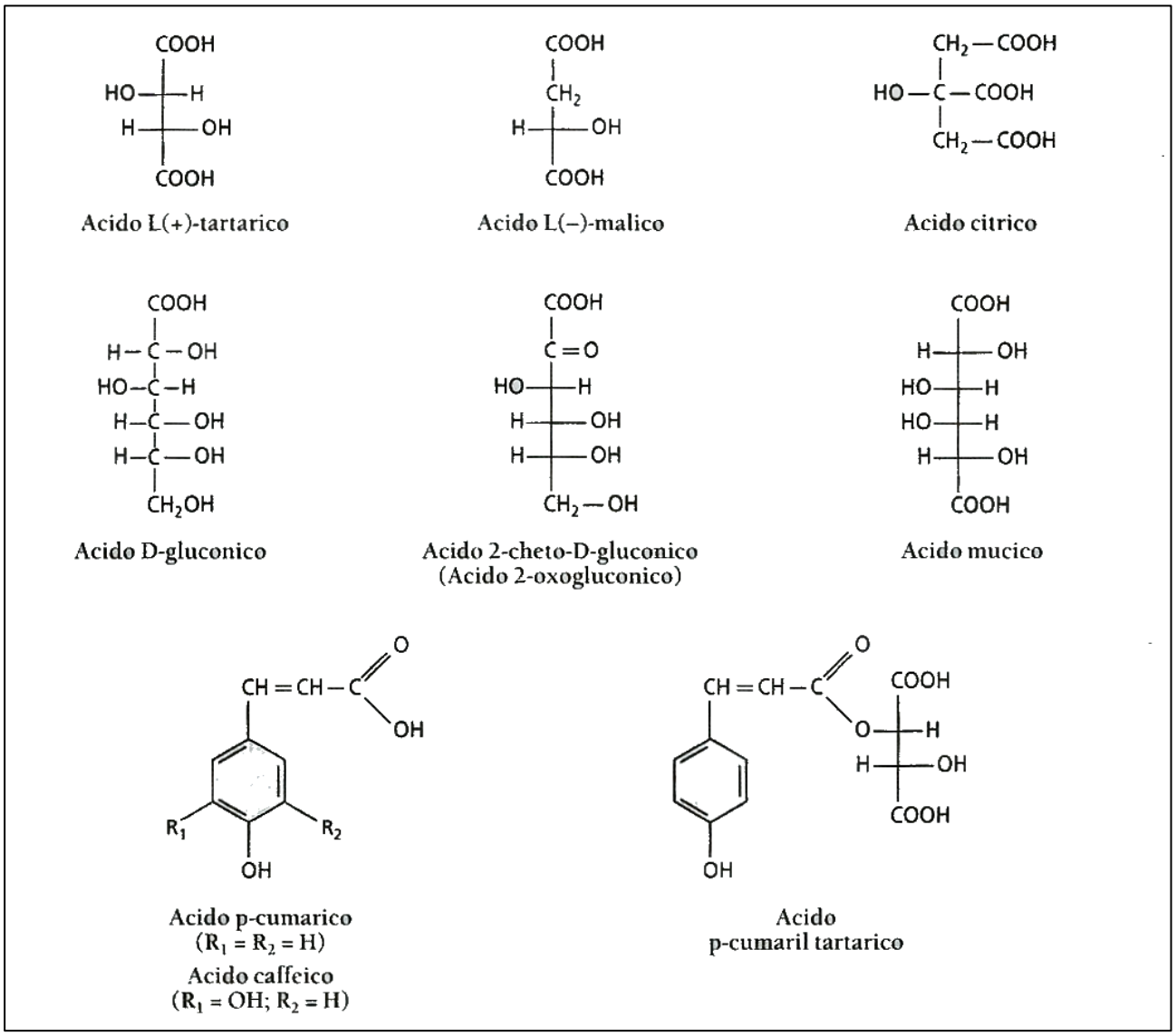
Dal punto di vista quantitativo l'*acido tartarico* è quello più significativo; infatti, nell'uva nella fase erbacea può raggiungere anche i 15 g/l. Nei mosti può variare da 2 a 7-8 g/l a seconda della zona e delle temperature di esposizione del vigneto.

L'*acido malico* è presente in tutti i viventi; ne sono ricche le mele verdi. Nel succo ottenuto da acini acerbi si ha fino a 25g/l prima dell'invaiatura; poi nelle due settimane seguenti alla comparsa del colore la concentrazione di acido malico si dimezza in seguito sia alla diluizione dovuta all'ingrossamento dell'acino che per il consumo da parte dell'acino.

A maturazione, infatti, la concentrazione di acido malico varia da 1-2 g/l nei mosti delle regioni meridionali a 4-7 g/l nei mosti delle regioni settentrionali.

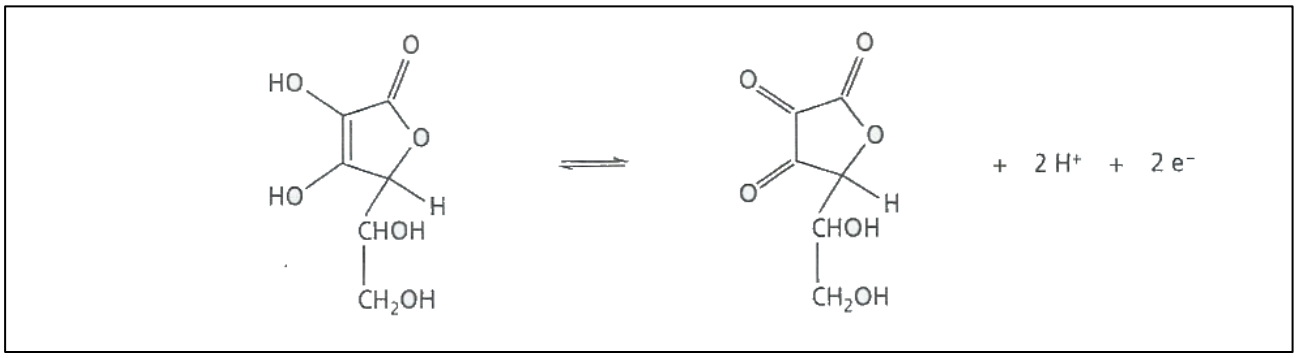
L'*acido citrico*, noto per la sua importanza nel ciclo di Krebs, è presente prima della FML in quantità pari a 0,5-1 g/l (Fig. 8.1.1).

Figura 8.1.1 - I principali acidi organici dell'uva.



A questi tre acidi principali dell'uva, si possono aggiungere gli acidi fenolici della serie cinnamica (*caffeico*, *p-cumarico*, *ferulico*) esterificati con una funzione alcolica dell'acido tartarico (*caffeil tartarico*, *p-cumaril tartarico*, *feruliltartarico*). Inoltre, occorre ricordare l'*acido ascorbico* che grazie ad un sistema redox che protegge i composti fenolici dall'ossidazione Fig.8.1.2.

Figura 8.1.2- Equilibrio di ossidoriduzione dell'acido ascorbico.



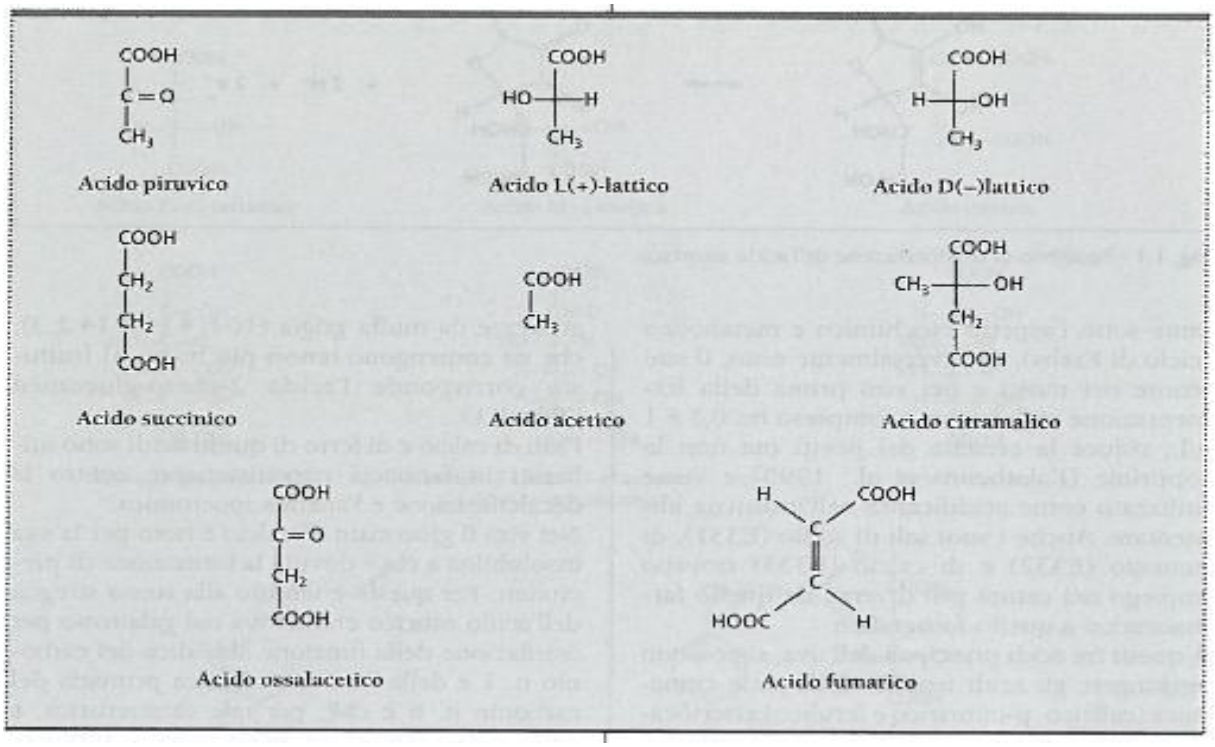
I vini provenienti da uve colpite da muffa grigia contengono anche acidi derivati dalla ossidazione della funzione aldeidica degli aldosi o di quella alcolica dei chetosi; la presenza infatti dell'acido gluconico (dal glucosio) fa sì che possano differenziare i vini colpiti da muffa nobile da quelli ottenuti da uve non attaccate.

8.2 - Principali acidi organici di fermentazione

Tra i diversi acidi organici di origine fermentativa (Fig. 8.2.1), in primis c'è l'acido piruvico, la cui quantità risulta quasi nulla in virtù del suo ruolo chiave. La sua riduzione infatti, porta alla formazione dei due enantiomeri L e D dell'acido lattico. Quello destrogiro è di origine

batterica, quello levogiro deriva quasi esclusivamente dal metabolismo dei lieviti.

Figura 8.2.1 - Principali acidi organici di fermentazione



L'acido piruvico si trasforma in etanale che poi sarà ridotto in etanolo con la fermentazione alcolica. Inoltre, la sua ossidazione, sia batterica che chimica, porta all'acido acetico.

Altro acido di fermentazione è l'acido succinico.

8.3 - Le diverse forme di acidità

Parlando di vino, si ha l'esigenza di differenziare l'acidità reale da quella totale e da quella volatile.

L'**acidità totale** rappresenta "*il numero di equivalenti di base forte necessari per neutralizzare a pH 7 le funzioni acide di un litro di mosto o di vino*". Essa è espressa in meq/l o g/l di acido tartarico.

L'acidità totale è l'espressione di tutte le specie acide presenti nel mosto o nel vino. Il contributo di ogni acido dipende dalla sua forza, da cui dipende poi sia il grado di dissociazione che il grado di salificazione.

L'**acidità volatile** è un parametro chimico da tenere sottocontrollo durante l'elaborazione del vino. Il suo contenuto è legato alla qualità del vino; un suo eccesso è subito rilevato alla degustazione e fa sì che il vino venga valutato negativamente dal punto di vista sensoriale.

Essa è costituita dalle forme libere e salificate degli acidi volatili, ed è espressa in meq/l o g/l di acido solforico (in Francia) e di meq/l o g/l di acido acetico (in Italia).

Il limite legale, per quanto riguarda il contenuto di acidità volatile, non deve essere superiore ad un decimo della gradazione alcolica espressa in acido acetico (Reg. UE 1493/99).

L'origine di acido acetico è prevalentemente fermentativa; normalmente la fermentazione alcolica porta a 0,24-0,37 g/l acido acetico ad inizio e fine fermentazione in relazione alla presenza di ossigeno. Inoltre, si può avere un ulteriore aumento di acidità volatile durante la FML: in questo

caso l'acido acetico si forma dalla degradazione dell'acido citrico ad opera dei batteri lattici.

L'**acidità fissa** di un vino è ottenuta per sottrazione del valore dell'acidità volatile da quello dell'acidità totale. Proprio per sottrazione, essa dovrebbe contenere sia le funzioni acide libere degli acidi fissi che le funzioni acide salificate degli acidi volatili.

L'**acidità reale**, o **pH**, è la concentrazione reale di ioni ossonio nel mosto o nel vino.

$$pH = -\log_{10} [H_3O]$$

$$HA + H_2O \Longleftrightarrow A^- + H_3O^+$$

Dal valore del pH dipendono, dal punto di vista sensoriale, le sensazioni acide di freschezza dei vini. Inoltre, più è basso il pH (nel vino 2,8 – 4,0) maggiore è la stabilità microbiologica e chimico-fisica del vino stesso, ciò perché il pH basso si oppone allo sviluppo microbico e aumenta il potere antisettico della SO_2.

L'effetto del pH sulla stabilità fisica si manifesta attraverso la sua solubilità dei sali tartarici (bitartrato di potassio, tartrato di calcio e tartrato malato di calcio).

9. L' Analisi sensoriale

9.1 - Cos'è

In passato, le aziende alimentari pensavano che il controllo della qualità consistesse unicamente in un controllo delle caratteristiche chimiche e microbiologiche. Veniva trascurato il fatto che il consumatore esprimeva il suo giudizio basandosi su parametri quali sapore, odore,colore, consistenza e rumore ossia da tutte quelle caratteristiche legate agli organi di senso.

Da questo nasce l'esigenza di affiancare ai laboratori chimico-fisici e microbiologici un laboratorio specializzato per la valutazione delle caratteristiche organolettiche.

Il settore alimentare è quello che necessita più di altri di un gruppo di persone addestrate e specializzate in grado di valutare sensorialmente le caratteristiche degli alimenti. Ovviamente, per poter poi utilizzare in maniera proficua ed idonea tali risultati occorre che i dati vengano elaborati statisticamente.

Compito del *Panel* è:

- percepire le caratteristiche organolettiche sia in assoluto che per confronto,
- identificare i descrittori organolettici,
- formulare pareri soggettivi sulla gradevolezza.

9.2 - Selezione ed addestramento del panel

La fase di costituzione di un panel è di fondamentale importanza in quanto tutti i risultati che si otterranno dipenderanno da essa. I soggetti che costituiranno il gruppo panel devono essere idonei a percepire, distinguere e misurare sensorialmente le caratteristiche organolettiche del prodotto.

I soggetti saranno scelti in base alla loro capacità a discriminare e alla loro costanza nella discriminazione.

I giudici sono organizzati in gruppi in funzione delle loro attitudini e caratteristiche:

- ✓ **Giudici inesperti:** soggetti che non hanno mai partecipato a test sensoriali, pertanto da coinvolgere soltanto in test semplici: di preferenza e/o di accettabilità.
- ✓ **Giudici esperti:** soggetti che hanno una limitata esperienza nel campo dell'analisi sensoriale e conoscono le procedure legate ai test più semplici: triangolare, duo-trio, ecc.. Questi soggetti hanno comunque una notevole conoscenza dei prodotti: ad es. nel settore enologico i giudici esperti sono gli enologi.
- ✓ **Giudici addestrati:** persone che hanno ricevuto una formale istruzione e sonoin grado di valutare e descrivere le caratteristiche sensoriali dei prodotti, di partecipare a test complessi e di fornire dati riproducibili.

Le fasi che precedono la formazione di un panel sono il *Reclutamento* e *la Selezione ed addestramento.*

La costituzione di un panel richiede la presenza di un coordinatore "*panel leader*" il quale deve avere una preparazione scientifica in grado di avvalersi di conoscenze ed esperienze derivate anche da altre discipline tecniche e scientifiche (fisiologia, chimica, matematica, statistica, ecc.) che servono da supporto all'analisi sensoriale.

Il panel leader deve:

- Pianificare e sviluppare le risorse quali test, soggetti e raccolta dati;
- Spiegare le procedure con cui devono essere svolti i test;
- Selezionare i test e i disegni sperimentali;
- Controllare le attività durante la valutazione sensoriale;
- Individuare le problematiche per la costituzione di un panel per i vari test;
- Predisporre la raccolta dei dati;
- Garantire tutti gli approvvigionamenti e servizi utili;
- Registrare i progressi del panel;
- Sviluppare e adattare tutti i programmi da svolgere;
- Condurre ricerche su nuovi metodi da applicare.

La giuria deve essere autonoma e non influenzabile,avere buona memoria per colori, odori e sapori, essere ben predisposta verso tutti i prodotti senza pregiudizi. Deve avere età compresa fra i 20(< concentrazione, > interesse, > sensibilità) e 60 anni(< concentrazione, > interesse, > sensibilità).

Prima di iniziare una seduta di degustazione occorre mettersi nelle condizioni più idonee per il lavoro, quindi occorre evitare di fumare per

almeno 30 minuti prima della seduta ed essere in buona salute psicofisica in quanto raffreddori o stanchezza potrebbero alterare le valutazioni.

Altre piccole accortezze sono, ad esempio, evitare l'uso del profumo e di prodotti per l'igiene personale con profumi molto intensi; evitare il rossetto.

E' preferibile un gruppo panel costituito da ambo i sessi.

Durante la fase di *Selezione* deve essere valutata la sensibilità sensoriale di ciascun soggetto e la sua capacità di descrivere e comunicare le percezioni sensoriali ai fini della scelta degli individui più adatti.

I soggetti reclutati vengono selezionati in funzione della loro capacità di:

- riconoscere i 4 gusti fondamentali e gli odori;
- determinare il livello soglia;
-discriminare e classificare le caratteristiche sensoriali dei prodotti alimentari.

I test in questa fase hanno lo scopo di selezionare gli individui più portati perquesto tipo di valutazione e di rendere loro familiare i metodi e i materiali usati nell'analisi sensoriale.

9.3 - Dalla percezione dello stimolo al riconoscimento

La conoscenza che si ha del mondo esterno è quella che si costruisce attraverso la *percezione* e la *conoscenza*. Sono i sensi i nostri strumenti per ricavare informazioni dal mondo fisico: i nostri recettori si

interfacciano con la realtà esterna. I nostri sistemi sensoriali sono fatti per poter interagire con l'Energia radiante, con l'Energia meccanica,con l'Energia termica e con quella chimica. Ovviamente, c'è un limite di percezione ossia un massimo ed un minimo che solo con un costante allenamento può essere affinato.

La percezione inizia nel momento in cui lo stimolo impatta con i recettori sensoriali. Queste cellule rilevano le caratteristiche del segnale, lo traducono, lo codificano fino a farlo arrivare al cervello. Quindi di qualsiasi natura sia l'energia dello stimolo essa arriva al cervello sottoforma di energia elettrochimica, ciò che varia è semplicemente il percorso che fa.

I segnali sensoriali giungono a livello della corteccia cerebrale tramite vie che dalla periferia arrivano al centro del sistema nervoso, dove avviene l'elaborazione cognitiva. Nella corteccia cerebrale avvengono quelle operazioni logiche e mentali che permettono di organizzare i dati sensoriali facendo, così, intervenire diversi fattori cognitivi (memoria, attenzione, linguaggio, pensiero…).

Tutto questo complesso meccanismo di elaborazione ci permette di capire e di agire di conseguenza, ossia di *reagire alla percezione con una risposta.*

La *sensazione* è un qualcosa di ancora non elaborato e poco distinto, ossia ciò che risulta dal venire a contatto dei recettori sensoriali con uno stimolo prima dell'elaborazione da parte del cervello e quindi grazie alle nostre conoscenze ed esperienze; la *percezione*, invece, è un insieme di

sensazioni già elaborate dal cervello e organizzato logicamente, in modo tale da consentire il riconoscimento.

La *sensazione* è soggettiva in quanto media tra la realtà esterna e la realtà psicologica ossia è *una impressione soggettiva di uno stimolo fisico di una data intensità*.

E' quindi possibile descrivere le proprie sensazioni, e se lo stesso evento è descritto da più persone in modo simile, si può dire che esse hanno avuto sensazioni simili. Ad esempio, ogni vino racconta un qualcosa di diverso ad ogni persona che lo assaggia, questo perché la mappa che ognuno di noi crea può assomigliarsi ma non è la stessa in virtù del fatto che ognuno registra un vissuto di esperienze diverse.

Scambiandosi, quindi, le informazioni la mappa del vino si completa e si dettaglia.

Inoltre, tenendo presente che il vino è una ambiente tanto complesso che cambia al contatto con l'aria ed evolve istante dopo istante e che anche la percezione dell'assaggiatore cambia man mano che vengono elaborati gli stimoli odorosi, la mappa sarà sempre più dettagliata.

I test descrittivi sono atti all'individuazione e alla misurazione, mediante gli organi di senso, delle caratteristiche che consentono di definire la percezione fisica e psicologica. La loro efficacia è determinata attraverso

- l'affidabilità ossia la misura oggettiva del percepito;
- attendibilità: il livello di probabilità di ottenere un risultato simile se il test è ripetuto,

- esaustività: indica in quale misura il test descrive la percezione dell'evento.

I descrittori sono le qualità con cui è espressa la percezione di un test descrittivo. Essi possono essere misurati attraverso la frequenza di comparizione e l'intensità con la quale si manifestano le qualità che essi esprimono, dando così un profilo di ciò che è oggetto di analisi.

I descrittori devono essere comprensibili, precisi, indipendenti e discriminanti.

I descrittori si possono dividere in :

- quantitativi:ossia che possono oggettivare una percezione
- edonici: misurano il livello di piacere che esprime il campione
- emozionali: sono vicini a quelli edonici ma definiscono la reazione emotiva che l'oggetto in esame suscita.

La numerosità dei descrittori utilizzata fa sì che si ha un profilo di ciò che si sta analizzando più o meno dettagliato. Nel caso della descrizione libera, il numero di descrittori dipende dalla quantità di stimoli che vengono prodotti ed anche dalla capacità dell'assaggiatore di tradurre gli stimoli. Invece, nel caso delle schede strutturate, ogni giudice deve essere in grado di rispondere ad una doppia domanda ossia deve valutare sia se quel descrittore è presente, sia in che quantità.

Nella descrizione libera, che può essere di vario tipo (descrizione libera di gruppo, descrizione libera di gruppo guidata,descrizione libera individuale) il panel leader lascia completamente liberi i giudici di

descrivere l'oggetto in analisi e ciò porta i giudici stessi ad automotivarsi per fornire mappe sempre più dettagliate del prodotto.

Allo scopo si adottano due tipi di procedure: quelle che mirano a determinare la sensibilità sensoriale e quelle che vengono utilizzate per valutare le potenzialità dei giudici a descrivere e comunicare le percezioni sensoriali.

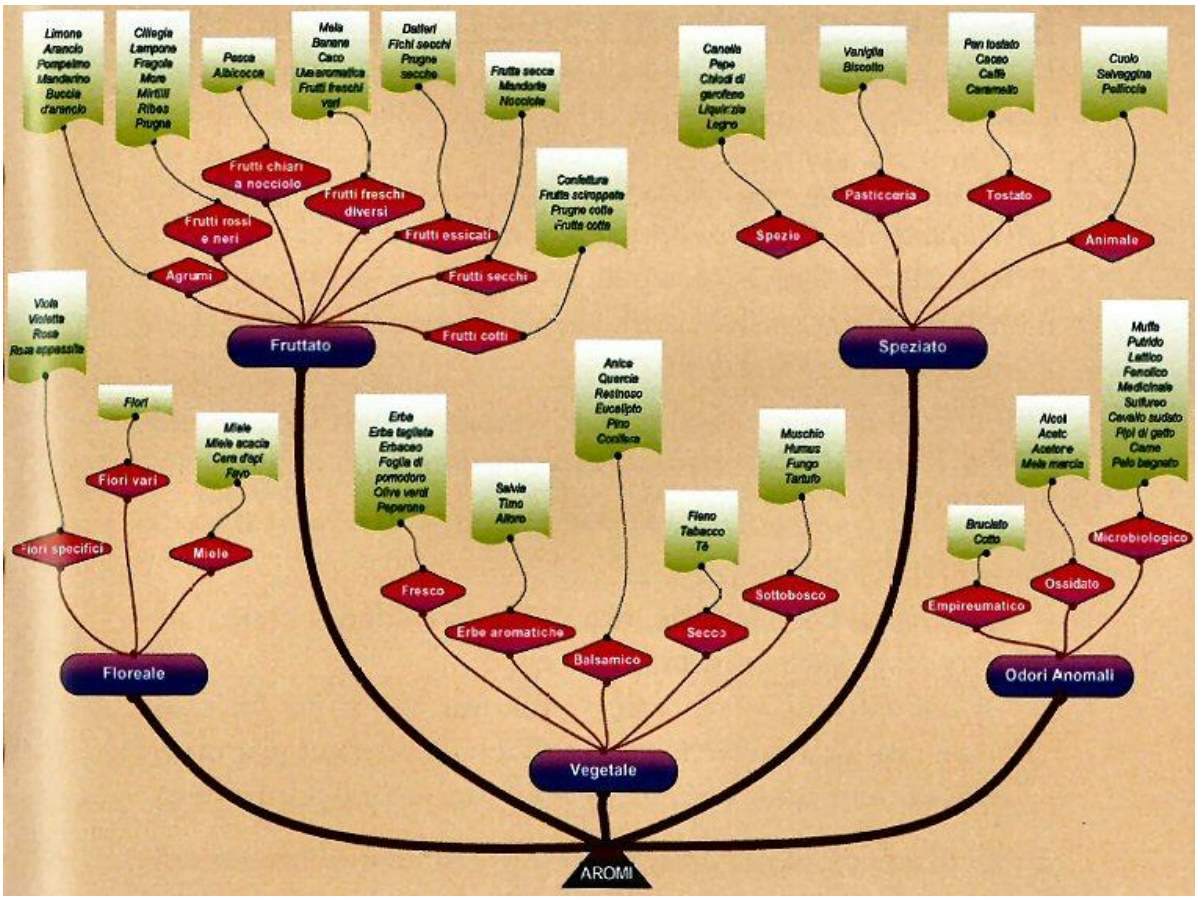
La criticità della descrizione sta nella corretta comunicazione della percezione. "Lo stimolo distale è trasdotto e giungendo al cervello, dove origina una sensazione che richiama funzioni intellettive, per poi diventare percezione. il percepito non è realtà ma una mappa della realtà fortemente deformata dalla personalità attiva in quel momento. la seconda fase è il passaggio della percezione alla descrizione della medesima in cui è fondamentale la capacità verbale. Essa dipende dal vocabolario a disposizione del giudice, dalla velocità con la quale le etichette semantiche vengono associate ai singoli elementi della percezione e dalla personalità del giudice". *(L.Odello et al. 2007).*

Alcuni stimoli (dolce, salato,...) vengono descritti in modo semplice, altri sono di più difficile descrizione quando interviene la sfera emotiva; per cui sono identificati in riferimento all'oggetto o all'esperienza che li produce (metonimia). Una pirazina che può ricondurre al peperone in quanto è l'emozione che fa sì che lo associamo a quella esperienza, sia essa positiva o negativa.

Da qui l'esigenza di creare un albero con una gerarchia dei descrittori(fig. 9.3.1), in modo da poter passare da un descrittore generico ad uno

specifico, e viceversa, senza difficoltà alcuna e in modo che due giudici diversi possano far confluire in una descrizione più generale le proprie descrizioni più specifiche (es. *Fruttato* comprenderà sia *ciliegia* che *more*, e allo stesso tempo ciliegia e mora possono confluire in un descrittore intermedio *Frutti rossi e neri*).

Figura 9.3.1 : Albero dei descrittori.



Occorre, poi, dare una intensità ai descrittori ma poiché ogni giudice è una entità a sé è possibile ovviare in due modi: il primo è fare una seduta di taratura ossia un assaggio zero in cui si calcola per ogni descrittori la mediana dei valori espressi dal gruppo e si spiegano meglio i descrittori in modo che i giudici che discostano dal valore si possano adattare; oppure si può utilizzare scale non numeriche in cui si invita il

giudice a segnare un punto su una linea (estrema sinistra minimo-estrema destra massimo).

Infine, si hanno test edonici-affettivi in cui ciò che cambia sono i descrittori.

10. AMMINE BIOGENE NELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Le ammine biogene sono conosciute fin dai tempi di Ippocrate (460 a.C.) come responsabili di problemi fisiologici per l'uomo. La presenza di ammine in quantità significative nei cibi è correlata alla presenza di diverse specie batteriche (Bover-CidHolfapfel, 2000) e considerata in genere indicatrice di condizioni igieniche e di conservazione non ottimali (G. Nicolini *et al.,* 2003). La pericolosità di questi composti deriva anche dal fatto che esse sono precursori di altre sostanze ben più tossiche come il carbammato di etile che è considerato carcinogeno (Vincenzini *et al.,* 2005).

Le ammine, essendo biologicamente attive sul sistema nervoso e vascolare, possono provocare nell'uomo mal di testa, rossori, palpitazioni e diverse reazioni allergiche in funzione della loro concentrazione e della sensibilità individuale.

Numerosi studi condotti su vini prodotti in diversi Paesi Europei hanno evidenziato che nell'ambito del processo di vinificazione la fermentazione malolattica (FML) è da ritenere la fase più critica per la produzione di ammine biogene.

Dal punto di vista biochimico, sono composti basici azotati a basso peso molecolare che provengono dalla decarbossilazione di amminoacidi precursori, il che implica l'intervento di microrganismi dotati di adeguate attività di decarbossilasi quali i batteri lattici. Di conseguenza, esse sono di origine fermentativa.

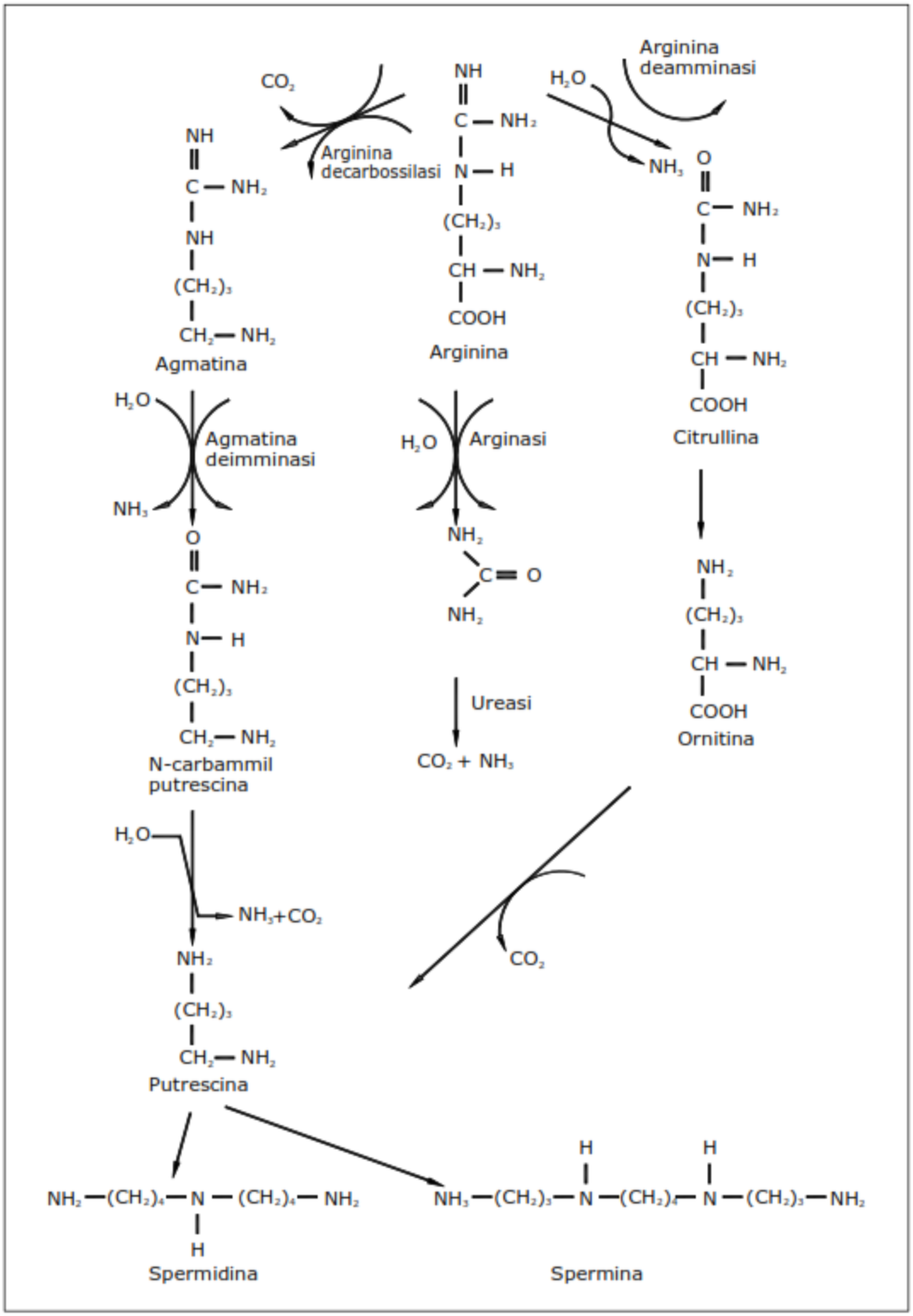
Il metabolismo degli aminoacidi ha anche la funzione di facilitare la tolleranza dei batteri all'ambiente acido grazie alla produzione di ammoniaca che aumenta il pH del mezzo. Molti batteri lattici sono in grado di produrre amine biogene, questa capacità varia da un ceppo all'altro in quanto dipende dalla presenza di trasportatori di aminoacidi sulla membrana plasmatica e degli enzimi specifici di decarbossilazione e di deaminazione.

Tra i batteri lattici, la capacità di produrre ammine biogene è stata per molto tempo attribuita ai soli ceppi appartenenti ai generi *Pediococcus* e *Lactobacillus* ma più recentemente è stato dimostrato che anche *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente responsabile della FML spontanea ed indotta in vino, è capace di produrre ammine biogene quali istamina, cadaverina, putrescina e tiramina, con differenze quali-quantitative in funzione del ceppo considerato (tab.10.1).

Un amminoacido precursore di diverse ammine biogene è l'arginina.

La sua decarbossilazione ad opera della arginina-decarbossilasi batterica, porta all'agmatina precursore della putrescina. Da quest'ultima possono, poi, originare la spermidina e la spermina. A queste ammine occorre aggiungere anche la metilammina, la di metilammina, la piperidina, la propilammina, la pirrolidina e la triptammina; la cui presenza nel vino è sempre di origine batterica.

Figura 10.1 - Ruolo dell'arginina nella sintesi delle ammine biogene.



Le ammine biogene più frequenti nel vino sono: istamina, tiramina e 2-feniletilamina – dotate di maggiore tossicità – e putrescina, cadaverina, spermina e spermidina (tab. 10.2) che, pur non essendo di per sé molto tossiche, potenziano gli effetti delle altre ammine biogene e rappresentano possibili precursori per la formazione delle nitrosoammine, sostanze potenzialmente cancerogene.

Tabella 10.2 – Le diverse ammine biogene e gli amminoacidi corrispondenti.

AMMINOACIDI	AMMINE BIOGENE	
		spermidina
Arginina	Agmatina	Putrescina
		spermina
Cisteina	Mercaptoetilammina	
Istidina	Istamina	
Fenilalanina	Feniletilammina	
Serina	Etanolammina	
Ornitina	Putrescina	
5-idrossitriptofano	Serotonina	
Lisina	Cadaverina	
Tirosina	Tiramina	

Proprio perché queste ammine sono di origine fermentativa, ossia legate alla fermentazione malolattica, ciò spiegherebbe il perché i vini rossi ne contengono in quantità superiori rispetto ai bianchi non disacidificati biologicamente.

I quantitativi di ammine biogene nei vini variano da qualche mg/l a qualche decina di g/l e dipendono dall'incidenza dei processi implicati nella produzione delle uve, nella vinificazione e nella stabilizzazione del vino.

La fertilizzazione azotata del suolo, un cattivo stato sanitario dell'uva associato alla presenza di muffe, il pH elevato del mosto e lo sviluppo di

alcuni lieviti in fermentazione può favorire la presenza di modeste concentrazioni di tali molecole; in seguito con la FML alcuni batteri possono aumentare tali concentrazioni.

Il contenuto risulta essere più elevato nel caso di fermentazione malo lattica spontanea. Il primo accorgimento, quindi,è quello di scegliere con attenzione il ceppo di batteri da impiegare nella disacidificazione, privilegiando quelli che presentano una bassa formazione di ammine biogene, cioè che hanno una bassissima capacità decarbossilante.

È stato, poi, osservato che il trattamento con bentonite (50mg/hl) riduce il tenore in ammine biogene in quanto, al pH dei vini, questi composti hanno carica positiva, mentre la bentonite carica negativa.

Ci sono poi altre condizioni che aumentano il tenore in ammine biogene e che quindi vanno tenute sotto controllo, come elevati valori di pH e una scarsa igiene in vinificazione.

Sebbene nel vino siano stati riscontrati tenori di ammine biogene più bassi rispetto ad altri alimenti fermentati, gli effetti tossici risultano potenziati sia dalla concomitante presenza di diverse ammine (effetto sinergico) sia dalla presenza dell'etanolo, che è noto svolgere un'azione inibitrice su alcuni enzimi intestinali, le monoamino-ossidasi, coinvolti nel naturale processo di detossificazione presente nell'uomo.

La causa esatta tra formazione di istamina e presenza di istidina ancora non è ben nota, ma l'intervento di batteri ricchi in istidina decarbossilasi sembra essere l'ipotesi più verosimile (Ribéreau-Gayon, 2010).

Un soggetto sano può comunque sopportare l’assunzione per via orale con gli alimenti di quantità anche elevate di istamina (comprese tra 200 e 500 mg).

SPERIMENTAZIONE

1. MATERIALI E METODI

1. 1 -Uve e vini impiegati nella sperimentazione

Nelle prove sperimentali sono state utilizzate uve e vini delle *cultivar Falanghina e Tintilia*.

Per quanto riguarda la *Falanghina,* sono state gentilmente fornite le uve da una azienda agricola (Palummo) in agro di Galluccio in provincia di Caserta. Due quintali di queste uve, integre ed igienicamente sane, sono state ammostate e vinificate presso il laboratorio di Tecnologie del Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Sono stati determinati parametri enologici quali alcol, acidità totale,pH, acidità volatile e SO_2 secondo i metodi ufficiali. I valori sono riportati in tabella1.1.

Tabella 1.1 - Caratteristiche del vino *Falanghina.*

pH	3.42
Acidità tot *(g/l ac. tartarico)*	7.56
Acidità volatile *(g/l ac. acetico*)	0.24
Alcol *(%Vol)*	15.0
SO_2 Totale *(mg/l)*	55.68
SO_2 libera *(mg/l)*	3.84
SO_2 Combinata *(mg/l)*	51.84

Il vino ottenuto ha riportato valori di alcol pari a 15% vol. e un contenuto di acido malico pari a 3,15 g/l.

Il vino rosso è stato fornito direttamente dalle cantine D'Uva di Larino (Campobasso) ed aveva un valore di alcol di 13,01% vol. ed un valore di acido malico di 3,44 g/l (tab.1.2).

Tabella 1.2 - Caratteristiche del vino *Tintilia.*

pH	3.78
Acidità tot *(g/l ac. tartarico)*	7.60
Acidità volatile *(g/l ac. acetico*)	0.45
Alcol *(%Vol)*	13.01
SO_2 Totale *(mg/l)*	52.00
SO_2 libera *(mg/l)*	31.00
SO_2 Combinata *(mg/l)*	21.00

1.2 -Trattamento dei vini per la fermentazione malo-lattica

Per i trattamenti sulla *Falanghina* sono stati inoculati due starter commerciali della ditta *Lallemand*; nel dettaglio il vino è stato suddiviso in 27 campioni da 5 l dei quali nove campioni inoculati con *Oenococcus oeni type strain* a tre diversi pH (3,0 - 3,4 - 3,8) e altri nove campioni con *Lactoballus plantarum V22* sempre ai tre diversi pH, i restanti campioni non sono stati inoculati per poterli utilizzare come controllo.

Oenococcus oeni type strain inoculato, dalle schede tecniche, risulta essere in grado di degradare l'acido malico anche in condizioni particolarmente difficili, quali pH bassi (3,0), elevate concentrazioni alcoliche (fino a 15,5%vol) e contenuti in SO_2 totale elevati (50-60 ppm) e temperature maggiori di 16°C.

Lactoballus plantarum V22, in virtù del suo metabolismo omofermentante non contribuisce all'incremento di acidità volatile. Inoltre, esso ha la capacità di dominare la FML in condizioni di alcol e pH elevati e di sviluppare positivamente il profilo sensoriale, soprattutto dei vini rossi.

Esso ha una buona alcol tolleranza (fino a 15,5%vol) e lavora bene già a 17°C.

I batteri sono stati reidratati in acqua distillata a 25°C per 15 minuti e sono stati aggiunti ai vini. La reidratazione permette una distribuzione più uniforme dei batteri aggiunti al vino.

L'inoculo (circa 10^6cfu • ml-1) è stato effettuato secondo il metodo di reidratazione attiva di protocollo batteri secchi *Lallemand*. Nel dettaglio, i batteri lattici liofilizzati sono stati sciolti in acqua ad una temperatura costante compresa fra 17°C e 25°C per trenta minuti; tale preparato è stato incorporato al vino da inoculare con un rimontaggio di omogenizzazione al riparo dell'aria.

La FML è stata condotta ad una temperatura controllata di 20°C.

L'inoculo dei batteri malolattici è stato effettuato a FA ultimata.

Infatti,secondo il punto di vista dei francesi, è raccomandabile inoculare i batteri malolattici solo dopo il completamento della fermentazione alcolica,per evitare il rischio di produzione di acido acetico e di acido D-lattico. La FML che si svolge durante la fermentazione alcolica può, occasionalmente, portare ad un arresto di fermentazione. Non tutti i ricercatori hanno confermato le preoccupazioni francesi rispetto allo sviluppo di elevate concentrazioni di acido acetico, all'antagonismo con i lieviti o agli arresti di fermentazione che sono stati associati allo sviluppo precoce dei batteri lattici. L'inoculo simultaneo lieviti-batteri è promosso da coloro che credono che i batteri abbiano migliori opportunità di crescita ed acclimatazione in assenza di alcool (Lallemand, 2006).

Le prove di FML sono state eseguite in triplo.

La fermentazione malolattica è stata monitorata settimanalmente misurando acido L- malico, acido lattico ed acido citrico mediante test enzimatico (Boehringer-Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt, Germania).

Il II anno sono state eseguite le prove di FML sulla *Tintilia*. Su tale vino sono stati utilizzati sia i ceppi precedentemente usati per la *Falanghina*, che un mix dei due batteri, sempre sottoforma di preparato commerciale della Lallemand.

Si è scelto di lavorare solo con due valori pH (3,4 - 3,8) in quanto dalle analisi effettuate sulla *Falanghina* si è notato che, sebbene in alcun casi la FML partisse essa si interrompeva immediatamente; questo perché i batteri lattici non lavorano con quei valori di acidità. Anche in questo caso le prove sono state eseguite sempre in triplo suddividendo il vino in sei lotti per ogni tipo di inoculo utilizzato.

Per poter seguire l'influenza del pH sulla fermentazione malolattica si è scelto di utilizzare batteri selezionati.

Il pH iniziale del vino è stato opportunamente modificato impiegando bicarbonato di potassio per aumentarlo ed acido tartarico per diminuirlo.

Inoltre, la scelta di batteri selezionati è importante per impedire gli aspetti negativi della FML ossia ridurre la formazione di ammine biogene e per impedire tutte le note negative legate alla variabilità della selezione naturale dei batteri.

Altro motivo per favorire l'uso dei batteri selezionati è quello di promuovere la qualità finale del prodotto intesa sia come sicurezza ma anche come possibilità di ripetibilità. La disacidificazione biologica è

altresì accompagnata da altre trasformazioni e modificazioni sia dell'aroma che del gusto, e talvolta anche del colore.

Sia per la *Falanghina* che per la *Tintilia*, l'inoculo dei diversi batteri è stato effettuato alla fine della fermentazione alcolica dopo un travaso.

Questo risulta essere il momento più adatto per l'inoculo della FML in quanto la temperatura del vino nuovo è ancora elevata, l'ambiente è ancora ridotto e la torbidità del vino favorisce lo sviluppo delle cellule batteriche grazie anche ad un buon apporto nutrizionale per i batteri.

2. METODI DI ANALISI CHIMICO, FISICHE E SENSORIALI

Le analisi chimico-fisiche (pH, acidità totale, acidità volatile, alcol, SO_2 libera, SO_2 combinata, SO_2totale) eseguite sui vini, sono state effettuate secondo le metodiche ufficiali (OIV 1990).

Per la determinazione del colore è stato utilizzato il colorimetro Minolta CR300b.

Per la determinazione dell'acido malico, lattico, citrico, succinico sono stati impiegati i kit enzimatici della ditta Boehriger Mannheim/ R-Biopharm con lettura della reazione di assorbanza con lo spettrofotometro a lunghezza d'onda 340 nm.

In aggiunta sui campioni di *Tintilia* è stato determinato l'acido lattico mediante il metodo con i biosensori. I campioni sono stati, prima dell'aggiunta dell'inoculo batterico, pastorizzati in modo da escludere ogni probabile interazione con altri microrganismi indigeni presenti.

Per quanto riguarda la determinazione delle ammine biogene è stato impiegato il metodo immuno-enzimatico (ELISA della dittaTecna).

Infine, sui vini sono state eseguite analisi sensoriali grazie ad un gruppo di assaggiatori esperti. Per completare il quadro sensoriale sui vini *Tintilia*, sono stati analizzati venticinque vini commerciali delle diverse cantine molisane per poter caratterizzare dal punto di vista sensoriale la *Doc Tintilia*.

2.1 -Il colorimetro

Per lo studio del colore è stato utilizzato un colorimetro “Minolta CR300b” (Japan) (fig.2.1.1), adottando il sistema Hunter (Hunter, 1987), in grado di valutare i valori L*a* b*. L* misura la luminosità e varia da 0 (bianco) a 100 (nero); a* è l’indice del rosso: predominanza del colore rosso quando è positivo (+a*) edel verde quando è negativo (a*); b* è l’indice del giallo predominanza del colore giallo quando è positivo (+b*) e blu quando è negativo(b*). È stato utilizzato uno spettrofotometro modello “DMS100” (Varian) per determinare nei campioni di vino presi in esame i seguenti parametri analitici: gli antociani totali e le diverse frazioni antocianiche in relazione al loro grado di polimerizzazione ì;indici cromatici quali intensità colorante (I), la tonalità (T), studio del colore secondo Glorie;indice di ionizzazione e l’indice PVPP.

Figura 2.1.1 - Colorimetro “Minolta CR300b” (Japan).

2.2 – I biosensori

La necessità di metodi analitici sempre più precisi può oggi essere soddisfatta dallo sviluppo di biosensori a basso costo, altamente selettivi, sensibili e facili da utilizzare in sostituzione della comune strumentazione analitica che richiede attrezzature spesso complesse e costose, non adatte alle determinazioni in linea o in campo e personale esperto.

Semplicemente, i biosensori non sono altro che dispositivi analitici che incorporano un elemento biologicamente attivo in intimo contatto con un trasduttore di segnale fisico –chimico; lo scopo di questa combinazione è di utilizzare l'alta selettività dei mediatori biologici per propositi analitici in vari campi della ricerca applicata, della tecnologia, della produzione industriale e della protezione ambientale.

Le caratteristiche ideali di un biosensore sono prioritariamente di tipo analitico,come l'accuratezza, la precisione, la specificità e/o la selettività, il limite di rilevabilità e la sensibilità; ma anche altri requisiti come l'economicità, i tempi ridotti di analisi,l'utilizzabilità "in campo" giocano un ruolo di notevole importanza.

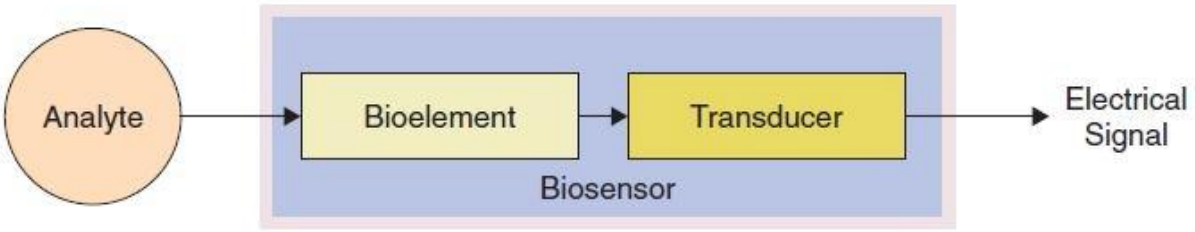
Un biosensore è un sensore (chimico o elettrochimico) nel quale il recettore utilizza un meccanismo biochimico; i processi di riconoscimento biochimico sono caratterizzati da alta selettività, per cui lo sviluppo dei biosensori è oggi oggetto di forte interesse.

Secondo la definizione dell' "International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), "*un biosensore è un dispositivo completo ed integrato capace di fornire informazioni analitiche specifiche usando un*

elemento di riconoscimento biologico(recettore biochimico) in diretto contatto spaziale con un trasduttore; è un dispositivo chetraduce un evento chimico in un segnale rilevabile".

I concetti base di un biosensore possono essere illustrati nella figura 2.2.1.

Figura 2.2.1: Rappresentazione schematica di un biosensore.



Uno specifico bioelemento, come ad esempio un enzima, riconosce uno specifico analita e l'elemento sensoriale trasduce il cambiamento che subisce la biomolecola in un segnale elettrico.

I biosensori, quindi, non sono altro che dei dispositivi analitici costituiti da tre componenti principali:

- Componente biologica
- Trasduttore
- Componente elettronica

Il meccanismo di funzionamento di un biosensore è relativamente semplice: il mediatore biologico immobilizzato sulla superficie del sensore prende parte ad uno o più processi che determinano la variazione di un parametro chimico o fisico che viene prontamente rilevato dal trasduttore che lo converte in un segnale elettrico.

Il mediatore biologico, o elemento di riconoscimento molecolare, è responsabile della selettività; nel caso più semplice può essere un enzima purificato o un sistema più complesso con un certo numero di enzimi che lavorano in cascata, organelli subcellulari, cellule o batteri, o infine tessuti animali o vegetali specializzati contenenti una o più molecole proteiche specifiche, fattori di protezione, etc.

E' questo il caso dei cosiddetti "Enzyme Based Biosensors", che utilizzano la specificità di una o più reazioni enzimatiche. I "Receptor Based Biosensor" impiegano, invece, anticorpi monoclonali,recettori endogeni o di membrana o ancora enzimi. In quest'ultimo caso, però,gli enzimi non esplicano la loro attività sull'analita ma è piuttosto l'analita a modulare l'attività interagendo con il biomediatore (biosensori ad inibizione).

Il trasduttore è l'elemento che traduce il segnale di riconoscimento biologico in un segnale elettrico (può essere un semplice dispositivo elettrochimico, una fibra ottica, un analizzatore di onda acustica, un cristallo piezoelettrico, etc.); la componente elettronica può essere costituita da un sistema di condizionamento del segnale, un display, un data-processor e un sistema di memorizzazione; in pratica da tutto ciò che serve per l'acquisizione e la visualizzazione dei dati.

Un aspetto di notevole importanza nella progettazione di un biosensore è l'instabilità del recettore biologico, il quale è soggetto a denaturazione. Riuscire ad aumentare la stabilità delle biomolecole è uno degli ambiti di ricerca maggiore nello sviluppo dei biosensori. Una soluzione a tale problema si è rivelata essere la procedura di immobilizzazione delle

biomolecole sui siti attivi dei dispositivi; attualmente la letteratura descrive una vasta gamma di tecniche di immobilizzazione.

A tal proposito, le membrane assumono notevole importanza come supporti per realizzare l'accoppiamento fra trasduttore e mediatore biologico; la tecnica di immobilizzazione adottata per realizzare tale accoppiamento viene scelta in base alle caratteristiche del biomediatore per evitarne la modifica strutturale, e quindi delle caratteristiche e del comportamento catalitico con riduzione e perdita dell'attività (Ronkainen *et al.,* 2010).

I biosensori vengono classificati in base alle due parti essenziali di cui sono costituiti: il mediatore biologico e il trasduttore di segnale.

In base alla componente biologica i biosensori si distinguono in:

- Biosensori biocatalitici
- Biosensori di affinità (immunosensori, chemorecettori, sensori a DNA e RNA).

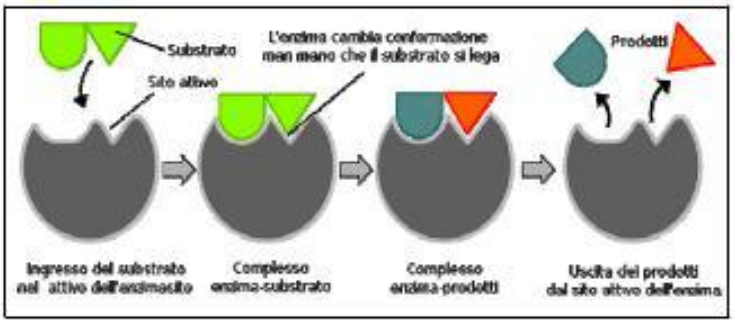
I biosensori amperometrici enzimatici sono quei biosensori in cui il biorecettore è costituito da un enzima e il cui trasduttore associato è di tipo elettrochimico amperometrico. Come è noto, la misura amperometrica è basata sulla misura della corrente che scorre in un elettrodo di Pt polarizzato negativamente rispetto ad un elettrodo diriferimento Ag/AgCl. In questi tipi di biosensori, l'elettrodo viene modificato intrappolando molecole di enzima.

Un enzima è una proteina (ovvero una sequenza di amminoacidi organizzati in una struttura terziaria e quaternaria definita) in grado di

accelerare una specifica reazione chimica senza intervenire sui processi energetici che ne regolano la spontaneità.

Chimicamente si parla di "catalizzatore biologico". L'enzima partecipa attivamente alla reazione: il substrato (la molecola su cui agisce l'enzima) si lega al sito attivo (la zona dell'enzima in cui avvengono le reazioni), formando un complesso attivato. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per reagire nuovamente (Fig.2.2.2).

Figura 2.2.2-Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nella catalisi enzimatica.



Una singola molecola enzimatica è in grado di catalizzare in un secondo le reazioni di decine di migliaia di molecole identiche, rendendo gli enzimi efficaci anche in quantità minime (Mignani, 2008).

A differenza dei catalizzatori inorganici, gli enzimi presentano una elevatissima stereospecificità, selettività e chemio selettività, catalizzando solo una reazione o pochissime reazioni simili. Tale specificità è legata a diversi fattori che caratterizzano l'associazione tra il substrato ed il sito attivo, come la complementarietà dal punto di vista strutturale, le cariche elettriche, la natura idrofilica o idrofobica. Molti enzimi contengono molecole non proteiche che partecipano alla funzione catalitica. Queste molecole, che si legano spesso all'enzima nelle

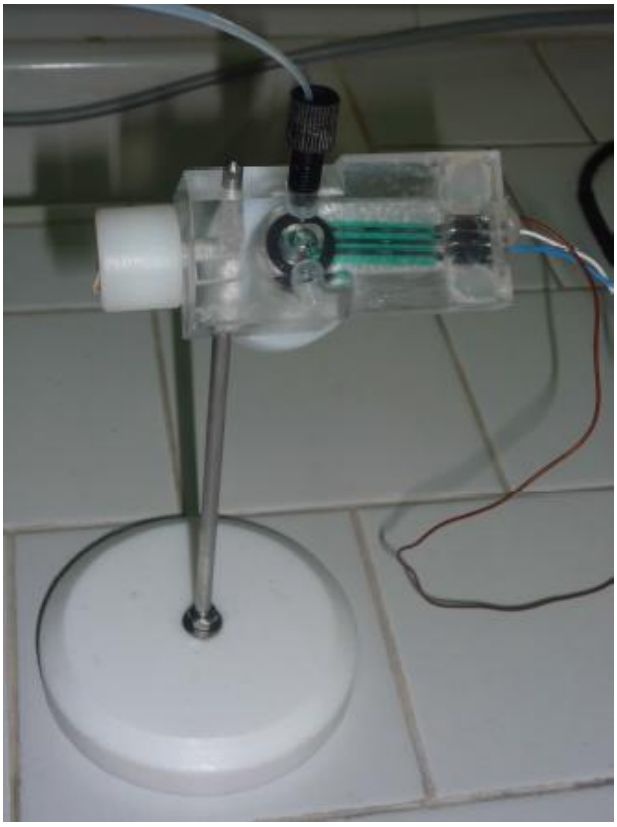
vicinanze del sito attivo vengono chiamate cofattori e sono divise in due categorie in base al loro legame con l'enzima: gruppi proteici e coenzimi. I gruppi proteici sono strettamente legati agli enzimi, generalmente in modo permanente.

I coenzimi, invece, sono legati agli enzimi piuttosto debolmente, permettendo così ad una singola molecola di coenzima di associarsi con enzimi diversi e di fungere, talvolta, da ponte da un enzima ad un altro per piccole molecole.

La Commissione sugli Enzimi (EC) dell'Unione Internazionale di Biochimica (IUB) ha elaborato il sistema di nomenclatura e numerazione degli enzimi, che li suddivide in sei classi principali in base alle principali reazioni che catalizzano:

1. Ossidoriduttasi: catalizzano reazioni di ossidoriduzione
2. Transferasi: catalizzano il trasferimento di interi gruppi di atomi
3. Idrolasi: catalizzano reazioni di idrolisi
4. Liasi: catalizzano la rimozione e l'aggiunta di un gruppo di atomi ad un doppio legame o altre scissioni con conseguenti riarrangiamenti elettronici
5. Isomerasi: catalizzano riarrangiamenti molecolari
6. Ligasi: catalizzano riarrangiamenti di fusione molecolare.

Foto 2.2.3 – Il biosensore.



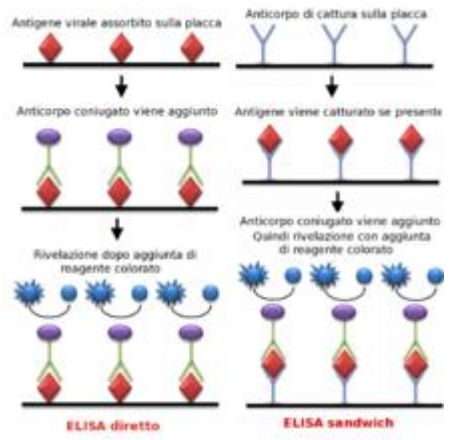
2.3 - Determinazione immuno-enzimatica delle ammine biogene

ELISA è un acronimo derivato dall'espressione inglese *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima). È un metodo d'analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima. La sostanza da rilevare può essere un antigene appartenente ad un patogeno od una molecola più piccola, chiamata aptene, come per esempio per riconoscere la presenza di steroidi. Se invece di un enzima, viene usato un radionucleide (spesso l'iodio-125) per rilevare la positività del test, si parla di RIA (radio-immunoassay).

Ci sono diversi varianti del test ELISA, che si differenziano secondo il componente che si vuole rilevare. Nel test diretto viene determinata la presenza dell'antigene, in quello indiretto, la presenza di anticorpi contro l'antigene. Il saggio può essere *competitivo* o *non competitivo*.

L'ELISA non competitivo diretto si effettua secondo diverse metodiche: semplice e sandwich ELISA.

Figura 2.3.1- Test E.L.I.S.A. diretto e sandwich



Nel metodo semplice l'antigene è assorbito sulla placca e rilevato con un anticorpo marcato da un enzima. Nel metodo a sandwich l'anticorpo che è usato per catturare l'antigene è assorbito sulla placca, gli anticorpi assorbiti sono in seguito esposti al fluido che potrebbe contenere l'antigene ed un secondo anticorpo, marcato, viene aggiunto per rilevare che l'antigene è stato catturato. In questo secondo caso, gli epitopi sull'antigene dei due anticorpi devono essere completamente distinti senza alcuna sovrapposizione.

Nel metodo indiretto si procede coprendo il fondo del pozzetto con l'antigene specifico per l'anticorpo da misurare. Si lava via l'eccesso per eliminare l'indesiderato. Si aggiunge il campione che si pensa contenga gli anticorpi per quell'antigene adsorbito al fondo del pozzetto. Si lava via l'eccesso ancora una volta. Si aggiunge un secondo tipo di anticorpo (marcato con un enzima), che legherà il complesso "antigene(adsorbito)+anticorpo(del campione)" se sono presenti gli anticorpi nel campione. Il secondo anticorpo è quindi un anti-anticorpo. Si effettua un lavaggio per eliminare eventuali anticorpi non legatisi al complesso (quelli combinati resistono invece al lavaggio). Infine, si aggiunge il substrato dell'enzima con cui è stato marcato l'anti-anticorpo: un cambiamento di colore indica la presenza degli anticorpi nel campione, visto che l'enzima usato agisce sul substrato modificandolo, in maniera che assorba la luce e risulti colorato.

2.3.1 -Kit Elisa per Istamina

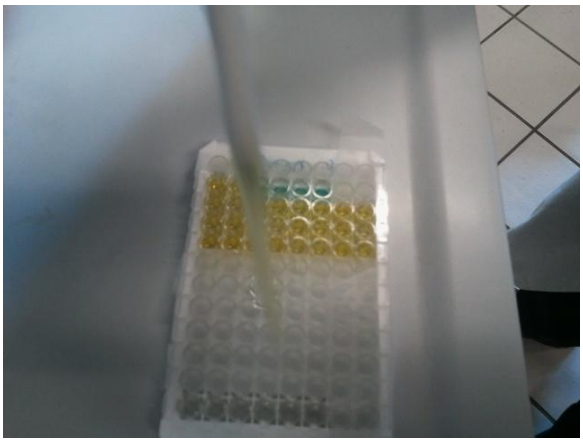
Il kit Elisa per istamina è un saggio immunoenzimatico competitivo.

Per la determinazione delle ammine biogene è stato utilizzato il kit immunoenzimatico ELISA della ditta *Tecna*.

La procedura prevede che sia gli standard che i campioni di vino vengano derivatizzati nella micropiastra inerte con il reagente di acilazione prima di essere dispensati nella micropiastra adsorbita con l'istamina, in questo modo l'istamina presente viene trasformata in N-acilistamina. Nel caso specifico del vino prima di procedere si effettua una diluizione del campione pari a 500 volte (20 µl in 10 ml di acqua distillata).

Il saggio è effettuato su micropiastre di polistirene adsorbite con istamina (foto 1), dove si trasferiscono sia gli standard che i campioni derivatizzati e successivamente si aggiunge l'anticorpo anti-istamina. Durante la prima incubazione si ha una competizione tra le molecole di N-acetilistamina libere, presenti nei campioni, e l'istamina legata alla fase solida per gli stessi siti di legame dell'anticorpo specifico anti-istamina. La successiva fase di lavaggio è necessaria per eliminare tutto ciò che non è legato in modo specifico. Segue, poi, l'aggiunta del coniugato enzimatico che va a rilevare il legame istamina-anticorpo sulla fase solida. Segue un ulteriore lavaggio ed ancora l'aggiunta di un cromogeno incolore che verrà convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato: lo sviluppo del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di istamina del campione.

Foto 1 - Micropiastra con cromogeno.



Infine, dopo aver bloccato la reazione enzimatica, si procederà a leggere l'assorbanza mediante un lettore di micro piastre.

E' stato utizzato il lettore Elisa Readwell Strip della ditta *Tecna* (Foto 2).

Il valore medio di assorbanza delle ripetizioni sul campione è diviso per il valore di assorbanza dello standard zero; il valore massimo del segnale (B_0) è posto uguale a 100%.

Foto 2 - Lettore per micro piastre *Elisa Readwell Strip* della ditta *Tecna.*

3. L'analisi sensoriale dei vini

3.1 – Analisi sensoriale dei vini *Falanghina* e *Tintilia* ai diversi pH e con i diversi inoculi

I diversi campioni di *Falanghina* e *Tintilia* sono stati assaggiati da un gruppo di assaggiatori esperti costituito da sette maschi e tre femmine con una età compresa tra 28 e 50 anni.

La scelta del piano di assaggio è stata quella del *Piano di assaggio ruotato*, utile per prodotti omogenei per minimizzare l'effetto di posizionamento.

Il piano risulta molto semplice in quanto una volta individuato l'ordine di presentazione per il primo assaggiatore, si spostala sequenza in avanti di una posizione per tutti gli altri (l'ultimo campione della serie del giudice A sarà il primo campione per il giudice B) (tab.3.1).

Tabella 3.1 - Piano di assaggio ragionato.

Numero di campioni	I	II	III	IV	V	VI
A	1	2	3	4	5	6
B	2	3	4	5	6	1
C	3	4	5	6	1	2
D	4	5	6	1	2	3
E	5	6	1	2	3	4
F	6	1	2	3	4	5
G	1	2	3	4	5	6
H	2	3	4	5	6	1
I	3	4	5	6	1	2
L	4	5	6	1	2	3

La scelta dei descrittori, in questo caso, è stato effettuato in una seduta preliminare dal gruppo guidato dal capo panel in modo da generare un elenco di etichette semantiche significative per i giudici e, poi, mediate ed accorpate dal capo panel per ridurre il numero dei descrittori da prendere in esame (Fig. 3.2).

Molti descrittori possono risultare sinonimi, espressione di una stessa sensazione che può essere descritta in modo diverso in relazione alla diversa percezione individuale del giudice. Inoltre, la gerarchia dei descrittori è importante per porre i descrittori su più livelli in funzione della precisione nel definire la percezione.

Figura 3.2 - scheda descrittori.

Data

Assaggiatore

Campione

FLOREALE	_____
VIOLETTA	_____
ROSA	_____
FRUTTATO	_____
SPEZIATO	_____
TERROSO	_____
AMMONIACALE	_____
LEGNOSO	_____
AFFUMICATO	_____
METALLICO	_____
FIORI DI ARANCIO	_____
MELA	_____
BURRO	_____
TOSTATO	_____
VEGETALE FRESCO	_____
VEGETALE SECCO	_____
BAGNATO	_____
OSSIDATO	_____
SOLFORATO	_____
ALCOLICO	_____
ACIDITA'	_____
AMARO	_____
ASTRINGENZA	_____
STRUTTURA	_____
P. G. O.	_____
INTENSITÀ COLORE	_____
COLORE	_____

NOTE……

3.2 – Analisi sensoriale dei vini *Tintilia* in commercio

È stata organizzata una degustazione alla cieca di venticinque vini *Tintilia* commerciali prodotti dalle cantine molisane e sottoposti all'attenzione di un pubblico esperto, ed anche meno esperto, con una scheda studiata in modo da poter essere fruibile per ogni tipologia di giudice.

Le schede compilate nel totale sono state 650 ripartite con lo stesso numero di ripetizioni per ogni vino.

La scheda utilizzata (Fig. 3.2.1) è strutturata in modo tale da studiare il vino sia con una analisi visiva, sia olfattiva che gustativa. Allo stesso tempo sono riportati dei descrittori edonici ed emozionali.

Analizzando nel dettaglio, nel visivo si richiede di valutare il colore nella sua densità ossia la concentrazione dei pigmenti coloranti presenti in un vino.

La tonalità del colore dipende dalla tipologia dei pigmenti coloranti e dalla loro quantità nelle uve; dal livello di estrazione; dalla stabilità e dallo stadio evolutivo e di conservazione; la valutazione di eventuali riflessi (violacei o aranciati) che nel vino sono indice di evoluzione dello stesso.

Il termine dell'*attraenza* indica il valore di piacevolezza visiva di un vino; è un carattere edonico che nasce dall'interazione delle caratteristiche visive con le attese che si generano in chi degusta; è un carattere edonico che nasce dall'interazione delle caratteristiche visive con le attese di colui che valuta il vino.

Nella valutazione olfattiva e retrolfattiva del vino si chiede di individuare le famiglie di appartenenza per scendere nello specifico dei riconoscimenti per i nasi più allenati.

Il *floreale* esprime la misura delle note odorose riconducibili al profumo dei fiori, il *fruttato* esprime la misura delle note odorose riconducibili a frutti di ogni genere e specie, il *vegetale* esprime la misura dell'intensità con la quale sono stati percepiti sentori vegetali che vanno dall'erba appena falciata al fieno, dalla foglia di pomodoro al peperone, nonché le note di erbe aromatiche quali anice, menta, salvia ed altre ancora, infine, lo *speziato* esprime la misura delle note odorose minerali e speziate vere e proprie. In quest'ultimo gruppo confluiscono, quindi, note di pietra focaia, pepe, timo, legno,vaniglia, cuoio, cannella, tostato,cacao, tabacco, chiodi di garofano, caffè e le altre del genere.

La descrizione olfattiva di un vino è estremamente complessa, a determinarla sono le numerose molecole proprie del vitigno o che si formano in seguito alle fermentazioni e ai processi di invecchiamento riduttivi e/o ossidativi.

Altro descrittore è la categoria *odori anomali* che in passato indicava tutti gli indicatori di una materia prima di cattiva qualità e/o di incurianella lavorazione, mentre attualmente il significato si è esteso all'ambito edonistico, per cui vengono molte volte classificate nella categoria note olfattive semplicemente non piacevoli. Allo stesso modo non mancano di essere considerate tipiche, e quindi fuori dell'ambito degli odori anomali, molecole prodotte da incidenti di percorso che però possono risultare

gradevoli. Ad esempio, il sentore di burro viene dato da diverse molecole tra cui dall'eptildiene acetone (15 ppm di valore soglia), dal metil butirrato (20 ppm), dal diacetile (1.3 ppb), dall'acetil acetone (30 ppb) e dall'isobutanoico ma in relazione alla sua quantità potrà essere piacevolmente apprezzato nel vino o essere considerato, addirittura, un grave difetto.

Una sola molecola può generare diverse percezioni anche molto diverse tra loro, quindi diventa semplicistico dire che una pirazina dà un sentore vegetale, ma è più corretto dire che può essere percepita come vegetale.

La descrizione tattile-gustativa è quella che descrive sia i sapori fondamentali (dolce, acido, salato, amaro) che tutte quelle sensazioni di natura tattile in bocca, quali la sensazione di calore nel cavo orale e la consistenza di un vino (corpo).

La struttura è il descrittore che esprime la dimensione sensoriale delle componenti fondamentali del vino sotto il profilo tattile e gustativo, è il volume determinato dalla percezione del vino in bocca; l'armonia, poi, è la valutazione di come tutte le sensazioni avvertibili con la degustazione siano tra di loro bilanciate e quindi la relativa piacevolezza che si genera.

Infine, la piacevolezza che emerge dal rapporto tra durezze e morbidezze del vino è l'equilibrio, esso può essere raffigurato, generalizzando, con una bilancia a due piatti il cui equilibrio non sarà mai quello reale ma sarà sbilanciato verso le durezze, nel caso di quei vini in cui la componente acidica deve prevalere, come nel caso dei vini bianchi, o

verso le morbidezze nel caso in cui le note predominanti del vino dovrà essere la morbidezza, come nel caso dei vini rossi.

Ed ancora, l'astringenza è la presenza nel vino di tannini in grado di legarsi alle proteine causando un riduzione del potere lubrificante della saliva che tendono ad asciugare il cavo orale fino ad avvertire una ruvidità sulle mucosa orale.

Figura 3.2.1 - Scheda degustazione

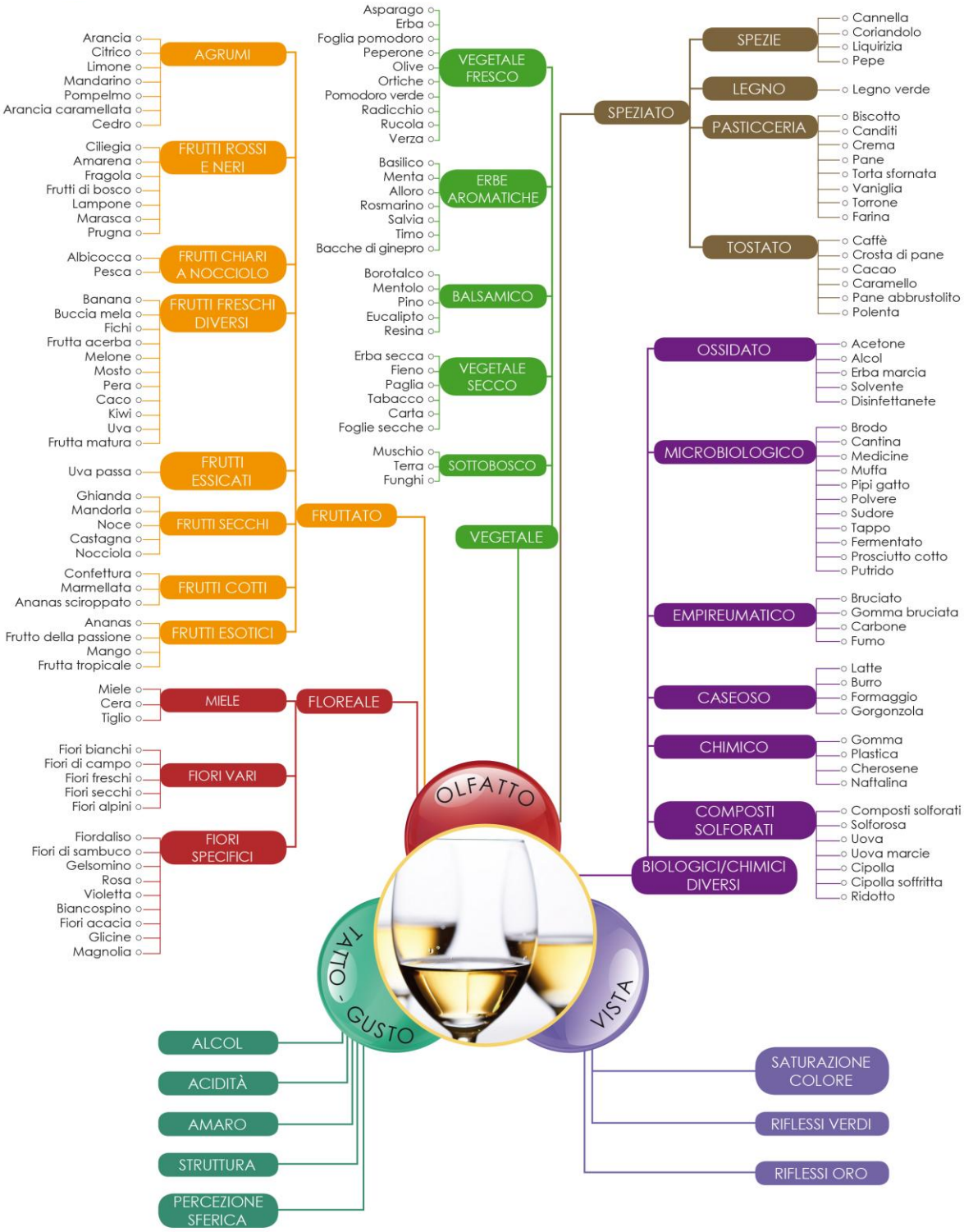
Data _____ Nome Giudice _____ Cod. Giudice _____ Cod. Campione _____

Cod. Giudice (1 lettera)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	Z
Cod. Campione	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DENSITA' COLORE											
RIFLESSI VIOLA											
RIFLESSI ARANCIO											
ATTRAENZA											
ALCOOL											
ACIDITA'											
ASTRINGENZA											
STRUTTURA											
MORBIDEZZA											
ARMONIA											
Fiori specifici	viola, violetta, rosa rosa appassita										
Fiori vari	fiori										
Miele	miele, miele acacia, cera d'api, favo										
FLOREALE											
Agrumi	limone, arancio, pompelmo, mandarino, buccia d'arancio										
Frutti rossi e neri	ciliegia, lampone, fragola, more, mirtilli, ribes, prugna										
Frutti chiari a nocciolo	pesca, albicocca										
Frutti freschi diversi	mela, banana, caco, uva aromatica, frutti freschi vari										
Frutti essiccati	datteri, fichi secchi, prugne secche										
Frutti secchi	frutta secca, mandorla, nocciola										
Frutti cotti	confettura, frutta sciroppata, prugne cotte, frutta cotta										
FRUTTATO											
Vegetale fresco	erbam erba tagliata, erbaceo, foglia di pomodoro, olive verdi, peperone										
Erbe aromatiche	salvia, timo, alloro										
Balsamico	anice, quercia, resinoso, eucalipto, pino, conifera										
Vegetale secco	fieno, tabacco, tè										
Sottobosco	muschio, humus, fungo, tartufo										
VEGETALE											
Spezie	cannella, pepe, chiodi di garofano, liquirizia										
Legno	legno nuovo										
Pasticceria	vaniglia, biscotto										
Tostato	pane tostato, cacao, caffè, caramello										
Animale	cuoio, selvaggina, pelliccia										
SPEZIATO											
Ossidato	alcol, acetone, aceto, mela marcia										
Microbiologico	muffa, putrido, lattico, fenolico, medicinale, sulfureo, cavallo sudato, pipi gatto, carne, pelo bagnato										
Empireumatico	bruciato, cotto										
ODORI ANOMALI											
Finezza											
Franchezza											
Ricchezza											
LIVELLO EDONICO											
PUNTEGGIO		60		70		80		90			

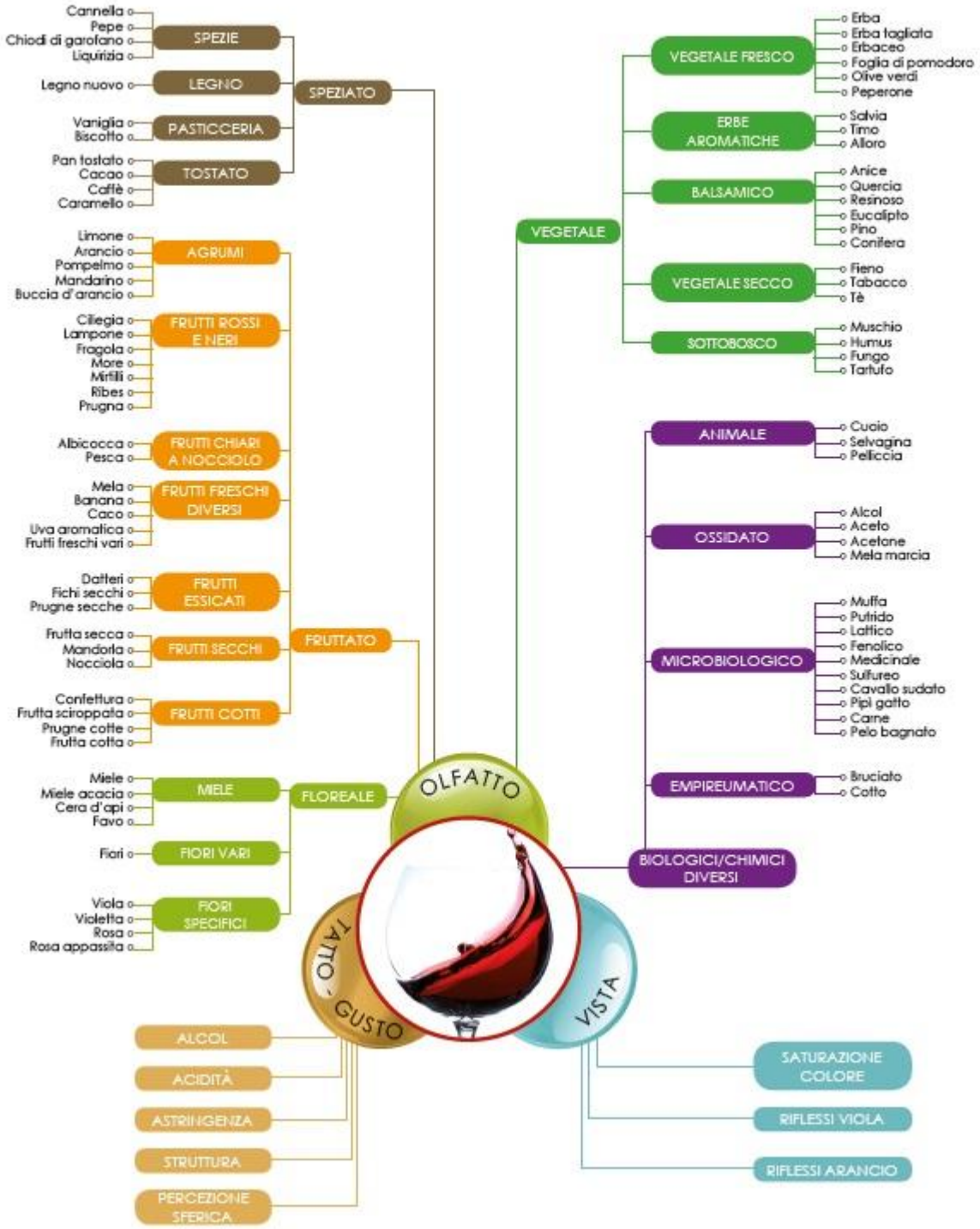
MAPPA SENSORIALE DEI VINI BIANCHI

Giudice..... Cod. Campione..... Cod. Giudice..... Data.....



MAPPA SENSORIALE DEI VINI ROSSI

Giudice..... Cod. Campione..... Cod. Giudice..... Data.....



RISULTATI

1. Il colore del vino

Qui di seguito sono riportati i risultati di un lavoro sul vino *Tintilia* già pubblicato sulla rivista *Vigne e Vini* (D. Formato, L. Goglia, G. De Stefano, L. Cinquanta-2012) prendendo in considerazione particolarmente la componente antocianica. I vini *Tintilia* presi in esame non hanno evidenziato differenze significative nei principali parametri analizzati: grado alcolico, pH, acidità totale, e polifenoli totali, ad eccezione dell'acidità volatile (Tab. 1.1).

Tab. 1.1- Composizione di vino *Tintilia* di diverse annate.

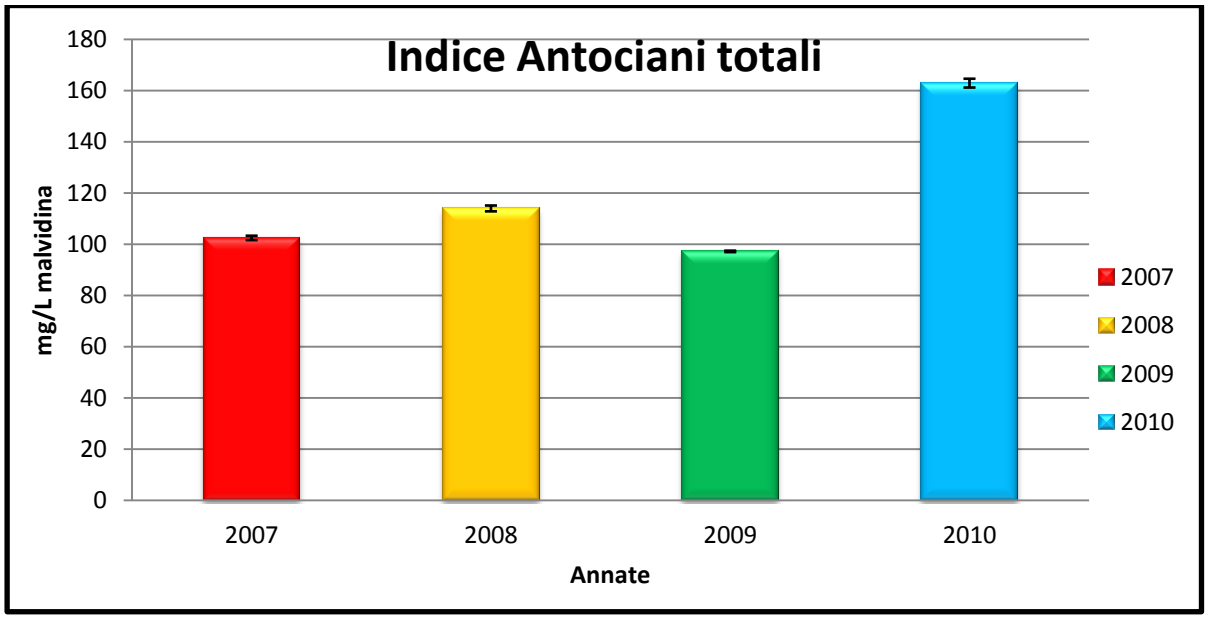
Composizione di vino Tintilia di diverse annate					
Annata di produzione	Grado alcolico (%)	pH	Ac. Totale (g/Lac. Tararico)	Ac. Volatile (g/Lac. Tararico)	Polifenoli totali (g/l catechina)
Tintilia 2007	14,50 ±0,14	3,98 ± 0,09	5,55 ± 0,41	0,86 ± 0,02	0,28 ± 0,03
Tintilia 2008	14,45 ±0,21	3,88 ± 0,05	5,53 ± 0,53	0,71 ± 0,03	0,42 ± 0,03
Tintilia 2009	14,10 ±0,28	3,95 ± 0,04	5,21 ± 0,48	0,78 ± 0,04	0,32 ± 0,04
Tintilia 2010	14,10 ±0,29	4,01 ± 0,10	5,59 ± 0,45	0,74 ± 0,05	0,41 ± 0,04

Differenze significative, invece, sono state evidenziate nella composizione e nelle caratteristiche cromatiche dei vini nelle varie annate.

Per quanto riguarda il contenuto di antociani, espressi come indice di antociani totali (At), il vino del 2010 presenta una quantità maggiore di antociani rispetto alle altre annate (Fig. 1.1).

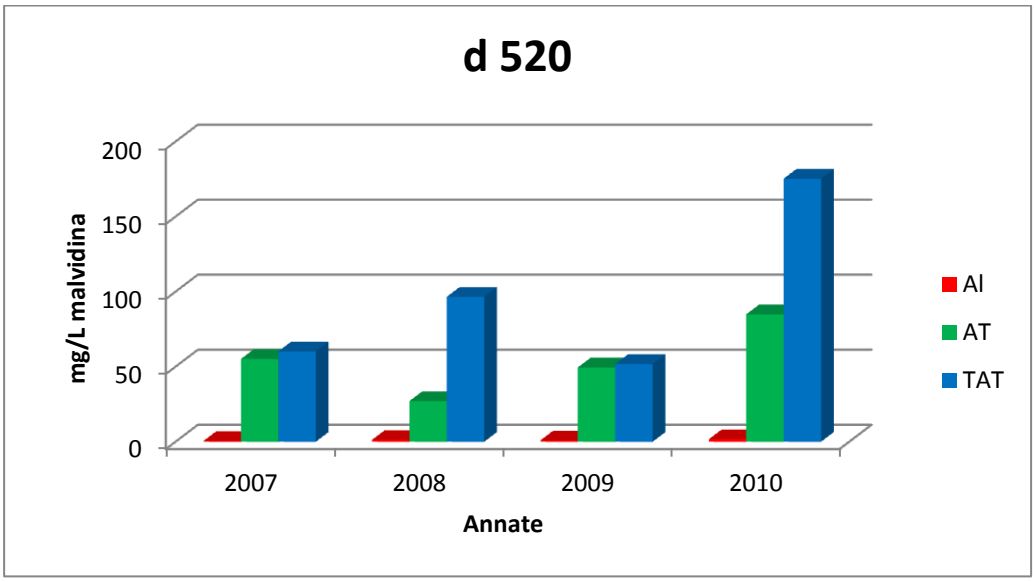
La colorazione dei vini è influenzata oltre che dal pH (a pH bassi prevale la forma flavilio che conferisce colorazione rossa) e dalla presenza di ioni metallo, dalla presenza di SO_2.

Fig. 1.1-Indice antociani totali.



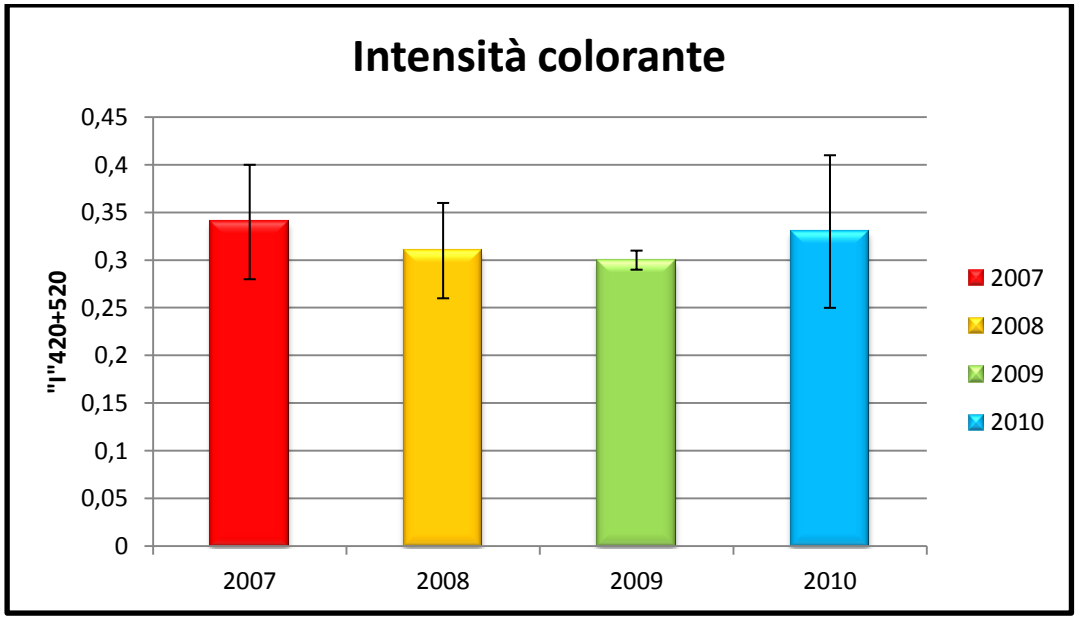
Quindi, gli antociani totali possono essere scomposti in tre frazioni: antociani monomeri, quelli sensibili alla SO_2 e quelli non sensibili alla SO_2 In relazione alla frazione degli antociani monomeri (Al), sensibili (AT) e non sensibili (TAT) alla SO_2, i vini prodotti nel 2008 e nel 2010 risultano maggiormente influenzato dalla SO_2, mentre i vini delle altre due annate: 2007, 2009, non presentano variazioni significative. Per i pigmenti non sensibili alla SO_2 si riscontrano valori molto elevati nell'annata 2010 (Fig. 1.2).

Figura1.2 – Scomposizione delle componenti antocianiche.



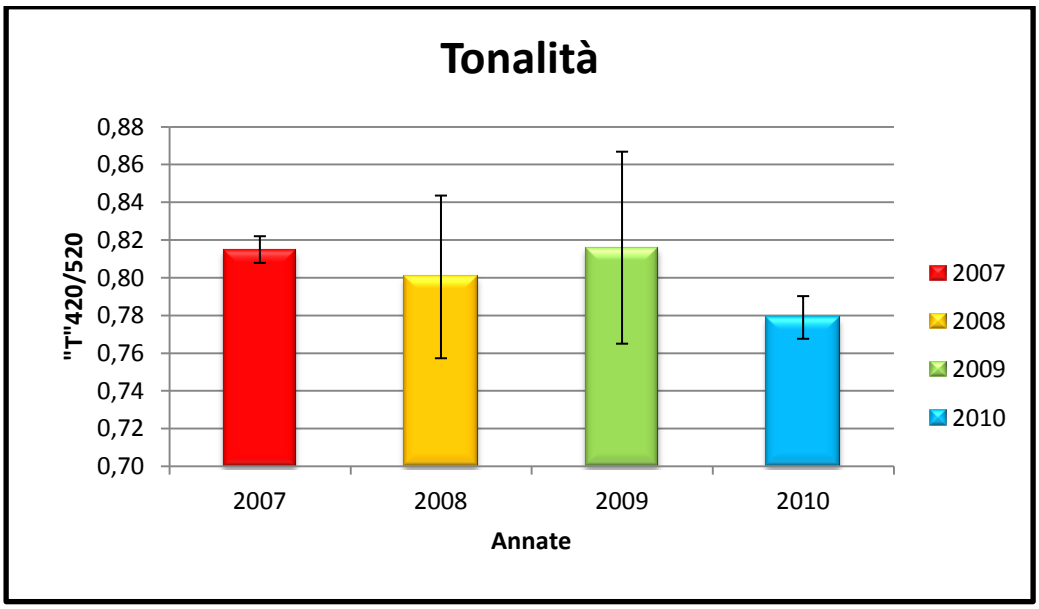
L'intensità del colore è la somma delle due assorbanze: A420 e A520, tale valore tende a diminuire nel tempo. I vini studiati non mostrano differenze significative con l'anno di produzione (Fig. 1.3). Tale dato, che può essere considerato positivo, è legato alle caratteristiche del vitigno e alle condizioni d'invecchiamento dei vini in fase riduttiva, che ha rallentato le trasformazioni dei pigmenti.

Figura 1.3 -Intensità colorante dei vini *Tintilia* nelle diverse annate.



La tonalità esprime il rapporto tra A420/A520; in genere il suo valore tende ad aumentare con l'invecchiamento. Valori anomali si possono notare nell'annata 2009, probabilmente dovuti dall'andamento meteorologico (Fig. 1.4).

Figura1.4 - Tonalità colorante dei vini *Tintilia* nelle diverse annate.



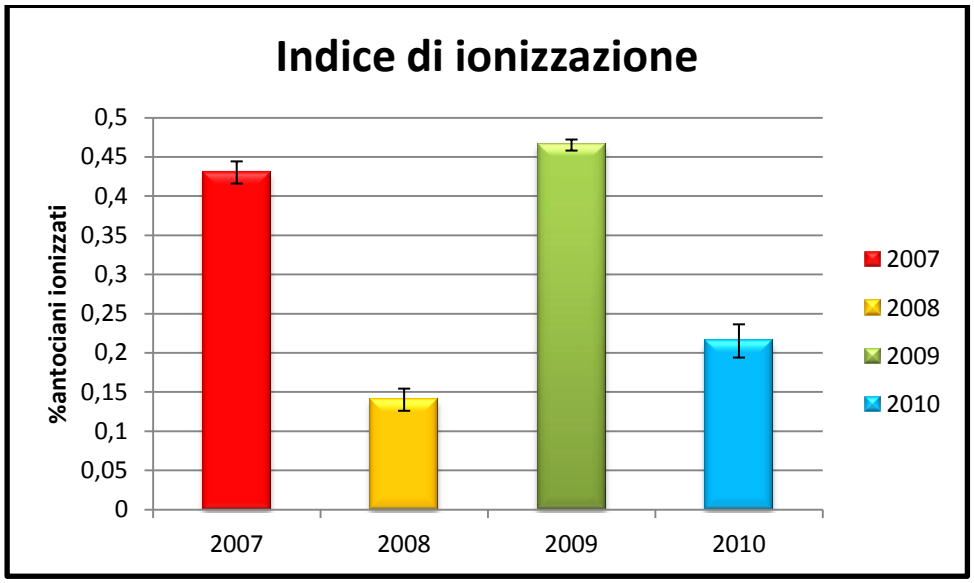
Una misura dell'evoluzione dei vini nelle diverse annate è stata ottenuta con il colorimetro, che utilizza una scala *Hunter L*a*b**, in grado di dare una rapida e precisa quantificazione del colore, facilmente riproducibile. Tale strumento consente di esprimere numericamente, secondo standard internazionali, i colori in modo univoco. I dati confermano gli altri dati riportati in questo studio, dimostrando la stabilità del colore in tutte le annate ad eccezione dell'annata 2009 (Tab. 1.2).

Tabella 1.2 -Indici colorimetrici.

Composizione di vino "Tintilia" di diverse annate				
	2007	2008	2009	2010
L	35,50 ±0,17	36,27 ±0,64	35,93 ±0,31	35,65 ±0,25
a*	3,24 ± 1,40	2,69 ±0,57	4,63 ±0,28	3,34 ±0,11
b*	1,94±0,06	1,67 ±0,09	2,49 ±0,60	1,90 ±0,45

L'indice di ionizzazione permette di definire la percentuale di antociani liberi e combinati che si trovano sotto forma colorata nel vino. Minore è tale valore, meno la componente antocianica è ionizzata. Le analisi dimostrano che nell'annata 2009 prevalgono le forme più ionizzate, così come nell'annata2007 (Fig. 1.5).

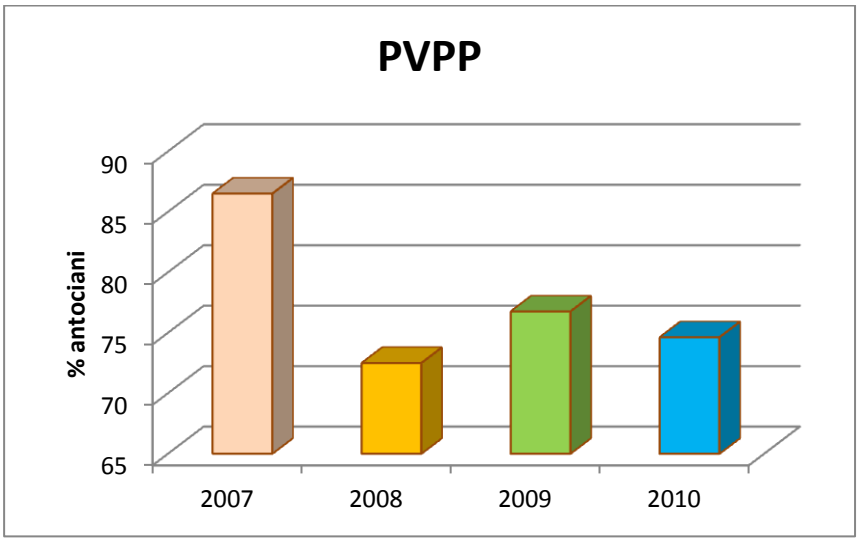
Figura1.5 - Indice di ionizzazione.



Per conoscere la concentrazione degli antociani monomeri ci si basa sulla peculiarità del PVPP di adsorbire i composti fenolici e sulle possibilità di eluire singolarmente le varie componenti adoperando dei solventi specifici.

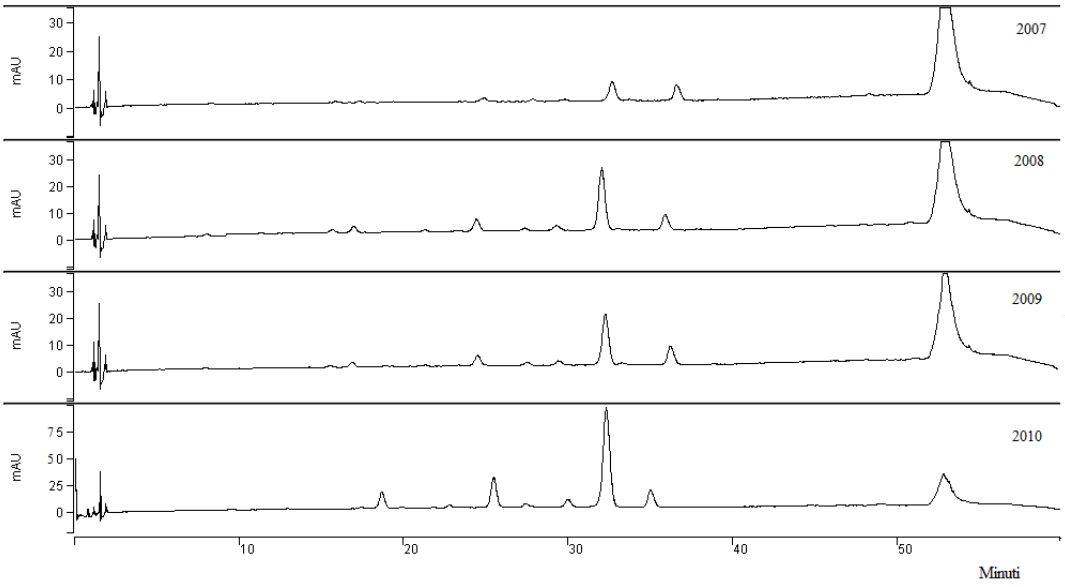
I dati ottenuti (figura 1.6) confermano la stabilità dell'intensità colorante dei vini nel tempo, dovuta alla mancanza di fasi ossidative durante l'invecchiamento.

Figura1.6 – Indice PVPP.



La figura 1.7 mostra il cromatogramma hplc tipico dei vini *Tintilia* registrato a 520 nm. Si notano diversi picchi delle forme antocianine più importanti che, in ordine di eluizione, sono: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina.

Figura 1.7 – cromatogrammi degli antociani di vino *Tintilia*nelle diverse annate



Paragonando i quattro cromatogrammi possiamo rilevare che, come prevedibile, l' annata 2010 si presenta con le componenti in quantità più elevate, ad eccezione della malvidina, mentre per le altre annate le concentrazioni diminuiscono in modo progressivo, fino a divenire non rilevabili, nel vino del 2007 (tab.1.4).

Tabella 1.4 - Concentrazione delle antocianine (mg/kg) in vini *Tintilia* di diverse annate.

Concentrazione delle antocianine (mg/Kg) in vini Tintilia di diverse annate				
	2007	2008	2009	2010
Malvidina	71 ± 1,41	17,26 ± 1,52	14,27 ± 0,88	4,95 ± 0,19
Peonidina	5,99 ± 0,49	-	-	-
Penutidina	17,3 ± 0,85	3,00 ± 0,04	2,72 ± 0,21	-
Cinidina	1,25 ± 0,21	0,05 ± 0,07	0,05 ± 0,07	-
Delfidina	8,94 ± 0,11	1,53 ± 0,30	1,33 ± 0,39	-

Le forme monomeriche degli antociani risultano minime già a meno di un anno dalla produzione. In generale, la frazione non sensibile della SO_2, che garantisce stabilità ai pigmenti colorati, ha una buona concentrazione nel campione 2007, ed è massima nel vino del 2010.

I dati ottenuti sono coerenti con quelli determinati col colorimetro (L*a*b*) e confermano la notevole stabilità del colore dei vini *Tintilia* analizzati, con l'eccezione del vino del 2009, in cui l'effetto annata ha influito in modo significativo.

La notevole stabilità del colore o intensità colorante dei vini *Tintilia* nel tempo è riconducibile alla gradualità con cui i pigmenti polimerici si sono

formati, a causa delle condizioni di riduzione in cui è avvenuto l'invecchiamento.

Dall'analisi HPLC del vino è emerso che la malvidina, più stabile all'ossidazione (sostituenti metossilati), è l'antocianina prevalente in *Tintilia* (62% del totale), e che non sono state rilevate forme acilate, menostabili delle corrispondenti non acilate. Quest'ultimo dato è peculiare per il vitigno *Tintilia* e può essere utilizzato come marker varietale.

1.1 - Analisi *Tintilia* 2014

Nella presente sperimentazione è stata valutata l'evoluzione del colore della *Tintilia* durante la fermentazione malolattica ai due differenti pH (3,4 e 4,1) (Foto 1.1.1).

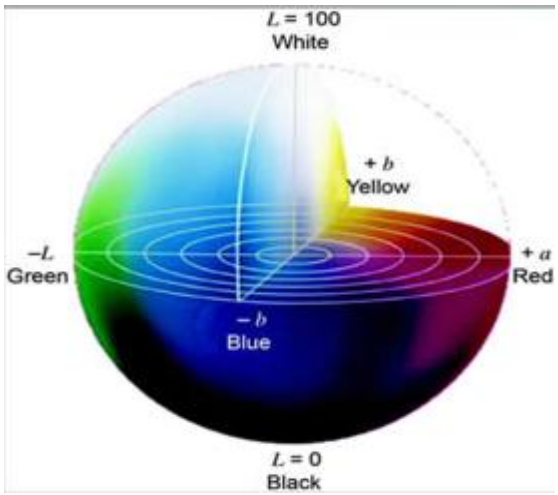
Foto1.1.1 -Analisi con il colorimetro.

Dai dati (tab.1.5) si evince che la luminosità (L) non ha subìto variazioni rilevanti (32 -35,57) in tutti i campioni presi in esame, mentre si è avuta una diminuzione del colorerosso (+a*) e del giallo (+b*) al termine della FML (Tab 1.1.1 e Fig.1.2).

Tabella 1.1.2 – Indici colorimetrici.

	11nov			5 dic			12 dic		
	L + D.S.	**+a* +D.S.**	**+b* +D.S.**	**L+ D.S.**	**+a*+ D.S.**	**+b*+ D.S.**	**L+ D.S.**	**+a*+ D.S.**	**+b*+ D.S.**
pH 3.4 *O.oeni*	32,29±0,8	4,85±0,06	2,35±0,05	32,85±0,8	4,29±0.15	2,2±0,05	35,57±0,9	2,5±0,8	1,99±0,02
pH 3.4 *L.plantarum*	31,88±0,6	4,78±0.05	2,71±0.05	35,41±0,9	4,48±0,2	2,52±0,05	35,47±0,8	0,99±0,02	1,35±0,03
pH 3,4 mix	33,2±0,6	6,45±0,11	2,93±0.05	34,45±0,8	3,72±0.06	2,33±0,04	35,86±0,8	1,84±0,03	1,61±0,04
pH 4,1 O. oeni	35,38±0,8	1,72±0,05	1,46±0.04	32,2±0,8	1,18±0,05	1,24±0,03	35,53±0,9	0,76±0,02	1,21±0,03
pH 4,1 *L.plantarum*	32,57±0.7	1,53±0,06	1,41±0,04	35,2±0,8	1,31±0,03	1,43±0,03	35,26±0,80	0,98±0,02	1,41±0,04
pH 4,1 mix	35,04±0,8	2,45±0,05	1,19±0,03	35,24±0,9	1,76±0,03	1,55±0,04	35,26±0,9	0,75±0,03	1,26±0,03

Figura 1.1.3 : Analisi del colore (CIElab color space).

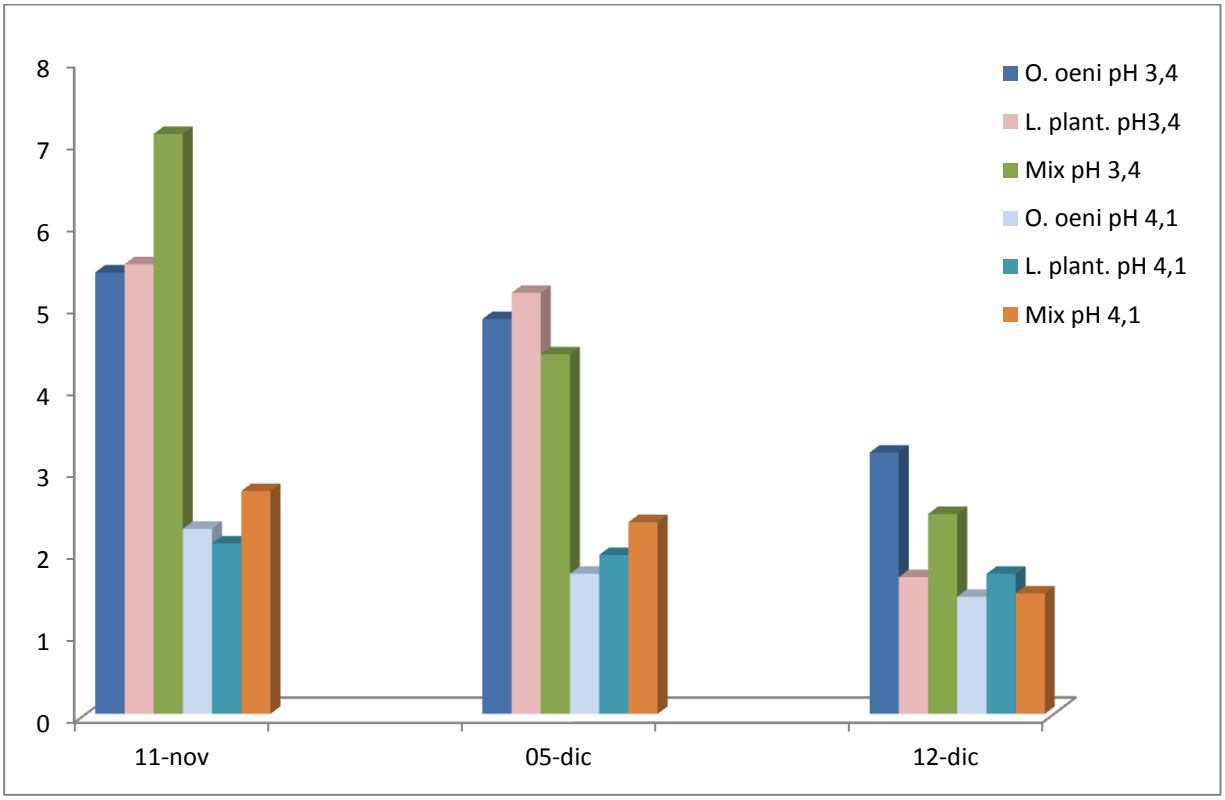


La figura 1.1.3 è la rappresentazione del solido del colore per lo spazio colorimetrico L*a*b*.

Il *Croma* (C)è l'indice di intensità di colore, o cromaticità, uguale a $\sqrt{(a^*)^2+(b^*)^2}$, espressa come percentuale del colore puro presente, ossia la forza con cui il colore si stacca dal neutro. Il valore di C è pari a zero al centro ed aumenta con la distanza dal centro.

La *Tinta* (h) è il rapporto, o grado di miscelazione, tra la componente rossa e la componente gialla Arctg b*/a* ed esprime una misura angolare, cioè la tonalità del colore.

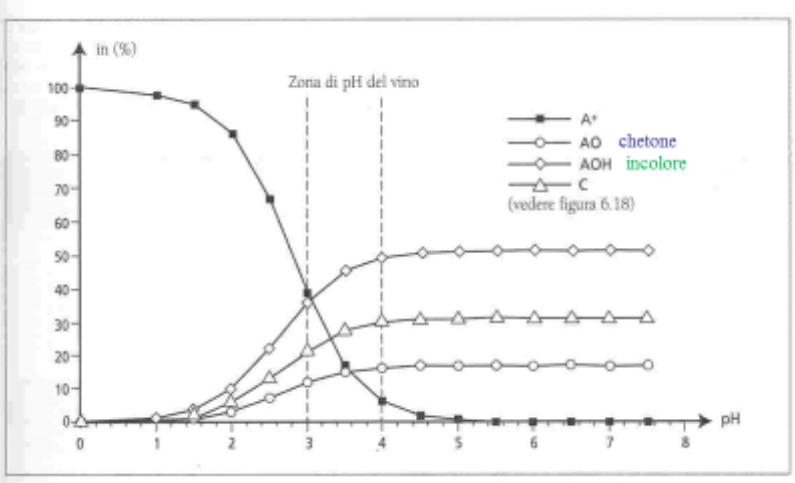
Figura 1.1.4 -Indice di intensità di colore (C) nei vini *Tintilia* durante la FML.



Dai valori riportati nella figura 1.1.4, si può notare come l'intensità del colore diminuisca durante la fermentazione malolattica a causa dell'incremento del pH.

Come riportato da Glories 1984nella figura 1.1.5, a pH alti l'intensità del colore diminuisce poiché al pH dei vini rossi (3,5 -3,7), circa il 15-20% degli antociani è sotto forma colorata (ione flavilio).

Figura 1.1.5 - Evoluzione del contributo delle diverse forme degli antociani in funzione del pH (Glories, 1984)



All'aumentare del pH aumentano le sostanze incolori e diminuiscono gli ioni flavilio, motivo per cui vira il colore del vino passando dal rosso rubino al rosso aranciato.

2. Gli acidi del vino

2.1 - Evoluzione degli acidi nella *Falanghina*

I risultati riportati nella tabella 2.1.1 e figura 2.1.2 mettono in evidenza un andamento differente dell'evoluzione dell'acido malico nella *Falanghina* in base al pH del vino. Al pH di 3,8 la FML termina già dopo 27 giorni di fermentazione per quanto riguarda l'inoculo con *O. oeni*; occorrono, invece, circa due mesi per portare a termine la FML con l'inoculo del *L. plantarum*.

Tabella 2.1.1-Evoluzione dell'acido malico (mg/l) nella *Falanghina* durante la FML a diversi pH.

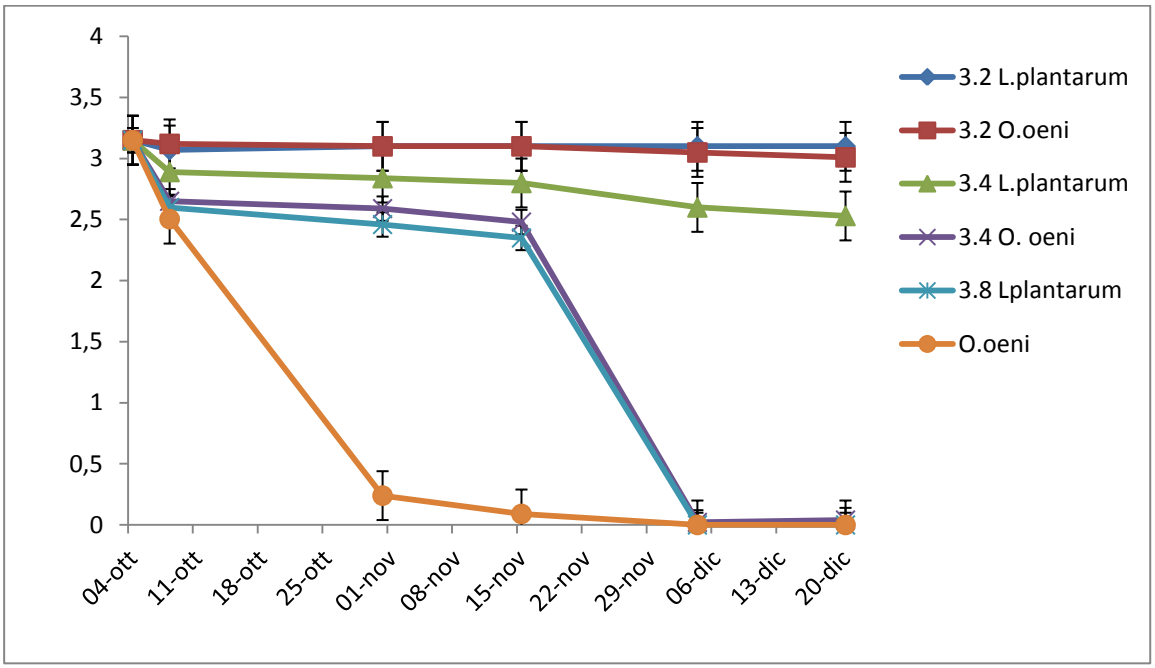
FML	pH 3,2		pH 3,4		pH 3,8	
	L.plantarum + D.S	O. oeni + D.S	L.plantarum +D.S	O. oeni + D.S	L. plantarum + D.S	O. oeni +D.S
04-ott	3,15±0,03	3,15±0,04	3,15±0,03	3,15±0,04	3,15±0,03	3,15±0,03
08-ott	3,07±0,02	3,12±0,02	2,89±0,04	2,65±0,03	2,60±0,02	2,50±0,02
31-ott	3,10±0,03	3,10±0,03	2,84±0,04	2,59±0,03	2,46±0,03	0,24±0,002
15-nov	3,10±0,03	3,10±0,03	2,80±0,03	2,48±0,04	2,35±0,03	0,09±0,006
04-dic	3,10±0,03	3,05±0,04	2,60±0,04	0,02±0,001	-------	------
20-dic	3,10±0,02	3,01±0,02	2,53±0,02	0,04±0,001	------	------

Molto più tempo occorre nel caso del pH di 3,4; per *O. oeni* occorrono circa due mesi e mezzo per portare a termine la fermentazione, mentre per *L. plantarum* per lo stesso periodo osservato la FML non è terminata.

A pH 3,2 (tab. 2.1.1) la FML non è praticamente avvenuta. Per questi motivi, nelle successive prove di fermentazione si è deciso di non utilizzare questo pH**.**

Si può osservare l'andamento dell'acido malico nella figura 2.1.2.

Figura 2.1.2 - Evoluzione dell'acido malico (mg/l) nella *Falanghina* durante la FML a diversi pH.

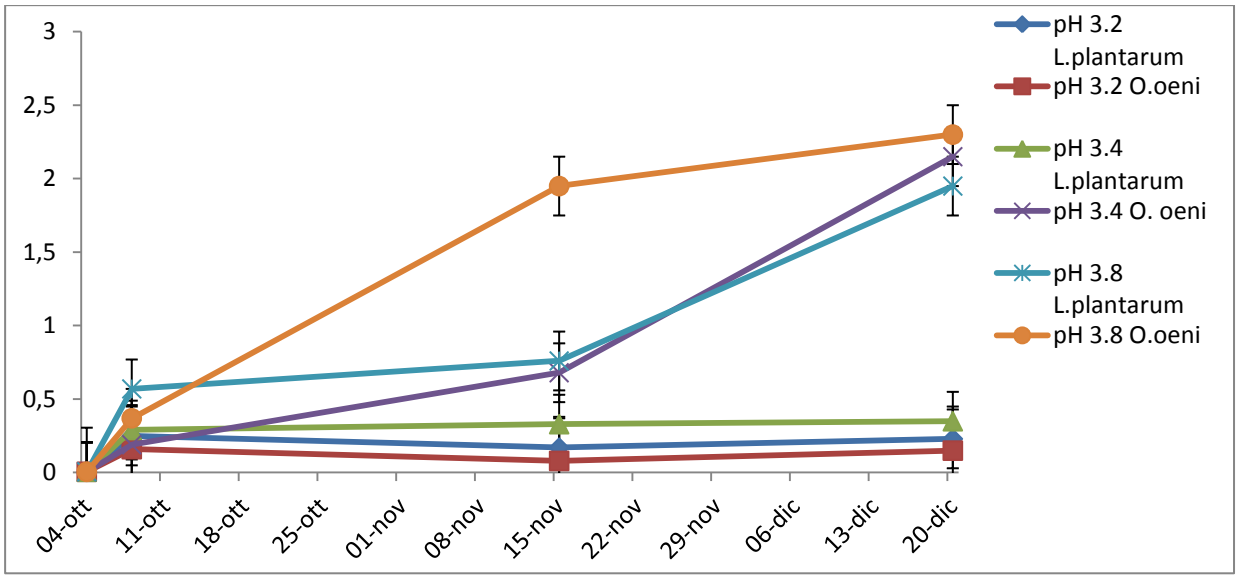


Nella tabella 2.1.3sono invece riportati i risultati del contenuto in acido lattico della *Falanghina* durante la fermentazione malolattica. L'evoluzione dell'acido lattico è proporzionalmente inverso alla degradazione dell'acido malico, in quanto dovuto appunto alla reazionemalolattica.

Tabella 2.1.3 - Evoluzione dell'acido lattico (mg/l) nella *Falanghina* durante la FML a diversi pH

FML	pH 3,2		pH 3,4		pH 3,8	
	L.plantarum Media ± D.S.	***O.oeni*** Media ± D.S.	***L.plantarum*** Media ± D.S.	***O.oeni*** Media ± D.S.	***L.plantarum*** Media ± D.S.	***O.oeni.*** Media ± D.S.
04-ott	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
08-ott	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,28 ± 0,04	0,37 ± 0,05
15-nov	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,33 ± 0,04	0,88 ± 0,06	0,76 ± 0,06	3,24 ± 0,13
20-dic	0,23 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,35 ± 0,05	2,15 ± 0,11	1,95 ± 0,10	3,30 ± 0,14

Figura 2.1.4 - Evoluzione dell'acido lattico (mg/l) nella *Falanghina* durante la FML a diversi pH.



Dalla figura 2.1.4 si nota che a pH 3,8 l'acido lattico è maggiormente prodotto soprattutto dal batterio *O. oeni*. Sempre a pH 3,8 si può dire che già al 15 novembre è terminata la fermentazione, per *L. plantarum* sono stati necessari ancora oltre trenta giorni per terminare la fermentazione.

A pH 3,4 *O. oeni* al 20 dicembre ha avuto un incremento di 2,15 mg/l di acido lattico; per cui si può concludere che a pH più bassi la FML è molto lenta tanto che a pH 3,2 essa è quasi inesistente.

Per quanto riguarda l'acido citrico nella *Falanghina* (tab. 2.1.5 e Fig.2.1.6),è diminuito in tutti i campioni, ma con una diminuzione maggiore a pH 3,8 prevalentemente in *L. plantarum* e in maniera non molto significativa a pH 3,2.

A pH 3,4 la diminuzione dell'acido citrico è stata pressoché uguale per i due microrganismi.

Tabella 2.1.5 - Evoluzione dell'acido citrico (mg/l) nella *Falanghina* durante la FML a diversi pH

FML	pH 3,2		pH 3,4		pH 3,8	
	L.plantarum Media ± D.S.	*O.oeni* Media ± D.S.	*L.plantarum* Media ± D.S.	*O.oeni* Media ± D.S.	*L.plantarum* Media ± D.S.	*O.oeni.* Media ± D.S.
04-ott	0,57± 0,01	0,57± 0,01	0,57± 0,01	0,57± 0,01	0,57± 0,01	0,57 ± 0,01
08-ott	0,53± 0,02	0,446± 0,02	0,53± 0,02	0,563± 0,02	0,573± 0,04	0,563± 0,05
15-nov	O,57± 0,02	0,563± 0,02	0,448± 0,04	0,531± 0,06	0,478± 0,06	0,324± 0,13
20-dic	0,407± 0,03	0,444± 0,02	0,371± 0,05	0,29± 0,11	0,191± 0,10	0,219± 0,14

Figura 2.1.6- Evoluzione dell'acido citrico (mg/l) nella *Falanghina* durante la FML a diversi pH

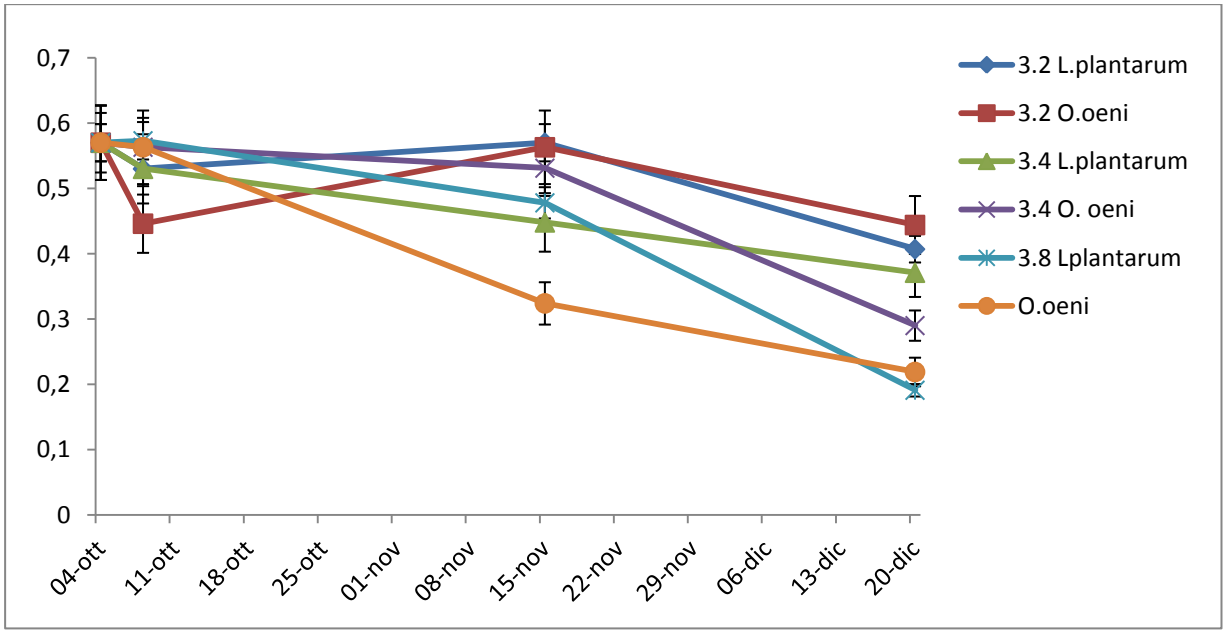
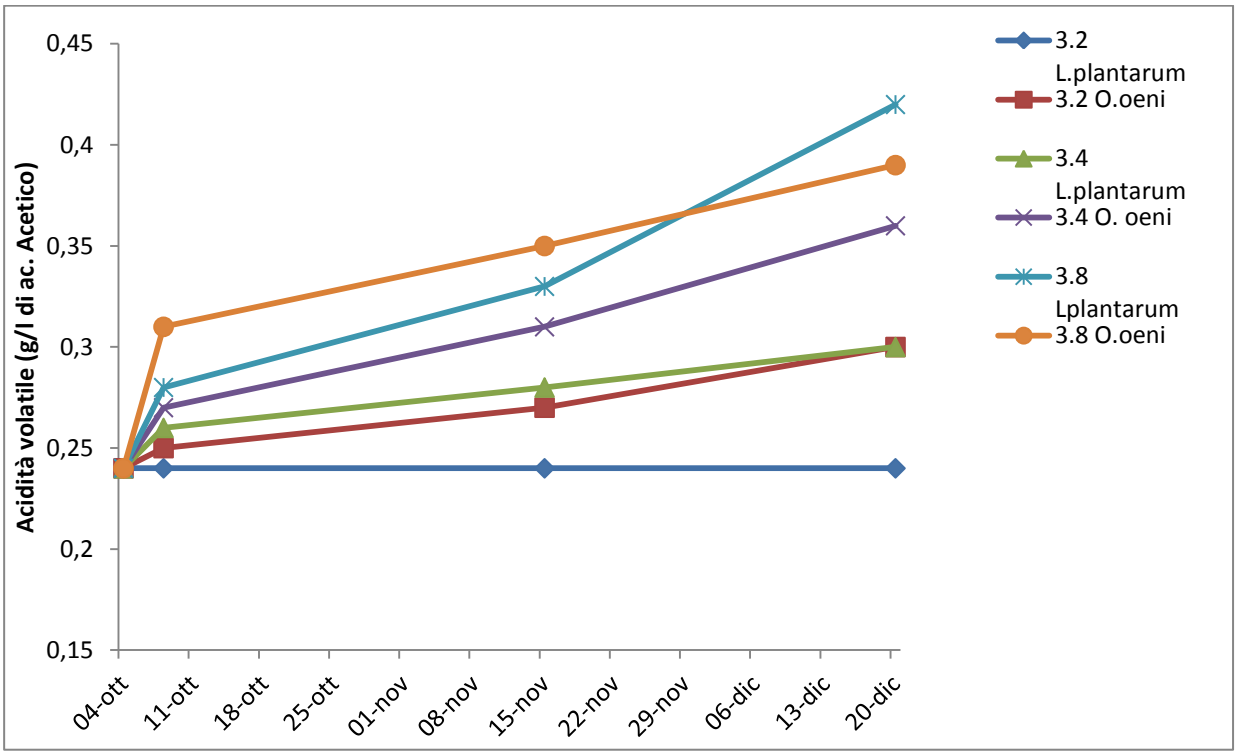


Figura 2.1.7 - Evoluzione dell'acidità volatile nella*Falanghina* durante la FML a diversi pH



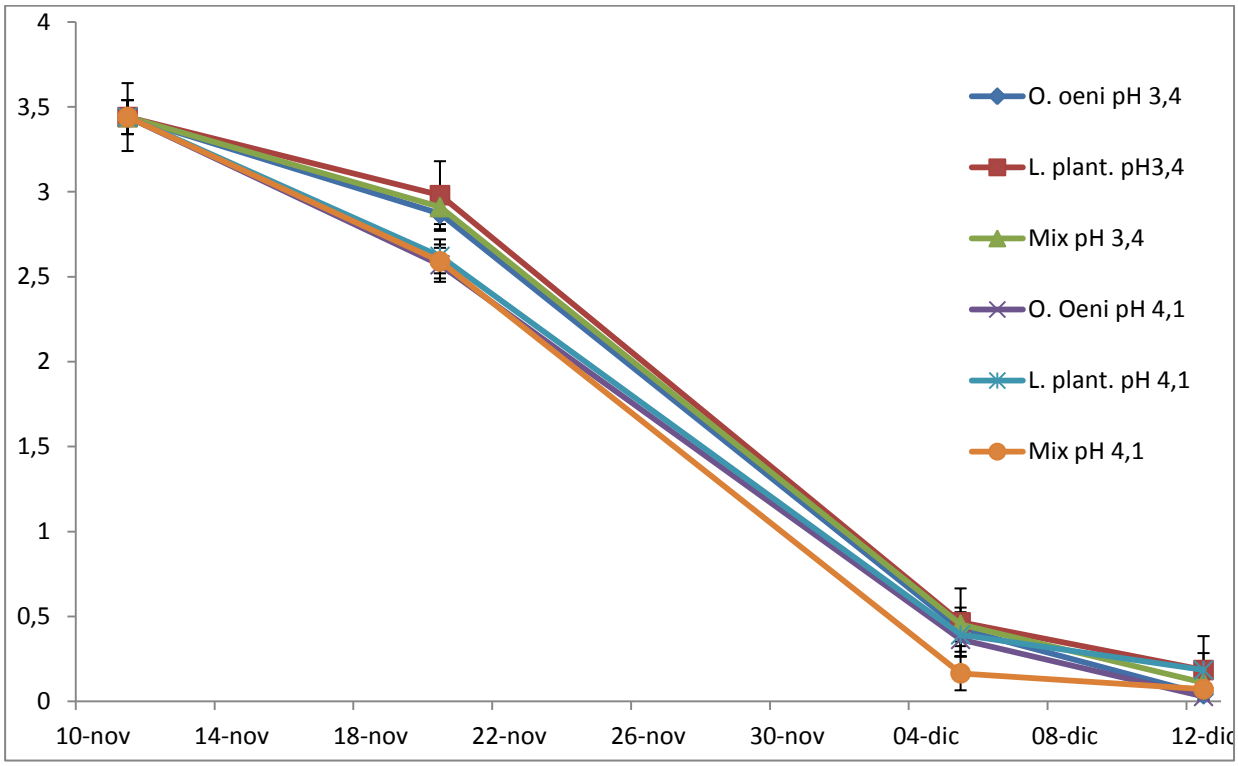
Infine, durante tutto il periodo della FML, l' acido acetico (fig. 2.1.7) ha subìto un incremento in tutti i campioni in maniera opposta all'acido citrico.

2.2 - Evoluzione degli acidi nella *Tintilia*

Tabella 2.2.1- Evoluzione dell'acido malico (mg/l) nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH.

FML	pH 3,4			pH 4,1		
	O.oeni + D.S.	L.plantarum + D.S.	Mix + D.S.	O.oeni + D.S.	L.plantarum + D.S.	Mix +D.S.
11-nov	3,441±0,3	3,442±0,3	3,442±0,2	3,443±0,3	3,442±0,3	3,441±0,2
20-nov	2,871±0,2	2,982±0,2	2,911±0,2	2,573±0,3	2,622±0,2	2,593±0,2
05-dic	0,425±0,02	0,465±0,03	0,452±0,03	0,364±0,03	0,392±0,02	0,165±0,03
12-dic	0,042±0,03	0,184±0,03	0,109±0,02	0,028±0,02	0,184±0,02	0,071±0,02

Figura 2.2.2- Evoluzione dell'acido malico (mg/l) nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH.



I risultati riportati nella tabella 2.2.1 e nella figura 2.2.1riportanol'andamento dell'acido malico nella *Tintilia* in base al pH

del vino. In questo caso, a differenza della *Falanghina*, si è scelto di non utilizzare il pH 3,2 in quanto a questo valore limite i batteri lattici inoculati non sono stati in grado di lavorare, ma si è deciso di valutare un mix, sempre commerciale, dei due microrganismi. Anche in questo caso il formulato è della *Lallemand*.

L'acido malico si è degradato in tutti i campioni e ad entrambi i pH utilizzati, con una spinta maggiore nel mix tanto da avere a pH 3,4 valori di 0,109 mg/l di acido malico residuo a fine fermentazione e a pH 4,1 il valore è stato di 0,071 mg/l.

Tabella 2.2.3- Evoluzione dell'acido lattico (mg/l) nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH

FML	pH 3,4			pH 4,1		
	O.oeni	L.plantarum	Mix	O.oeni	L.plantarum	Mix
11-nov	0,081±0,02	0,083±0,02	0,082±0,02	0,074±0,02	0,068±0,02	0,081±0,02
20-nov	0,481±0,02	0,413±0,02	0,442±0,02	0,823±0,2	0,745±0,02	0,782±0,2
05-dic	2,681±0,2	2,614±0,3	2,641±0,2	2,992±0,2	2,852±0,2	2,873±0,2
12-dic	3,251±0,4	3,083±0,3	3,122±0,3	3,293±0,4	3,184±0,3	3,221±0,4

L'acido lattico che si è formato è stato pressoché simile ai due pH.

Figura 2.2.4 - Evoluzione dell'acido lattico (mg/l) nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH

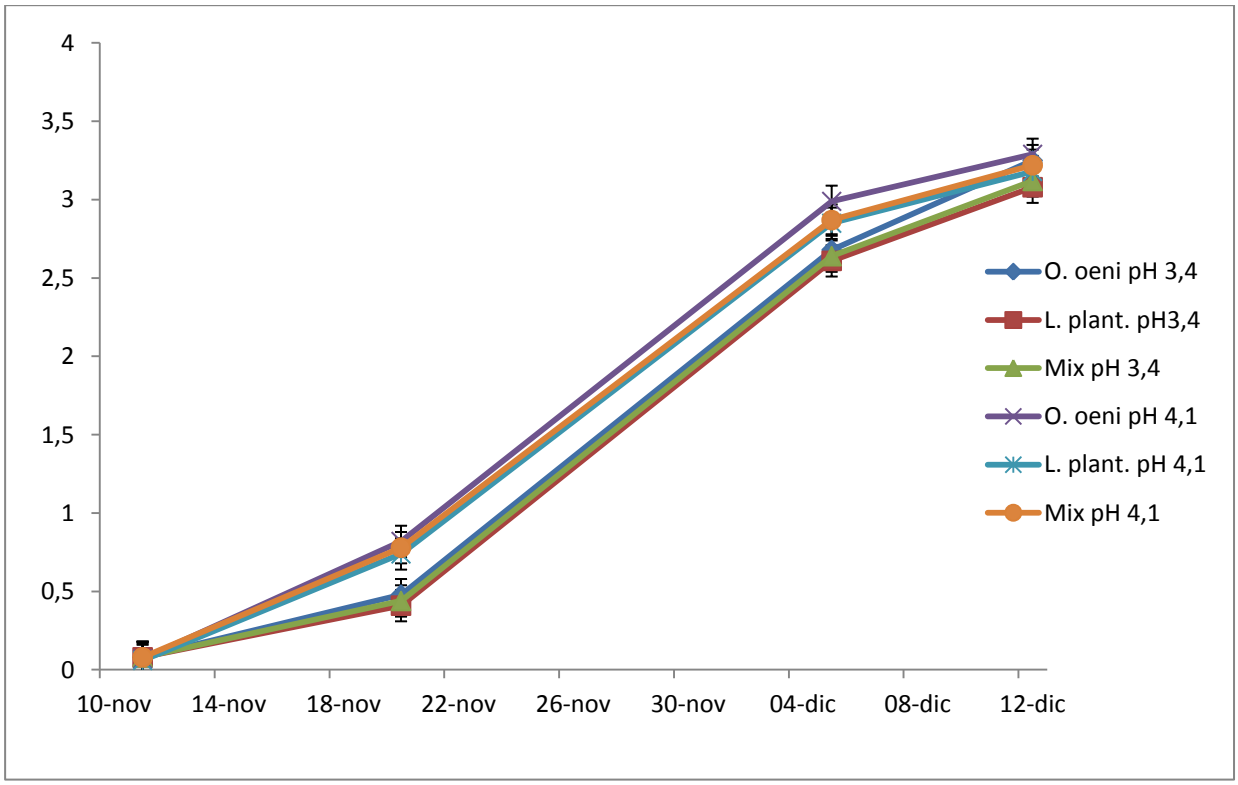


Tabella 2.2.5 - Evoluzione dell'acido citrico (mg/l) nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH

FML	pH 3,4			pH 4,1		
	O.oeni + D.S.	L.plantarum + D.S.	Mix+ D.S.	O.oeni+ D.S.	L.plantarum + D.S.	Mix + D.S.
11-nov	0,57±0,02	0,57±0,03	0,57±0,02	0,57±0,02	0,57±0,04	0,57±0,02
20-nov	0,41±0,03	0 ,46±0,03	0,44±0,04	0,38±0,02	0,42±0,02	0,43±0,03
05-dic	0,31±0,02	0,34±0,02	0,33±0,02	0,31±0,02	0,33±0,02	0,32±0,02
12-dic	0,25±0,02	0,27±0,03	0,26±0,02	0,22±0,02	0,191±0,04	0,219±0,02

A pH 3,4 l'acido citrico (tab.2.2.5) si è dimezzato con tutti e tre gli inoculi impiegati, mentre a pH 4,1 si è osservato una diminuzione maggiore.

Figura 2.2.6 - Evoluzione dell'acido citrico (mg/l) nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH

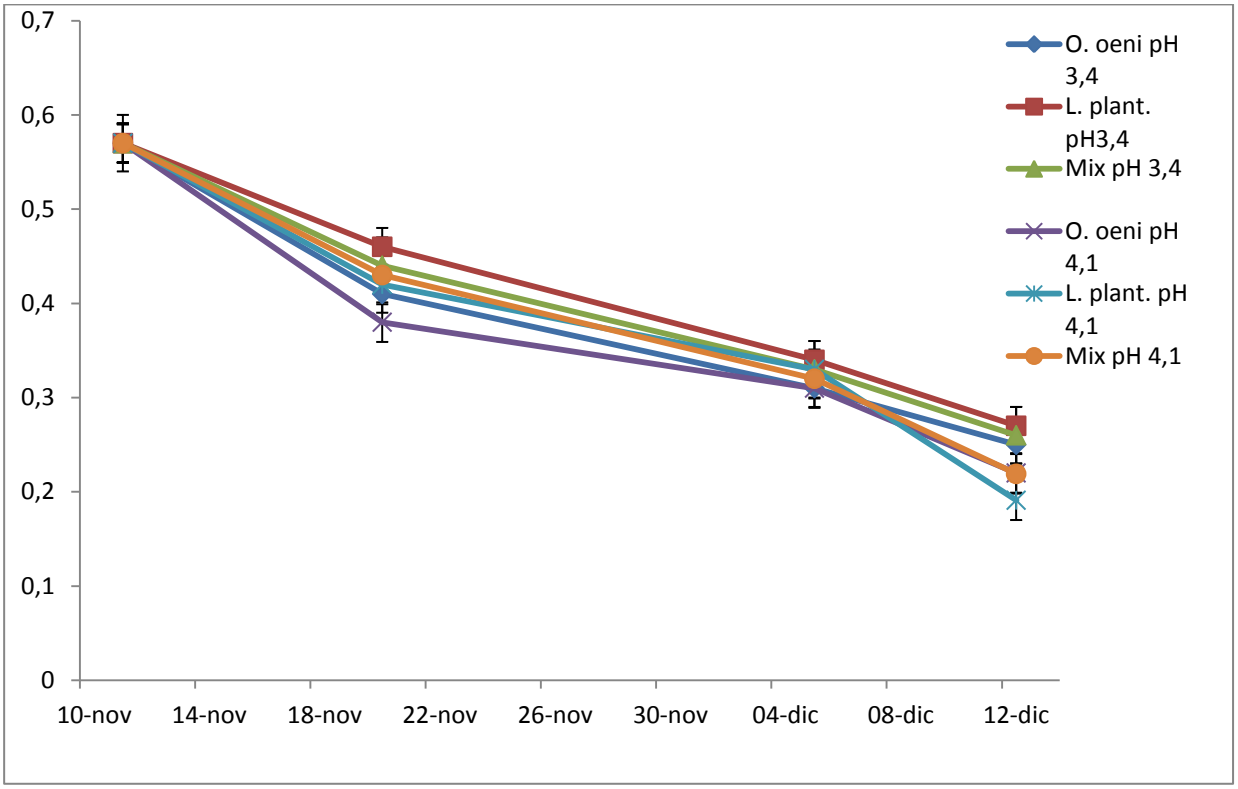
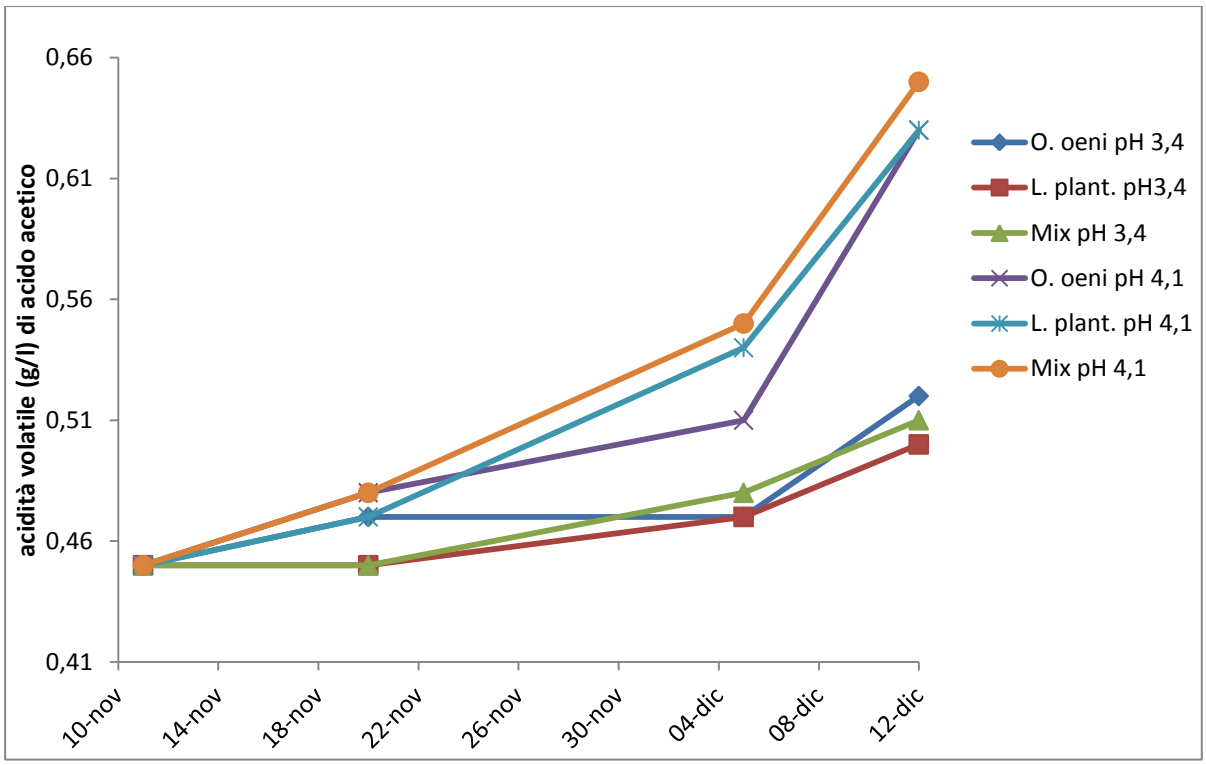


Figura 2.2.7 - Evoluzione dell'acidità volatile nella *Tintilia* durante la FML a diversi pH.

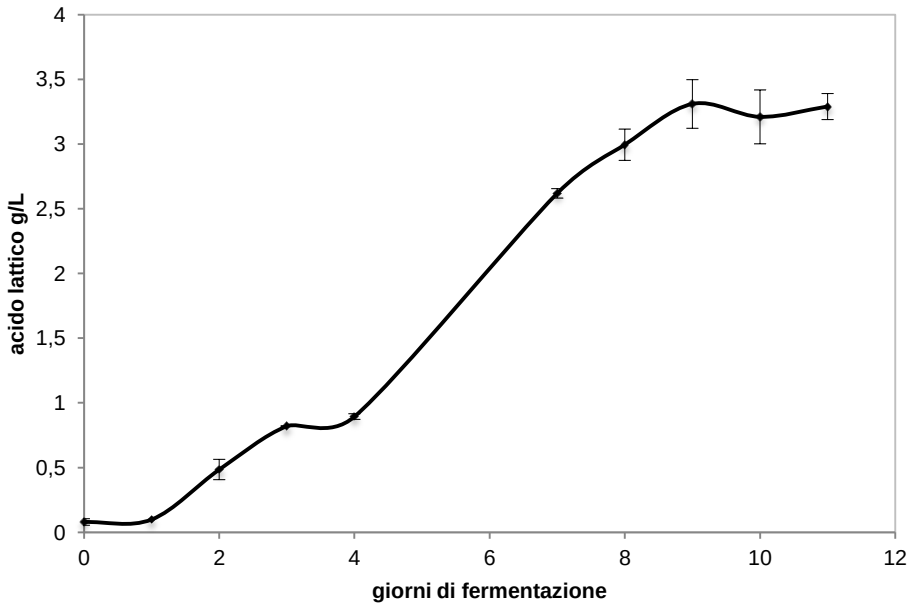


Nella figura 2.2.7 si può osservare l'evoluzione dell'acidità volatile nei vini *Tintilia* a diversi pH ed è risultata molto simile a quella della *Falanghina* con andamento crescente specialmente per il pH 4,1.

3. I biosensori

Per valutare al meglio la FML ed anche i suoi tempi di svolgimento è stata valutata la sua evoluzione anche mediante l'utilizzo di biosensori per la determinazione dell'acido lattico. La prova è stata effettuata solo per una tipologia di inoculo (*O. oeni*) pastorizzando preventivamente i campioni di vino. I risultati sono riportati nella figura 3.1.

Figura 3.1 - Evoluzione dell'acido lattico (g/l).



L'acido lattico, come previsto, ha mostrato una cinetica di formazione quasi lineare durante tutta la fermentazione malolattica completata dopo soli 12 giorni. Si può notare che nella fase iniziale,si ha la moltiplicazione cellulare dei microrganismi e quindi un lieve incremento di acido lattico; dal quarto giorno fino all'ottavo si ha un incremento esponenziale dell'acido lattico per poi diminuire e diventare stazionario quando termina la fermentazione in quanto termina il substrato.

La scelta di pastorizzare è stata fatta per valutare l'effetto di una ipotetica competizione dei microrganismi presenti nel vino con l'inoculo scelto per la fermentazione.

4. Contenuto in istamina dei vini

Per la determinazione delle ammine biogene è stato utilizzato il kit immunoenzimatico E.L.I.S.A. della ditta *Tecna*.

Dai valori riportati in tabella 4.1 e figura 4.2 si evince che la produzione di istamina è stata nettamente superiore nei vini che sono riusciti a terminare tutta la fermentazione malolattica grazie ad un pH ottimale per lo sviluppo dei batteri lattici.

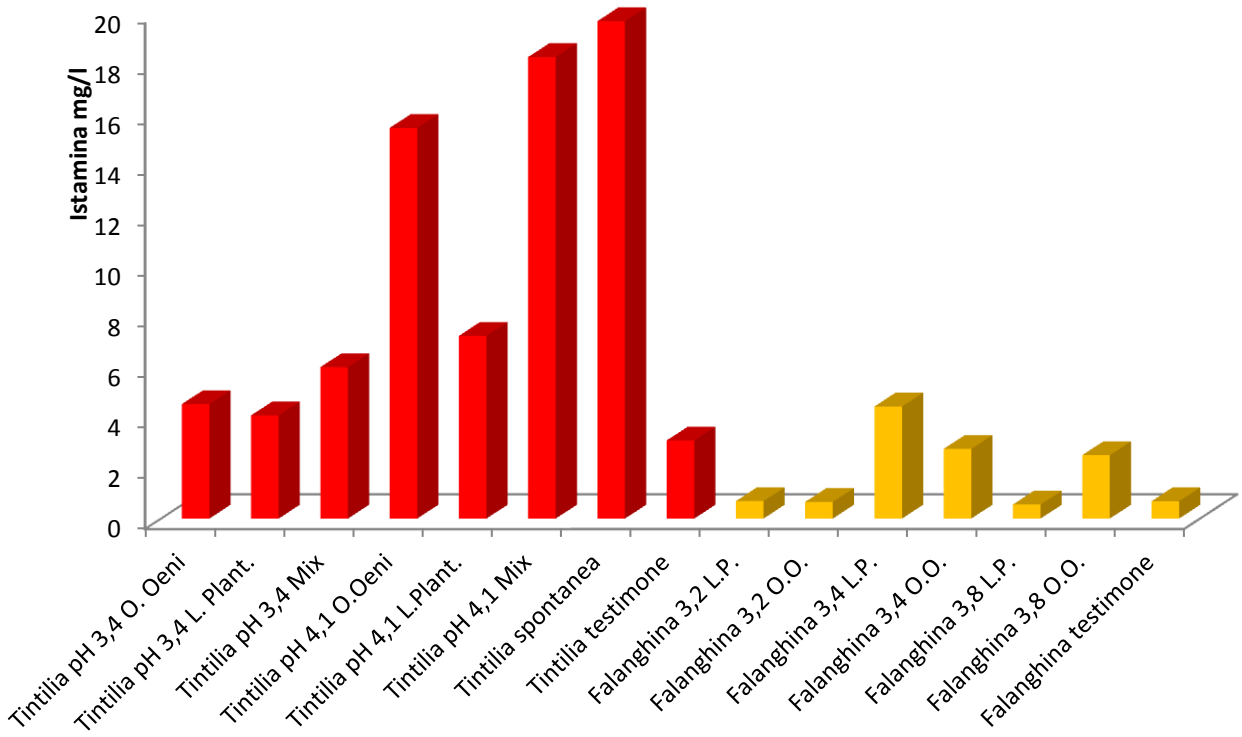
Dal grafico si può notare,nei vini *Tintilia*, che si è avuta una considerevole produzione di istamina soprattutto a pH più alti (pH 4,1) e tra i due microrganismi inoculati, *O. oeni* ne ha prodotto in quantità superiore e rispetto a quanto ne ha prodotto *L. plantarum*.

Nel caso della *Falanghina*, la produzione di istamina si è avita maggiormente a pH 3,4 per *L. plantarum*.

La FML spontanea nella *Falanghina* non è avvenuta mentre nella *Tintilia* si è avuta sia la FML che una grande produzione di istamina, superiore alla produzione avuta con l'inoculo selezionato.

e valori maggiori si sono avuti soprattutto in presenza di *O. oeni* o in campioni che hanno subìto una fermentazione malolattica spontanea.

Fig. 4.1- Contenuto di istamina nei vini *Falanghina* e *Tintilia.*



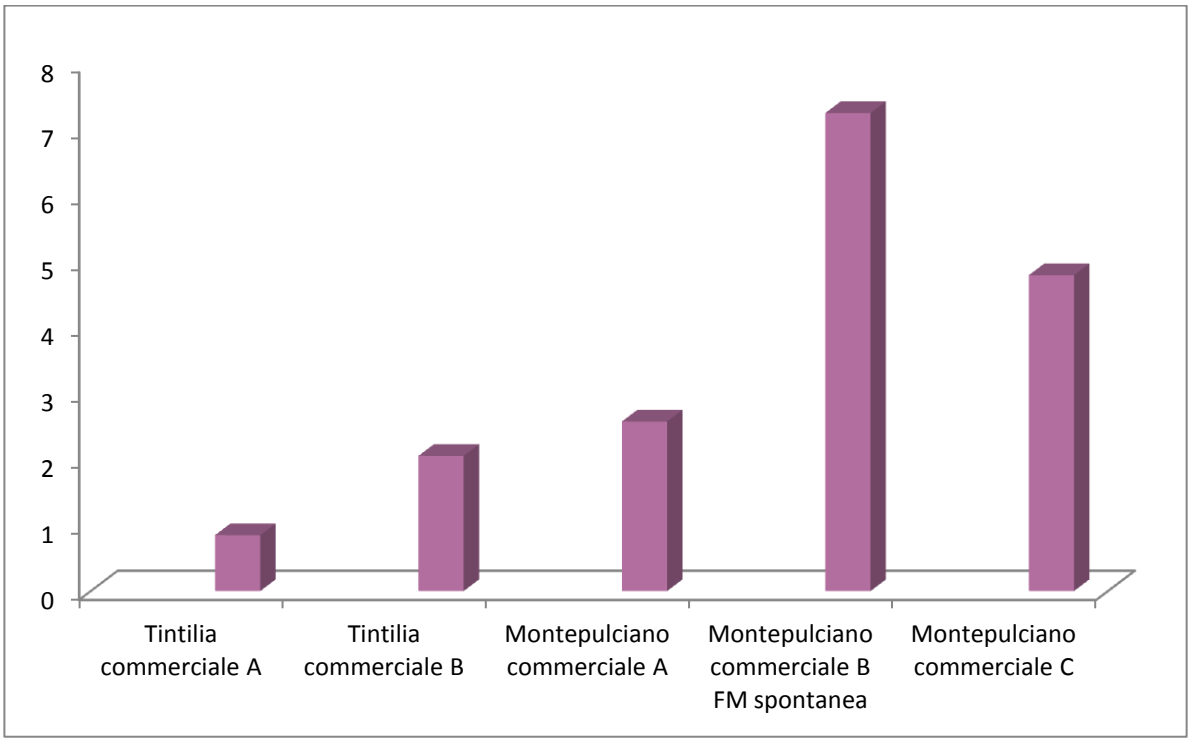
Tab. 4.2- Contenuto in istamina (mg/l).

Campioni	Istamina mg/l
TintiliapH 3,4 *O. oeni*	4,526
TintiliapH 3,4 *L. plantarum*	4,081
TintiliapH 3,4 Mix	5,988
TintiliapH 4,1 *O.oeni*	15,452
TintiliapH 4,1 *L. plantarum*	7,227
TintiliapH 4,1 Mix	18,257
TintiliaFML spontanea	19,678
Tintiliatestimone	3,089
FalanghinapH3,2 *L. plantarum*	0,689
FalanghinapH 3,2*O.oeni*	0,656
FalanghinapH3,4 *L. plantarum*	4,433
FalanghinapH3,4 *O.oeni*	2,756
FalanghinapH3,8 *L. plantarum*	0,556
FalanghinapH 3,8 *O.oeni*	2,507
Falanghina FML spontanea	0,685
Tintilia commerciale A	0,847
Tintilia commerciale B	2,050
Montepulciano commerciale A	2,571
Montepulciano commerciale B FM spontanea	7,248
Montepulcianocommerciale C	4,788

Inoltre, sono stati analizzati alcuni vini commerciali (figura 4.3) dove solo in uno è dichiarata la FML spontanea.

Il contenuto in istamina in essi è abbastanza contenuto tranne nel campione in cui è avvenuta la fermentazione spontanea.

Fig. 4.3 - Contenuto di istamina in vini commerciali.



5. Analisi sensoriale dei vini

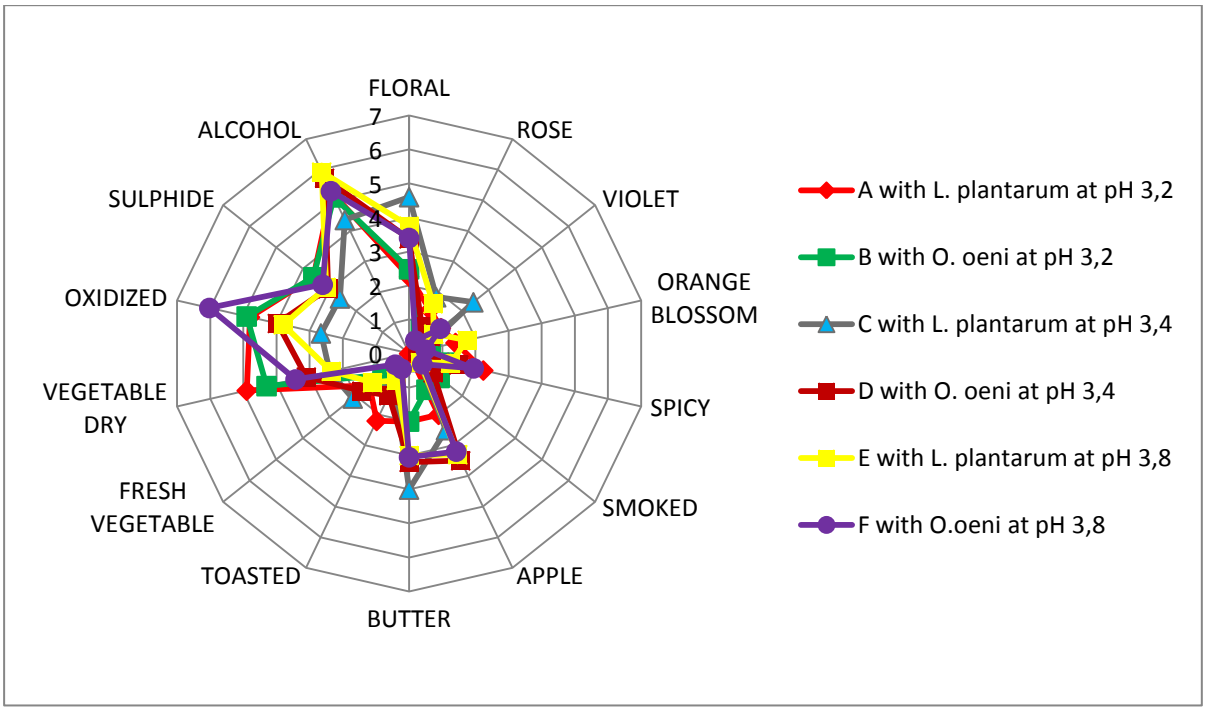
5.1 – Analisi sensoriale della *Falanghina*

La *Falanghina* è risultata di colore giallo paglierino, limpido e consistente. All'olfatto, di buona intensità e qualità fine, con una notevole nota floreale, prevalentemente di fiori di arancio e di camomilla, e di vegetale fresco. Al naso seguono note di un bel fruttato, prevalentemente di mela e, poi, di pesca bianca ed,infine,ricco di sfumature piacevoli quali burro, mandorla e un minerale.

In bocca, il vino si presenta secco senza residui zuccherini, caldo e abbastanza morbido che ben si bilancia con una notevole spalla acida e buona sapidità.

Dalla degustazione effettuata dai giudici sui campioni di *Falanghina* (Fig.5.1.1) è risultato che i vini presentano un profilo pressoché simile ma con valori di intensità più marcati nei vini a pH maggiore ed, in particolare, nei vini in cui è stato usato l'inoculo mix. Notevole è la presenza di note di burro e di mela per i campioni che hanno portato a termine la FML.

Figura 5.1.1 - Profilo sensoriale *Falanghina.*



5.2- Analisi sensoriale della *Tintilia*

Il vino *Tintilia* si presenta rosso rubino con una notevole intensità di colore che vira dal rosso con riflessi violacei nei vini di annate più giovani, al rosso rubino con riflessi arancio per i vini che maturano più a lungo o che fanno dei passaggi in legno.

All'olfatto, presenta un corredo aromatico caratterizzato prevalentemente da un fruttato, di frutti rossi e ciliegie sottospirito, e da un elegante speziato prevalentemente vaniglia, ma anche pepe nero, chiodi di garofano e liquirizia. Nei vini affinati in legno sono evidenti anche sentori balsamici oltre che di legno che ampliano la complessità aromatica.

Al gusto, la *Tintilia* ha una notevole quantità in alcol (12,5%- 14%) supportato da una buona spalla acidica, a sua volta bilanciata da una sufficiente morbidezza. La struttura che ne deriva è quindi importante.

Il tannino è presente e tende a diventare elegante e perdere la sua ruvidezza nei vini meno giovani.

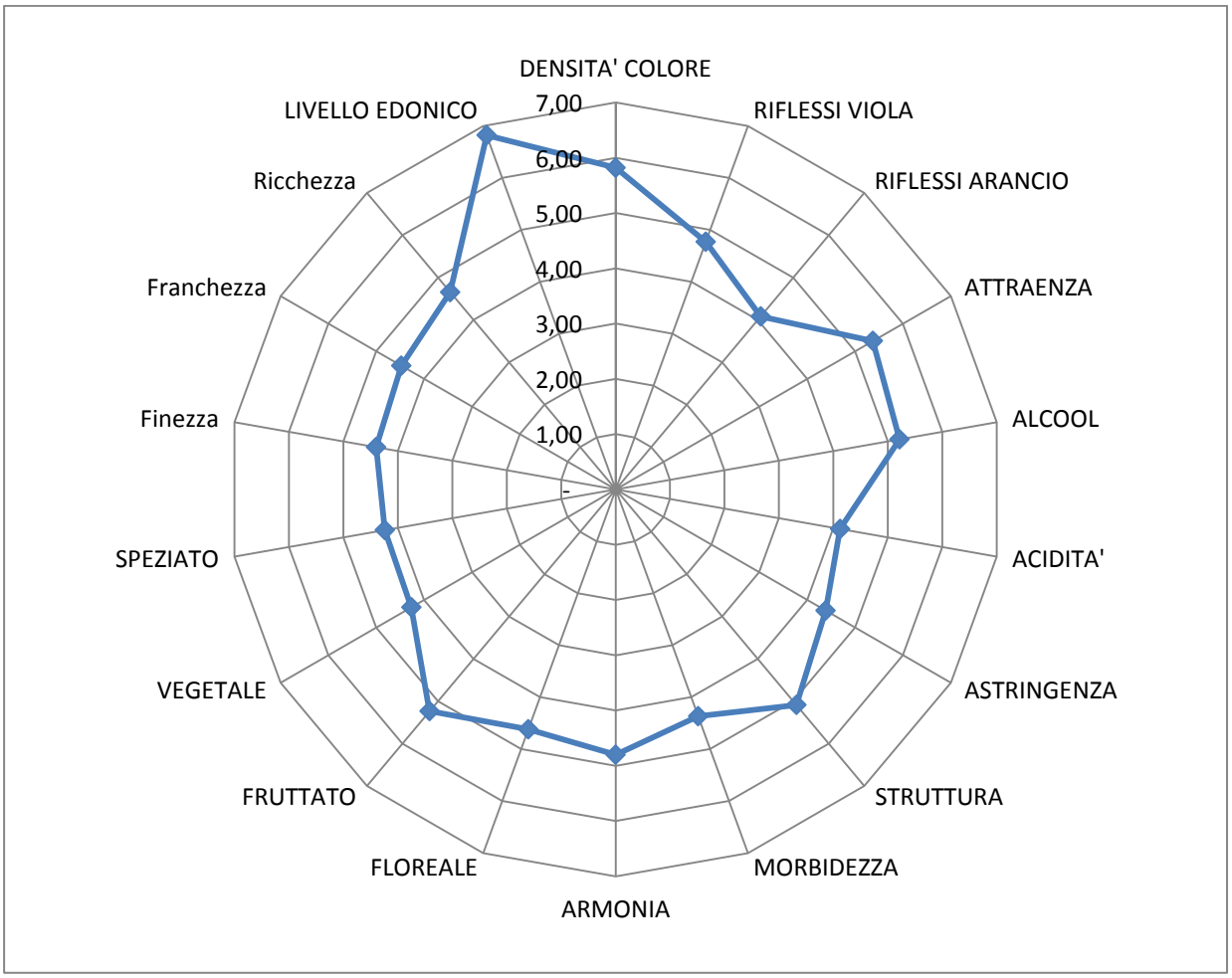
E' un vino che si presta, quindi, ad un affinamento sia in bottiglia che in legno per un periodo di media durata, acquisendo in questo modo una maggiore complessità aromatica e sicuramente una buona armonia sia gustativa che di profumi.

Dall'analisi è risultato (fig. 5.2.1) che il vino *Tintilia* (25 campioni di vino commerciale) ha avuto un notevole riscontro edonistico sui consumatori attestando un valore di piacevolezza elevato, nel dettaglio ha riscontrato

nel parametro dell'attraenza visiva valori di 5,37 e nel giudizio edonistico complessivo6,82di preferenza (scala da 0 a 9).

Infine, il punteggio medio di tale vino prodotto dalle diverse cantine molisane si attesta superiore a 85/100.

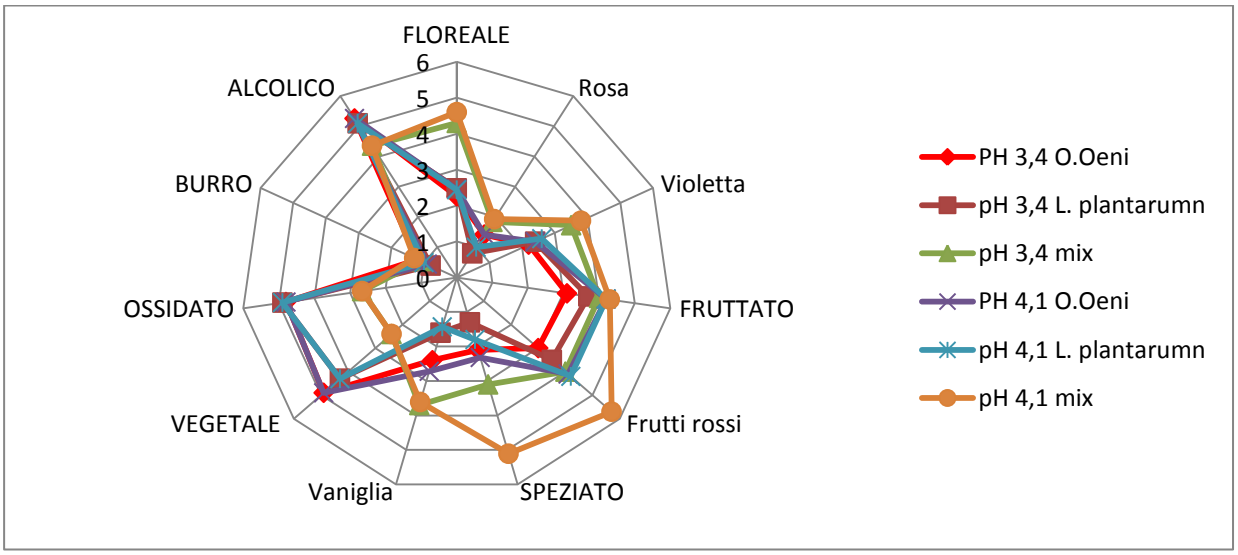
Figura. 5.2.1 - Profilo sensoriale del vino *Tintilia* (valori medi di 25 campioni commerciali).



Nel vino *Tintilia* trattato in laboratorio i valori di intensità sono più elevati a pH 4,1 rispetto al pH inferiore (Fig. 5.2.2). Inoltre, differenze si sono evidenziate con i diversi inoculi impiegati, nettamente superiore è

l'intensità rilevata nel mix a pH 4,1 segno evidente che i due batteri lattici in esso presente hanno lavorato in maniera sinergica.

Figura 5.2.2 - Profilo sensoriale *Tintilia.*



Infine, è da sottolineare che sebbene la FML sia stata completata, i valori del descrittore *"Burro"* non sono elevatissimi e tale aroma risulta gradevole nei vini degustati.

CONCLUSIONI

1. *FALANGHINA*

Dalle prove sul vino *Falanghina* si può affermare che a pH 3,8 la FML termina già dopo 27 giorni per quanto riguarda l'inoculo con *O. oeni*; occorrono, invece, circa due mesi per portare a termine la FML con l'inoculo del *L. plantarum.* Molto più tempo occorre nel caso del pH 3,4, infatti, per l'*O. oeni* occorrono circa due mesi e mezzo per portare a termine la fermentazione, mentre per il *L. plantarum* nello stesso tempo la FML non è terminata e a pH 3,2 non è avvenuta.

Per quanto riguarda l'acido citrico, il valore è diminuito in tutti i campioni e maggiormente a pH 3,8 prevalentemente con il *L. plantarum.*

A pH 3,4 la diminuzione di acido citrico è stata pressoché uguale per i due microrganismi.

Per quanto riguarda l'analisi sensoriale, alla degustazione effettuata dai giudici sui campioni di *Falanghina* è risultato che i vini presentano un profilo simile ma con valori di intensità più marcati per i vini a pH maggiori ed, in particolare, nei vini in cui è stato usato l'inoculo mix dei due batteri. Inoltre, sono presenti notevoli note di pasticceria e di mela.

2. *TINTILIA*

Nella *Tintilia*, particolarmente importante è il colore, e per questo motivo sono stati presi in esame i valori di L a* b*; la luminosità (L) non ha subìto variazioni rilevanti in tutti i campioni presi in esame, mentre si è avuta una diminuzione del colore rosso (+a*) e del giallo (+b*) al termine della FML.

Anche i valori di intensità di colore, di conseguenza, sono diminuiti.

All'aumentare del pH aumentano le sostanze incolori e diminuiscono gli ioni flavilio, motivo per cui vira il colore del vino dal rosso rubino al rosso aranciato.

Per quanto riguarda la composizione degli acidi, l'acido malico è stato degradato in tutti i campioni, con una spinta maggiore si è avuta utilizzando il mix di microrganismi a pH 3,4 che a pH 4,1.L'acido lattico che si è formato è stato pressoché simile ai due diversi pH.

Per l'acido citrico, a pH 3,4 si è avuta una diminuzione con tutti e tre gli inoculi impiegati, mentre a pH 4,1 si è osservato una diminuzione maggiore.

Per valutare meglio la FML ed i suoi tempi di svolgimento è stata valutata la sua evoluzione anche mediante l'utilizzo di biosensori per la determinazione dell'acido lattico. La prova è stata effettuata solo per una tipologia di inoculo (*O.oeni*) pastorizzando preventivamente i campioni di vino. L'acido lattico ha mostrato una cinetica di formazione quasi lineare durante tutta la fermentazione malolattica completata dopo soli 12 giorni.

La scelta di pastorizzare il vino è stata fatta esclusivamente per valutare l'effetto di una competizione tra microrganismi presenti in esso.

In effetti è risultato che i tempi di fermentazione si abbreviano drasticamente limitando la competizione microbica. Quindi si può suggerire, per migliorare la qualità dei vini laddove si utilizza la FML, di farla avvenire sempre dopo una preventiva filtrazione sterilizzante e successivamente inoculando i batteri lattici selezionati.

L'analisi sensoriale effettuata sui campioni di *Tintilia,* riportano valori di intensità più elevati a pH 4,1 rispetto al pH inferiore. Inoltre, l'intensità risulta nettamente maggiore nel mix di microrganismi a pH 4,1 poiché concorrono anche nel dare una connotazione più intensa agli aromi prodotti.

A conclusione delle sperimentazioni effettuate, sono stati determinati i contenuti di istamina prodotta durante la FML, poiché particolarmente importante per la loro tossicità.

È stata maggiormente prodotta nei vini che hanno terminato la fermentazione malolattica, in quanto i microrganismi esplicano questa attività negativa prevalentemente dopo aver degradato tutto l'acido malico.

Nei vini *Tintilia*, che si è avuta una considerevole produzione di istamina soprattutto a pH più alti (pH 4,1) e l'*O. oeni* ne ha prodotto una quantità superiore rispetto al *L. plantarum*.

Nei campioni con la FML spontanea, si è avuta una maggiore produzione di istamina a conferma che batteri non selezionati sono più propensi a questo tipo di metabolismo.

Si può suggerire, dunque, a tecnici e operatori del settore, di effettuare le pratiche di cantina (travasi, filtrazioni, etc) non appena termina la fermentazione malolattica sia per eliminare i substrati fonti del metabolismo delle amine, sia per eliminare i microrganismi (batteri lattici) ancora presenti nel vino.

BIBLIOGRAFIA

Albanese D., Di Matteo M., Crescitelli A. (2010) Screen printed biosensors for detection of nitrates in drinking water. *Computer Aided Chemical Engineering*, **28**, 283-288.

Albanese D., Liguori C., Paciello V., Pietrosanto A. (2011) Winemaking Process Monitoring based on a biosensor Automatic system. *IEEE Transactions on a Instrumentation and Mesasurement,* **60**, 1909 -1916.

Bartowsky E.J., Costello P., Henschke P.A. (2002) Management of the malolactic fermentation wine flavor manipulation. *Aust. & N.Z. Grape grower & Winemaker* **461**, 10-12.

Bauer R., Dicks LMT (2004) Control of malolactic fermentation in wine: a review. *S Afr J Enol Vitic* **25**, 74-88.

Brentani E. – Odello L. (2004) - *Assaggiare e far di conto. Elementi di statistica per l'analisi sensoriale* - L'Assaggio 11 Centro studi Assaggiatori.

Bover-Cid S., Holzapfel W. (2000) Biogenic amine production by bacteria. In: COST 917: Biogenically active a mines in food. D.M.L.

Davis C.R., Wibowo D., Fleet G.H., Lee T.H. (1988) Properties of wine lattic acid bacteria: Their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic*. **39**, 137-142.

De Revel G., Bertrand A., Lonvaud- Funel A. (1989) Conn. vigne Vin, 23.

Fondazione Italiana Sommelier (2014) Il gusto del vino**.** Bibenda Editore.

Formato D., Goglia L., De Stefano G., Cinquanta L. (2012) Effetto dell'invecchiamento sul colore del vino Tintilia. *Vigne e Vini.*

Garcia – Moruno E., Ribaldone M., Di Stefano R., Conterno L., Gandini A. (2002) In Étude de cinq souches de *Saccharomyces cerevisiae* par rapport à leur métabolisme du gérianol. *Journal International Science Vigne Vin.,* **36,** 221-225.

Gramatica P., Manitto P., Ranzi B., Dal Bianco A., Francavilla M. (1982) Stereospecific Reduction of geraniol to citronellol by *Saccharomyces cerevisiae. Experientia,* **38,** 775-776.

Henick-Kling T. (1995) Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *J Appl Bacteriol* **79**: 29-37.

Henick-Kling T., Acree T.E., Krieger S.A., Laurent M.H. (1993) Sensory aspects of malolactic fermentation. In: Stockle C. S., Johnston RS, Leske PA, Lee TH (Eds) *Proceedings of the eighth Australian wine industry technical conference*, Melbourne (Australy), 26-28 October, 1992, pp 148-152.

Knoll C, Fritsch S, Schnell S, Grossmann M, Maret du Toit DR (2011) Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *Food Sci and Technol* **44**: 2077-2086.

Kunkee R.E. (1991) Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiology rewies* **88**, 55-72.

Kunkee RE (1967) Malo-lactic fermentation. *AdvApplMicrobiol* **9**: 235-279.

Lallemand (2006)

Lonvaud-Funel A. Zmirou- Bonnamour C., Weinzorn F. (1984)- Le metabolisme de l'acide citrique par les bacteries lactiques de la fermentation malolactique des vins. Sciences et Aliments **4**, 81-85.

Lonvaud-Funel A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *Mini review. FEMS Microbiology letters* **199**, 9-13.

Morgan A., White F., Sanchez - Jiminez S., Bardocz, Eds.; Proc, First general workshop, Vol. lV, Pubblication of the European Communities.

Mignani A., Scavetta E., Guadagnini L., Tonelli D. (2009) Comparative study of protective membranes for glucose biosensors based on electro deposited hydrotalcites. *Sensors and Actuators B* ***136*** *196–202*.

Nicolini G., Larcher R., Beftoldi D. (2003) Indagine sul tenore di ammine libere in mosti d'uve di varietà autoctone. *Rivista di Viticoltura e di Enologia - 1.*

Nicolini G., Larcher ,Ramponi M. (2001) Contenuto di ammonio e profilo aminoacidico di mosti varietali dell'annata 1999 L'Enologo**(37,3)**:79-87

Odello L.(2013)- Codice *sensoriale del vino* - L'Assaggio Centro studi Assaggiatori.

Odello L., Violoni M. (2011) Sensi, cervello, Analisi sensoriale - *L'Assaggio 13 Centro studi Assaggiatori*.

Odello L., Ugolini A., Violoni M. (2007) Analisi sensoriale: I test descrittiv i- *L'Assaggio 14 Centro studi Assaggiatori*.

Office International de la Vigne et du Vin (OIV)(1990) Recuil des methods internationals d'analyse des vins et des mouts. Paris.

Petravic Tominac V., Kovacevic Ganic K., Komes D., Gracin L., Banovic M., Maric V.- Department of Biochemical Engineering and Department of Food Technology Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia – *Influence of media Composition and Temperature on Volatile Aroma Production by Various Wine Yeast Strains.*

Ribereau P.-Gayon, Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A.(**Eds) (2006)** (2nd ed). The microbiology of wine and vinifications. Vol.1 Handbook of enology. Chichester: John Wiley Sons.

Ribereau P., Gayon, Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. *Trattato di enologia* Edagricole.

Ribéreau- Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P., Amati A. Trattato di Scienza e Tecnica Enologica, Edizioni AeB Brescia.

Ribéreau-P. Gayon, Glories Y., Maujean A., Dubordieu D. (2010) *Trattato di EnologiaI- II*, Edagricole.

Ronkainen N.J., Halsall H.B. , Heineman W.R. (2010) Electrochemical biosensors. Chem. Soc. Rev., **39** pp. 1747–1763

***Tintilia del Molise* (2009)**- Assessorato all'Agricoltura e Foreste.

Ugliano M., Genovese A, Moio L. (2003) Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcusoeni J. Agric. FoodChem.* ***51***, 5073-5078.

Vaudano E., Garcia – Moruno E., Di Stefano R. (2004) Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermantation. *International journal of the Institute of Brewing,* **110,** 213-219.

Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. (2005) Microbiologia del vino. Edizioni Ambrosiana.