

STRUMENTI
PER LA DIDATTICA E LA RICERCA

– 124 –

La ricerca applicata ai vini di qualità

a cura di
Stefano Di Blasi

Firenze University Press
2012

La ricerca applicata ai vini di qualità / a cura di Stefano Di Blasi.
– Firenze : Firenze University Press, 2012.
(Strumenti per la didattica e la ricerca ; 124)

<http://digital.casalini.it/9788866551652>

ISBN 978-88-6655-163-8 (print)
ISBN 978-88-6655-165-2 (online)

Progetto grafico di Alberto Pizarro Fernández
Immagine di copertina: © Petrafler | Dreamstime.com



Certificazione scientifica delle Opere

Tutti i volumi pubblicati sono soggetti ad un processo di referaggio esterno di cui sono responsabili il Consiglio editoriale della FUP e i Consigli scientifici delle singole collane. Le opere pubblicate nel catalogo della FUP sono valutate e approvate dal Consiglio editoriale della casa editrice. Per una descrizione più analitica del processo di referaggio si rimanda ai documenti ufficiali pubblicati sul sito-catalogo della casa editrice (<http://www.fupress.com>).

Consiglio editoriale Firenze University Press

G. Nigro (Coordinatore), M.T. Bartoli, M. Boddi, F. Cambi, R. Casalbuoni, C. Ciappei, R. Del Punta, A. Dolfi, V. Fargion, S. Ferrone, M. Garzaniti, P. Guarnieri, G. Mari, M. Marini, M. Verga, A. Zorzi.

© 2012 Firenze University Press
Università degli Studi di Firenze
Firenze University Press
Borgo Albizi, 28, 50122 Firenze, Italy
<http://www.fupress.com/>
Printed in Italy

Indice

PREFAZIONE	7
LA VITICOLTURA DI PRECISIONE	9
<i>L. Genesio, T. De Filippis, F. Di Gennaro, E. Fiorillo, A. Matese, J. Primicerio, L. Rocchi, F.P. Vaccari</i>	
LA GESTIONE DELLA CHIOMA NELLA VITICOLTURA DI PRECISIONE	51
<i>S. Pedò, D. Porro, R. Zorer</i>	
TECNICHE DI RACCOLTA, PULIZIA E CERNITA DELLE UVE	81
<i>A. Parenti, S. Spinelli, S. Benedettelli</i>	
MASSIMIZZAZIONE DEL POTENZIALE ENOLOGICO PER MEZZO DI DIVERSE TECNICHE DI VINIFICAZIONE	107
<i>L. Calamai, F. Valori, I. Lozzi, O.L. Pantani</i>	
MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEI VINI MEDIANTE L'IMPIEGO DI INOCULI MISTI	129
<i>P. Domizio, L. Lencioni, C. Romani, M. Ciani, F. Comitini, M. Gobbi, I. Mannazzu</i>	
IL CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA PER LA TUTELA DELLA QUALITÀ DEL VINO	155
<i>L. Granchi, S. Guerrini, M. Bronzini</i>	
L'ANALISI METABOLOMICA DESCRIVE COME CAMBIA LA COMPOSIZIONE DEL VINO DURANTE LA MICRO-OSSIGENAZIONE, SOTTO L'EFFETTO COMBINATO DI OSSIGENO E FERRO	189
<i>F. Mattivi, P. Arapitsas, D. Perenzoni, U. Vrhovsek</i>	

Prefazione

La ricerca viticola ed enologica è alla base del processo di miglioramento della produzione del vino.

Nel quadriennio 2007-2010 il Consorzio Toscana ha svolto un programma di ricerca dal titolo *La ricerca scientifica applicata ai vini di qualità*, in accordo ad un contratto di programma definito dalla delibera CIPE 35/2004.

Nei capitoli che seguono è riportata una sintesi delle linee di progetto che comprendono la viticoltura (gestione della chioma e viticoltura di precisione), le tecniche di raccolta delle uve, l'enologia (macerazione, fermentazione alcolica e malolattica, gestione dell'ossigeno).

L'obiettivo del programma di ricerca è il miglioramento di tecniche colturali e di vinificazione del Sangiovese, in particolare nel contesto toscano, individuando come fruitore naturale dei risultati di ricerca, il produttore di vino di qualità, al quale anche questo libro è rivolto.

Nel progettare la ricerca si è ritenuto che alcune pratiche viticole ed enologiche, sebbene note, dovessero e devono a tutt'oggi, essere comprese in modo più dettagliato, soprattutto in relazione alle condizioni ambientali a cui si applicano.

Non esiste una tecnica, sia essa viticola che enologica giusta o sbagliata in assoluto, esistono delle combinazioni più adatte rispetto agli obiettivi produttivi.

Infine per migliorare la qualità di un vino si deve poter misurare, capire e controllare tutto il processo produttivo.

Il produttore leggendo i capitoli che seguono, troverà alcune risposte alle tante domande che si pone, avrà conferma della complessità della produzione del proprio vino ed apprezzerà quanto la ricerca possa aiutare a svelarla.

La trattazione completa dei risultati della ricerca non poteva essere racchiusa nelle pagine di questo testo, alcuni risultati sono ancora in via di pubblicazione su riviste scientifiche internazionali.

Per ulteriori approfondimenti si rimanda al sito <www.consorziotoscania.it> dove è reperibile il programma di ricerca nella sua interezza.

La viticoltura di precisione

L. Genesio*, T. De Filippis*, F. Di Gennaro*, E. Fiorillo*,
A. Matese*, J. Primicerio*, L. Rocchi*, F.P. Vaccari*

I. La viticoltura di precisione nel Consorzio Tuscania

Il settore vitivinicolo italiano ha conosciuto nel corso degli ultimi 30 anni una profonda evoluzione con l'ammodernamento degli assetti produttivi delle aziende finalizzato all'ottenimento di livelli qualitativi più elevati; ciò ha permesso una maggiore competitività delle produzioni italiane sui mercati internazionali.

Questi cambiamenti hanno comportato un radicale rinnovamento del patrimonio viticolo ed una revisione delle tecniche agronomiche con la finalità, da un lato, di massimizzare il potenziale enologico dei territori, e dall'altro, di ottimizzare gli input al vigneto in un'ottica di minimizzazione dei costi e di tutela ambientale.

È in questo contesto che si è affermato il concetto di viticoltura di precisione, ovvero di un approccio gestionale e produttivo sito-specifico improntato alla ottimizzazione di ogni singolo vigneto o porzione di esso. I vigneti si presentano, soprattutto nel contesto italiano, come ambienti caratterizzati da una elevata eterogeneità dovuta a fattori strutturali, quali la morfologia, il suolo ed il clima, ed altri dinamici quali le pratiche colturali e la variabilità climatica stagionale. La viticoltura di precisione nasce con lo scopo di gestire la variabilità presente nel vigneto al fine di ottimizzare le pratiche agronomiche e quindi massimizzare il potenziale enologico (Fig. 1).

Questo approccio innovativo è stato possibile grazie allo sviluppo ed al perfezionamento di strumenti conoscitivi in grado di caratterizzare in mo-

* Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biometeorologia (CNR-IBIMET), via G. Caproni 8, 50145, Firenze, Italia.

10 La ricerca applicata ai vini di qualità

Figura 1. Diagramma di flusso della viticoltura di precisione



Figura 2. Schema logico della viticoltura di precisione



do dettagliato l'ambiente specifico di sviluppo della pianta ed il suo stato vegetativo. Il mondo della ricerca ha negli anni messo a punto molteplici strumenti per il monitoraggio del vigneto ed alcuni di questi sono già utilizzati in modo operativo dalle aziende. Il monitoraggio meteorologico e micro-meteorologico, la mappatura dei vigneti basata sia su tecniche di remote sensing aereo e satellitare che di proximity sensing, unitamente allo sviluppo di macchine operatrici basate sulla cosiddetta *Variable Rate Technology* (VRT), permettono di effettuare una gestione differenziata di porzioni del vigneto sulla base di input georiferiti (Fig. 2).

In parallelo, il concetto di *information based management*, ha fornito un notevole impulso per lo sviluppo sia di ricerche mirate ad una miglior comprensione dei meccanismi eco-fisiologici della vite ed alla sua risposta alle diverse pratiche di gestione agronomica, sia di sistemi informativi finalizzati alla gestione dell'informazione geografica ed alla fornitura di strumenti decisionali per le aziende secondo una logica di sotto-zonazione.

La diffusione di queste tecnologie a costi sempre più accessibili, ha trovato terreno fertile nella necessità delle aziende di gestire estensioni territoriali sempre maggiori sulla base di criteri oggettivi ed attraverso processi meccanizzati.

In questo contesto la sperimentazione portata avanti dal CNR IBIMET nell'ambito del progetto di ricerca Consorzio Toscana, ed in particolare nella linea di ricerca A2 *Valutazione Multiscala della potenzialità enologica del vigneto*, ha avuto l'obiettivo di migliorare la comprensione delle relazioni tra i parametri vegetazionali telerilevati e la qualità dell'uva analizzando come tale relazione possa essere sfruttata per ottimizzare sia le pratiche di gestione del vigneto sia la qualità del prodotto ottenuto.

Sulla base del disegno sperimentale del progetto, la ricerca portata avanti da IBIMET, in collaborazione con gli altri partner di progetto, si è concentrata sugli aspetti seguenti:

- analizzare la variabilità interna e tra i vigneti attraverso gli strumenti di telerilevamento fornendo informazioni per la caratterizzazione dei vigneti sperimentali;
- integrare i risultati con le analisi di tipo ecofisiologico e micrometeorologico svolte nel modulo A1 e confrontare la variabilità ottenuta con le analisi di qualità delle uve verificando la capacità degli strumenti impiegati di discriminare effettivamente i livelli qualitativi;
- testare la validità degli indici arrivando ad orientare la vendemmia tramite l'individuazione di classi omogenee di raccolta.

I risultati della sperimentazione presentati in questo capitolo, sebbene non possano considerarsi esaustivi forniscono indicazioni importanti sulle nuove frontiere della ricerca in viticoltura e sull'efficacia, sul piano operati-

12 La ricerca applicata ai vini di qualità

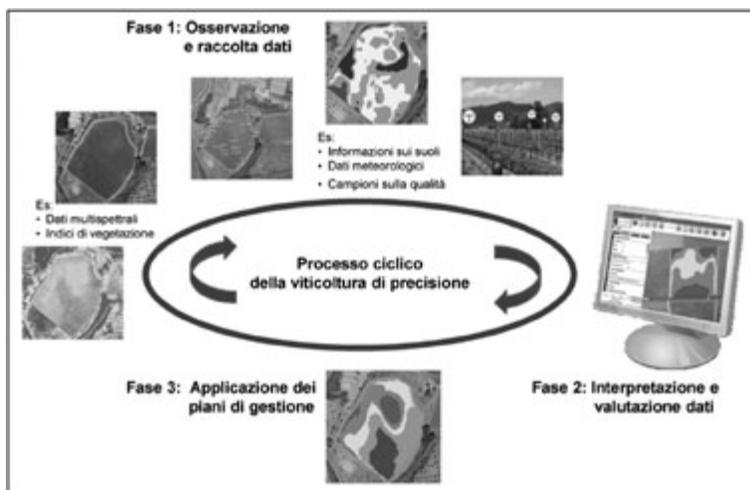
vo aziendale, dei nuovi strumenti di monitoraggio finalizzati alla viticoltura di precisione ed alla gestione dell'informazione.

2. Introduzione al telerilevamento in viticoltura

La viticoltura moderna può essere considerata come una forma di agricoltura di precisione, dove una gestione differenziata tra i diversi vigneti ed all'interno del vigneto è ormai riconosciuta come prerogativa per ottenere una produzione di qualità.

La viticoltura di precisione, quindi, deve necessariamente essere orientata alla comprensione delle interazioni tra vigneto ed ambiente al fine di gestirle per ottenere uve di qualità, che rappresentano il primo requisito per una produzione di vini di qualità. In viticoltura la gestione di pratiche agronomiche quali concimazioni, irrigazioni, potature, lavorazioni, trattamenti antiparassitari, richiede non solo una profonda conoscenza della fisiologia della pianta, ma anche quella del territorio e dell'ambiente, in particolare alla luce dei nuovi scenari ambientali dovuti al Cambiamento Climatico ai quali la viticoltura dovrà sapersi adattare. L'approccio della viticoltura di precisione si basa su un continuo processo ciclico (Fig. 3, rielaborata da Bramley 2001) che comincia con l'osservazione delle performance del vigneto e dei parametri associati, seguito dalla interpretazione e valutazione dei dati raccolti, fino ad arrivare ad una gestione mirata degli input e/o alla vendemmia selettiva.

Figura 3. Il processo ciclico della viticoltura di precisione



La tecnologia moderna del monitoraggio ambientale ha messo a punto molteplici strumenti per la classificazione del territorio quali il remote sensing, le tecnologie di monitoraggio dei parametri meteorologici, i sistemi per la trasmissione, archiviazione ed analisi statistica dei dati, i Sistemi Informativi Geografici (GIS) e la modellistica. Questi strumenti sono in grado di raccogliere molte informazioni, anche apparentemente difficili da coniugare, e possono essere utilizzati in modo integrato per offrire al viticoltore il quadro più esauriente possibile per indirizzare i propri interventi, volti ad ottenere una produzione di qualità, nel rispetto dell'ambiente e della sua sostenibilità.

Dal punto di vista operativo le finalità che si propone la viticoltura di precisione sono molteplici:

- gestione dell'eterogeneità dei vigneti attraverso la concimazione differenziata di varie porzioni del vigneto (VRT);
- riduzione dei costi e dell'impatto ambientale dei trattamenti attraverso irroratrici a rateo variabile;
- gestione differenziata delle potature verdi e delle sfogliature a seconda della vigoria e delle esigenze microclimatiche;
- uniformità dei lotti di uve alla raccolta (vendemmia selettiva).

In particolare la conoscenza del livello qualitativo delle produzioni prima della maturazione è di primaria importanza per pianificare l'attività di vendemmia al fine di indirizzare verso la vinificazione popolazioni di uve che siano il più possibile omogenee.

In generale i sistemi di osservazione remota, sia da satellite che da piattaforma aerea che da supporti terrestri, sono destinati a diventare la principale fonte di informazioni per il controllo e la gestione del territorio, permettendo l'aggiornamento continuo dei piani informativi e fornendo un continuo contatto con i cambiamenti del mondo reale. Grazie ai continui progressi tecnologici ed al contenimento dei costi, questi sistemi sono ormai il routinario complemento di molte analisi e procedure di valutazione che vengono svolte con metodologie tradizionali. Le potenziali applicazioni del telerilevamento in agricoltura devono comunque essere valutate sulla base sia delle caratteristiche dei sensori e dei satelliti, sia sulla loro appropriatezza a rappresentare il mondo reale per soddisfare le esigenze operative e le priorità degli utenti finali. In particolare l'applicabilità del telerilevamento (remote sensing) al monitoraggio dei processi ecofisiologici dipende da tre importanti elementi: le caratteristiche elettromagnetiche, la risoluzione spaziale e la risoluzione temporale.

Molte applicazioni del telerilevamento dedicate alla gestione ambientale possono essere esportate in viticoltura, come dimostrato da numerosi

14 La ricerca applicata ai vini di qualità

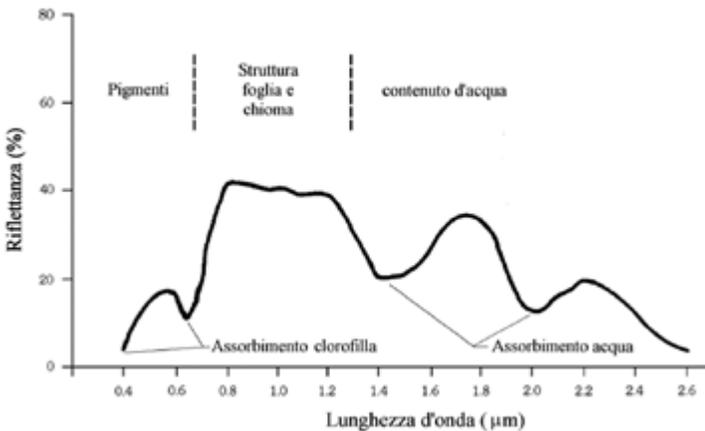
studi realizzati sulla capacità degli strumenti di remote sensing di orientare il processo decisionale nel vigneto. Un grosso limite alla diffusione operativa di questi strumenti è stato sia la bassa risoluzione spaziale e temporale dei sensori disponibili sia il costo delle informazioni. Oggi, l'affinamento dei sensori, l'introduzione di nuove piattaforme di rilevazione più efficienti e con costi più contenuti, hanno permesso la diffusione di nuove tecniche di telerilevamento che utilizzano piattaforma aerea o veicolare per il monitoraggio.

La multidisciplinarietà è particolarmente rilevante nella gestione del vigneto a causa dei numerosi fattori che determinano la quantità e la qualità del prodotto finale. I viticoltori cercano solitamente di controllare i fattori più importanti con la consapevolezza che interventi efficaci possono essere realizzati nel corso dell'anno esclusivamente per un numero limitato di elementi, mentre per tutti gli altri le scelte determinanti sono effettuate al momento dell'impianto. Ciononostante un numero rilevante di scelte compiute nel corso dell'anno influenzano in modo consistente qualità e quantità delle produzioni.

Il telerilevamento può supportare l'attività di gestione del vigneto, e questo compito può essere svolto utilizzando direttamente l'informazione prodotta da queste tecniche o integrando i suoi prodotti in sistemi o modelli più complessi. Le prime applicazioni delle tecniche di Earth Observation (EO) volte alla stima della produzione del vigneto derivano dall'elaborazione di immagini acquisite da satellite.

Fin dall'inizio delle missioni di EO i maggiori sforzi sono stati orientati alla comprensione delle implicazioni dei cambiamenti delle firme spettrali caratteristiche della vegetazione (Fig. 4), nelle diverse bande dello spettro elettromagnetico.

Figura 4. Firma spettrale caratteristica della vegetazione



La maggior parte delle informazioni acquisite dai satelliti devono essere estratte ed elaborate per le specifiche applicazioni desiderate. Nel caso delle firme spettrali della vegetazione esistono molte procedure ed algoritmi diversi (indici vegetazionali) che sono in grado di fornire importanti informazioni per l'agrometeorologia e per la fisiologia vegetale, come dimostrato dalla ricca bibliografia esistente.

Il contributo di specifici indici vegetazionali all'agricoltura è stato ampiamente studiato e dimostrato. Generalmente gli indici relativi alla vegetazione sono legati alla lunghezza d'onda relativa ai pigmenti fotosintetici nella porzione Rosso del visibile, e all'Infrarosso Vicino. Gli indici spettrali vegetazionali riducono i valori multispettrali di ogni pixel dell'immagine a un singolo valore numerico (index), e ne sono stati sviluppati vari con lo scopo di evidenziare i cambi delle condizioni vegetative. Il più utilizzato è senza dubbio il Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) che viene ricavato in base alla seguente relazione:

$$NDVI = (R_{NIR} - R_{RED}) / (R_{NIR} + R_{RED})$$

dove R_{NIR} e R_{RED} sono rispettivamente la riflettanza nelle bande del vicino infrarosso e rosso.

Il valore di NDVI è un valore compreso fra -1 e +1, ed è l'indice più usato come indicatore del vigore della pianta o di biomassa relativa sia per la facilità di elaborazione sia per il fatto che, a differenza di altri indici, sono necessarie solamente due bande che possono essere acquisite con sensori non particolarmente costosi. Per aree altamente vegetate, il valore NDVI sarà un valore vicino all'unità, mentre per aree non vegetate sarà vicino a 0. Un vantaggio importante di questo tipo di indici è che l'intensità della luce totale riflessa influenza in maniera moderata il calcolo. Un oggetto o una pianta in ombra avrà una riduzione di luce riflessa approssimativamente uguale su tutto lo spettro elettromagnetico. Quindi attraverso l'uso di indici vegetazionali, l'effetto delle ombre, che altrimenti sarebbero un problema significativo in immagini come quelle di vigneti con filari vicini l'uno all'altro, è efficacemente ridotto. Alla stessa maniera, gli indici vegetazionali normalizzati permettono il confronto fra immagini acquisite in periodi diversi consentendo perciò di effettuare analisi multi temporali.

A partire da questa prerogativa, ovvero di associare a specifiche lunghezze d'onda dello spettro elettromagnetico dei determinati elementi, si comprende come le possibili applicazioni possano essere sempre più complesse e diversificate in funzione delle specifiche finalità di monitoraggio.

Le analisi derivanti dal telerilevamento hanno confermato come l'indice NDVI sia strettamente correlato con il Leaf Area Index (LAI) del vigneto. Le misure dirette di area fogliare, che comportano comunque una misura distruttiva, sono molto accurate, ma necessitano di impiego di personale

che le rende inapplicabili in senso operativo, trovando esclusivamente giustificazione in attività di ricerca scientifica. Le misure indirette o ancora meglio da telerilevamento offrono un importante contributo a questo tipo di problematica, soprattutto in applicazioni operative dal costo contenuto.

In particolare la relazione tra i valori di NDVI ottenuti da immagini satellitari Ikonos e misure di LAI ha dimostrato di avere un ottimo grado di correlazione (r^2 compreso tra 0.91 e 0.98) (Johnson, 2003). Oltre a tale importante correlazione di questi due parametri, lo studio ha anche messo in evidenza come questa risposta sia stabile nel tempo e che quindi è possibile ottenere mappe di LAI a partire da immagini satellitari ad alta risoluzione per tutto l'arco temporale vegetativo della vite.

In ogni caso, per ottenere un risultato affidabile, è comunque necessario, prima della formulazione di un indice sintetico, procedere ad una serie di campionamenti distruttivi direttamente in campo, che possano servire per una calibrazione dell'indice. La consistenza e la natura dei campionamenti diretti deve essere necessariamente definita in base alla variabilità statistica del fenomeno da misurare.

Alcune differenze nella firma spettrale delle caratteristiche della foglia e della fenologia, come il rapporto forma e dimensione, suggeriscono che è possibile discriminare tra questi elementi, utilizzando tecniche di telerilevamento, anche attraverso mappe dedicate. Le differenze comunque in molti casi possono essere talmente piccole che la risoluzione delle immagini satellitari non riesce ad evidenziarle.

Partendo dall'elaborazione di mappe NDVI è inoltre possibile calcolare una serie di parametri secondari che possono essere quindi utilizzati come dati di input per modelli di simulazione di crescita, come l'evapotraspirazione e l'efficienza fotosintetica (Myneni *et al.* 1997).

L'interesse nell'uso dei dati EO direttamente implementati in modelli ecofisiologici ha indotto la NASA a sviluppare un sistema semi-automatico chiamato TOPS (Terrestrial Observation and Prediction System), in grado di assimilare dati satellitari in modelli spaziali che in tempo quasi reale restituiscono mappe che possono aiutare i viticoltori nella gestione del vigneto e delle operazioni colturali (Nemani *et al.* 2003) relativamente a :

- Mappa di Uniformità dei vigneti: deriva dal coefficiente di variazione (Deviazione standard / media * 100) dell'NDVI. Questa mappa può assistere il viticoltore nell'identificazione di differenti aree, all'interno dello stesso vigneto che necessitano una differenziazione delle operazioni colturali.
- Mappa del Bilancio del Vino: prende in considerazione il bilancio tra l'apparato fogliare e la produzione di uva, fondamentale per ottenere una produzione di qualità (Iland *et al.* 1995; Smart 2001). Le ricerche in questo settore suggeriscono che nei climi freddi il rapporto deve esse-

re pari a 1 ovvero 1 m² di foglie per 1 kg di uva prodotta (Smart 2001). Generalmente i produttori sanno qual è il rapporto migliore per ogni vigneto. La mappa in questo caso fornisce una indicazione con un grado di risoluzione inferiore al metro (0.75 m) che può facilmente trovare numerose applicazioni operative.

- Mappa di Bilancio idrico. L'irrigazione è una normale pratica in alcune aree di coltivazione della vite e soprattutto in occasione di alcune specifiche operazioni colturali come l'impianto o il soccorso da una siccità prolungata. La quantità di acqua da distribuire e la durata dell'irrigazione, sono due parametri decisivi per ottenere una produzione di qualità, in quanto in determinate fasi fenologiche un moderato stress idrico, può far aumentare la qualità del vino (stress controllato), senza che questo pregiudichi la vita stessa della pianta. Il telerilevamento può essere efficacemente applicato per monitorare lo stato idrico della pianta (Apostol *et al.* 2003). Johnson e collaboratori (2003b) hanno messo a punto un semplice bilancio idrico (Vineyard Soil Irrigation Model, VSIM) per facilitare la pianificazione delle operazioni di irrigazione. Il modello simula il bilancio idrico su base giornaliera o stagionale come funzione del LAI, delle condizioni meteorologiche, del tipo, della profondità del suolo e della tessitura del terreno e della profondità delle radici.

Nonostante la loro potenzialità, esiste una ricca bibliografia che mette in evidenza come le immagini satellitari non siano in grado di fornire la risoluzione spaziale e temporale (tempo di ritorno) necessaria per applicazioni operative di precision farming. A seguito di ciò, negli ultimi anni differenti sensori e tecnologie sono stati specificatamente sviluppati per ottenere strumenti flessibili ed economici atti al monitoraggio del vigneto, principalmente basati su tecniche di remote sensing (RS) e proximal sensing (PS). La differenza fra PS e RS è principalmente legata alla distanza dalla parete vegetale alla quale viene effettuato il monitoraggio, nel primo caso circa un metro e nel secondo da centinaia fino a migliaia di metri a seconda se il sensore è montato su un Unmanned Aerial Vehicle (UAV), un aeroplano o un satellite. Un'altra differenza fra questi sistemi è l'angolo di vista del sensore rispetto alla canopy; nadirale per il RS e variabile (nadirale, obliquo o laterale) per il PS a seconda di come il monitoraggio è effettuato. Un'altra differenza fondamentale è la fonte di luce utilizzata per le misure di riflettanza spettrale delle cortine vegetali: di solito naturale (sensori passivi) per il RS e variabile per il PS a seconda del sensore utilizzato (sensori attivi e passivi). I sensori attivi hanno il vantaggio che possono operare indifferentemente in tutte le condizioni di luce superando il problema della copertura nuvolosa e le limitazioni dovute al momento del giorno durante il quale le misurazioni sono effettuate (luce e ombre) (Stamatiadis *et al.* 2010). Ciò è ottenuto tramite l'emissione di fasci di luce intermittente emessa da una fonte di luce ausiliaria. L'uso di mappe digitali ottenute da sensori montati

su piattaforma aerea, piattaforma terrestre (trattrici) e più recentemente da UAV, sta rapidamente diffondendosi in quanto questa tecnologia è in grado di evidenziare sia lo stadio di crescita sia l'andamento di specifiche fasi fenologiche ed è quindi in grado di supportare decisioni di gestione del vigneto anche a livello operativo. Oggi grazie a queste nuove piattaforme è possibile colmare numerose lacune dei sistemi satellitari ed in particolare:

- lavorare a risoluzioni elevate, dell'ordine delle decine di centimetri potendo così discriminare l'informazione proveniente dallo spazio interferire rispetto a quella della vegetazione;
- scegliere con maggior esattezza la tempistica dei passaggi aerei, svincolandosi dalla cadenza spesso inadeguata delle rilevazioni satellitari, che incorrono inoltre nei problemi dovuti alla copertura nuvolosa.

La viticoltura moderna, che si basa su produzioni di elevato standard qualitativo può trarre grande vantaggio da questo sviluppo tecnologico riuscendo ad assicurare un controllo più completo di tutte le fasi della filiera produttiva. Va ricordato, infine, che ad oggi gli indicatori di produzione e qualità sono collegati tra di loro anche se queste relazioni variano significativamente tra un vigneto e l'altro e spesso all'interno dello stesso vigneto. A ciò si aggiunga che frequentemente, all'interno di un vigneto, le aree a bassa ed alta produttività rimangono stabili nel tempo, così da suggerire un significativo ruolo delle condizioni ambientali, soprattutto pedologiche, sulla variabilità.

In questo contesto è nato l'interesse di confrontare differenti metodi di acquisizione di NDVI basati su tecniche di RS e PS nell'ambito della linea di ricerca A2 *Valutazione multiscala della potenzialità enologica del vigneto* del Progetto di Ricerca Consorzio Toscana. Sono stati coinvolti tre gruppi di ricerca, con differenti strumentazioni per l'acquisizione della misura della biomassa fotosinteticamente attiva (PAB, *Photosynthetically Active Biomass*) dei vigneti tramite misure di NDVI:

- IBIMET (Istituto di Biometeorologia – Consiglio Nazionale delle Ricerche): acquisizione di immagini tele rilevate in falsi colori per mezzo della camera multi spettrale DUNCAN (Redlake Inc., San Diego, Ca, Usa) montata a bordo dell'aereo SKY ARROW. Le immagini vengono elaborate per derivare mappe NDVI che successivamente vengono elaborate tramite filtri appositamente sviluppati a finestra mobile che sono in grado di rimuovere efficacemente i valori dell'interfilare. Sono state inoltre acquisite immagini nell'infrarosso termico volte a determinare lo stato di stress idrico della vegetazione per effettuare una comparazione con immagini multi spettrali.
- DIPROVE (Dipartimento Produzione Vegetale Università degli Studi di Milano): rilevamento in continuo sull'intera estensione dei vigneti dei valo-

ri di NDVI e di spessore delle pareti fogliari attraverso sensori ottici (GreenSeeker RT100, Ntech Industries Inc., Ukiah, CA, USA) e ad ultrasuoni (Jameco Part n. 134105, Senix Corp., USA) montati su mezzo mobile, attrezzato con DGPS (Topcon mod. GB-500, Capelle a/d IJssel, The Netherlands) e PC industriale. Ciò ha permesso di ottenere dati georeferenziati ogni 30 cm lungo i filari, i quali, non necessitando di alcun tipo di filtraggio, sono stati sottoposti ad una semplice spazializzazione tramite interpolazione mediante metodo Inverse Distance Weight (IDW) per l'ottenimento delle mappe tematiche relative agli indici di vegetazione utilizzati.

- IASMA-FEM (Istituto Agrario San Michele all'Adige – Fondazione Edmund Mach): rilevamento in verticale su singola pianta con misuratore portatile Spectrosense 2+ (Skye instruments, Llandrindod. Wells, Powys, UK).

Uno degli aspetti fondamentali che differenzia i tre diversi sistemi di acquisizione dei sensori dei tre gruppi di ricerca è il differente punto di vista da cui viene fatta la rilevazione della PAB delle piante. Infatti, mentre tramite aereo vengono registrati valori relativi alla parte superiore della *canopy*, con il sensore montato su di un mezzo *quad* mobile operante direttamente in vigneto si ha invece una misurazione laterale di tutta la spalliera; più simile alla rilevazione aerea è quella tramite misuratore portatile che effettua la rilevazione in verticale rispetto alla spalliera. Altra considerazione da fare sull'angolo di acquisizione è che nei rilievi effettuati da IBIMET e IASMA non si acquisiscono informazioni dirette sulla zona della vegetazione che ha subito trattamenti agronomici, quali differente carica di gemme e sfogliatura, e che quindi le significatività rilevate si riferiscono ai *feedback* che i vari trattamenti hanno sulla parte superiore della *canopy*; diverso invece il discorso per i rilievi DIPROVE che, infatti, si dimostrano molto efficaci nel rilevare trattamenti quali la sfogliatura basale e le loro interazioni. Le riprese da aereo consentono inoltre di avere una visione contemporanea di appezzamenti anche molto estesi.

In questo contesto tecnologico, le principali questioni alle quali ha cercato di rispondere la sperimentazione sono le seguenti:

- Individuare la migliore data per l'acquisizione di immagini multi spettrali per la creazione di mappe di prescrizione.
- Verificare la capacità delle immagini multi spettrali di discriminare classi di uve in base ai loro parametri qualitativi nelle varietà Cabernet Sauvignon e Sangiovese in diverse condizioni ambientali.
- Valutare la variazione della capacità predittiva delle immagini in funzione della data di vendemmia (tecnologica o tardiva).
- Analizzare la relazione tra indice di vigore e mappe termiche in relazione alla qualità dell'uva.

20 La ricerca applicata ai vini di qualità

- Sviluppare le catene di pre-processing dell'informazione per passare dal dato telerilevato a mappe di prescrizione utilizzabili su macchinari a rateo variabile.

Per rispondere a queste domande sono state effettuate tre rilevazioni (approssimativamente intorno al 15 giugno, 15 luglio, 15 agosto) in momenti fenologicamente importanti quali allegagione, invaiatura, maturazione del frutto sui 4 vigneti sperimentali per quattro anni (2007-2010) e i risultati sono stati successivamente analizzati in funzione delle analisi vendemmiali delle uve. Il paragrafo seguente illustra i risultati dell'analisi da telerilevamento aereo, mentre nel paragrafo 4 (Analisi multiscala) è descritto il risultato del confronto tra i tre metodi di rilevazione.

3. Analisi da telerilevamento aereo

I voli per il telerilevamento vengono effettuati con l'aereo SKY ARROW 650 TC/TCNS (Iniziative Industriali Italiane Spa, Roma, Italia; Fig. 5). Semplici operazioni permettono di alloggiare e rimuovere i sensori posizionati su apposite piastre. Questo aereo è certificato FAA/JAR ed è interamente realizzato in carbonio e kevlar. Il velivolo è equipaggiato con motore Rotax da 100 HP ed ha un'autonomia al volo di 3.5 ore. Estremamente maneggevole e flessibile nell'uso, può decollare e atterrare da aeroporti ed avio-superfici con lunghezza della pista di appena 500 m. I sorvoli sono stati effettuati ad una quota compresa tra i 300 e i 400 m s.l.m.

Figura 5. Sky Arrow ERA (Environmental Research Aircraft)



Il sistema che acquisisce nelle bande del visibile, del vicino infrarosso e termico, è composto da camere multispettrali, termiche e digitali a colori reali, sistemi GPS e GPS/INS, altimetro laser:

- Camera Duncan Multispettrale MS4100: acquisizione nel verde, rosso e infrarosso vicino
- Camera Flir SC500/A40M: acquisizione nell'infrarosso termico
- Unità GPS: Ashtech DG14, Novatel OEM4
- Altimetro Laser: Riegl LD90 series
- Camera Canon EOS 20D: acquisizione in colori reali.

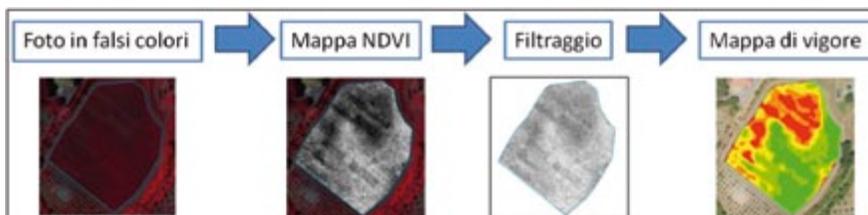
Questi apparati sono integrati in un unico sistema di acquisizione, flessibile e configurabile dall'utente. È stato sviluppato un software di gestione che permette l'acquisizione di tutti i sensori, e di memorizzare la posizione e l'assetto del velivolo associati alle immagini acquisite. La sincronizzazione tra sistemi GPS e le camere è gestita tramite segnali di trigger TTL. Le immagini utilizzate in questo lavoro sono state acquisite ad una risoluzione spaziale di 30 cm e programmate per acquisire nelle bande spettrali del visibile e del vicino infrarosso. Ogni volo di campionamento è stato corretto radiometricamente e geometricamente. La correzione radiometrica converte il digital number di ogni pixel (valore di brightness) a un valore di radianza spettrale applicando parametri di calibrazione specifici per le foto-camere utilizzate. Questo è un fattore importante per l'uso delle immagini processate in analisi avanzate poiché permette di lavorare su immagini uniformi dal punto di vista radiometrico, specialmente quando è richiesta la correzione atmosferica.

L'alta risoluzione geometrica prevede un lavoro di ortorettifica più accurato di quello normalmente necessario, anche a causa del fatto che le immagini riguardanti vigneti sono particolarmente complesse da ortorettificare. I problemi risiedono principalmente nel fatto che di solito i vigneti si trovano su aree morfologicamente complesse e anche perchè si hanno pochi punti idonei come Ground Control Point (GCP), cioè punti a coordinate note che vengono utilizzati per la georeferenziazione delle immagini acquisite. A tal fine è stata effettuata una serie di rilievi ad alta precisione tramite l'utilizzo di un GPS (Global Positioning System) differenziale (DGPS). Tali strumenti di nuova generazione consentono di acquisire in maniera differenziale le coordinate di punti di interesse con precisione centimetrica. Inoltre all'inizio di ogni stagione estiva sono stati montati dei pannelli a coordinate note di colore bianco e dimensione 1*1 m. La ortorettifica è stata realizzata con l'ausilio di un Modello Digitale del Terreno (DEM) di passo 5*5 m. Le immagini orto rettificate sono state quindi elaborate con appositi software per ottenere mappe NDVI.

Successivamente le mappe di NDVI sono state trattate al fine di distinguere il filare dall'interfila, come illustrato dal diagramma metodologico

della figura 6. In particolare, in questa ricerca, sono stati studiati e valutati dei filtri per immagini digitali a finestra mobile. Il loro funzionamento consiste nell'estrarre il valore del pixel al centro della finestra mobile nel caso questo sia il valore massimo fra quello dei pixel presenti all'interno della finestra. L'applicazione di filtri porta ad un aumento dei valori medi di indice di vegetazione nel caso di vigneti non o scarsamente inerbiti nell'interfilare. Infatti i valori di NDVI del suolo nudo sono molto bassi, per cui includendoli nella media per parcella l'abbassamento è chiaramente significativo (Tab. 1). Sono stati confrontati nella prima fase del progetto quattro filtri differenti per la dimensione della finestra mobile, 3*3, 5*5, 7*7, 9*9 pixel. I test effettuati hanno indicato che più grande è la finestra mobile del filtro, maggiore è il valore medio di NDVI per parcella a scapito però del coefficiente di variabilità. Considerato che uno degli scopi della ricerca è quello di identificare la variabilità delle produzioni intra-vigneto e capire se i trattamenti agronomici della chioma influiscono significativamente sulla qualità delle uve, è stato scelto il filtro a finestra mobile in grado di mantenere il valore più alto possibile di coefficiente di variabilità (Tab. 2). A tal fine si è scelto di usare il filtro con la finestra mobile più piccola, 3*3 pixel. Nessun tipo di filtro però è risultato idoneo a discriminare il filare dall'interfila nel caso in cui quest'ultima sia altamente inerbita, cioè abbia degli alti valori vegetazionali.

Figura 6. Diagramma metodologico dell'elaborazione delle immagini multi-spettrali per la realizzazione di mappe di prescrizione (esempio del vigneto di Brolio)



I rilevamenti effettuati nelle stagioni 2007-2010 evidenziano la potenza dell'indice di vegetazione come descrittore della micro-zonazione del vigneto (Filorillo *et al.*, 2009, 2012). Le indagini statistiche condotte hanno evidenziato una generalmente buona correlazione tra l'NDVI ed alcuni indici qualitativi delle uve come descritto approfonditamente nei successivi paragrafi. Grazie alla ripetizione delle rilevazioni è stato inoltre possibile evidenziare la variazione del grado di correlazione nel corso della stagione e fra le diverse annate.

I notevoli risultati ottenuti tramite l'utilizzo dei dati NDVI hanno dato l'impulso allo sviluppo di metodologie per l'utilizzo delle mappe in ambito aziendale. L'utilizzo delle mappe di prescrizione in ambito operativo aziendale richiede la messa a punto di una catena di produzione dell'informazione come descritto dallo schema di Figura 7.

Tabella 1. Diagramma metodologico dell'elaborazione delle immagini multi-spettrali per la realizzazione di mappe di prescrizione (esempio del vigneto di Brolio)

Blocco	Vigoria	Trattamento	Min	Max	Media
Br_1	Bassa	Non filtrato	-0.157	0.961	0.504
Br_1	Bassa	filtrato	0.534	0.961	0.707
Br_2	Media	Non filtrato	-0.222	0.964	0.557
Br_2	Media	filtrato	0.416	0.964	0.719
Br_3	Media	Non filtrato	-0.037	0.937	0.547
Br_3	Media	filtrato	0.463	0.937	0.723
Br_4	Alta	Non filtrato	0.000	0.951	0.613
Br_4	Alta	Filtrato	0.642	0.971	0.794

Tabella 2. Valori medi NDVI e coefficiente di variabilità (C.V.) dei i blocchi sperimentali del 16-07-08 del vigneto di Cacciagrande

	Filtro 3*3	Filtro 5*5	Filtro 7*7	Filtro 9*9
Media blocchi	0,611	0,729	0,753	0,757
C.V. interna	0,088	0,056	0,048	0,047

Figura 7. Diagramma di flusso per la realizzazione delle mappe di prescrizione



Fattore fondamentale, per un utilizzo in chiave operativa di tali mappe, è l'omogeneizzazione delle differenti aree di vigore e la creazione di mappe, definite mappe di prescrizione, in formati informatici compatibili con i *devices* montati a bordo di macchinari agricoli dotati di VRT e vendemmiatrici a doppia tramoggia per vendemmie selettive.

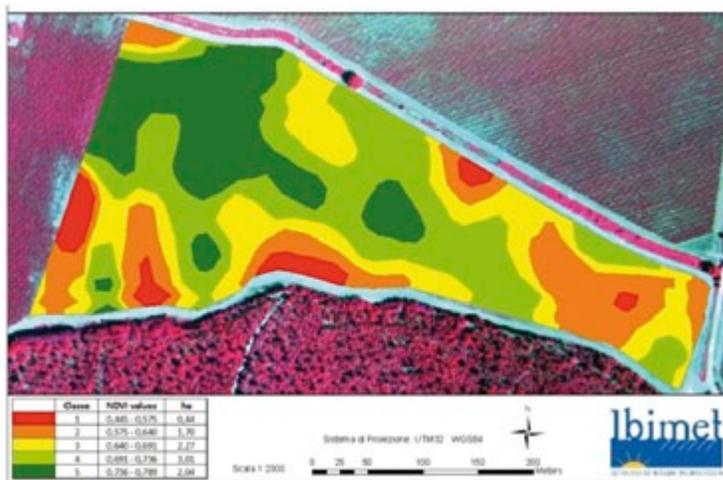
La metodologia sviluppata, rappresentata nella Figura 7, si basa su varie tecniche di elaborazione di immagini digitali ed è personalizzabile in base alla risoluzione spaziale delle immagini, alle caratteristiche del vigneto cui è riferita e al tipo di mappa che si vuole ottenere. La collaborazione

24 La ricerca applicata ai vini di qualità

Figura 8. Mappa di prescrizione a 2 classi



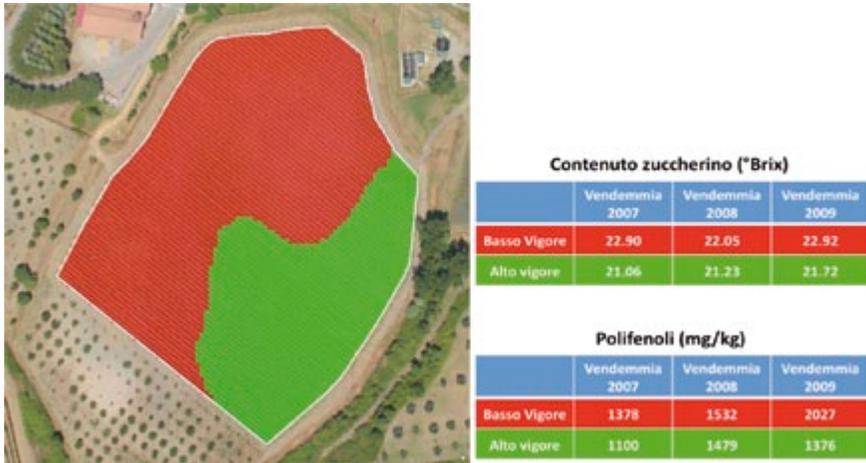
Figura 9. Mappa di prescrizione a 5 classi



diretta con aziende del settore ha infatti indicato che le mappe di prescrizione, per un utilizzo ottimale da parte degli agronomi o più in generale dei *decision-makers*, devono avere delle peculiari caratteristiche in base alle finalità con cui vengono utilizzate.

In particolare si è potuto constatare l'utilità di realizzare mappe di prescrizione a 2 e 5 classi (Figg. 8 e 9) a seconda che tali mappe siano utilizzate, rispettivamente, su vendemmiatrici a doppia tramoggia o su macchinari agricoli VRT (i.e. concimatrici e sfogliatrici di precisione).

Figura 10. Mappa di prescrizione a 2 classi per il vigneto di Brolio e corrispondenti valori medi di contenuto zuccherino ($^{\circ}$ Brix) e polifenoli negli anni di sperimentazione 2007-2008-2009



Le mappe di prescrizione sono state inoltre efficacemente utilizzate per la raccolta di uve omogenee riguardo al grado di maturazione per la linea di ricerca B4 *Massimizzazione del potenziale enologico per mezzo di diverse tecniche di vinificazione*. La figura 10 illustra la mappa di prescrizione a 2 classi per il vigneto di Brolio ed i corrispondenti valori medi di contenuto zuccherino ($^{\circ}$ Brix) e polifenoli negli anni di sperimentazione 2007-2008-2009.

Se da un lato le mappe di NDVI sono molto efficaci nell'individuare differenti aree di vigore all'interno di un vigneto e per quanto si sia dimostrato che questa classificazione mostri una buona stabilità tra un anno e l'altro, bisogna comunque tenere conto che la scelta delle soglie di classificazione delle immagini non può prescindere da una valutazione agronomica che sia funzione sia della destinazione operativa delle mappe che dell'andamento stagionale. Infatti la sperimentazione ha mostrato che sebbene sia possibile identificare un *pattern* generale di correlazione tra immagini telerilevate e parametri qualitativi è altresì vero che la forza di questa correlazione può variare fortemente da un anno all'altro potendo essere condizionata dai parametri climatici.

La correlazione tra indici vegetazionali e parametri qualitativi non ha un valore assoluto, ma ha validità per effettuare una classificazione relativa intra-vigneto. Ad esempio, due vigneti adiacenti situati presso Castiglion della Pescaia presentano lo stesso *range* di valori NDVI, ma con differenti *range* di $^{\circ}$ BRIX (imputabile in questo caso alla diversa varietà e diverso orientamento dei filari). Le figure 11a e 11b mostrano il rapporto fra NDVI

26 La ricerca applicata ai vini di qualità

Figura 11a. Rapporto fra NDVI e contenuto zuccherino (°Brix) nell'annata 2008-2009 il vigneto Cortigliano (Sangiovese)

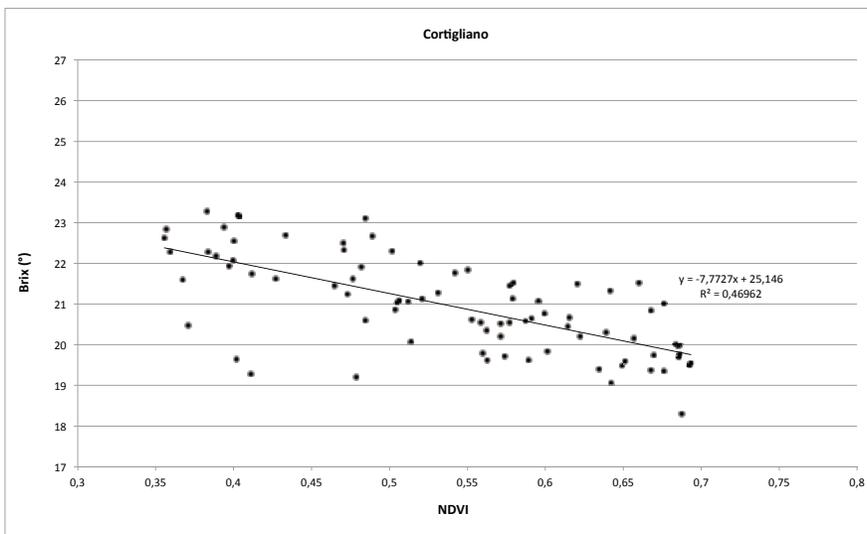
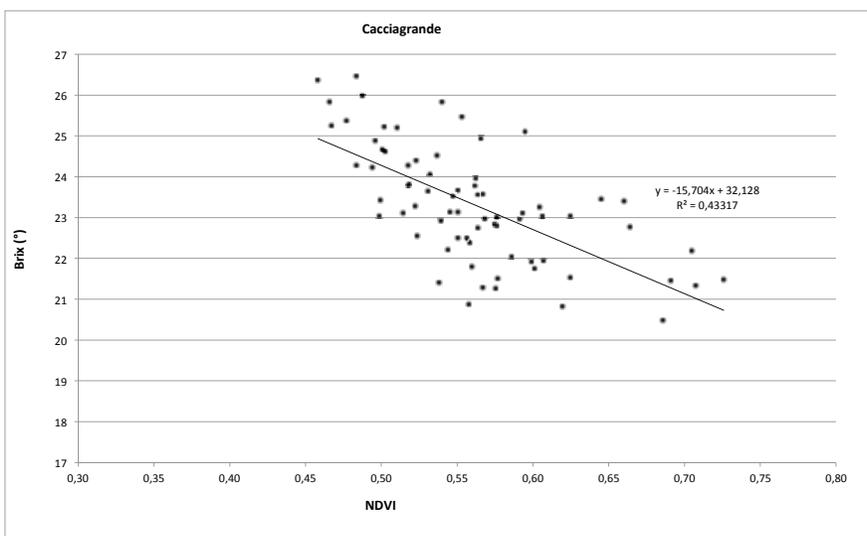


Figura 11b. Rapporto fra NDVI e contenuto zuccherino (°Brix) nell'annata 2008-2009 il vigneto Cacciagrande (Cabernet Sauvignon)



e contenuto zuccherino (°Brix) nell'annata 2008-2009 per i due vigneti attigui di Cortigliano (Sangiovese) e Cacciagrande (Cabernet Sauvignon).

Nel complesso le analisi statistiche realizzate incrociando i valori di NDVI e parametri delle uve delle differenti aree di vigoria dei vigneti sperimentali hanno confermato che esistono correlazioni inverse fra vigore e indicatori qualitativi come contenuto zuccherino, polifenoli, antociani, pH, acidità totale. Le analisi hanno altresì evidenziato che l'uso del telerilevamento aereo risulta efficace prevalentemente nei vigneti in cui sia presente una certa eterogeneità geo-pedo-morfologica. In vigneti omogenei quindi il *remote sensing* non è attualmente in grado di fornire informazioni utili ad un miglioramento del prodotto finale. Inoltre, un aspetto che merita di essere messo in evidenza è che il *remote sensing* è in grado di identificare le differenti aree produttive presenti in vigneti eterogenei, ma non è in grado di fornire indicazioni quantitative riguardo i parametri delle uve alla vendemmia, non ha cioè una capacità predittiva per il contenuto di parametri qualitativi nelle uve alla vendemmia. Ciò è emerso chiaramente per esempio analizzando i contenuti antocianici delle uve del vigneto di Brolio nei vari anni (Fiorillo *et al.* 2012). Nel 2010 il contenuto antocianico è risultato doppio rispetto a quello degli anni precedenti, ma nessuna indicazione è stata fornita dai dati NDVI riguardo tale trend.

4. Analisi multiscala

Dalla comparazione dei tre sistemi di acquisizione descritti nel par. 2 risulta che i fattori ambientali sono sempre statisticamente significativi nell'influenzare i valori di NDVI registrati su ambedue le cultivar oggetto della sperimentazione. Tale risultato conferma quanto emerso dalle altre linee di ricerca viticole del Progetto, cioè che le condizioni climatiche e geo-pedo-morfologiche, rappresentate rispettivamente dal fattore anno, dal fattore località e dal fattore blocco (vigore), nelle aree di studio rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo della pianta. In questa ottica si spiega la sempre maggior attenzione che viene rivolta negli ultimi anni allo studio della caratterizzazione ambientale delle aree produttive ad un'alta scala di risoluzione.

La sensibilità dei tre sistemi di acquisizione NDVI è stata testata circa la capacità di discriminare differenti pratiche agronomiche sfruttando le parcelle del disegno sperimentale della Linea di Ricerca A.1 (Tab. 3). Differenze significative nei valori medi NDVI fra parcelle con differente carica di gemme (1 o 3 per sperone) sono state registrate nei rilievi di Giugno da tutti e tre i sistemi. Nei rilievi di luglio e agosto, differenze significative sono state registrate solo per i rilievi aerei IBIMET. Un aspetto interessante che emerge è che nei rilievi aerei di Giugno valori più alti sono stati registrati per le parcelle a tre gemme per sperone, mentre nei mesi successivi il trend si inverte. Questo risultato è stato trovato anche per i rilievi di *proximal sensing* nadirali di IASMA-FEM, ma non per quelli laterali

28 La ricerca applicata ai vini di qualità

Tabella 3. Valori medi NDVI acquisiti con le tecniche di monitoraggio testate per parcelle con differenti trattamenti agronomici sui vigneti di Brolio e Cortigliano per gli anni 2007-2010. ARS: telerilevamento da aereo; HH PS: proximal sensing tramite spettro-radiometro a spalla; ATV PS: proximal sensing tramite quad; N: non eseguito; E: eseguito. Valori accompagnati da differenti lettere entro ogni trattamento agronomico e colonna sono significativamente differenti a $P > 0.05$

PRATICHE AGRONOMICHE	ARS Giugno	ARS Luglio	ARS Agosto	HH PS Giugno	HH PS Luglio	HH PS Agosto	ATV PS Giugno	ATV PS Luglio	ATV PS Agosto	
CARICA DI GEMME	1	0.577 a	0.520 a	0.589 a	0.649 a	0.673 a	0.647 a	0.820 a	0.806 a	0.784 a
	3	0.584 b	0.514 b	0.583 b	0.663 b	0.666 a	0.643 a	0.831 b	0.809 a	0.784 a
DEFOGLIAZIONE BASALE	N	0.596 a	0.516 a	0.588 a	0.666 a	0.671 a	0.644 a	0.839 a	0.812 a	0.782 a
	E	0.565 b	0.518 a	0.584 a	0.646 b	0.668 a	0.646 a	0.812 b	0.803 b	0.785 a
DIRADAMENTO DEI FRUTTI	N	0.591 a	0.539 a	0.589 a	0.651 a	0.672 a	0.648 a	0.827 a	0.812 a	0.786 a
	E	0.597 a	0.535 a	0.582 b	0.662 a	0.667 a	0.641 b	0.823 a	0.802 a	0.781 a

del DIPROVE; in questo ultimo caso valori più alti sono stati registrati in parcelle con tre gemme per sperone, ma questi risultati non sono statisticamente significativi. Una spiegazione ai risultati dei rilievi aerei si può trovare considerando che piante con una minore carica di gemme hanno più risorse disponibili nel lungo termine e quindi sviluppano meno germogli, ma più vigorosi e conseguentemente con una *canopy* più spessa; questo ultimo aspetto può essere registrato efficacemente dal monitoraggio aereo in quanto rilievi effettuati lateralmente rispetto alla spalliera, come i rilievi DIPROVE, sono meno efficaci nel registrare l'influenza implicita dello spessore della parete sui valori NDVI.

Riguardo l'effetto sui valori NDVI della defogliazione basale dei primi sei nodi basali, differenze statisticamente significative sono state registrate a giugno per tutti e tre i sistemi di monitoraggio, mentre successivamente solo per i rilievi effettuati da DIPROVE. Questo risultato evidenzia come il rilevamento di questo tipo di pratica agronomica è più efficacemente effettuato con un sensore montato in posizione laterale rispetto alla parete. Valori medi NDVI più alti sono stati generalmente trovati nelle parcelle non defoliate, in special modo a giugno, cioè pochi giorni dopo l'esecuzione di tale pratica. Inoltre le differenze fra parcelle defogliate e non, con il procedere della stagione, diminuiscono a causa del fatto che le piante defogliate tendono a ristabilire la superficie fogliare rimossa attraverso una maggiore emissione di germogli laterali.

Il diradamento dei grappoli induce differenze significative sui valori NDVI registrati con monitoraggio nadirale della parete (IBIMET e IASMA-FEM). Questo risultato evidenzia che le pratiche agronomiche inducono dei cambiamenti fisiologici nelle piante che sono riscontrabili non solo nella stagione in corso, ma anche in quelle successive e che possono essere colti anche con le strumentazioni utilizzate nella presente ricerca. Ad esempio, ciò è emerso analizzando i valori medi di NDVI di parcelle trattate e non con il diradamento dei frutti. Benché questo tipo di trattamento venga normalmente realizzato verso il 25 di agosto, nei rilievi di agosto (effettuati di solito attorno al 15) sono state talvolta registrate differenze significative fra i due tipi di parcelle; quindi, tali differenze sono evidentemente causate dagli effetti del diradamento degli anni precedenti. La spiegazione, da un punto di vista fisiologico, è che diminuendo il carico in frutti complessivamente diminuiscono i *sink* a beneficio della vegetazione rimanente. Tale effetto risulta evidente nei rilievi NDVI di giugno in quanto le parcelle che hanno subito il diradamento l'anno precedente hanno dei valori medi più alti, per quanto non statisticamente significativi. Interessanti conferme sono emerse analizzando i dati del contenuto di zuccheri strutturali nel legno del ceppo campionato ogni anno a dicembre-gennaio da IASMA-FEM. Tali analisi hanno infatti mostrato che le piante che subiscono diradamento mostrano ogni anno via via un maggior contenuto di zuccheri strutturali fino a raggiungere differenze significative rispetto alle non diradate nel 2010 per il vigneto di Brolio. Questo risultato è tanto più sorprendente pensando che le riserve di zuccheri strutturali (amido) vengono stoccate principalmente nelle radici, in misura fino a 4 volte superiore rispetto al ceppo.

Il lavoro ha confermato che l'indice NDVI può essere uno strumento efficiente per predizioni di qualità, a patto però che nel vigneto esista una certa variabilità, dovuta alle caratteristiche pedo-morfologiche e microclimatiche insistenti sul vigneto, dei valori di NDVI delle piante. In questo senso si riscontra la necessità di individuare in future linee di ricerca valori soglia di variabilità dell'NDVI entro i quali risulti auspicabile o no l'utilizzo di tali nuove tecniche di rilevamento. I risultati hanno quindi evidenziato che i differenti metodi di acquisizione sono efficaci nel rilevare l'indice NDVI per predizioni di qualità delle uve, seppur con gradi diversi. In particolare la ricerca si è focalizzata sulla comparazione delle tecniche di acquisizione aerea e tramite *quad* poiché queste sono attualmente le più comunemente usate in ambito operativo. I risultati indicano chiaramente una maggior efficacia dei rilievi aerei nadirali rispetto a quelli di proximal sensing con vista laterale della parete (Tabb. 4 e 5) visto che per ogni anno e ogni vigneto, un maggior numero di correlazioni significative è stato registrato. La differente efficacia di queste due tecniche appare essere influenzata dall'angolo di vista del sensore rispetto alla parete. Bisogna con-

30 La ricerca applicata ai vini di qualità

Tabella 4. Coefficienti di correlazione di Pearson fra valori NDVI acquisiti con i due sistemi di acquisizione più comuni e parametri di qualità delle uve per il vigneto di Cacciagrande (Cabernet Sauvignon). ARS: telerilevamento da aereo; ATV PS: proximal sensing tramite quad. (***) Significativo a $P < 0.001$; ** Significativo a $P < 0.01$; * Significativo a $P < 0.05$

	ARS Giugno	ARS Luglio	ARS Agosto	ATV PS Giugno	ATV PS Luglio	ATV PS Agosto	
2008	CONTENUTO ZUCCHERINO	-	-0.634**	-0.663**	-0.452	-0.411	0.025
	pH	-	0.528*	0.535*	0.478	0.053	0.232
	POLIFENOLI	-	-0.363	-0.411	-0.02	-0.604*	-0.476
	ANTOCIANI	-	-0.447	-0.427*	-0.302	-0.602*	-0.308
2009	CONTENUTO ZUCCHERINO	-0.942***	-0.884***	-0.879***	-0.629**	-0.423	-0.5*
	pH	-0.906***	-0.866***	-0.877***	-0.524*	-0.375	-0.539*
	POLIFENOLI	-0.721**	-0.536*	-0.592*	-0.693**	-0.373	-0.261
	ANTOCIANI	0.797***	0.701**	0.689**	0.423	0.445	0.507*
2010	CONTENUTO ZUCCHERINO	-0.816***	-0.79***	-0.799***	-0.492*	-0.499*	-0.621**
	pH	-0.236	-0.289	-0.221	-0.575*	-0.712**	-0.651**
	POLIFENOLI	-0.484*	-0.436	-0.487*	0.18	-0.17	-0.331
	ANTOCIANI	-	-0.634**	-0.663**	-0.452	-0.411	0.025

Tabella 5. Coefficienti di correlazione di Pearson fra valori NDVI acquisiti con i due sistemi di acquisizione più comuni e parametri di qualità delle uve per il vigneto di Cortigliano (Sangiovese). ARS: telerilevamento da aereo; ATV PS: proximal sensing tramite quad. (***) Significativo a $P < 0.001$; ** Significativo a $P < 0.01$; * Significativo a $P < 0.05$

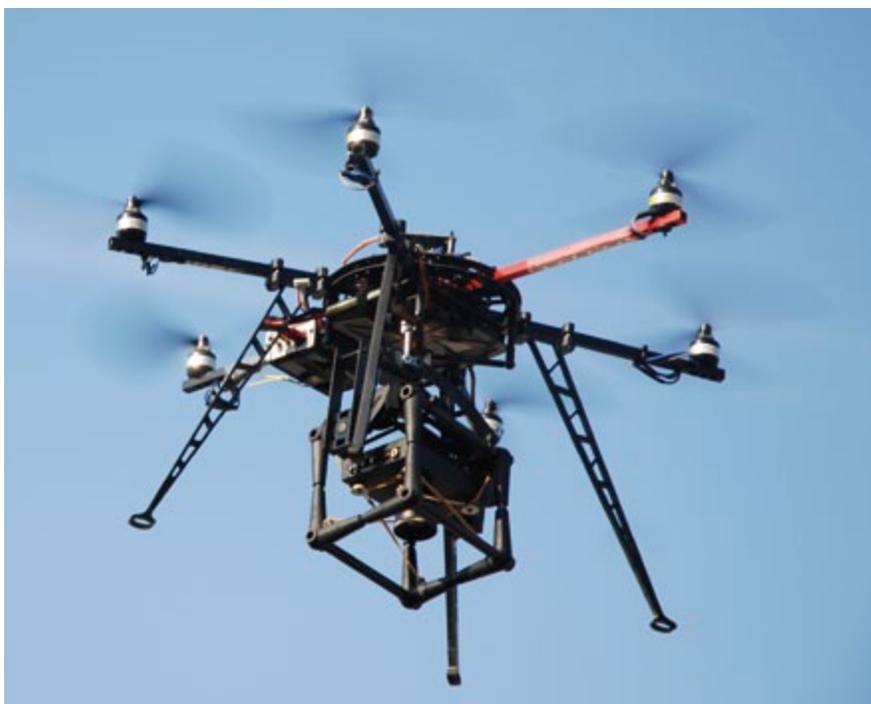
	ARS Giugno	ARS Luglio	ARS Agosto	ATV PS Giugno	ATV PS Luglio	ATV PS Agosto	
2008	CONTENUTO ZUCCHERINO	-	-0.587**	-0.347	-0.542**	-0.016	-0.178
	pH	-	0.633***	0.678***	0.35	0.122	0.605**
	POLIFENOLI	-	-0.226	-0.128	-0.426*	-0.37	-0.087
	ANTOCIANI	-	-0.075	-0.145	-0.193	-0.332	-0.222
2009	CONTENUTO ZUCCHERINO	-0.458*	-0.342	-0.511**	0.2	-0.255	-0.23
	pH	-0.505*	-0.643***	-0.705***	0.451*	-0.509**	-0.633***
	POLIFENOLI	-0.427*	-0.515**	-0.456*	0.404*	-0.319	-0.409*
	ANTOCIANI	-0.27	-0.485*	-0.392	0.373	-0.063	-0.291
2010	CONTENUTO ZUCCHERINO	-0.682***	-0.756***	-0.757***	0.015	0.201	-0.172
	pH	-0.135	-0.1	-0.255	0.375	-0.092	0.051
	POLIFENOLI	-0.328	-0.4*	-0.643***	0.3	-0.141	-0.427
	ANTOCIANI	-0.548**	-0.686***	-0.835***	0.37	-0.02	-0.339

siderare che studi precedenti (Stamiatidis *et al.* 2006 e 2010) avevano già evidenziato che misure nadirali di NDVI sono più efficaci rispetto alle non nadirali; inoltre Hall *et al.* (2008) hanno provato che misure NDVI nadirali ad alta risoluzione sono più influenzate da differenze nelle dimensioni dell'area della 'canopy' che da differenze nei valori di riflettenza, cioè che l'NDVI è più influenzato da aspetti fisici (LAI) che da aspetti chimico-fisiologici (contenuto di clorofilla). Si può quindi desumere che una posizione relativa del sensore di acquisizione rispetto alla parete vegetale che agevoli il rilevamento degli aspetti fisici, come i rilevamenti nadirali, faciliti la possibilità dell'instaurarsi di correlazioni significative fra misure di NDVI e LAI. Un altro aspetto fondamentale nel monitoraggio di cortine vegetali che è stato messo in luce da precedenti lavori (Myneni *et al.* 1997; Dobrowski *et al.* 2003; Vina *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005) è che la relazione fra NDVI e parametri di biomassa non è lineare in quanto l'NDVI risulta meno sensibile alle differenze di biomassa a densità vegetazionali medio-alte, limitandone perciò la sua efficacia. I risultati relativi al vigneto di Cortigliano, caratterizzato da livelli medio-alti di PAB, indicano che tale limitazione dell'NDVI è particolarmente evidente sui rilievi prossimali a vista laterale della parete, mentre i rilievi aerei non risultano particolarmente influenzati negativamente da tale aspetto.

L'analisi delle correlazioni fra NDVI e parametri di qualità delle uve suggerisce anche altre interessanti considerazioni. Correlazioni più alte sono state registrate nel 2009 con tutti i tipi di sensore testato suggerendo un effetto preminente dell'andamento climatico annuale. Inoltre per alcuni vigneti, ad alti livelli di PAB non sempre sono corrisposti bassi livelli di qualità e viceversa. Ciò appare chiaramente considerando le correlazioni fra NDVI e parametri quali pH o antociani per il vigneto di Cacciagrande. A seconda dell'anno il segno della correlazione cambia indicando che nell'ambiente Mediterraneo, in vigneti non irrigati, la relazione fra vigore e qualità è influenzata dall'andamento climatico. Questo aspetto indica che le mappe NDVI non possono essere semplicisticamente interpretate valutando che per ogni vigneto in ogni stagione a bassi livelli di PAB corrispondono alti livelli di qualità e viceversa. D'altra parte i risultati confermano l'esistenza all'interno dello stesso vigneto di popolazioni diverse di uve che possono essere efficacemente individuate attraverso misure di riflettenza. Perciò nell'ambiente mediterraneo le mappe NDVI possono essere utilizzate per individuare popolazioni omogenee di uve all'interno dello stesso vigneto, ma la loro relazione con i parametri di qualità delle uve deve essere capita e interpretata in base alle specifiche peculiarità del vigneto e l'andamento climatico stagionale.

Bisogna comunque considerare che la scelta del metodo più idoneo per il rilevamento NDVI non può non essere basata su considerazioni di tipo economico-operativo, soprattutto riguardo la dimensione dell'area che si

Figura 12. Unmanned Aerial Vehicle (UAV) equipaggiato con sistema di acquisizione multi-spettrale



vuole monitorare. La strumentazione montata a spalla ovviamente si dimostra un utile strumento per fini di ricerca o comunque per monitorare un numero molto esiguo di piante. Il monitoraggio tramite quad può essere preferibile da un punto di vista economico per acquisire informazioni su aree di dimensioni medio-piccole e presenta il vantaggio rispetto al telerilevamento di una maggior flessibilità rispetto alle condizioni meteorologiche. Il telerilevamento da aereo rimane comunque uno strumento indispensabile per monitorare aree di grandi dimensioni sia per motivi economici sia per la capacità di acquisire informazioni riguardanti diversi vigneti nello stesso momento.

In questo senso una ulteriore frontiera per il telerilevamento è rappresentata dall'impiego di droni a controllo remoto o UAV (Unmanned Aerial Vehicle) (Fig. 12) che permettono di aumentare la flessibilità delle rilevazioni aeree e presentano una maggiore economicità per piccole superfici (Primicerio *et al.* 2012).

Una sperimentazione in questo senso è stata compiuta nel corso del 2010 sul vigneto di Brolio con il drone del gruppo di ricerca sulla Viticoltura di Precisione di IBIMET CNR.

5. Telerilevamento termico

Un ulteriore tema di ricerca che è stato sviluppato è quello legato all'utilizzo di immagini nell'infrarosso termico in ambito viticolo. Attualmente le immagini termiche vengono utilizzate, in combinazione con immagini nell'infrarosso vicino, per valutare lo stato di stress idrico della coltura e pochi tentativi sono stati fatti per capire se tale informazione può essere anche predittiva per produzioni di qualità. In questa linea di ricerca si è quindi tentato un approccio innovativo, andando prima a studiare le relazioni che esistono fra NDVI e termico e come esse variano nel corso della stagione, successivamente valutando se l'informazione termica è in grado di integrare quella dell'indice vegetazionale. Le acquisizioni nell'infrarosso termico sono state svolte in parallelo a quelle nel multispettrale tramite l'utilizzo della camera Flir SC500 (FLIR Systems, West Malling, UK). La camera ha un range spettrale di 7.5-13 μm e una risoluzione del sensore CCD di 320x240 pixel che ha permesso di ottenere immagini con risoluzione geometrica di 1,5 m. Le immagini vengono georiferite, ortorettificate e calibrate con valori di temperatura registrati a terra dal sistema di stazioni meteorologiche N.A.V. (Matese *et al.* 2009). Un esempio di mosaicazione di immagini termiche per l'azienda Le Mortelle (GR) è mostrata nella figura 13.

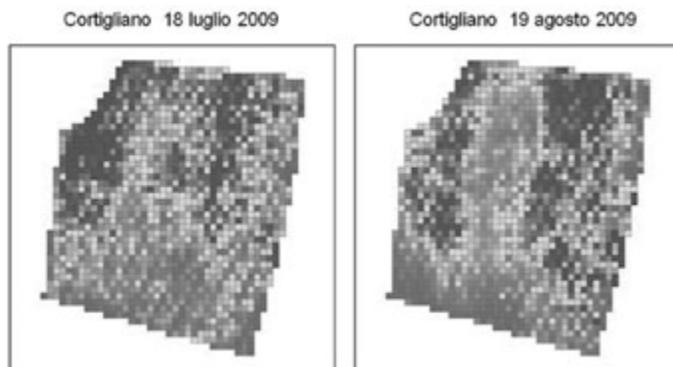
Figura 13. Mosaicazione di immagini termiche a Le Mortelle



Dalle analisi svolte è emerso che esistono delle correlazioni inverse molto forti fra vigore e temperatura delle piante; queste correlazioni tendono ad abbassarsi da luglio ad agosto presumibilmente a causa di fenomeni di stress che insorgono nelle piante. Molto interessante è il fatto che due

vigneti, Brolio e Donna Olimpia, risultano avere delle correlazioni molto più forti rispetto a quelle di Cacciagrande e Cortigliano. Le figure 14a e 14b mostrano la regressione fra temperatura e NDVI per il vigneto di Brolio a luglio e agosto per l'anno 2009.

Figura 14. Mappe di scostamento termico



Il grado di relazione non sembra quindi dipendere da fattori varietali ma ambientali: in questa ottica sono state effettuate analisi sui dati pedologici disponibili, ma non sono emersi risultati significativi.

Successivamente sono state realizzate delle mappe, definite mappe di scostamento termico, che si basano sulla spazializzazione dello scostamento delle aree del vigneto rispetto alla linea di tendenza che descrive il rapporto fra temperatura e NDVI delle piante. Le mappe di scostamento termico per il vigneto di Cortigliano a luglio e agosto per l'anno 2009 sono nella Figura 14 e nelle Figure 15a e 15b.

Tali immagini mostrano come a parità di NDVI varie aree del vigneto abbiano valori di temperatura superficiale diversa. Queste mappe risultano generalmente correlate fra loro sia per lo stesso anno sia fra i diversi anni; ciò suggerisce quindi che aree del vigneto tendano ad andare maggiormente in stress termico rispetto ad altre con possibili effetti sulla resa qualitativa.

Infine è stata svolta un'approfondita analisi statistica sui dati relativi al vigneto di Brolio volta a valutare se il termico sia esso stesso un predittore per produzioni di qualità o se possa integrare, in maniera diretta o tramite gli scostamenti termici, l'informazione fornita dall'NDVI (Tab. 6). Le analisi indicano che la temperatura radiometrica T_s si è dimostrata un predittore efficace dei parametri di qualità quanto l'NDVI, in alcuni casi anche migliore. Raramente è stato in grado di aumentare in maniera diretta l'informazione fornita dall'indice vegetazionale e questo fatto era ampiamente prevedibile a causa della forte correlazione che esiste fra essi. La combinazione dell'indice NDVI o di T_s con lo scostamento termico ΔT_s ha fornito dei risultati molto interessanti e incoraggianti visto che gli scosta-

Figura 15a. Regressione fra temperatura superficiale misurata con camera termica ed NDVI per il vigneto di Brolio nel luglio 2009

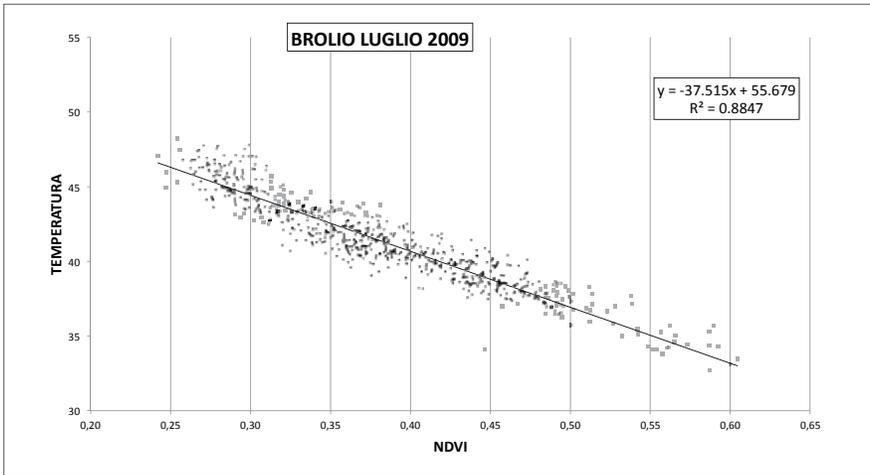
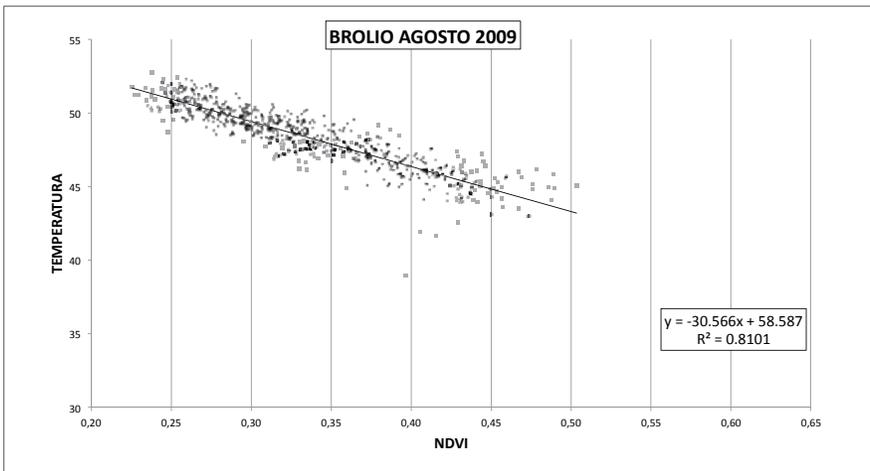


Figura 15b. Regressione fra temperatura superficiale misurata con camera termica ed NDVI per il vigneto di Brolio nell'agosto 2009



menti termici hanno spesso aumentato le singole correlazioni esistenti fra vigore e parametri di qualità. L'interpretazione di questo risultato, in ottica di produzioni di qualità, fa supporre che il singolo indice vegetazionale NDVI possa consentire una classificazione di tipo strutturale dei vigneti sul lungo periodo svincolandosi maggiormente dall'andamento climatico stagionale, mentre la combinazione di tale informazione con quella deriva-

ta da riprese nell'infrarosso termico, consente una classificazione congiunturale della stagione sulla base degli stress climatici.

Al fine di valutare in modo più approfondito questo risultato, nel corso della stagione 2010 è stato svolto un campionamento addizionale delle uve alla vendemmia sui vigneti di Brolio e Cortigliano, con l'obiettivo di raggiungere una copertura integrale dei vigneti svincolandosi dal disegno sperimentale. I risultati di questo studio sono ancora in fase di elaborazione.

In definitiva si può affermare che, sebbene la risoluzione spaziale delle immagini termiche sia ad oggi insufficiente per discriminare il filare dall'interfila ed quindi ancora troppo bassa per renderle preferibili alle immagini multi spettrali in ottica di gestione sito-specifica del vigneto, ci si può attendere che con il miglioramento dei sensori si potranno aggiungere informazioni sostanziali alle attuali informazioni predittive sulla qualità.

Tabella 6. Singole correlazioni, analisi multi regressiva e significatività (**P<0.01; **P<0.05; *P<0.06) fra NDVI (N), termico (Ts), scostamento termico (ΔT) e parametri di qualità delle uve per il vigneto di Brolio

	N	Ts	N + Ts	ΔT	N+ ΔT	Ts+ ΔT	
LUGLIO 2008	BRIX	-0.425**	0.357**	0.518	-0.117	0.501	0.486*
	pH	-0.482***	0.568***	0.676	0.673***	0.731***	0.738***
	POLIFENOLI	-0.503***	0.429**	0.592	-0.203	0.631***	0.635***
LUGLIO 2009	BRIX	-0.497***	0.434**	0.546	-0.066	0.604***	0.619***
	pH	-0.372**	0.412**	0.432	0.14	0.375	0.441
	POLIFENOLI	-0.742***	0.651***	0.657	0.151	0.777*	0.734***
AGOSTO 2009	BRIX	-0.485***	0.498***	0.501	-0.088	0.487	0.511
	pH	-0.328	0.452***	0.528	0.164	0.422	0.473
	POLIFENOLI	-0.741***	0.657***	0.749	-0.061	0.742	0.715**

6. Micrometeorologia del vigneto

Lo sviluppo della chioma ha un'influenza sostanziale sulla qualità dell'uva attraverso le modificazioni che induce nel microclima (Dokoozlian e Kliever 1995). Nell'ambito della viticoltura di precisione questo concetto indica da un lato l'importanza di valutare le diverse espressioni microclimatiche che possono verificarsi all'interno di un vigneto per motivi intrinseci (suolo, morfologia) e dall'altro l'importanza delle pratiche di gestione della chioma per orientare il microclima al fine di massimizzare il potenziale enologico.

In questo senso, i tradizionali indici climatici, basati su sommatorie termiche calcolate a partire da stazioni meteorologiche esterne al vigneto, non sono in grado di caratterizzare in modo adeguato la variabilità microclimatica intra-vigneto.

Nell'ambito del Progetto Consorzio Toscana è stato sviluppato un sistema di monitoraggio micrometeorologico al fine di migliorare la para-

metrizzazione del microclima del vigneto e capire l'influenza delle tesi di gestione della chioma sul microclima. Al fine di monitorare i parametri meteo e micrometeo nei quattro anni del progetto è stato realizzato un sistema basato sulla tecnologia WSN (Wireless Sensor Network) chiamato NAV (Network Avanzato per il Vigneto; Fig. 16). Il sistema NAV comprende una stazione di base (Master Unit) e una serie di nodi wireless periferici (Slave Unit) posizionati nella vigna. L'Unità Master (MU) è una tipica stazione di monitoraggio *single-point* che raccoglie i dati agrometeorologici. Le Unità Slave (SU) sono più stazioni collocate nel vigneto con sensori specifici per il monitoraggio dei dati agrometeorologici di precisione, utilizzando la tecnologia wireless per trasmettere alla MU.

Figura 16. Il sistema NAV installato in campo; stazione master (a sinistra), stazione slave (a destra)



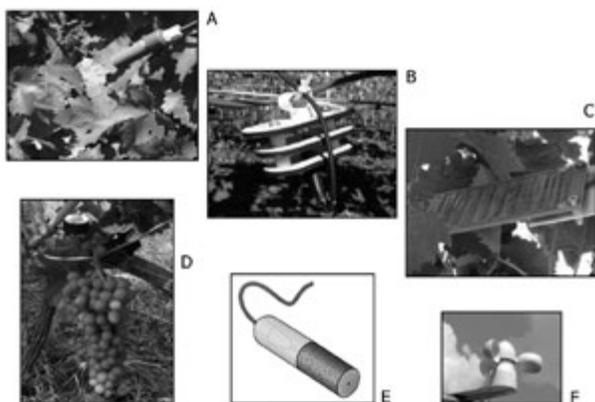
Un server remoto centrale è predisposto per la ricezione, la memorizzazione e l'elaborazione dei dati provenienti dalla MU. Un software di gestione di rete fornisce la configurazione hardware e gestisce sia le funzioni di trasmissione che l'archiviazione dei dati. Il *dataset* completo della sperimentazione comprende 4 anni di dati (2007, 2008, 2009, 2010) per i parametri delle stazioni Master con una risoluzione a 15 minuti, e 3 anni di dati (2008, 2009, 2010) per le stazioni Slave con una risoluzione di 30 minuti.

I parametri monitorati e i sensori per acquisirli sono di seguito descritti ed illustrati in Figura 17:

- temperatura interna del grappolo misurata con una termocoppia tipo T schermata in resina. Questo tipo di sensore è stato scelto in base a caratteristiche non invasive, economiche e di efficienza;
- temperatura superficiale della cortina fogliare misurata con un sensore infrarosso a termocoppia tipo K. Questo sensore permette una misura

- della temperatura con una buona precisione nel range di temperatura della cortina fogliare nel periodo vegetativo;
- potenziale idrico del suolo a 2 profondità (30-60 cm) stimato con sensori Campbell 229-L a dispersione termica dotati al loro interno di un sensore di temperatura che fornisce anche una misura di temperatura del terreno. Questo sensore ci permette di avere una duplice misura delle caratteristiche del suolo (temperatura e potenziale idrico) a differenza di quelli classici per l'umidità, utilizzando un solo canale di acquisizione nella scheda;
 - bagnatura fogliare di tipo standard;
 - temperatura dell'aria misurata con termocoppia tipo T con schermo antiradiazione, sensore standard per efficienza ed economicità;
 - velocità del vento stimato con sensore ad impulsi (reed). Questa tipologia di sensore è quella più indicata per l'installazione in vigneto, in quanto presenta caratteristiche di robustezza e resistenza agli agenti atmosferici;
 - sensore di radiazione intercettata dal grappolo. Il sensore utilizzato è un prototipo realizzato per le esigenze di progetto. Esso ha la forma di un 'acino' realizzato in teflon con affogato al suo interno un sensore a fotocella. Questa tecnologia permette di monitorare la radiazione intercettata dal grappolo simulando in maniera ottimale la superficie esposta.

Figura 17. Principali componenti della sensoristica installata in una stazione micrometeorologica (SU): A sensore di temperatura all'infrarosso; B Sensore di temperatura nella chioma; C sensore di bagnatura fogliare; D sensore di radiazione del grappolo; E Sensore di potenziale idrico; F anemometro



Caratterizzazione climatica delle annate e dei vigneti e indici bioclimatici

Utilizzando i dati collezionati dalle stazioni meteorologiche sono stati caratterizzati i vigneti e calcolati i più comuni indici bioclimatici. Per quanto concerne il fattore anno riguardo al parametro meteorologico tempera-

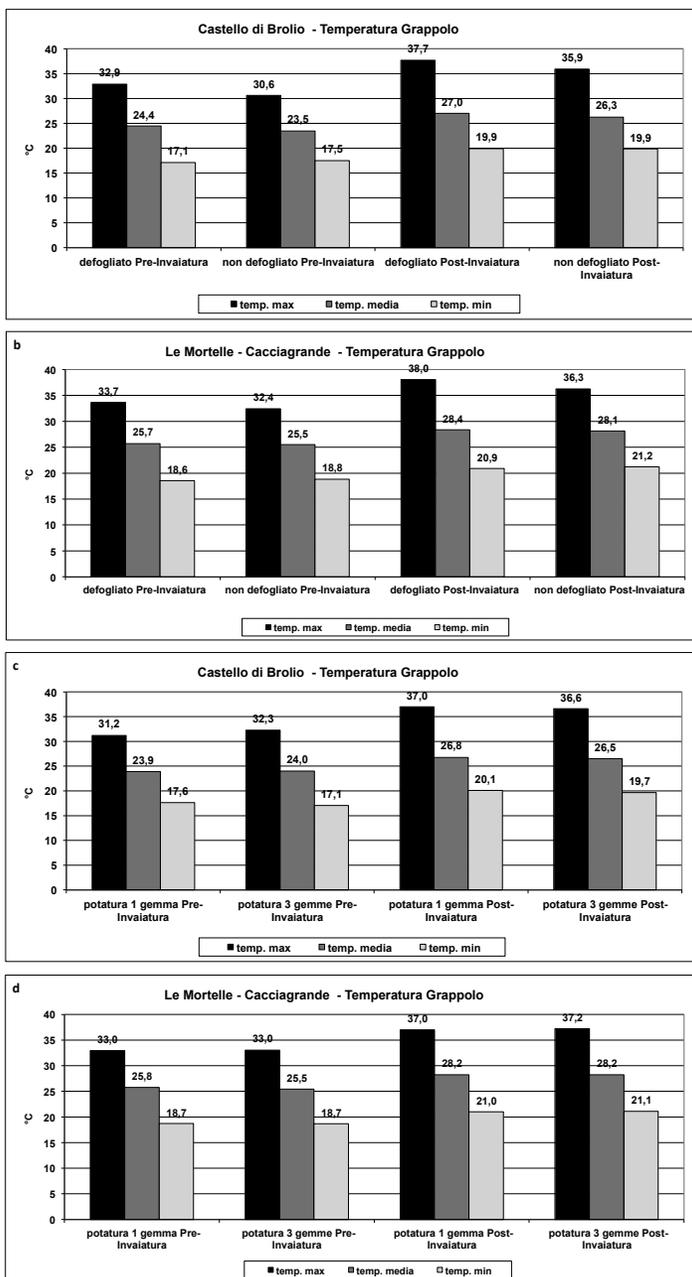
tura si evidenzia una distribuzione delle sommatorie termiche che vede il 2007 come l'anno con valori più bassi (5552 DD), ed il 2009 come l'annata più calda tra quelle monitorate (5880 DD). Le annate 2008 e 2010 si collocano ad un livello intermedio con 5850 DD e 4490 DD rispettivamente, tuttavia il dato dell'anno in corso è incompleto dato che è aggiornato al 31 Ottobre. Le precipitazioni hanno seguito anch'esse una variabilità descrivibile annualmente, con una piovosità minima nel 2007. Il 2008 è stato caratterizzato da intense precipitazioni nei mesi di novembre e dicembre. Nel 2009 i valori di precipitazione cumulata annua si abbassano, per incrementare poi nell'annata in corso che nonostante sia valutata per il periodo gennaio-ottobre, presenta già valori simili al 2009 in soli 10 mesi. Il profilo radiativo delle ultime 3 annate presenta valori di radiazione globale massimi nell'annata 2009, minimi invece nel 2008. L'annata in corso si presenta con tenori radiativi intermedi tra le due annate precedenti.

Gli indici calcolati sono stati l'indice di Winkler, indice di Huglin, indice di Gladstone, indice di Ribereau-Gayon-Peynaud, sommatoria delle escursioni termiche, sommatorie termiche medie, massime e minime, e precipitazioni cumulate. L'indice di Winkler segue il trend termico annuale e vede nel vigneto di Castello di Brolio valori di temperature attive più bassi, mentre gli altri due si attestano a valori superiori di circa 150-200 GDD annui. Per l'indice di Huglin, considerando anche il peso delle temperature massime, si vede un incremento nei valori rilevati nel Chianti Classico e presso la zona viticola di Monteregio di Massa Marittima, mentre a Bolgheri le escursioni termiche sono molto più basse grazie all'azione mitigatrice del mare. L'indice di Gladstone valuta le temperature attive comprese tra 10 e 19°C; nell'azienda di Donna Olimpia 1898 sono calcolati i valori più alti rispetto alle altre zone, ritroviamo infatti l'impatto della vicinanza al mare. Per quanto riguarda le precipitazioni registrate nei diversi vigneti monitorati nel periodo vegetativo aprile-settembre, non si riscontrano particolari trend tra i vigneti e le diverse annate. Si può comunque sottolineare come nel 2008 si rilevi la massima variabilità tra le diverse zone, con un delta fino a 140 mm circa; nel 2009 si ottengono dati simili per tutte le zone monitorate (260 mm circa), mentre il 2010 si presenta come l'anno con maggior piovosità dei 3 anni di studio.

Caratterizzazione della micrometeorologia del vigneto in varie condizioni di gestione agronomica

Un ulteriore obiettivo del progetto è stata la caratterizzazione microclimatica all'interno della canopy in funzione delle tesi di gestione applicate seguendo il disegno sperimentale. Il lavoro si è concentrato sulle due pratiche di gestione della chioma sfogliatura e differente carico di gemme. La pratica diradamento non è stata considerata in quanto si ipotizza che nell'immediato non abbia un effetto sensibile sul micro-clima della canopy. Quindi sulle 8 tesi combinazione delle tre pratiche di gestione sono state

Figura 18. Temperature massime medie e minime del grappolo in pre e post-invaiaitura: per le tesi defogliate e non-defogliate per i vigneti di Brolio (A) e Cacciagrande (B); per le tesi di potatura ad 1 e 3 gemme per i vigneti di Brolio (C) e Cacciagrande (D)



analizzate quattro macro-tesi con ognuna due repliche. I risultati ottenuti confrontando le medie dei valori nelle tesi sui parametri di temperatura del grappolo hanno dimostrato come il sistema di monitoraggio multipuntuale svolto dalle stazioni Slave, ha permesso di individuare la variabilità interna al vigneto, e nello specifico sulle tesi di gestione della canopy.

Nella figura 18a vengono riportate le temperature del grappolo massime, medie e minime delle tesi defogliate e non defogliate nei due periodi presi in esame, ossia nella preinvaiaatura (15 giugno – 31 luglio) e dall'invaiaatura alla raccolta (1 agosto – 15 settembre) nel vigneto di Brolio. Si osservano temperature superiori nel secondo periodo di circa 5°C. Il trattamento di sfogliatura causa un incremento delle temperature di circa 2°C per quanto riguarda le temperature massime mentre scarsa è la sua influenza sulle temperature medie o minime, questo a causa della maggior incidenza della pratica nelle ore centrali del giorno che ricevono un maggior irraggiamento. Nella figura 18b sono rappresentati i dati di temperatura del grappolo relativi al vigneto di Le Mortelle; nella tesi sfogliata le temperature massime sono più alte di oltre 1.5°C, mentre per quanto riguarda le temperature minime, in particolare dopo l'invaiaatura, queste si presentano inferiori presumibilmente a causa dell'effetto di schermatura della radiazione uscente e della riduzione di circolazione operata dalla canopy. Per quanto riguarda invece l'effetto del trattamento di potatura sulle dinamiche della temperatura del grappolo, si può osservare nelle figure 18c e 18d, che le differenze tra tesi in entrambi i due periodi sono minime, nonostante il periodo dell'invaiaatura continui ad essere caratterizzato da temperature fino a 4°C superiori, sia per il vigneto di Brolio (Fig. 18c) che per Le Mortelle (Fig. 18d).

7. Tecnologie e informazione in viticoltura di precisione

La viticoltura di precisione è basata sull'uso di tecnologie avanzate per il monitoraggio operativo, ambientale e produttivo delle produzioni e richiede la raccolta, l'archiviazione, la condivisione e l'analisi di grandi moli di dati georiferiti.

Molti casi presentati in letteratura sull'adozione di questa nuova strategia di gestione dei vigneti illustrano nei dettagli il processo dall'acquisizione del dato, usando, come abbiamo già visto sensori e strumenti avanzati che vanno dalla micro-meteorologia di campo, a varie forme di telerilevamento, alla mecatronica per descrivere quella variabilità spaziale dell'ambiente agrario che dovrebbe indirizzare la scelta gestionale dell'agricoltore nel raggiungimento di obiettivi di produzione di qualità, redditività ed eco-compatibilità.

Il mito che accompagna l'uso della tecnologia dell'acquisizione dei dati deve tuttavia confrontarsi con la realtà di come utilizzarli, come gestirli ed

integrarli fra di loro, come interpretarli, quanto le informazioni derivate siano importanti e quanto della variabilità identificata sia gestibile ed accettabile per la presa di decisione e per le conseguenti azioni che ne derivano.

Per questo motivo per essere usati nella pratica devono essere trasferiti fra differenti piattaforme hardware, software, fra diverse organizzazioni e utilizzatori.

Il flusso di dati e informazioni al momento rappresenta una delle maggiori criticità per le applicazioni operative e lo sviluppo di nuove metodologie di analisi sito-specifiche, a causa dei problemi di compatibilità con i modelli, i formati, le interfacce e i sistemi di riferimento in uso nelle diverse realtà di ricerca, aziendali e produttive (Nash 2009).

Inoltre, come già evidenziato nei precedenti capitoli, il valore aggiunto delle tecnologie e metodologie impiegate è dato dall'integrazione della raccolta ed elaborazione dei dati e dalle azioni richieste per la loro gestione. Anche nel caso delle ricerche e sviluppi in viticoltura di precisione l'integrazione dei dati, il flusso delle informazioni e le azioni che favoriscono un approccio multidisciplinare all'ampliamento delle conoscenze dell'ambiente agrario rivestono un ruolo fondamentale per la trasferibilità dei risultati per applicazioni operative.

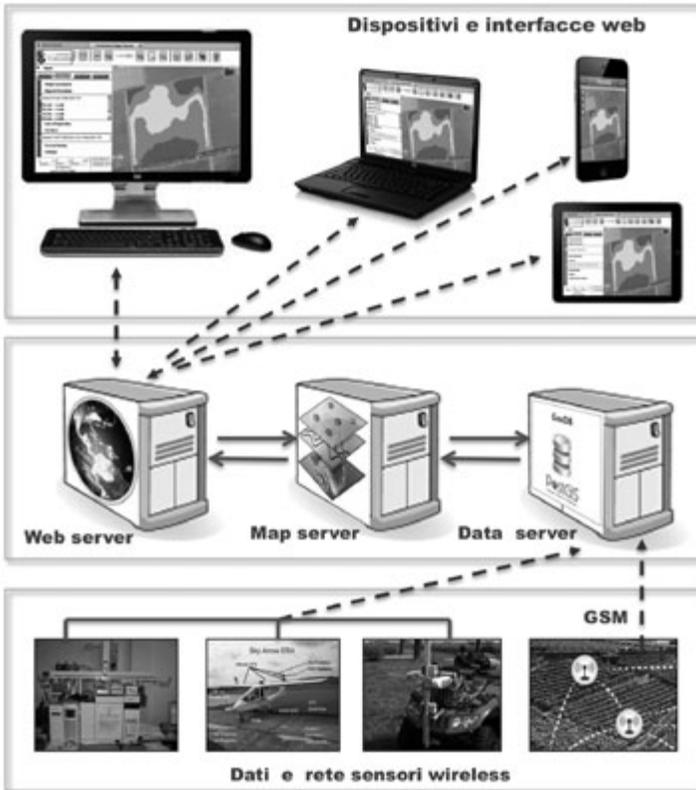
Le moderne imprese agricole vitivinicole sono complesse e hanno bisogno di molto tempo e risorse per la loro gestione, così i produttori che sono alla ricerca di miglioramenti nell'impiego di nuove tecnologie richiedono dal mondo scientifico risultati e prodotti che non aumentino la complessità delle loro attività (Kitchen 2008). Sembra così evidente che l'adozione delle nuove strategie di gestione indicate dalla viticoltura di precisione richieda la disponibilità di prodotti e soluzioni che sappiano coniugare competenze ingegneristiche, informatiche ed agronomiche in modo semplice e dinamico.

Le nuove tecnologie sviluppate per il settore agricolo in congiunzione con la rapida evoluzione dell'Information Communication Technologies (ICT) e dei Sistemi Informativi Geografici offrono enorme potenzialità per lo sviluppo e l'ottimizzazione di soluzioni per la distribuzione delle informazioni a supporto della viticoltura di precisione.

Da questi presupposti è nata l'idea di sviluppare, in parallelo alle attività delle linee di ricerca del progetto Tuscania, un sistema WebGIS in grado di integrare in un unico ambiente condiviso su web i dati strutturali dei vigneti, i risultati della ricerca integrata in viticoltura di precisione ed i dispositivi di monitoraggio agro-meteorologico per facilitare l'applicazione del processo ciclico che sta alla base della gestione sito-specifica della viticoltura. Il flusso delle informazioni e l'accessibilità distribuita su più piattaforme informatiche è alla base di un sistema intelligente che dal campo può raggiungere tutti gli attori coinvolti nei processi di raccolta dei dati, di ricerca avanzata, di analisi integrata e di presa di decisione per produzioni sempre più sostenibili, economicamente vantaggiose e competitive sui mercati.

L'idea progettuale della creazione di un ambiente di conoscenze condivise fra i diversi attori coinvolti nelle varie linee di ricerca si è tradotta in pratica nello sviluppo di un'architettura di sistema (Fig. 19) per la creazione di un geoportale dedicato alla viticoltura di precisione e di un database relazionale che possa far confluire in un unico ambiente tutti i dati raccolti durante le attività di ricerca.

Figura 19. Architettura di sistema del GEO-DB Toscana



L'obiettivo generale dello sviluppo del sistema è stato quello di creare un ambiente accessibile via web dove i diversi attori coinvolti nelle attività del progetto di ricerca Toscana potessero condividere dati e risultati della ricerca avanzata per contribuire all'ampliamento di conoscenze nel settore della viticoltura e dell'enologia non solo in termini qualitativi ma anche con la prospettiva di contribuire alla sostenibilità ambientale delle produzioni.

Il processo di condivisione, attraverso le diverse componenti del sistema WebGIS (Fig. 20) e le funzioni sviluppate per diversi dispositivi ed interfacce web (es: PC, notebook, smartphone, tablet) può così facilitare

l'accesso e le analisi dei dati geografici e tabulari dei vigneti sperimentali oggetto di studio e incentivare lo sviluppo di nuove metodologie di analisi integrata e multi-scala per la viticoltura di precisione. Il sistema, attraverso specifici canali e moduli software, ha inoltre lo scopo di facilitare l'archiviazione dei dati e la gestione dei flussi degli stessi in ingresso ed in uscita fra i diversi attori coinvolti nelle attività di ricerca e, per alcuni prodotti che hanno un'immediata ricaduta operativa, agevolare la distribuzione verso gli utilizzatori finali.

Figura 20. Visualizzatore Web-GIS del Consorzio Toscana



Ai fini della ricerca integrata e sviluppo di metodologie sito-specifiche, la priorità è stata data alla costruzione delle relazioni fra dati multi-scala e multi-precisione ed alla redazione dei metadati che documentassero i dati raccolti in ogni fase della ricerca.

Ai fini operativi si è cercato invece di rendere le informazioni di campo (es: parametri meteorologici) ed alcuni dati di base (es: pedologia, indici di vegetazione, disegno sperimentale) facilmente fruibili per gli agronomi ed enologi aziendali secondo i tempi (ciclo colturale) e formati (es: report, immagini) che potessero essere verificati e utilizzati anche in pieno campo.

L'attività sperimentale di creazione di un sistema accessibile via internet ha voluto fornire delle soluzioni informatiche, tecnologiche e metodologiche per favorire l'interoperabilità dei dati, a diversa scala spazio-temporale e in diversi formati, raccolti ed elaborati durante lo svolgimento delle attività di ricerca ed ad orientare i partner del Consorzio verso la costruzione di percorsi di analisi basati sulla 'convergenza delle evidenze' per un loro maggiore coinvolgimento nelle fasi di analisi e valutazione dei risultati della ricerca.

8. Conclusioni e risvolti operativi

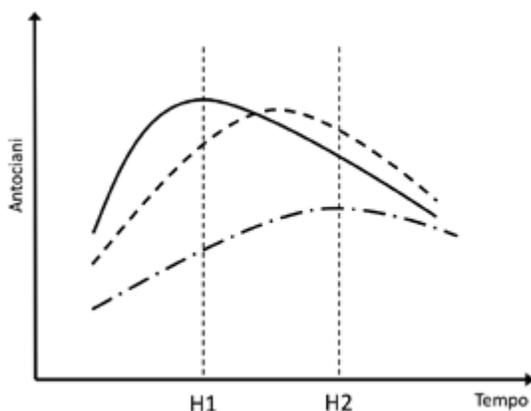
I risultati della sperimentazione hanno messo in evidenza come il telerilevamento sia uno strumento efficace per la caratterizzazione della variabilità spaziale della vigoria all'interno del vigneto. In generale, sul singolo anno, le differenze osservate nella vigoria sono correlate con differenze riscontrate nelle rese e nei parametri qualitativi dell'uva. È tuttavia difficile stabilire una relazione quantitativa che abbia valore in tutte le annate tra gli indici di vegetazione e parametri qualitativi dell'uva, vista anche l'influenza dell'andamento stagionale e, come spiegato in seguito, dell'importanza della data di vendemmia sulla qualità finale.

Un risultato interessante è che nelle singole annate la correlazione si dimostra stabile variando la fase fenologica di rilevazione. Infatti sebbene le correlazioni siano più alte per i voli effettuati a metà giugno (allegagione) i legami con rese e qualità restano elevati anche per i voli effettuati a metà luglio e metà agosto. Questa indicazione è importante dal punto di vista operativo in quanto allarga la finestra temporale nella quale è possibile effettuare il rilevamento a gran parte della stagione vegetativa.

Il confronto dei parametri qualitativi in diverse date di vendemmia ha permesso di mettere in evidenza come all'interno di un singolo vigneto possano coesistere popolazioni di uve con dinamiche di maturazione diverse e variabili in base all'andamento climatico annuale e dunque con risultati qualitativi diversi a seconda delle annate.

I risultati delle analisi hanno inoltre mostrato come il grado di correlazione tra indici tele-rilevati e parametri qualitativi possa variare significativamente tra la vendemmia tecnologica e quella tardiva. In particolare la relazione è sempre più stretta alla vendemmia tecnologica e tende a perdere consistenza alla vendemmia tardiva in modo diverso a seconda del parametro qualitativo considerato ed in funzione dell'andamento meteorologico dell'annata. Per il contenuto zuccherino e l'acidità delle uve (pH) le correlazioni si indeboliscono moderatamente dalla vendemmia tecnologica alla tardiva in quanto questi parametri tendono a variare scarsamente da una data all'altra e in maniera complessivamente omogenea per le varie aree di vigoria. Per quanto riguarda invece la correlazione degli indici vegetazionali con i parametri antociani e polifenoli, è emerso che questa generalmente si indebolisce in maniera notevole alla vendemmia tardiva evidenziando anche una forte influenza dell'annata (Fiorillo *et al.* 2012). Questo andamento è compatibile sia con la variabilità della curva di maturazione di questi parametri nelle varie annate e blocchi di vigoria sia con l'effetto della scelta del momento vendemmiale in relazione alla curva di maturazione. La figura 21 (da Glories, 1986, modificato) mostra le curve teoriche di maturazione degli antociani nelle varie aree di vigoria per la vendemmia (H1) e vendemmia tardiva (H2).

Figura 21. Curve teoriche di maturazione degli antociani (da Glories, 1986, modificato); H1=vendemmia tecnologica, H2= vendemmia tardiva



Questo aspetto ha ripercussioni importanti dal punto di vista dell'utilizzo operativo del remote sensing per l'identificazione precoce di classi qualitative all'interno del vigneto sottolineando l'importanza della interpretazione delle mappe sulla base dell'esperienza agronomica. Quindi, in particolare in vigneti che presentano una elevata variabilità qualitativa inter-annuale, le mappe di prescrizione possono fornire una indicazione per guidare il campionamento pre-vendemmiale delle uve secondo aree omogenee. In un'ottica di viticoltura di precisione, si può affermare che il telerilevamento non può prescindere dal campionamento delle uve per la valutazione della loro maturazione, quanto piuttosto integrarlo e guidarlo identificando aree omogenee dove andare a campionare le uve.

Dai risultati della sperimentazione è possibile trarre importanti conclusioni sulla effettiva funzionalità in ambito operativo delle mappe di prescrizione. Le mappe di prescrizione fornendo una visione di insieme del vigneto e dell'intero comprensorio aziendale possono supportare numerose pratiche quali la gestione del verde (potature), delle concimazioni, dei trattamenti e della vendemmia, tramite macchine operatrici a rateo variabile. In particolare per quanto riguarda la vendemmia differenziata delle uve è possibile trarre dalla sperimentazione del Consorzio Toscana le seguenti raccomandazioni:

- il remote sensing è efficace nell'identificare popolazioni diverse di uve all'interno di un singolo vigneto;
- l'efficacia nel discriminare classi di vigoria diminuisce in modo sensibile nel caso di inerbimenti troppo spinti;
- la classificazione del vigneto in aree omogenee presenta una elevata stabilità inter-annuale. Si può dunque affermare che i risultati di classifica-

- zione di un singolo volo sono validi per più anni soprattutto nei vigneti che presentano una elevata eterogeneità;
- i voli di acquisizione delle immagini possono essere eseguiti durante tutta la stagione vegetativa da giugno a settembre senza variazioni sostanziali della capacità predittiva di identificare aree omogenee all'interno dei vigneti;
 - il telerilevamento è un strumento efficace per la classificazione qualitativa delle uve in quanto correlazioni tra parametri di qualità e vigoria sono state registrate in numerosi casi, ma tali correlazioni possono variare da un'anno all'altro essendo influenzate dall'andamento climatico stagionale;
 - la data di vendemmia influenza in modo sostanziale la predittività del remote sensing riguardo ad alcuni parametri qualitativi quali antociani e polifenoli. In particolare i valori di correlazione più elevata si riscontrano alla vendemmia tecnologica e diminuiscono in caso di vendemmia tardiva;
 - la variabilità ambientale è risultata molto più influente del fattore varietà nelle correlazioni fra vigoria e parametri di qualità delle uve. I risultati della presente ricerca quindi non hanno messo in rilievo limiti operativi nell'uso del remote sensing legati a particolari varietà coltivate;
 - misure NDVI tramite *remote sensing* sono più efficaci per classificazioni qualitative delle uve rispetto a misure di *proximal sensing*, soprattutto a livelli medio alti di PAB.

Riguardo alla sperimentazione relativa alla micrometeorologia del vigneto, questa assume un particolare rilievo alla luce della crescente preoccupazione espressa dai viticoltori dell'area mediterranea per i crescenti trend di temperatura e di aumentata variabilità climatica (Battaglini *et al.* 2009). Questo aspetto è destinato ad assumere sempre maggior rilevanza alla luce delle proiezioni climatiche che indicano l'area mediterranea come un *hot spot* del cambiamento climatico con aumenti di variabilità nella quantità e qualità delle produzioni in particolare vinicole (Moriondo *et al.* 2011). I viticoltori sono quindi alla ricerca di pratiche di gestione della chioma che permettano di adattarsi al cambiamento climatico mantenendo inalterati i livelli qualitativi. In questo senso il miglioramento della parametrizzazione del microclima del vigneto, grazie ai nuovi strumenti di monitoraggio, consente di approfondire la comprensione della relazione tra microclima e qualità guidando la scelta di pratiche di gestione della chioma appropriate in vista dei cambiamenti climatici.

Infine, il vastissimo dataset a disposizione nel geodatabase del sistema distribuito su web ha permesso di approfondire aspetti legati alla viticoltura di precisione che ancora non erano stati del tutto chiariti o ottimizzati nell'ottica di un'applicazione operativa di queste nuove tecnologie e metodologie di indagine.

Con il sistema WebGis sviluppato per il Consorzio Toscana è stato sperimentato come la coniugazione della tecnologia dei sistemi di acquisizione dei dati, le scienze geomatiche e le tecnologie ICT offra grandi potenzialità di sviluppo per superare criticità relative al flusso dei dati e delle informazioni. Inoltre, la creazione di un ambiente di conoscenze condivise può dare nuovi impulsi alla ricerca, alla sperimentazione in campo da parte degli agricoltori, al settore delle produzioni meccaniche e dei servizi per l'agricoltura sostenibile.

Bibliografia

- Apostol S., Viau A.A., Tremblay J., Briantais J-M, Prasher S., Parent L.E. e Moya I. (2003), *Laser-induced fluorescence signature as a tool for remote monitoring of water and nitrogen stress in plants*.
- Battaglini A., Barbeau G., Bindi M., Badeck F.W. (2009), *European winegrowers' perceptions of climate change impact and options for adaptation*, «Reg Environ Change», 9: 61-73.
- Bramley R.G.V. (2001), *Progress in the development of precision viticulture – Variation in yield, quality and soil properties in contrasting Australian vineyards. Precision Tools for Improving Land Management*, Eds. L.D. Currie and P. Loganathan. Occasional report n. 14: 25-43.
- Dobrowski S.Z., Ustin S.L. e Wolpert J.A. (2003), *Grapevine dormant pruning weight prediction using remotely sensed data*, «Australian Journal of Grape and Wine Research», 9(3): 177-182.
- Dokoozlian N.K., Kliewer W.M. (1995), *The light environment within grapevine canopies. I. Description and seasonal changes during fruit development*, «Am. J. Enol. Vitic.», 46: 209-218.
- Fiorillo E., Crisci A., De Filippis T., Di Gennaro S.F., Di Blasi S., Matese A., Primicerio J., Vaccari F.P. e Genesio L. (2011), *Airborne high-resolution images for grape classification: changes in correlation between technological and late maturity in a Sangiovese vineyard in Central Italy*, «Australian Journal of Grape and Wine Research», 18-1: 80-90. doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00174.x.
- Glories Y. (1986), *Proceedings of the Symposium sur le critères modernes de macération pour la production des vins blancs et rouge. Associations des Oenologues Italiens*, Vignale Monferrato, Italy.
- Hall A., Louis J.P. e Lamb D.W. (2008), *Low-resolution remotely sensed images of winegrape vineyards map spatial variability in planimetric canopy area instead of leaf area index*, «Australian Journal of Grape and Wine Research», 14(1): 9-17.
- Johnson L.F. (2003), *Temporal stability of an NDVI-LAI relationship in a Napa Valley vineyard*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(2): 96-101.
- Johson L.F., Pierce L., De Martino J., Youkhana S., Nemani R., Bosh D. (2003b), *Image-based Decision Tools for Vineyard Management*, ASAE annual International Meeting, 27-30 July Las Vegas, Nevada, USA.
- Iland P.G., Booting D.G., Dry P.R., Giddings J. e Gawel R. (1995), *Grapevine canopy performance. Proceedings Canopy Management Viticulture Seminar*, Mildura, Australia: 18-22.

- Kitchen N.R. (2008), *Emerging technologies for real-time and integrated agriculture decisions*, «Computers and electronics in agriculture», 61: 1-3
- Matese A., Di Gennaro S.F., Zaldei A., Genesio L. e Vaccari F.P. (2009), *A wireless sensor network for precision viticulture: the NAV system*, «Computers and Electronics in Agriculture», 69: 51-58.
- Myneni R.B., Nemani R.R. e Running S.W. (1997), *Estimation of global leaf area index and absorbed PAR using radiative transfer models*, «IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing», 35: 1380-1393.
- Moriondo M., Bindi M., Fagarazzi C., Ferrise R., Trombi G. (2011b), *Framework for high-resolution climate change impact assessment on grapevines at a regional scale*, «Reg. Environ Change», doi: 10.1007/s10113-010-0171-z.
- Nash E., Korduan P. e Bill R. (2009), *Applications of open geospatial web services in precision agriculture: a review*, «Precision Agriculture», 10(6): 546-560. doi: 10.1007/s11119-009-9134-0.
- Nemani R., Johnson L. e White M. (2001), *Adding science to intuition: application of remote sensing and ecosystem modelling to vineyard management*, *The Australian Grapegrower and Winemaker, Annual Technical Issue*, 45-47.
- Primicerio J., Di Gennaro S.F., Fiorillo E., Genesio L., Lugato E., Matese A., Vaccari F.P. (2012), *A Flexible Unmanned Aerial Vehicle for Precision Agriculture*, «Precision Agriculture», doi: 10.1007/s11119-012-9257-6.
- Stamatiadis S., Taskos D., Tsadilas C., Christofides C., Tsadila E. e Schepers, J.S. (2006), *Relation of ground-sensor canopy reflectance to biomass production and grape color in two merlot vineyards*, «American Journal of Enology and Viticulture», 57(4): 415-422.
- Stamatiadis S., Taskos D., Tsadila E., Christofides C., Tsadilas C. e Schepers J.S. (2010), *Comparison of passive and active canopy sensors for the estimation of vine biomass production*, «Precision Agriculture», 11: 306-315.
- Smart R.E. (2001), *Good wines stem from balanced vines*, «Australian and New Zealand Wine Journal», 16: 53-54.
- Vina A., Gitelson A.A., Rundquist D.C., Keydan G., Leavitt B. e Schepers J.S. (2004), *Monitoring maize (Zea mays L.) phenology with remote sensing*, «Agronomy Journal», 96: 1139-1147.
- Wang Q., Adiku S., Tenhunen J. e Granier A. (2005), *On the relationship between NDVI with leaf area index in a deciduous forest site*, «Remote Sensing of Environment», 94: 244-255.

La gestione della chioma nella viticoltura di precisione

S. Pedò*, D. Porro*, R. Zorer**

I. Premessa

Un modello auspicabile di vigneto prevede un assetto vegeto-produttivo con elevata attitudine all'accumulo di sostanze utili all'espressione della qualità secondo l'obiettivo enologico e all'estrinsecazione di caratteri del territorio. In un ambiente vocato le migliori combinazioni vitigno/portinesto e le corrette scelte d'impianto dovrebbero permettere l'impostazione di un modello viticolo a basse richieste di input, dove l'intervento antropico durante la stagione vegeto-produttiva sia ridotto.

Per quel che riguarda la gestione della copertura vegetale, in linea teorica, dopo la potatura invernale ulteriori interventi a verde dovrebbero essere minimizzabili grazie al raggiungimento di un equilibrio vegeto-produttivo naturale che consenta la piena espressione del vitigno nell'ambiente di coltivazione e, conseguentemente, la migliore sostenibilità della coltura.

In realtà le operazioni a verde sono una prassi spesso obbligata per l'ottenimento di un buon rapporto funzionale *sink-source* e di determinate caratteristiche qualitative del prodotto finale. Talune di queste pratiche, quali cimatura e spollonatura, sono oramai consuetudini, altre, quali la defogliazione ed il diradamento dei grappoli, possono non essere necessarie in tutti i contesti viticoli e per tutti gli obiettivi produttivi. La defogliazione parziale è di evidente utilità in vigneti dotati di elevata vigoria e densità fogliare, ma va considerata con cautela in condizioni di medio/basso vigore, nelle quali si può conseguire un peggioramento della qualità del prodotto (Poni S. 2003). Il diradamento dei grappoli su piante in piena produzione può essere effettuato dall'allegagione all'invaiaitura asportan-

* Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario di San Michele all'Adige (TN), Italia. Centro Trasferimento Tecnologico.

** Centro Ricerca ed innovazione, Via E. Mach, 1 - 38010 S. Michele all'Adige (TN)

do quantitativi variabili di uva pendente. I diradamenti effettuati su vigne in condizioni di squilibrio vegeto-produttivo per eccesso di uva determinano significativi incrementi qualitativi; interventi effettuati su vigneti in equilibrio possono non dare i medesimi riscontri positivi (Poni S. 2003; Brancadoro e Failla 2001).

La varietà orografica e pedologica di numerose realtà viticole si esprime sovente con una variabilità della vegetazione non circoscritta dai limiti di confine tra vigneti: buona parte di questa si manifesta all'interno dello stesso vigneto. È facile così evidenziare aree del vigneto a differente vigore, di prassi gestite in maniera uniforme. La difforme vigoria è chiaramente un fattore limitante l'espressione delle migliori prestazioni qualitative. È da tempo riconosciuto il fatto che i migliori risultati al fine della produzione di uve destinate a vini di qualità superiore si ottengano da ceppi a ridotta vigoria e bassa produzione per ceppo, caratterizzate da un arresto precoce della crescita vegetativa, da un buon anticipo e da una buona omogeneità di maturazione, che tendano all'accumulo di solidi solubili nella polpa e di sostanze nobili nella buccia. Oggi esistono strumenti di misura e di spazializzazione della variabilità intra-vigneto facilmente accessibili alle aziende e con costi di utilizzo in costante diminuzione. Il riferimento è alle misure multispettrali ottenibili da telerilevamento aereo o satellitare o da rilievi a terra che facilmente consentono una mappatura della variabilità aziendale e la possibilità della corretta gestione della stessa.

La Fondazione Edmund Mach (Istituto Agrario di San Michele all'Adige) è stata incaricata di valutare gli effetti fisiologico-produttivi sul vigneto in seguito all'applicazione di differenti tecniche di gestione della chioma – numero di gemme per ceppo, defogliazione e diradamento precoce dei frutti – nell'ambito della viticoltura di precisione.

2. Luoghi e modalità della sperimentazione

La sperimentazione si è svolta in quattro vigneti disposti in tre diversi areali toscani a denominazione di origine: Chianti Classico, Bolgheri e Montegio di Massa Marittima presso tre delle aziende associate al Consorzio Tuscania (Barone Ricasoli, Tenuta Le Mortelle, Donna Olimpia 1898).

Il partner della linea di ricerca CNR-Ibimet di Firenze ha compiuto studi preliminari relativi allo stato di vigore degli impianti tramite voli aerei equipaggiati con telecamere operanti nel visibile e nel multispettrale. Per ciascun vigneto (Tab. 1) sono stati acquisiti dati, poi elaborati per ottenere mappe NDVI, che evidenziassero zone omogenee di biomassa fotosinteticamente attiva (*PAB- Photosynthetically Active Biomass*).

La combinazione delle differenti tecniche di gestione della chioma – otto 'tesi' differenti disposte in singole parcelle sperimentali – è stata applicata in ciascuno dei blocchi di PAB individuati.

La gestione della *canopy* ha previsto la combinazione delle seguenti tecniche applicate su contropalliera a cordone speronato unilaterale semplice:

- Differenti carichi gemme
 - tesi C0: 4 speroni (5 nei vigneti Cacciagrande e Cortigliano) ad una gemma per sperone, oltre la gemma di corona;
 - tesi C1: 4 speroni (5 nei vigneti Cacciagrande e Cortigliano) a tre gemme per sperone, oltre la gemma di corona;
- Defogliazione
 - tesi A0: carico fogliare naturale;
 - tesi A1: in fioritura-allegazione sono state eliminate le foglie dai primi 6 nodi basali dei germogli;
- Diradamento dei grappoli
 - tesi D0: carico di grappoli naturale;
 - tesi D1: eliminazione di circa il 50% dei grappoli presenti, ad inizio invaiatura (BBCH: 81).

Tabella 1. Vigneti sperimentali e relativi blocchi di PAB omogenea

Vigneto	Blocchi di vegetazione	Cultivar
Brolio (Chianti – SI) +43° 24' 50.12", +11° 27' 22.70" Quota media: 420 m s.l.m.	1. bassa PAB (L) 2. media PAB (M1) 3. media PAB (M2) 4. alta PAB (H)	Sangiovese clone R24 portinnesto 420A
Cortigliano (Castiglione della Pescaia – GR) +42° 48' 27.83", +10° 57' 30.16" Quota media: 12 m s.l.m.	1. media PAB (M1) 2. media PAB (M2) 3. alta PAB (H1) 4. alta PAB (H2)	Sangiovese clone R23 su portinnesto 420A
Cacciagrande (Castiglione della Pescaia - GR) +42° 48' 37.16", +10° 57' 31.92" Quota media: 12 m s.l.m.	1. alta PAB (H) 2. media PAB (M) 3. bassa PAB (L)	Cabernet Sauvignon clone 191 su portinnesto 3309
Donna Olimpia ("Al pino 2") (Bolgheri – LI) +43° 12' 33.55", +10° 34' 6.23" Quota media: 9 m s.l.m.	1. alta PAB (H) 2. media PAB (M1) 3. media PAB (M2)	Cabernet Sauvignon clone 191 su portinnesto 101.14

Il numero complessivo di piante condotte secondo le finalità della linea di ricerca ha superato le 10000. Tra queste sono stati caratterizzati singolarmente 1184 ceppi rilevando i seguenti parametri: numero dei germogli, numero di grappoli ante- e post- diradamento, peso di uva per pianta, peso medio del grappolo, peso medio del germoglio, peso del legno di potatura, indice di Ravaz e fertilità reale. Inoltre, in concomitanza con analoghi rilievi dei partner di ricerca, sono state effettuate tre campagne estive di misura di indici di trasmittanza e riflettanza, ogni mese da giugno ad agosto, al

fine di ottenere valori di SPAD (*SPAD-502 Konica-Minolta Business Solution Italia*; Milano) e di NDVI (*Skye-Spectrosense 2+*; *Skye instruments, Llandrindod Wells, Powys, UK*) per singola pianta.

La valutazione dello stato nutrizionale delle piante è stata effettuata tramite diagnostica fogliare e peziolare nel biennio 2009-2010. Il campionamento delle foglie e dei piccioli è stato eseguito in post-allegagione scegliendo la prima foglia disponibile a partire dal 6° nodo e prelevando su 30 piante per ciascuna parcella una foglia per pianta.

In fase vendemmiale sono stati compiuti campionamenti in doppio per ciascuna tesi sperimentale, ripetuti in due fasi, ovvero alla maturazione tecnologica e circa quindici giorni più tardi, comunque nel periodo di raccolta conforme alle scelte aziendali, per un totale di 448 campioni annui. Per ciascun campione è stato effettuato l'ammestamento e l'analisi chimica dei mosti (Mattivi 2006) mediante FT-IR Grape scan 2000 (*Foss, Hillerød, Denmark*) con determinazione di zuccheri solubili (°Brix), acidità titolabile (g/l), pH, concentrazione di acido malico e tartarico (g/l), ione potassio (mg/l), azoto prontamente assimilabile (APA – mg/l), antociani totali (mg/kg di uva) e polifenoli totali (mg/kg di uva).

In occasione della potatura invernale è stato effettuato il prelievo di un campione di legno annuale rappresentativo delle singole parcelle sperimentali, per un totale di 112 per anno. Sul campione essiccato, polverizzato ed omogeneizzato è stata effettuata la determinazione spettrofotometrica dei carboidrati non strutturali di riserva (CNS), ovvero dei carboidrati solubili e dell'amido. Si ricorda che i CNS non comprendono carboidrati strutturali, quali cellulose, emicellulose, lignine e pectine.

Poiché l'effetto varietale assume un ruolo fondamentale nel determinare una gran parte dei caratteri vegeto-produttivi e qualitativi, si è deciso di elaborare i dati separatamente per le due cultivar monitorate. Qualora lo studio degli effetti non comprenda il fattore 'epoca di raccolta', le medie riportate si riferiranno esclusivamente ai dati della raccolta tecnologica.

3. Situazione vegeto-produttiva e nutrizionale

Viene di seguito concisamente illustrata la situazione vegeto-produttiva dei diversi vigneti tramite indici classici, mediando i dati rilevati nel corso del quadriennio d'indagine in relazione ai diversi blocchi di PAB individuati. Quindi vengono riportate considerazioni complessive a riguardo dello stato nutrizionale e dell'effetto che su di esso esercitano gli elementi di variabilità naturale ed indotta.

Sangiovese

Vigneto di Brolio. Questo vigneto è quello ove è stato possibile evidenziare la massima variabilità della copertura vegetale. Gli indici vegeto-produt-

tivi classici (Tab. 2) confermano la netta distinzione effettuata tra i blocchi ad alta PAB e quelli a media e bassa.

Le porzioni di vigneto ad alta PAB presentano una potenzialità produttiva, una fertilità del germoglio ed una vigoria (espressa dal peso medio del germoglio) superiori al resto del vigneto; il rapporto tra produzione e vegetazione di tali blocchi, espresso dall'indice di Ravaz, si attesta a valori di 5.26 rispetto ai livelli inferiori riscontrati nei blocchi a media e bassa PAB (attorno a 4), considerati piuttosto bassi secondo bibliografia. I valori di riferimento relativi al peso del germoglio presenti in letteratura, indici dell'espressione di vigore equilibrato, si attestano sui 40-50 g. I blocchi a media-bassa PAB avrebbero così un vigore – correlato altresì direttamente all'indice di area fogliare – teoricamente sub ottimale, in quanto si rilevano valori decisamente inferiori a questo limite.

Vigneto di Cortigliano. In tale appezzamento erano stati individuati solo due livelli di biomassa fotosinteticamente attiva, medio e alto, ripartiti in 4 blocchi per avere una ripetizione utile ai fini statistici. Gli indici vegeto-produttivi principali (Tab. 2) caratterizzano anch'essi due situazioni abbastanza distinte, anche se l'espressione della vigoria *strictu sensu* non risulterebbe differente dal punto di vista statistico, così come i valori di potenzialità produttiva e di fertilità.

Tabella 2. Indici vegeto produttivi classici distinti per blocco di PAB

	Numero Grappoli	Fertilità	Peso uva pianta (g)	Peso medio grappolo (g)	Peso medio germoglio (g)	Peso medio legno (g)	Indice di Ravaz
BROLIO							
H	8.35 a	1.07 a	1829 a	255.0 a	53.6 a	399 a	5.26 a
M	6.89 b	0.94 b	863 b	145.2 b	30.1 b	216 b	4.18 b
L	6.37 b	0.87 b	690 c	126.2 c	28.5 b	200 b	3.65 b
CORTIGLIANO							
H	10.2 a	1.05 a	2796 a	342.1 a	51.1 a	509 a	6.34 a
M	9.92 a	1.06 a	1974 b	263.5 b	50.5 a	468 b	4.43 b

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$). % S.S.: % sulla sostanza secca

Cabernet Sauvignon

Vigneto di Cacciagrande. In generale la cultivar esprime una maggiore omogeneità nel comportamento vegeto-produttivo rispetto al Sangiovese.

In tale vigneto gli indici classici (tab. 3) mostrano differenze solo per quel che riguarda il peso di uva per ceppo, il peso medio del grappolo ed il peso medio del legno di potatura.

Vigneto di Donna Olimpia. Questo vigneto, ad una descrizione con indici classici, si dimostra assolutamente omogeneo (Tab. 3).

Tabella 3. Indici vegeto-produttivi classici distinti per blocco di PAB

	N° Grappoli	Fertilità	Peso uva pianta (g)	Peso medio grapp (g)	Peso medio germoglio (g)	Peso medio legno (g)	Indice di Ravaz
CACCIAGRANDE							
H	12.2 a	1.19 a	1582 a	150.7 a	64.5 a	625 a	2.96 a
M	12.8 a	1.24 a	1285 b	124.7 b	60.3 a	602 ab	2.53 ab
L	11.2 a	1.20 a	1108 b	118.4 b	59.5 a	554 b	2.41 b
DONNA OLIMPIA							
H	11.3 a	1.17 a	985 a	110 a	79.3 a	721 a	1.38 a
M	11.8 a	1.20 a	1048 a	108 a	81.2 a	754 a	1.48 a

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$)

Da una valutazione dei dati complessivi di tutti i vigneti risulta evidente che i blocchi di PAB, sebbene in modo differente in relazione ai siti oggetto delle prove, hanno evidenziato differenze nello *stato nutrizionale delle piante*: in particolare, al crescere dei valori di PAB, i contenuti di azoto, calcio, magnesio, ferro e boro sono proporzionalmente aumentati, al contrario di quanto osservato per i livelli di potassio che sono risultati significativamente superiori nei blocchi di PAB inferiori (Tab. 4).

Tabella 4. Effetto della PAB sul contenuto in nutrienti delle lamine fogliari

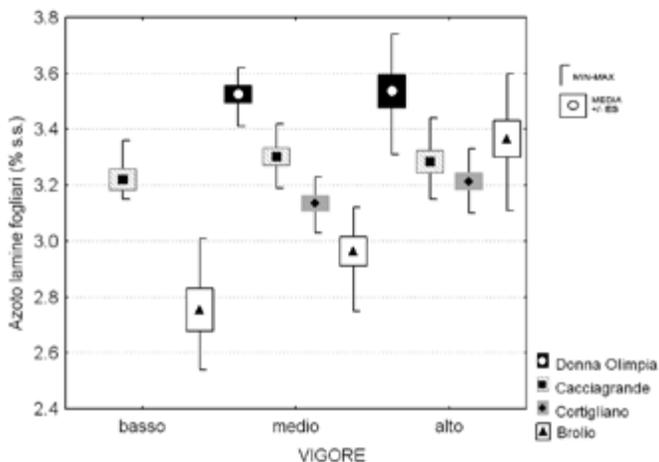
	N % s.s.	P % s.s.	K % s.s.	Ca % s.s.	Mg % s.s.
Basso	2.99 c	0.23 a	1.19 a	1.77 b	0.28 b
Medio	3.22 b	0.24 a	0.99 b	1.93 a	0.33 a
Alto	3.32 a	0.24 a	0.92 c	1.84 ab	0.31 ab
	S % s.s.	Fe mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.	Cu mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.
Basso	0.25 a	85.6 b	54.4 b	93.9 a	28.3 a
Medio	0.26 a	95.7 ab	75.1 a	124 a	26.2 a
Alto	0.26 a	100 a	77.1 a	94.9 a	26.1 a

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$).
% s.s.: % sulla sostanza secca

Com'è possibile osservare nella figura 1, nonostante l'ampia variabilità dei dati, si evidenzia che blocchi di PAB inferiore presentano valori più bassi di azoto fogliare, quasi ai limiti di una nutrizione ottimale, soprattutto-

to su Sangiovese nel Chianti. Per contro, blocchi di PAB alti, in tutti i siti oggetto della sperimentazione, presentano analoghi valori di azoto, decisamente sopra l'ottimalità dei *range* di riferimento; analoghi andamenti e/o tendenze sono state osservate nei piccioli.

Figura 1: Variabilità dei livelli di azoto fogliare in relazione ai diversi blocchi di PAB ed ai siti



L'effetto cultivar si è rivelato influente sui livelli nutrizionali nelle foglie in modo netto, ad esclusione del fosforo; nei piccioli l'effetto varietale si manifesta significativamente sui livelli di azoto, calcio, magnesio, zolfo, boro e rame.

Nelle lamine azoto, potassio, magnesio, ferro e boro sono risultati significativamente più concentrati nel Cabernet, mentre calcio e zinco nel Sangiovese (Tabb. 5 e 6). Nei piccioli, come già evidenziato relativamente alle foglie, azoto, magnesio e boro hanno presentato livelli significativamente più elevati in Cabernet e calcio in Sangiovese, mentre lo zolfo è risultato più elevato in Sangiovese.

Tabella 5. Effetto della cultivar sui valori nutrizionali delle lamine fogliari

	N	P	K	Ca	Mg
	% s.s.	% s.s.	% s.s.	% s.s.	% s.s.
Sangiovese	3.09 b	0.24 a	0.97 b	2.00 a	0.29 b
Cabernet S.	3.40 a	0.24 a	1.03 a	1.71 b	0.35 a
	S	Fe	B	Cu	Zn
	% s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.
Sangiovese	0.24 b	85 b	59 b	26 b	28 a
Cabernet S.	0.29 a	110 a	91 a	219 a	25 b

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$)

Tabella 6. Effetto della cultivar sul contenuto in nutrienti dei piccioli

	N % s.s.	P % s.s.	K % s.s.	Ca % s.s.	Mg % s.s.
Sangiovese	0.81 b	0.21 a	2.01 a	1.95 a	0.59 b
Cabernet S.	1.13 a	0.21 a	2.50 a	1.59 b	0.70 a
	S % s.s.	Fe mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.	Cu mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.
Sangiovese	0.14 a	20 a	49 b	9 b	28 a
Cabernet S.	0.12 b	51 a	54 a	39 a	26 a

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$)

Tale risultato conferma che le differenti cultivar possiedono profili nutrizionali ed esigenze ben diversi. Di tale specificità occorre tenerne debitamente conto, soprattutto nella gestione della fertilizzazione: il Sangiovese potrebbe richiedere apporti di concimi azotati e potassici per superare eventuali carenze temporanee, che in situazioni di particolare stress, come ad esempio a Brolio in talune annate particolarmente a rischio, si rendono decisamente indispensabili, in particolare se associate a condizioni di PAB più basse.

L'incremento del numero di gemme per sperone (*effetto carica di gemme*) ha comportato un decremento significativo dei valori fogliari di azoto e fosforo ed un innalzamento di quelli del potassio (Tab. 7).

Tabella 7. Effetto della carica di gemme sul contenuto in nutrienti delle lamine fogliari

	N % s.s.	P % s.s.	K % s.s.	Ca % s.s.	Mg % s.s.
1 gemma	3.27 a	0.25 a	0.97 b	1.91 a	0.31
3 gemme	3.18 b	0.22 b	1.01 a	1.84 a	0.31
	S % s.s.	Fe mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.	Cu mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.
1 gemma	0.26 a	94 a	78 a	114 a	26 a
3 gemme	0.25 a	98 a	68 b	103 a	27 a

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$)

La rimozione delle foglie basali del germoglio (*effetto defogliazione*) ha influenzato in modo significativo l'incremento di azoto e zinco (Tab. 8).

L'eliminazione della metà dei grappoli (*effetto diradamento*), invece, non ha sortito alcun effetto rilevante nella modificazione dello stato nutrizionale delle piante.

La relazione esistente tra indice di SPAD, valori NDVI e azoto fogliare risulta piuttosto interessante e predittiva, soprattutto quando i valori di SPAD sono bassi, mentre quando i valori di lettura di tale strumento si attestano attorno a 40 una stima previsionale dell'azoto fogliare non risulta attendibile.

Tabella 8. Effetto defogliazione sul contenuto in nutrienti delle lamine fogliari

	N % s.s.	P % s.s.	K % s.s.	Ca % s.s.	Mg % s.s.
Non defogliato	3.19 b	0.23	0.98	1.91	0.32
Defogliato	3.26 a	0.24	1.00	1.84	0.31
	S % s.s.	Fe mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.	Cu mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.
Non defogliato	0.26	97	72	114	28 a
Defogliato	0.26	95	73	102	25 b

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$)

4. Effetto della gestione della chioma sulla qualità delle uve

Nella presente trattazione vengono considerati i dati complessivi quadriennali, distinti per cultivar e vigneto, al fine di rendere conto di risultati con una forte consistenza statistica, quindi senz'altro generalizzabili nella realtà operativa.

Da un'analisi d'insieme si evidenzia un'elevatissima significatività ($p < 0.001$) sui dati analitici qualitativi, sia dei fattori fissi (numero di gemme/sperone, defogliazione e diradamento) sia di quelli variabili (anno, vigneto ed epoca di raccolta).

Valutando l'entità della varianza spiegata da ciascun fattore si osserva che più influenti sono risultati gli effetti vigneto, anno ed epoca di raccolta, a seguire quelli relativi a blocco di PAB e defogliazione (su Sangiovese), mentre la variazione del numero di gemme/ceppo e il diradamento hanno presentato una minor attitudine nel controllo complessivo della variabilità del vigneto.

L'effetto del blocco di PAB (Tab. 9) non solo è risultato significativo dal punto di vista statistico, ma le differenze in termini di dati qualitativi tra aree omogenee sono apparse, in molti casi, molto consistenti ed importanti anche da un punto di vista tecnico-operativo. Ad una semplice prima osservazione delle medie dei dati qualitativi risulta evidente come le migliori prestazioni siano attribuibili alle aree a media-bassa PAB.

Sangiovese

Questo vitigno posto in differenti ambienti produttivi evidenzia una particolare plasticità all'interazione tra le caratteristiche pedologiche e quelle meteorologiche dell'anno, riuscendo a garantire un'elevata stabilità produttiva per la produzione di una gamma di prodotti spesso molto differenti tra loro: dal novello a vini di pronta beva, dai vini da invecchiamento a DOCG ai *Supertuscans*. Dal punto di vista strettamente genetico, gli si riconosce un potenziale di accumulo polifenolico medio-basso ed una

60 La ricerca applicata ai vini di qualità

Tabella 9. Medie dati qualitativi 2007-2010 categorizzati per PAB

	SANGIOVESE				
	BROLIO			CORTIGLIANO	
	Alto	Medio	Basso	Alto	Medio
°Brix	21.8 c	23.8 a	23.4 b	21.8 a	20.6 b
Acidità	5.59 a	5.76 a	4.99 b	4.92 a	4.89 a
pH	3.23 b	3.21 b	3.30 a	3.35 b	3.39 a
Ac. tartarico	6.54 b	7.30 a	6.58 b	6.51 b	6.53 a
Ac. malico	1.59 a	1.07 b	0.94 b	1.55 a	1.56 a
Potassio	1.23 a	1.26 a	1.18 a	1.26 a	1.30 a
APA	62.8 a	34.2 b	61.3 a	83.8 b	128 a
Antociani	717 b	1020 a	969 a	468 b	649 a
Polifenoli	1358 c	1859 a	1732 b	1219 b	1389 a

	CABERNET SAUVIGNON				
	CACCIAGRANDE			DONNA OLIMPIA	
	Alto	Medio	Basso	Alto	Medio
°Brix	23.1 c	24.2 b	24.8 a	22.5 a	22.3 b
Acidità	4.02 b	4.04 b	3.93 b	4.66 b	4.81 a
pH	3.52 b	3.54 b	3.59 a	3.48 a	3.43 b
Ac. tartarico	5.29 b	5.57 a	5.22 b	5.72 b	5.84 a
Ac. malico	1.94 a	1.39 b	1.44 b	2.12 a	2.08 a
Potassio	1.67 ab	1.62 b	1.72 a	1.69 a	1.59 b
APA	65.7 a	69.0 a	55.4 b	89.6 a	92.4 a
Antociani	687 ab	772 a	659 b	912 a	902 a
Polifenoli	1153 b	1256 a	1243 a	1155 a	1162 a

A lettere diverse corrispondono differenze significative (Anova-HSD di Tukey per $P \leq 0.05$)

Tabella 10. Sangiovese: test di significatività univariati per i dati qualitativi

Fattore variabilità	°Brix	pH	Acidità	Acido tartarico	Acido malico	Potassio	APA	Antociani	Polifenoli
Anno	*	***	***	***	***	***	***	***	***
Vigneto	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Vigore (Vign)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
N° gemme	***	***	**	***	ns	ns	ns	ns	ns
Defogliazione	***	ns	**	***	*	*	***	***	***
Diradamento	***	***	***	***	ns	*	ns	ns	ns
Epoca racc.	***	***	***	***	***	***	***	***	***

*, **, ***: significatività rispettivamente per $p = 0.05$, $p = 0.01$, $p = 0.001$; ns = non significativo

composizione antocianica meno stabile rispetto ad altri vitigni a bacca rossa. La sua plasticità, però, permette un indirizzo dell'equilibrio vegeto-produttivo tramite l'applicazione di differenti tecniche agronomiche al fine di ottenere evoluzioni qualitative consone all'obiettivo enologico.

L'elaborazione dei dati (Tab. 10) ha evidenziato la significatività dei diversi fattori di variabilità, epoca di vendemmia inclusa, su ogni singolo parametro di qualità dei mosti.

Le medie quadriennali, che evidenziano l'entità dell'effetto delle singole tecniche di gestione della copertura vegetale (Tab. 11), mostrano che l'aumento del numero di gemme per sperone (*effetto carica di gemme*) provoca i seguenti effetti:

- incremento dell'acido tartarico in entrambi i vigneti;
- costanza dei valori degli altri indici qualitativi in entrambi i vigneti.

Defogliando (*effetto defogliazione*) i sei nodi prossimali di ogni germoglio si ottiene:

- incremento del °Brix in entrambi i vigneti e, solo a Brolio, dell'acidità titolabile, dell'acido tartarico e dei contenuti in antociani e polifenoli totali;
- decremento di azoto prontamente assimilabile in entrambi i vigneti;
- livelli costanti di pH, acido malico e ione potassio in entrambi i vigneti.

Eliminando la metà dei grappoli potenziali (*effetto diradamento*) si ottiene:

- incremento del °Brix a Cortigliano;
- calo dell'acidità totale a Brolio e dell'acido tartarico in entrambi i vigneti;
- costanza dei valori di pH, acido malico, potassio, azoto prontamente assimilabile, antociani e polifenoli totali.

Va ricordato che a causa della grandinata occorsa durante il primo sviluppo vegetativo nel 2009, nei vigneti maremmani non è stato effettuato il diradamento, per cui l'analisi statistica quadriennale perde parte dell'informazione circa l'efficacia di tale pratica agronomica, considerati i recuperi produttivi dovuti all'ottima fertilità dei germogli secondari tipica della cultivar.

Relativamente all'effetto del posticipo della vendemmia è interessante notare come, nel vigneto di Brolio, si evidenzia, in seconda raccolta, un calo significativo degli antociani e dei polifenoli (Tab. 12), segno dell'inizio della fase di degradazione degli stessi. Ciò accade per i blocchi a media e bassa PAB, mentre quelli ad alta PAB mantengono una capacità di sintesi ed accumulo antocianico più prolungata. Questo indica che se l'obiettivo

62 La ricerca applicata ai vini di qualità

Tabella 11. Effetto della gestione della canopy nei vigneti a Sangiovese

	CORTIGLIANO		BROLIO	
	NUMERO GEMME/SPERONE			
	1 gemma	3 gemme	1 gemma	3 gemme
°Brix	20.9 a	20.6 a	22.6 a	22.4 a
Acidità	5.10 a	5.21 a	5.67 a	5.78 a
pH	3.34 a	3.31 a	3.22 a	3.20 a
Ac. tartarico	6.52 b	6.76 a	6.92 b	7.06 a
Ac. malico	1.60 a	1.60 a	1.38 a	1.31 a
Potassio	1.34 a	1.33 a	1.23 a	1.21 a
APA	107 a	105 a	43.0 a	38.4 a
Antociani	576 a	602 a	1020 a	992 a
Polifenoli	1335 a	1325 a	1782 a	1773 a
	DEFOGLIAZIONE			
	NON defogliato	defogliato	NON defogliato	Defogliato
°Brix	20.5 b	21.0 a	22.1 b	23.0 a
Acidità	5.10 a	5.22 a	5.61 b	5.83 a
pH	3.33 a	3.32 a	3.21 a	3.20 a
Ac. tartarico	6.61 a	6.67 a	6.90 b	7.15 a
Ac. malico	1.61 a	1.59 a	1.37 a	1.32 a
Potassio	1.35 a	1.33 a	1.23 a	1.21 a
APA	116 a	95.4 b	45.0 a	36.4 b
Antociani	591 a	586 a	958 b	1054 a
Polifenoli	1297 a	1362 a	1663 b	1892 a
	DIRADAMENTO			
	NON diradato	diradato	NON diradato	Diradato
°Brix	20.5 b	21.0 a	22.4 a	22.7 a
Acidità	5.23 a	5.09 a	5.81 a	5.64 b
pH	3.31 a	3.34 a	3.23 a	3.25 a
Ac. tartarico	6.72 a	6.56 b	7.14 a	6.91 b
Ac. malico	1.62 a	1.59 a	1.26 a	1.43 a
Potassio	1.33 a	1.35 a	1,21 a	1.22 a
APA	106 a	105 a	40.3 a	41.0 a
Antociani	584 a	593 a	1000 a	1013 a
Polifenoli	1305 a	1355 a	1796 a	1759 a

Anova test: valori sulle righe contrassegnati da lettera uguale non sono significativamente diversi per $p = 0.05$ (Tukey)

enologico primario fosse l'ottenimento di vini più ricchi in tali componenti, il ritardo della raccolta sarebbe auspicabile solamente per le aree di vigneto ad alta PAB.

Effettuando la ricerca del carico di rottura per la qualità derivata da un'analisi congiunta del contenuto di solidi solubili, antociani e polifenoli totali possiamo ottenere delle indicazioni interessanti.

Tabella 12. Effetto del posticcipo di raccolta su Sangiovese

	BROLIO					
	Basso		Medio		Alto	
	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A
°Brix	22.5 b	24.1 a	23.3 b	24.3 a	21.1 b	22.6 a
Acidità	5.15 a	4.82 b	5.95 a	5.58 b	5.91 a	5.27 b
pH	3.28 b	3.33 a	3.18 b	3.23 a	3.17 b	3.29 a
Ac. tartarico	6.65 a	6.51 b	7.44 a	7.17 b	6.60 a	6.41 b
Ac. malico	1.08 a	0.81 b	1.29 a	0.86 b	1.71 a	1.47 b
Potassio	1.23 a	1.13 b	1.23 a	1.19 a	1.18 a	1.17 a
APA	54 b	68 a	25 b	43 a	54 b	71 a
Antociani	1077 a	861 b	1123 a	918 b	730 a	703 a
Polifenoli	1854 a	1611 b	1978 a	1740 b	1348 a	1367 a

	CORTIGLIANO			
	Medio		Alto	
	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A
°Brix	21.4 b	22.5 a	20.1 b	21.3 a
Acidità	5.15 a	4.59 b	5.18 a	4.53 b
pH	3.35 b	3.42 a	3.29 b	3.41 a
Ac. tartarico	6.67 a	6.30 b	6.61 a	6.18 b
Ac. malico	1.64 a	1.29 b	1.55 a	1.36 b
Potassio	1.41 a	1.14 b	1.25 a	1.22 a
APA	127 a	130 a	81 a	78 a
Antociani	661 a	683 a	505 a	475 a
Polifenoli	1414 a	1394 a	1233 a	1244 a

Anova test: valori sulle righe contrassegnati da lettera uguale non sono significativamente diversi per $p = 0.05$ (Tukey)

Nel vigneto chiantigiano di Brolio la quantità di uva per pianta al di sopra della quale si ottiene un decadimento qualitativo si attesta sui 1600-1700 g/ceppo. Tale soglia è stata superata solo nel triennio 2007-09, esclusivamente nei blocchi ad alto vigore, sia sulle piante diradate sia su quelle con carico naturale di frutti. Dal confronto dei pesi medi dei grappoli (dati non riportati) è possibile mettere in evidenza l'instaurarsi di fenomeni compensativi, ricorrenti in tutti gli anni ad eccezione del 2009, con i quali le piante sono in grado di incrementare considerevolmente il peso medio del grappolo nelle tesi diradate.

Nel vigneto maremmano di Cortigliano il carico di rottura per la qualità relativo al grado zuccherino si attesta sui 3000 g/ceppo, mentre per quel che riguarda antociani e polifenoli totali sale fino ai 3800 g/ceppo, valori questi ben più elevati rispetto a quelli relativi al medesimo clone posto nella realtà viticola chiantigiana. Le prescrizioni del disciplinare produttivo della DOC "Montegio di Massa Marittima" impongono il limite di 3000

g/ceppo per un totale di produzione di 100 q/ha; possiamo confermare come in effetti il valore di 3000 g/ceppo di produzione sia un reale riferimento per ottenere i migliori livelli qualitativi.

Nel quadriennio di sperimentazione tali valori critici sono stati superati nel 2007 nelle aree ad alta PAB, sulle tesi non diradate (medie di 3200 g/ceppo), nel 2010 nelle aree a media PAB non diradate (3778 g/ceppo) ed in quelle ad alta PAB non diradate (4682 g/ceppo), mentre le tesi diradate, nello stesso anno, si sono solo approssimate (2978 g/ceppo) al carico di rottura.

Rammentiamo l'effetto della grandinata primaverile che determinò quantitativi di uva per ceppo certamente anomali nel 2009 sui vigneti maremmani, risultato della fruttificazione su germogli secondari derivati da gemme di controcchio e/o latenti. Confrontando i valori del peso medio del grappolo risulta chiaro che in tale vigneto i fenomeni d'incremento compensativo in seguito al diradamento sono stati meno cospicui (dati non riportati).

Gli effetti diretti e le complesse interazioni tra i fattori fissi e quelli variabili si possono sintetizzare distintamente verificando quali siano le migliori prestazioni qualitative delle singole tesi sperimentali, frutto della combinazione fattoriale dei trattamenti di gestione della chioma.

Su Sangiovese, in entrambi i vigneti, le combinazioni che hanno dato i risultati complessivamente migliori in termini qualitativi sono state quelle a 1 gemma/sperone defogliate (sia diradate che non) e quella a 3 gemme/sperone, defogliata e diradata. Queste diverse combinazioni hanno fornito uve con un grado zuccherino più elevato, acidità, di tipo tartarico, più equilibrata e un livello di polifenoli totali maggiore.

Cabernet Sauvignon

L'analisi statistica su Cabernet Sauvignon evidenzia la significatività dei diversi fattori di variabilità sui singoli parametri qualitativi dei mosti (Tab. 13).

Aumentando il numero di gemme per sperone (effetto carica di gemme) si è ottenuto (Tab. 14):

- un decremento del °Brix, del pH e del tenore di potassio a Cacciagrande;
- un incremento dell'acidità e dell'acido tartarico in entrambi i vigneti;
- livelli costanti di acido malico, di azoto prontamente assimilabile, di antociani e polifenoli totali su entrambi i vigneti.

L'eliminazione delle foglie nella parte basale del germoglio (*effetto defogliazione*) ha determinato:

- un incremento del grado zuccherino, del pH e del contenuto fenolico a Cacciagrande, mentre il contenuto in antociani totali è cresciuto a Donna Olimpia;

Tabella 13. Cabernet S.: test di significatività univariati per i dati qualitativi

Fattore variabilità	°Brix	pH	Acidità	Acido tartarico	Acido malico	Potassio	APA	Antociani	Polifenoli
Anno	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Vigneto	***	***	***	***	***	*	***	***	**
Vigore (Vign)	***	***	**	***	***	***	***	**	**
N° gemme	**	***	***	**	ns	***	ns	ns	ns
Defogliazione	***	*	***	ns	***	ns	***	ns	**
Diradamento	***	***	***	*	ns	***	**	ns	ns
Epoca racc.	***	***	***	ns	***	*	***	ns	*

*, **, ***: significatività rispettivamente per p = 0.05, p = 0.01, p = 0.001; ns = non significativo

Tabella 14. Effetto della gestione della canopy su Cabernet S. nei diversi vigneti

	CACCIAGRANDE		DONNA OLIMPIA	
	NUMERO GEMME	SPERONE	NUMERO GEMME	SPERONE
	1 gemma	3 gemme	1 gemma	3 gemme
°Brix	24.0 a	23.5 b	21.9 a	21.9 a
Acidità	4.12 b	4.24 a	4.89 b	5.08 a
pH	3.58 a	3.52 b	3.42 a	3.40 a
Ac. tartarico	5.29 b	5.38 a	5.83 b	5.94 a
Ac. malico	1.67 a	1.68 a	2.25 a	2.25 a
Potassio	1.76 a	1.67 b	1.67 a	1.64 a
APA	72.2 a	66.1 a	106 a	109 a
Antociani	620 a	646 a	935 a	925 a
Polifenoli	1223 a	1198 a	1189 a	1196 a
	DEFOGLIAZIONE			
	NON defogliato	defogliato	NON defogliato	Defogliato
°Brix	23.3 b	24.2 a	21.9 a	21.9 a
Acidità	4.22 a	4.14 a	5.10 a	4.96 b
pH	3.53 b	3.57 a	3.42 a	3.41 a
Ac. tartarico	5.35 a	5.32 a	5.89 a	5.87 a
Ac. malico	1.78 a	1.57 b	2.35 a	2.04 b
Potassio	1.70 a	1.72 a	1.69 a	1.62 a
APA	74.4 a	63.7 b	112 a	104 b
Antociani	635 a	631 a	899 b	962 a
Polifenoli	1179 b	1241 a	1175 a	1209 a
	DIRADAMENTO			
	NON diradato	diradato	NON diradato	Diradato
°Brix	23.6 a	23.9 a	21.8 a	22.0 a
Acidità	4.24 a	4.12 b	5.10 a	4.69 b
pH	3.54 a	3.55 a	3.39 b	3.43 a
Ac. tartarico	5.35 a	5.32 a	5.94 a	5.82 a
Ac. malico	1.70 a	1.64 a	2.23 a	2.26 a
Potassio	1.70 a	1.72 a	1.62 b	1.69 a
APA	70.8 a	67.3 a	109 a	106 a
Antociani	614 a	652 a	904 a	957 a
Polifenoli	1213 a	1208 a	1167 a	1219 a

Anova test: valori sulle righe contrassegnati da lettera uguale non sono significativamente diversi per p = 0.05 (Tukey)

- un decremento dell'azoto prontamente assimilabile e dell'acido malico in entrambi i vigneti, dell'acidità titolabile a Donna Olimpia;
- mantenimento dei livelli di acido tartarico e potassio.

Il diradamento del 50 % dei grappoli (*effetto diradamento*) ha determinato:

- un incremento del pH e del potassio a Donna Olimpia;
- un calo dell'acidità titolabile in entrambi i vigneti e dell'acido tartarico a Donna Olimpia;
- livelli costanti per acido malico, acido tartarico, azoto prontamente assimilabile, antociani e polifenoli totali.

Il posticipo della vendemmia su Cabernet Sauvignon ha evidenziato che in seconda raccolta non si registra un calo degli antociani, ma bensì un continuo incremento nel vigneto di Cacciagrande (Tab. 15), segno che tale varietà non è ancora nella fase di degradazione delle sostanze coloranti.

In entrambi i vigneti a Cabernet S. non è stato possibile individuare un punto critico preciso di rottura della qualità globale per grado zuccherino, antociani e polifenoli totali considerate le insufficienti relazioni statistiche tra questi dati ed il quantitativo per pianta. L'unica considerazione possibile che interessa Cacciagrande riguarda il fatto che i contenuti in antociani totali potenzialmente migliori, superiori ai 1200 mg/kg, sono ottenibili esclusivamente dai carichi di uva inferiori ai 2500 g/ceppo.

Nel vigneto di Donna Olimpia si evidenzia che i contenuti in antociani superiori ai 1200 mg/kg e di polifenoli totali superiori ai 2000 mg/kg si ottengono solo dai carichi di uva inferiori ai 2500 g/ceppo. Anche in questo caso tale limite coincide con quanto prescritto dal Disciplinare di Produzione della DOC "Bolgheri".

La cv Cabernet Sauvignon, ancora una volta, mette in mostra le caratteristiche tipiche di un vitigno internazionale, poiché si dimostra più stabile nei differenti ambienti di coltivazione nonostante la chioma sia stata gestita in modo nettamente differenziato. Anche per tale varietà le prestazioni relativamente migliori sono state riscontrate nella tesi a 1 gemma/sperone defogliate (sia diradate che non) e in quella a 3 gemme/sperone, defogliata e diradata. L'individuazione delle ottimali combinazioni di gestione della vite è dettata solo dal più elevato grado zuccherino riscontrato (evidente in special modo nel vigneto di Cacciagrande), in quanto i rimanenti dati qualitativi non mostrano differenze significative.

Lo studio delle *sostanze di riserva del legno* annuale, effettuato mediante l'analisi dei carboidrati non strutturali (CNS), ha consentito di trarre utili indicazioni per entrambe le cultivar.

I test multivariati sui dati triennali (2007-2009) rivelano un effetto significativo dei fattori anno, varietà e blocco di PAB; tra questi, l'effetto 'annata'

Tabella 15. Effetto del posticipo di raccolta su Cabernet S.

	CACCIAGRANDE					
	Basso		Medio		Alto	
	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A
°Brix	24.7 a	24.9 a	23.7 b	24.9 a	22.7 b	23.6 a
Acidità	4.15 b	3.57 a	4.20 a	3.76 b	4.18 a	3.76 b
pH	3.60 a	3.60 a	3.53 a	3.54 a	3.51 a	3.54 a
Ac. tartarico	5.21 a	5.24 a	5.55 a	5.61 a	5.25 a	5.35 a
Ac. malico	1.48 a	1.39 a	1.52 a	1.18 b	2.04 a	1.78 b
Potassio	1.76 a	1.66 b	1.68 a	1.53 b	1.70 a	1.62 a
APA	68 a	48 a	75.7 a	57.7 a	71.3 a	56.4 b
Antociani	555 b	828 a	695 b	905 a	647 b	753 a
Polifenoli	1270 a	1248 a	1240 a	1283 a	1151 a	1155 a
	DONNA OLIMPIA					
	Medio		Alto		Medio2	
	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A	1 ^A	2 ^A
°Brix	21.9 b	22.7 a	22.0 b	23.0 a	21.8 b	22.8 a
Acidità	5.03 a	4.65 b	4.97 a	4.36 b	5.10 a	4.49 b
pH	3.39 b	3.43 a	3.44 b	3.52 a	3.42 b	3.49 a
Ac. tartarico	5.89 a	5.8 a	5.82 a	5.62 b	5.94 a	5.66 b
Ac. malico	2.17 a	1.96 b	2.32 a	1.93 b	2.25 a	1.97 a
Potassio	1.60 a	1.48 b	1.72 a	1.66 a	1.66 a	1.61 b
APA	100 a	72 b	110 a	70 b	114 a	86 b
Antociani	877 a	897 a	954 a	871 a	977 a	942 a
Polifenoli	1183 a	1171 a	1186 a	1124 a	1208 a	1083 b

Anova test: valori sulle righe contrassegnati da lettera uguale non sono significativamente diversi per $p = 0.05$ (Tukey)

assumerebbe un ruolo preminente nel determinare la dinamica di accumulo delle riserve. I test di significatività univariati dimostrano come l'effetto varietale non sia così determinante sul tenore di carboidrati solubili (glucosio/fruttosio), quanto sull'amido. Glucosio e fruttosio risultano più influenzati dall'ambiente, in modo particolare dalle temperature invernali nella seconda fase di riposo vegetativo, quella di tipo esogeno.

Inoltre, per quel che riguarda l'effetto varietà, Cabernet Sauvignon presenta un contenuto complessivamente più elevato di riserve in amido rispetto a Sangiovese.

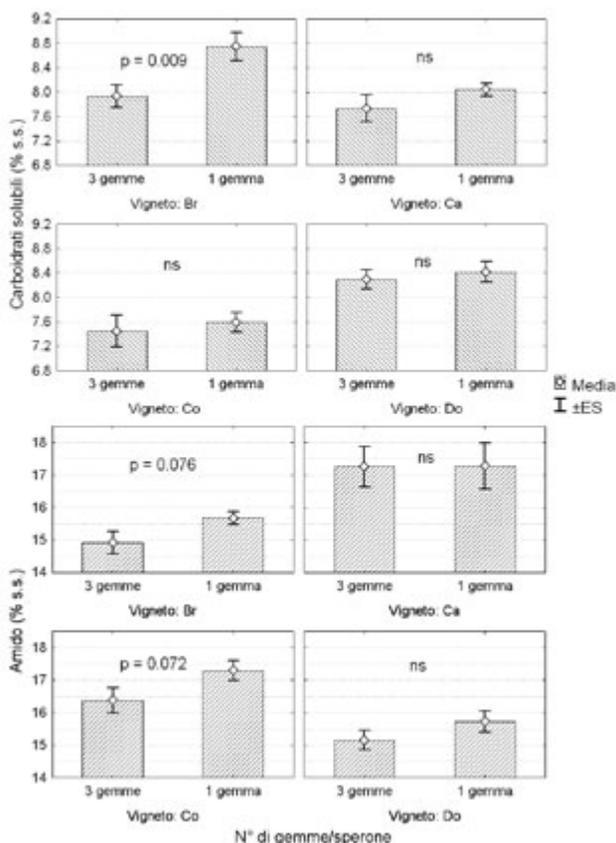
Nonostante vi sia un'effettiva significatività delle differenze riscontrate tra blocchi di PAB per quel che riguarda i contenuti di amido, nel confronto tra condizioni di vigoria più o meno elevata non è ravvisabile un incremento proporzionale degli stessi: nei diversi vigneti si registrano infatti comportamenti dissimili. Le differenze nel contenuto in zuccheri solubili,

in maggior misura dipendenti dalle temperature invernali, non sono mai veramente significative.

Effettuando tuttavia l'analisi univariata dei dati in funzione delle diverse annate, relativamente all'effetto del numero di gemme per sperone, vengono messe in evidenza alcune differenze significative per quanto riguarda carboidrati solubili ed amido.

Dopo tre anni di gestione della chioma, secondo il protocollo sperimentale previsto per il vigneto di Brolio, si assiste ad un calo significativo del rapporto glucosio/fruttosio e, tendenzialmente, anche del contenuto in amido di riserva nelle piante condotte con 3 gemme/sperone rispetto a quelle con 1 gemma/sperone (Fig. 2). La stessa tendenza si verifica anche negli altri vigneti.

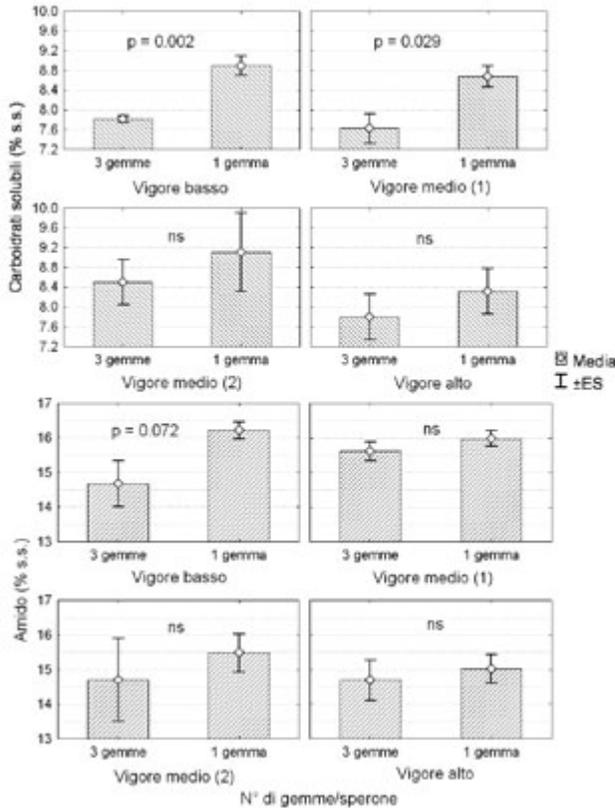
Figura 2. Contenuti in carboidrati ed amido distinte per carica di gemme (2009)



Entrando più nel dettaglio, se si effettua un'elaborazione statistica distinta per blocco di PAB, si nota che le differenze più significative sono

riscontrabili essenzialmente nei blocchi a media e bassa PAB per i carboidrati solubili, e solamente nel blocco a bassa PAB per quanto riguarda l'amido (Fig. 3).

Figura 3. Vigneto di Brolio: medie dei contenuti in carboidrati e amido distinte per blocco di PAB



L'analisi dei dati indicherebbe che il condizionamento imposto dal differente carico di gemme determina, su vegetazione con ridotta biomassa fotosinteticamente attiva, un maggiore utilizzo di riserve, quando la pianta non ha autosufficienza fotosintetica, a scapito della possibilità di accumulo negli organi e nei tessuti di riserva. Di per sé, quindi, l'aumento del numero di gemme/ceppo, seppur efficace nel modificare quantità e qualità della produzione, determinerebbe una minor flessibilità di gestione del rapporto *source-sink* nel medio-lungo periodo, accorciando le prospettive di vita del vigneto.

L'incremento del numero di gemme per ceppo può dimostrarsi un'utile pratica colturale al fine di attenuare l'eccessiva vigoria del vigneto, o

di parte di esso, ma tale soluzione non è assolutamente consigliabile in un periodo di media-lunga durata.

5. Approfondimento sulla fisiologia del vigneto in condizioni di stress idrico

La vite, come tutte le piante terrestri, è caratterizzata da due processi principali che riguardano i flussi di energia e materia: la fotosintesi e la traspirazione.

Nella fotosintesi l'energia solare è convertita in energia chimica, utilizzata per costruire la materia organica (foglie, legno, radici, frutti, ecc.). La traspirazione è invece il processo per il quale l'acqua fluisce attraverso la pianta, dalle radici agli stomi, le aperture presenti nelle foglie che regolano anche l'ingresso del biossido di carbonio CO_2 , il mattone su cui si basa la materia organica. La traspirazione è regolata dalla differenza di potenziale tra il vapor acqueo presente nell'aria e quello idrico della pianta e prima ancora del terreno. Nel processo traspirativo l'acqua viene quindi risucchiata, pompata dal suolo all'aria passando attraverso le aperture stomatiche, che costituiscono una porta, un cancello di controllo.

È facile quindi immaginare che quando gli stomi sono chiusi non passa né acqua né anidride carbonica e la pianta non può produrre materia organica e neppure zuccheri da immagazzinare nei frutti o nel legno.

Lo stesso succede nella vite, che nel corso dell'evoluzione però si è adattata a condizioni di carenza idrica e, in relazione all'*habitus* lianoso, ha la capacità di trasportare l'acqua in maniera molto efficiente.

Nonostante questo, in particolari condizioni di carenza idrica, di scarsa profondità o elevata permeabilità del suolo, anche la vite può soffrire di stress idrico ed i primi sintomi, anche per i motivi sopra accennati, sono una ridotta crescita vegetativa, una bassa produzione d'uva con conseguenze talvolta sulla qualità nelle bacche, che dipende però dal rapporto vegeto-produttivo. A livello di vigneto gli effetti della carenza idrica prolungata si evidenziano in una disomogeneità nella biomassa fotosinteticamente attiva (PAB) e nella vigoria, che possono essere facilmente individuate con tecniche di telerilevamento prossimale e distale, generalmente chiamate viticoltura di precisione.

Di seguito riportiamo i risultati di quattro anni di indagini sulle relazioni tra stato idrico della pianta ed effetti sulla fisiologia, valutati nei quattro vigneti sperimentali precedentemente descritti, in periodo pre-invaiaitura, che è coinciso con il periodo di massima carenza idrica. In particolare è stato caratterizzato l'andamento giornaliero (dall'alba al tramonto) di alcuni parametri fisiologici, potenziali indicatori di stress idrico e/o di carenze nutrizionali.

Le campagne di misura sono iniziate nel 2007 presso il vigneto di Brolio (Chianti), proseguite nel 2008 a Donna Olimpia (Bolgheri) e, dopo un'interruzione nel 2009 dovuta a forte grandinata in Maremma, che ha compromesso le tesi di gestione della chioma impostate, sono riprese e terminate

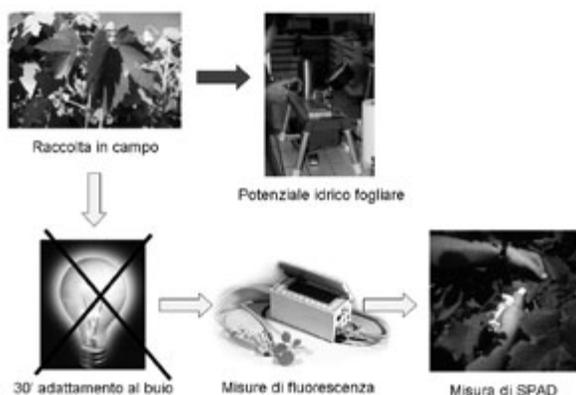
nel 2010 nei vigneti Cacciagrande e Cortigliano presso la Fattoria Le Mortelle (Castiglione della Pescaia).

L'obiettivo primario è stato quello di determinare gli andamenti giornalieri dell'efficienza fotosintetica del fotosistema II (F_v/F_m) e del potenziale idrico fogliare nelle diverse zone del vigneto caratterizzate da blocchi a differente PAB (alta, media e bassa) e di capire come le eventuali variazioni si potessero ripercuotere sulla fisiologia della maturazione delle uve, in funzione anche delle diverse modalità di gestione della chioma. All'interno di diversi blocchi di vigoria del vigneto, infatti, erano state allestite le tesi sperimentali modificando l'equilibrio vegeto-produttivo al fine di migliorare la qualità delle uve e fornire indicazioni e metodologie per una gestione ottimale della variabilità.

L'indagine ha riguardato in particolare le piante sottoposte alle tesi estreme di equilibrio vegeto-produttivo, sfogliato non diradato e carica di quattro speroni a tre gemme (C1A1D0: massima produzione di grappoli per unità di area fogliare), confrontate con la tesi più scarica dal punto di vista produttivo con diradamento del 50% dei grappoli e nessuna sfogliatura (C1A0D1).

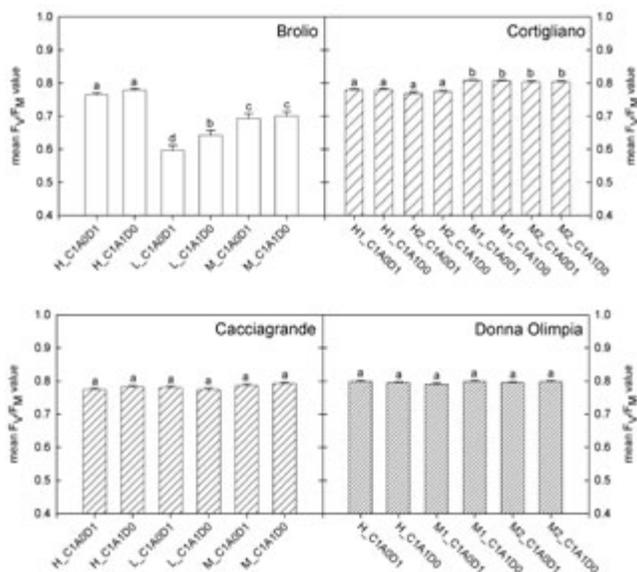
Immediatamente dopo la raccolta, di un sub-campione di foglie (Fig. 4) è stato misurato il potenziale idrico fogliare mediante camera a pressione di Scholander (*Plant Water Status Console Model 3005 – Soilmoisture Equipment Corp*). Le restanti foglie sono state adattate per almeno mezz'ora al buio per sottoporle alla determinazione dell'efficienza quantica del fotosistema II (F_v/F_m) tramite fluorimetro portatile PAM 2000 (*Walz GmbH, Effeltrich, Germany*). Il contenuto di clorofilla è stato rilevato indirettamente mediante un misuratore portatile SPAD 502 (*Konica-Minolta Inc., Tokyo, Japan*).

Figura 4. Protocollo di raccolta e misura delle foglie per analisi fisiologiche



Tali rilievi sono stati ripetuti periodicamente nell'arco della giornata, ogni due ore circa, dal primo mattino fin all'imbrunire per tre giorni consecutivi in fase di pre-invaiaatura, al fine di registrare la dinamica giornaliera dell'efficienza dell'apparato fotosintetico delle piante nei diversi blocchi di

Figura 5. Valori medi dell'efficienza quantica nei quattro vigneti sperimentali in relazione al PAB (L=basso, M=medio, H=alto) ed alle tesi agronomiche (C1A0D1 = potatura a 3 gemme, non defogliato, diradato al 50%; C1A1D0 = potatura a 3 gemme, defogliato fino al sesto nodo). Da notare le differenze significative in relazione al blocco di vigore a Brolio e in parte a Cortigliano e la non influenza della gestione della chioma su F_v/F_M ad eccezione di Brolio



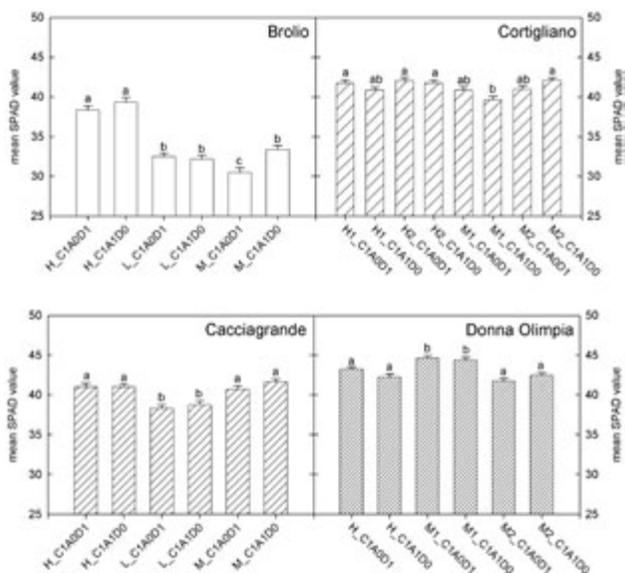
vigore e soggette a tesi estreme di equilibrio vegeto-produttivo. Complessivamente per ciascun parametro sono state effettuate 1120 misure.

Gli andamenti giornalieri del potenziale idrico hanno evidenziato un abbassamento dei valori nelle ore centrali, che venivano recuperati nelle prime ore serali, nei vigneti di Bolgheri e della Fattoria Le Mortelle. A Brolio, invece, sono stati registrati valori bassi durante tutto il giorno. Inoltre si è osservato che Cabernet Sauvignon riprende il turgore fogliare più rapidamente di Sangiovese.

Anche i valori di efficienza dell'apparato fotosintetico hanno mostrato valori più bassi a Brolio (0.67 ± 0.01), specialmente nei blocchi a media e bassa vigoria (0.62 ± 0.01), mentre nei restanti vigneti i valori diminuivano leggermente in corrispondenza delle ore più calde della giornata. Nelle ore più calde (12:00-15:00) della giornata sono stati registrati abbassamenti del 21% di F_v/F_M (0.53 ± 0.05) su foglie di Sangiovese a Brolio, con conseguente abbassamento dell'attività fotosintetica.

Un'ulteriore conferma della situazione fisiologica dei quattro vigneti è venuta dall'analisi del contenuto di clorofilla, rappresentato dall'indice di SPAD, con valori più elevati in Cabernet Sauvignon a Donna Olimpia (SPAD medio: 43.1 ± 0.2) e Sangiovese a Cortigliano (SPAD medio: $41.2 \pm$

Figura 6. Valori medi di SPAD (indice del contenuto di clorofilla) nei quattro vigneti sperimentali in relazione al PAB (L=basso, M=medio, H=alto) ed alle tesi agronomiche (C1A0D1 = potatura a 3 gemme, non defogliato, diradato al 50%; C1A1D0 = potatura a 3 gemme, defogliato fino al sesto nodo). Da notare le differenze significative in relazione al blocco di vigore soprattutto a Brolio dove sono stati registrati valori fisiologicamente bassi. Negli altri vigneti i valori sono sempre ottimali e con leggere differenze non sempre riconducibili alla 'presunta' maggiore vigoria del blocco come nel caso di Donna Olimpia, dove la situazione M1 mostra valori di SPAD superiori a L



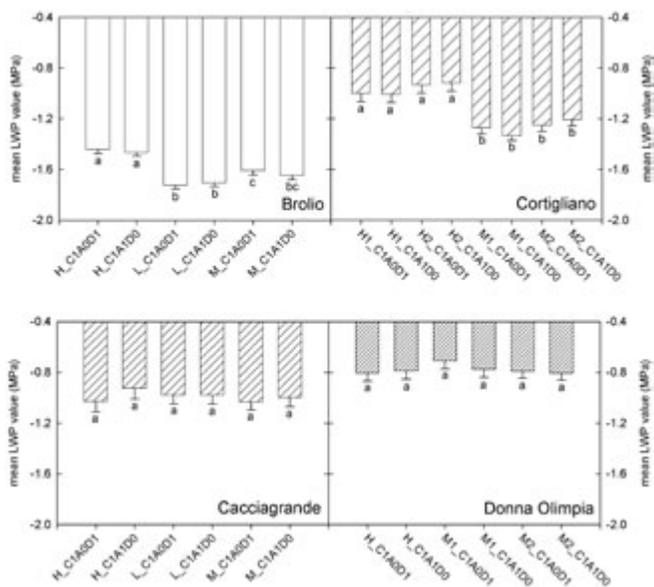
0.2), leggermente inferiore in Cabernet Sauvignon a Cacciagrande (SPAD medio: 40.2 ± 0.2) ed infine nelle foglie di Sangiovese a Brolio (SPAD medio: 34.3 ± 0.3). Dall'esame complessivo dei dati si può rilevare un abbassamento significativo dell'efficienza dell'apparato clorofilliano, con potenziali ripercussioni negative sull'attività fotosintetica, in corrispondenza di potenziali idrici fogliari inferiori a -1.2 -1.3 MPa e per valori di SPAD minori di 36.

Per quanto riguarda l'effetto delle differenti gestioni agronomiche sulla risposta fisiologica, generalmente non sono state riscontrate differenze significative, se non nel vigneto di Brolio, nel quale risulta comunque dominante il ruolo della variabilità del terreno.

In particolare il confronto dei valori medi di efficienza (Fig. 5) ha evidenziato differenze significative in relazione al blocco di vigore a Brolio e in parte a Cortigliano e la non influenza della gestione della chioma su F_v/F_M , ad eccezione di Brolio (lettere b e d).

I valori medi di SPAD (indice del contenuto di clorofilla; Fig. 6) nei quattro vigneti sperimentali in relazione al blocco di vigore hanno mostrato differenze significative soprattutto a Brolio dove sono stati registrati

Figura 7. Valori medi del potenziale idrico fogliare nei quattro vigneti sperimentali in relazione al PAB (L=basso, M=medio, H=alto) ed alle tesi agronomiche (C1A0D1 = potatura a 3 gemme, non defogliato, diradato al 50%; C1A1D0 = potatura a 3 gemme, defogliato fino al sesto nodo). Da notare le differenze significative in relazione al blocco di vigore a Brolio e in parte a Cortigliano e la non influenza della gestione della chioma

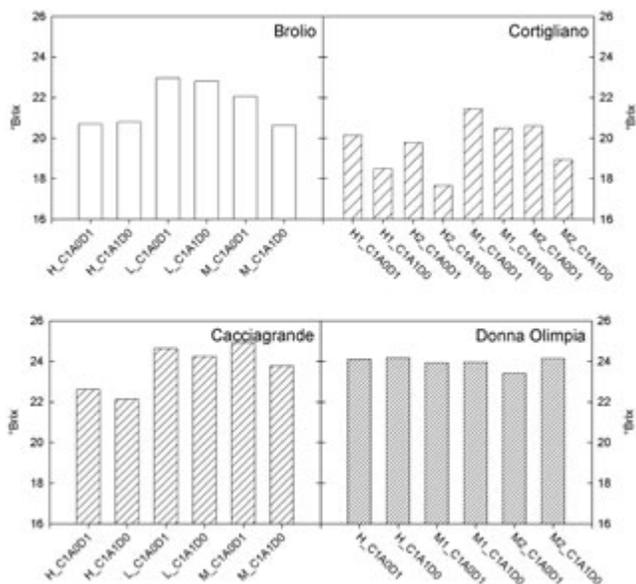


valori fisiologicamente bassi. Negli altri vigneti i valori di SPAD sono sempre risultati ottimali e con leggere differenze non sempre riconducibili alla 'presunta' maggiore vigoria del blocco come nel caso di Donna Olimpia, dove la situazione 'Media' mostra valori di SPAD superiori a quella 'Alta'.

Per quanto riguarda il potenziale idrico fogliare (Fig. 7) si può notare una situazione molto simile a quella registrata per l'efficienza quantica (F_v/F_M), che conferma quanto esistente in letteratura relativamente alla capacità di questo indice fisiologico di individuare lo stress idrico. Differenze significative in relazione al blocco di vigore sono state registrate a Brolio e in parte a Cortigliano, mentre la gestione della chioma non ha influito sul potenziale idrico medio.

Tali indicazioni sono confermate dalle misure di potenziale idrico del suolo a due profondità (30 e 60 cm) condotte dal CNR-Ibimet di Firenze (vedi *Relazione scientifica finale Linee di ricerca A1-A2*, CNR-Ibimet) che hanno registrato valori al di sotto del punto di appassimento (-1.5 MPa) nel vigneto di Brolio a partire da luglio di ciascun anno nel pieno delle misure fisiologiche effettuate tra i giorni giuliani (JD 218-221), a Donna Olimpia in particolar modo nel 2008 anno nel quale sono state effettuate le misure fisio-

Figura 8. Valori medi del contenuto in zuccheri delle uve relativi alle due vendemmie di ciascuna effettuata nell'anno di campionamento corrispondente ai rilievi fisiologici (Brolio 2007, Cortigliano e Cacciagrande 2010, Donna Olimpia 2008)



logiche (JD 210-212), ed a Cacciagrande e Cortigliano con valori (-1.3 MPa) prossimi al punto di appassimento nei giorni delle misure (JD 208-210).

Valutando lo stato fisiologico globale, rappresentato dall'indice $F_v/F_M \cdot SPAD$, si osserva nel vigneto di Brolio un gradiente positivo nella capacità fotosintetica in corrispondenza dell'aumento dei valori di PAB ed un lieve positivo effetto della defogliazione, significativo però solo per il blocco a PAB medio. Il vigneto di Cortigliano risulta omogeneo, Cacciagrande ha valori inferiori nelle parti a PAB inferiore, mentre il vigneto di Donna Olimpia risulta più efficace nel blocco a PAB medio (M1).

Per quanto riguarda la qualità delle uve il grado zuccherino (Fig. 8) è risultato generalmente inferiore nelle zone del vigneto ad elevato PAB (a Brolio, Cortigliano e Cacciagrande), mentre Donna Olimpia conferma una notevole omogeneità. Dall'analisi statistica dei dati (Tab. 16) gli zuccheri non risultano correlati in modo significativo con i parametri fisiologici ($F_v/F_M \cdot SPAD$, LWP e $F_v/F_M \cdot SPAD$) come ci si sarebbe potuto attendere. Le relazioni più significative riguardano invece il potenziale idrico fogliare (LWP) inversamente correlato con l'acidità, ossia a LWP meno negativo (minor stress idrico) corrispondono uve meno acide.

Tabella 16. Correlazione tra parametri chimico-analitici delle uve e fisiologici fogliari. Gli zuccheri non risultano correlati in modo significativo ($p > 0.05$) mentre Acidità titolabile e pH dei mosti risultano generalmente correlati in modo significativo con i parametri fisiologici

Correlazione di Pearson	°Brix	pH	Acidità totale (g l ⁻¹)
F _v /F _M	-0.0136 p=.948	.3792 p=.056	-.5284 p=.006
SPAD	.0386 p=.851	.4917 p=.011	-.5473 p=.004
LWP	.2862 p=.156	.7159 p=.000	-.7126 p=.000
F _v /F _m *SPAD	-.0919 p=.655	-.5597 p=.003	.6333 P=.001

In conclusione non sono stati evidenziati potenziali problemi alla produzione e all'accumulo di zuccheri nei vigneti di Donna Olimpia, Caccia-grande e Cortigliano, e neppure a Brolio, sebbene in corrispondenza della zona a bassa vigoria, si siano registrati valori bassi di SPAD e di efficienza quantica, questi ultimi addirittura critici nelle ore centrali più calde della giornata. Probabilmente la bassa carica produttiva è riuscita ad equilibrare la situazione vegeto-produttiva permettendo di ottenere risultati interessanti per la qualità delle uve.

La gestione agronomica non ha modificato in modo significativo lo stato fisiologico delle piante, che è risultato invece maggiormente influenzato dal terreno e correlato con la biomassa fotosinteticamente attiva (PAB).

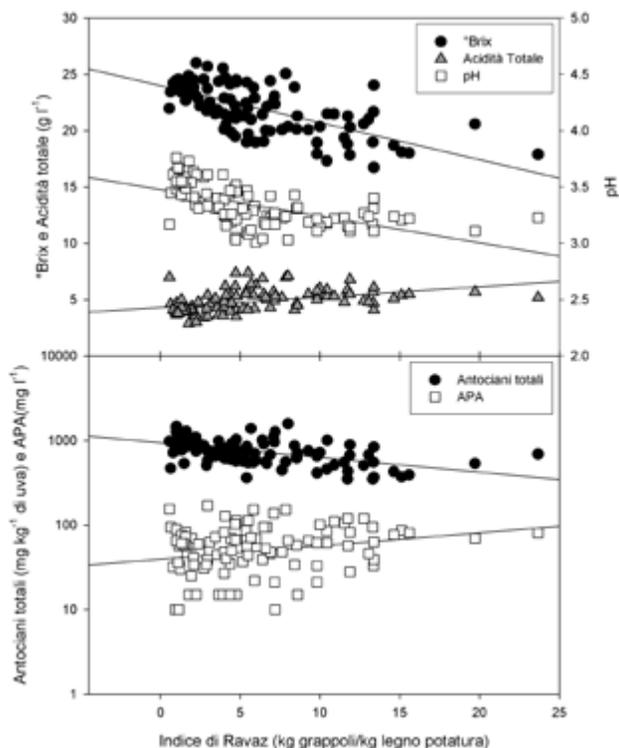
La qualità delle uve è risultata invece correlata con l'equilibrio vegeto-produttivo, rappresentato dall'indice di Ravaz (Tabb. 2 e 3; Fig. 9), che fornisce la chiave di lettura fisiologica più adeguata a spiegare il livello di maturazione raggiunto nelle due epoche di raccolta.

A valori fino a 5 di indice di Ravaz corrispondono uve con elevato tenore zuccherino ed adeguata acidità, alti antociani totali e buon contenuto di APA (Fig. 9). Aumentando la produzione a parità di chioma si ottengono linearmente uve meno mature.

6. Conclusioni e prospettive

L'approccio sperimentale ha previsto di considerare il vigneto individuando preliminarmente la variabilità della vegetazione all'interno dei singoli appezzamenti. Quest'ottica, propria della viticoltura di precisione, s'è rivelata decisiva per rendere manifesto quello che è un fattore primario di controllo della variabilità dei risultati vegeto-produttivi e qualitativi. La variabilità intra-vigneto è risultata il fattore che, dopo le variabili annata e condizioni pedo-climatiche (effetto vigneto), consente maggiormente un

Figura 9. La qualità delle uve risulta significativamente correlata con l'equilibrio vegeto-produttivo, rappresentato dall'indice di Ravaz ossia il rapporto tra kg di produzione e legno di potatura



controllo della qualità delle uve. L'esperienza maturata in quest'occasione scoraggia ogni generalizzazione e suggerisce di considerare ogni vigneto a sé stante e di decidere di intervenire con le tecniche colturali caso per caso.

Nei vigneti a *Sangiovese* le aree naturalmente più consone all'ottenimento degli obiettivi enologici sono quelle a basso-medio vigore. A fronte di ciò è possibile ipotizzare due strategie alternative o complementari:

- *Gestire la variabilità esistente* intervenendo con scelte di gestione della chioma e con epoche di vendemmia differenziate nel tempo a seconda del blocco di vigore;
- *Modificare la variabilità* applicando le scelte agronomiche che riducano la vigoria delle piante troppo esuberanti dal punto di vista vegetativo (diminuire l'apporto di fertilizzanti azotati, differenziare gli interventi irrigui, la potatura verde e l'inerbimento).

L'incremento del numero di gemme/ceppo può essere utile per consentire uno sfogo a coperture vegetali troppo vigorose in quanto permette una riduzione del peso medio del germoglio con conseguenze sulla qualità dei mosti che si concretizzano essenzialmente solo in un incremento dell'acidità di tipo tartarico. La depauperazione delle riserve del legno e la difficoltà della gestione della struttura legnosa nel tempo ne sconsigliano un utilizzo durevole.

In vigneti caratterizzati da un'elevata variabilità interna, quale Brolio (Chianti), solo nei blocchi a bassa e media PAB l'associazione di defogliazione e diradamento ha sortito un effetto positivo sull'accumulo in antociani anche se le migliori prestazioni sono state ottenute dalla sola defogliazione, che appare pratica essenziale, anche per il benefico effetto sullo stato sanitario delle uve.

A parte le zone viticole nelle quali il diradamento è un intervento quasi costante negli anni per contenere la produzione nei limiti imposti da disciplinari di produzione severi, negli altri casi tale pratica può anche essere applicata solamente su parti del vigneto o in condizioni particolari. Ad esempio è già stato verificato in altre sperimentazioni l'effetto alterno del diradamento su Sangiovese che risulterebbe utile in annate sfavorevoli – piovose, con elevata umidità in maturazione, scarsa insolazione – mentre con andamenti climatici favorevoli – elevate sommatorie termiche, scarse precipitazioni, buone escursioni termiche giorno/notte – tale pratica perde grandemente di efficacia (Paliotti *et al.* 2000).

Nei vigneti ad elevata variabilità interna opportuni campionamenti di uva nelle zone individuate come appartenenti a classi di vigore differenti potranno dare un preciso quadro della situazione reale, permettendo di creare curve di maturazione specifiche per le varie zone e fornendo l'opportunità di condurre la vendemmia in maniera selettiva, intervenendo eventualmente in momenti diversi nelle varie zone del vigneto. Nelle aree a PAB medio-bassa è consigliabile non diradare ed effettuare una raccolta più precoce dei blocchi a medio-bassa PAB per evitare di entrare in fase di degradazione delle sostanze antiossidanti, anche perché l'incremento del grado zuccherino rischia, permanendo ulteriormente le uve su pianta, di essere eccessivo per una corretta fermentazione. Per le aree a maggior PAB si consiglia un posticipo di raccolta al fine di giungere ad un tenore zuccherino congruo.

Si ritiene importante specificare che l'equilibrio vegeto-produttivo che caratterizza le aree a minor PAB del vigneto di Brolio – vigoria particolarmente bassa – non va considerato un modello ideale da perseguire, nonostante le buone performance qualitative dimostrate, in quanto trattasi di piante che, a fronte di avversità biotiche ed abiotiche, avrebbero capacità reattive molto ridotte, non adeguate a garantire costanza produttiva e vitalità.

In generale, nelle aree a PAB maggiore è consigliabile mettere in atto quelle tecniche agronomiche (riduzione delle fertilizzazioni, azotate *in pri-*

mis, inerbimento competitivo) che riducano la vigoria e ottimizzino l'equilibrio vegeto-produttivo. L'inerbimento può determinare una riduzione sia del vigore sia della produzione media per pianta, dovuta alla diminuzione del numero di grappoli per pianta che del peso medio dei grappoli, con conseguente incrementi del grado zuccherino. Ciò non tanto per l'effetto sul contenuto idrico del terreno quanto per effetti di competizione nutrizionale e/o per effetti allelopatici (Pisani *et al.* 2000).

Proprio su Sangiovese, varietà più sensibile a nutrizioni azotate ai limiti dell'ottimalità, si consigliano interventi fertilizzanti in annate molto calde e a ridotte precipitazioni, solo in condizioni di blocchi a bassa o media PAB. Per contro, in blocchi ad alta PAB si consiglia di fertilizzare solo con minime dosi di azoto ad anni alterni.

La situazione dei vigneti a *Cabernet Sauvignon* è di più difficile interpretazione, anche perché l'entità della variabilità vegeto-produttiva intra-vigneto è risultata essere piuttosto limitata. Comunque anche in questo caso le aree del vigneto meno vigorose sono quelle che naturalmente forniscono uve migliori. La scelta di sconsigliare un maggiore numero di gemme vale anche, per i medesimi motivi esposti in precedenza, per la cultivar Cabernet Sauvignon, per la quale, inoltre, appare consigliabile defogliare regolarmente anche per gli effetti positivi che tale pratica determina sullo stato sanitario delle uve. Il diradamento ha in generale un effetto positivo in termini di calo dell'acidità totale, incremento del grado zuccherino, aumento nella dotazione di antociani. Si deve contemplare però che possano esserci dei cali del tenore polifenolico, anche dovuti all'effetto interattivo tra defogliazione e diradamento. Anche in questo caso la gestione del vigneto dovrebbe tendere ad una riduzione della vigoria nelle aree ad alto PAB e ad una applicazione delle tecniche di gestione della chioma differenziata (attenta valutazione sulla convenienza del diradamento dei frutti) alla luce dei miglioramenti qualitativi propedeutici agli obiettivi enologici che si intendono perseguire. Considerata l'alternativa utilità del diradamento potrebbe essere strategico sperimentare l'anticipo della defogliazione in fase di pre-fioritura (Poni *et al.* 2006; Poni *et al.* 2010), al fine di ridurre comunque la produzione di uva per germoglio attraverso la diminuzione dell'allegagione, mantenendo gli utili effetti sulla qualità e sulla sanità dei frutti.

Bibliografia

- Brancadoro L. e Failla O. (2001), *Influenza di forma di allevamento e gestione della chioma sull'equilibrio vegeto-produttivo*, «L'Informatore Agrario», 14: 17-26.
- Mattivi F. (2006), *Gli indici di maturazione delle uve e la loro importanza*, «Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino», 28: 27-40.
- Paliotti A., Carte Chini A., Nottiani G., Guelfi P. (2000), *Influenza della cimatura dei germogli e del diradamento dei grappoli sulla produttività del "Sangiovese"*

- allevato a cortina semplice*. Atti del Simposio Internazionale "Il Sangiovese", 15-17 febbraio, Firenze: 195-203.
- Pisani P.L., Bandinelli R., Boselli M., Mancuso S., Loreti F., Scalabrelli G., Porcinai S. (2000), *Risultati di ricerche sull'inerbimento del vigneto nel Chianti Classico*. Atti del Simposio Internazionale "Il Sangiovese", 15-17 febbraio, Firenze: 251-257.
- Poni S. (2003), *Speciale gestione della chioma. 1. La defogliazione, per arieggiare i grappoli. 2. Il diradamento dei grappoli*, «Vignevini», 30(6): 76-80.
- Poni S., Bernizzoni F., Libelli N., Civardi S., Gatti M. (2010), *Variazione di crescita dei componenti dell'acino in vitigni rossi sottoposti a defogliazione precoce*, «Italus Hortus», 17 (Suppl. n. 3): 13-20.
- Poni S., Casalini L., Bernizzoni F., Civardi S., Intrieri C. (2006), *Effects of early defoliation on shoot photosynthesis yield components and grape composition*, «A. J. Enol. Vitic.», 57: 397-407.
- Porro D., Ceschini A., Dorigatti C., Stefanini M. (2001), *Use of SPAD meter in diagnosis of nutritional status in apple and grapevine*, «Acta Horticulturæ», 564: 243-252.

Tecniche di raccolta, pulizia e cernita delle uve

A. Parenti*, S. Spinelli*, S. Benedettelli**

I. Introduzione

Nell'ottica di una produzione vitivinicola di qualità, appare sempre più importante riuscire a vinificare uve in perfette condizioni, sia in termini di stato di maturazione che di 'pulizia'. Peraltro risulta non semplice identificare in maniera univoca la qualità delle uve in ingresso, per le quali è considerato il grado zuccherino come riferimento generale (valore medio della popolazione degli acini in ingresso), mentre nessun altro parametro stima il loro grado di pulizia ovvero la quantità di materiale estraneo agli acini che entra comunque nelle vasche di vinificazione. Non sono inoltre a tutt'oggi evidenti le relazioni che quantifichino in maniera puntuale gli effetti fra la qualità dei vini prodotti e questi parametri.

Molte delle scelte operative effettuate in campo durante la raccolta e all'interfaccia vigneto-cantina sembrano più legate all'esperienza e alle sensazioni che non a dati oggettivi sistematicamente rilevati. Vi è da considerare inoltre che tali operazioni coinvolgono fortemente la forza lavoro dell'azienda in quando avvengono in un momento di picco lavorativo e quindi risultano essere ancora più delicate sia per l'organizzazione che per la razionalizzazione della forza lavoro. Appare quindi estremamente interessante ed attuale, andare a valutare la qualità del lavoro di raccolta e, quando utilizzato, di cernita, in situazioni operative reali in modo da costruire una base dati utile alla valutazione più possibile oggettiva di questa delicata fase. Un altro ambito di incertezza è generato dal fatto che a

* D.E.I.S.T.A.F. Dipartimento di Economia, Ingegneria, Scienze e Tecnologie Agrarie e Forestali, sezione Ingegneria dei biosistemi agrari e forestali, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia.

** D.I.P.S.A. Dipartimento di Scienze delle Produzioni vegetali, del Suolo e dell'ambiente Agroforestale, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia.

tutt'oggi non si conoscono quantitativamente i depauperamenti sui vini prodotti derivanti dalla vinificazione di uve a diverso grado di maturazione e con diversi livelli di 'sporco'. Nelle realtà viticole toscane di qualità si utilizzano tecniche di raccolta e cernita diverse ma, nonostante esistano ancora molti pregiudizi legati all'uso delle vendemmiatrici meccaniche, sono sempre di più le aziende produttrici di vini di qualità che ricorrono alla vendemmia meccanica sia per la tempestività di intervento che la macchina garantisce, sia per la conseguente riduzione dei costi di manodopera (Coletta *et al.* 2002). Il confronto con la raccolta manuale e una risposta sulle effettive differenze sulla qualità delle uve portate in cantina è uno dei principali obiettivi di questa ricerca. Al fine di valutare l'effettiva qualità del cantiere di lavoro sono stati messi a confronto, associati con le varie tipologie di raccolta, i più utilizzati sistemi di cernita.

2. Vendemmia

I punti critici che differenziano la vendemmia meccanica dalla manuale sono legati proprio alla presunta scarsa capacità di cernita delle vendemmiatrici.

Infatti, se con la vendemmia manuale, l'operatore adeguatamente formato, ha la possibilità di scartare tutto ciò che ritiene non idoneo alla vinificazione, la macchina raccoglie tutto ciò che incontra, a volte causando anche la rottura di alcune parti della pianta e delle strutture portanti del vigneto. Per questo si ritiene che le uve vendemmate meccanicamente possano essere maggiormente contaminate da parti verdi, come frammenti di foglie e raspi, nonché da materiali estranei del vigneto rappresentati da pezzi plastici, metallici o legnosi. L'altra possibile 'contaminazione' riguarda la raccolta di uve non completamente mature, di grappoli ammuffiti o colpiti da marciumi che risulterebbero scartati con la vendemmia manuale, ma che non possono essere riconosciuti e separati dalla vendemmiatrice. Infine, il problema forse più temuto, soprattutto per le uve 'bianche', e ritenuto responsabile di peggiorare la qualità dei vini ottenuti con uve vendemmate meccanicamente, è quello del parziale ammostamento delle uve che, se associato a tempi lunghi prima dell'ingresso in vasca, può determinare imbrunimenti, ossidazioni e avvii di fermentazioni non desiderati, portando quindi ad un decremento qualitativo dei vini.

Per migliorare questi aspetti, le vendemmiatrici si sono molto evolute e sono diventate sempre più performanti, sempre meno invasive sul vigneto e alcune addirittura dotate di diraspatrice a bordo per ridurre la frazione di parti verdi nelle uve. Inoltre anche i vigneti vengono sempre più spesso impiantati e gestiti nell'ottica della vendemmia meccanica, aspetto assolutamente fondamentale, come visto in altri studi, per ottenere buone prestazioni della macchina sia in termini di danni al vigneto che di qualità del raccolto (Parenti *et al.* 2007).

I lavori presenti in letteratura tendono principalmente a valutare gli effetti della vendemmia meccanica sul vigneto (efficienza delle diverse macchine in relazione alla disposizione e alle tipologie di impianto), e sull'uva valutando parametri come numero di acini interi, rotti, con pedicello (Troncoso *et al.* 2002), le perdite di prodotto (Clary *et al.* 1990), la presenza di parti estranee (Scaglione *et al.* 2002; Parenti *et al.* 2005; Marone *et al.* 2003). Si è ritenuto invece interessante stimare altri parametri che potrebbero incidere negativamente sulla qualità delle uve vendemmiate (Morris *et al.* 1998; Pandolfi de Fernandez *et al.* 2000; Petrucci *et al.* 1976).

I fattori scelti per valutare il decremento qualitativo del prodotto di partenza che verranno misurate nella sperimentazione sono:

- presenza di materiali estranei e che possono contribuire alla complessità chimico-sensoriale dei vini prodotti (M.O.G.: Material Other than Grape);
- presenza di Acini a Scarsa Maturazione (A.S.M.).

A tutt'oggi, come detto, non è noto quale sia il peso dei parametri citati sulla qualità finale del prodotto e soprattutto non è noto se sussistano delle interazioni fra di essi. Una valutazione accurata di tali parametri permetterebbe la definizione di rapporti causa-effetto estremamente utili al fine di determinare quali tecnologie oggi disponibili permettano i migliori vantaggi produttivi. Una volta individuati i parametri più sensibili, si potranno focalizzare gli sforzi per eventuali miglioramenti su quelli che conferiscono l'entità maggiore di decremento qualitativo puntando quindi su sviluppi e modifiche impiantistiche e/o operative.

L'ulteriore problema dell'ammontamento precoce che può verificarsi particolarmente nella vendemmia meccanica può essere superato con successo solfitando correttamente, riducendo i tempi di attesa delle uve prima dell'ingresso in vasca o mantenendo le uve a basse temperature. Studi precedenti effettuati presso il DEISTAF (Dipartimento di Economia, Ingegneria, Scienze e Tecnologie Agrarie e Forestali, Sezione di Ingegneria dei Biosistemi Agrari e Forestali dell'Università di Firenze, ex DIAF), hanno messo in evidenza che, semplicemente migliorando le attuali pratiche di distribuzione del metabisolfito ed irrorando in maniera uniforme la massa, il processo di ossidazione diventa trascurabile (Martelli 2006, Wine business monthly 2008). Per tale motivo e per il fatto che questa ricerca è focalizzata sulla cultivar a bacca rossa (Sangiovese) molto meno sensibile al problema delle ossidazioni è stato stabilito di trascurare questo parametro nella valutazione della qualità delle uve.

3. Cernita

Al fine di migliorare la qualità delle uve prima dell'ingresso nelle vasche di vinificazione, le aziende più attente agli aspetti qualitativi, utiliz-

zano vari sistemi di cernita post vendemmia. Una prima cernita, molto utilizzata nella viticoltura di qualità e quindi inserita a pieno titolo nello schema sperimentale, è la cernita in campo prima del passaggio della vendemmiatrice. In tal modo, facendo togliere dagli operatori tutti quei grappoli che visivamente si presentano in condizioni di scarsa maturazione o con livelli sanitari non ottimali, la vendemmiatrice raccoglie solo quanto lasciato e quindi si evitano buona parte dei possibili depauperamenti qualitativi. In pratica l'operatore opportunamente istruito esegue la stessa procedura, di scelta visiva in due momenti distinti. Nella precernita in campo elimina i grappoli che ritiene non idonei alla vinificazione prima che passi la vendemmiatrice, nella raccolta manuale sceglie i grappoli che ritiene vinificabili.

Oltre a ciò è uso comune effettuare delle cernite all'ingresso del processo di vinificazione. Tali cernite spesso sono posizionate erroneamente prima della diraspa-pigiatrice. Riteniamo questo un errore perché anche la diraspatrice stessa, allontanando parte del materiale verde eventualmente presente nelle uve, effettua una 'pulizia' del prodotto in ingresso e quindi eventuali altre azioni sono sicuramente più efficaci dopo tale fase del processo.

I sistemi di cernita disponibili sul mercato sono molteplici e vanno dai semplici tavoli di cernita a nastro trasportatore (dove la cernita viene effettuata manualmente da operatori) fino ad impianti molto complessi e automatici in grado di separare frazioni con diversa maturità partendo da una massa unica di uva (Falconer *et al.* 2006). Naturalmente, se i primi sistemi sono alla portata di molte aziende, l'utilizzo di impianti più complessi trova giustificazione solo per realtà di dimensioni consistenti, sia per il loro costo di acquisto sia per la necessità di lavorare con masse di uva sufficienti ad ottenere volumi critici commercializzabili. Essendo impossibile considerare tutte le diverse realtà operative praticate nelle varie aziende, la sperimentazione si pone come obiettivo di testare l'efficacia del funzionamento di alcune delle filiere raccolta/cernita scelte fra quelle più comunemente utilizzate nella viticoltura di qualità toscana.

4. Material Other than Grape (M.O.G.)

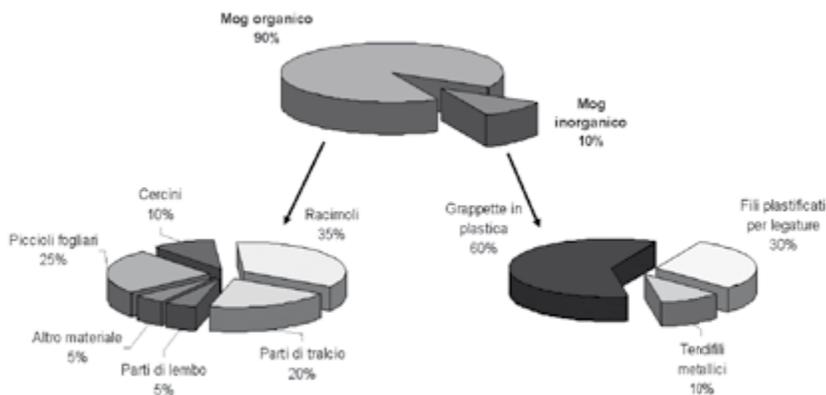
Con il termine 'M.O.G.' si intende 'Material Other than Grape'. Questo parametro, espresso in g/kg o in ‰, indica la presenza di sostanza organica ed inorganica, che non sono acini di uva appena raccolta, e che permane nel pigiato fino ad entrare nella vasca di vinificazione.

Fanno parte di questa frazione: foglie, raspi, piccioli, parti di tralcio, ma anche lumache, lucertole, ragni, parti di palo e lacci di legatura, tendifilo e sostegni per la pianta di qualsiasi natura.

Il Dipartimento nel 2004 ha effettuato uno studio che ha permesso di stabilire la composizione percentuale media dei costituenti che partecipa-

no alla formazione del M.O.G., come riportato nella figura 1 (Parenti *et al.* 2005).

Fig. 1. Rappresentazione percentuale delle frazioni di M.O.G.



La vendemmia manuale viene effettuata tramite l'asportazione dei grappoli interi, dotati quindi di raspo. La pulizia delle uve derivanti dalla vendemmia manuale è pertanto molto influenzata dalla qualità del lavoro svolto dalla diraspa-pigiatrice: tale operazione è peraltro facilitata dal fatto che la componente da allontanare dagli acini si trova integra e generalmente asciutta al momento della diraspatura.

Per quanto la diraspatura possa essere efficace, il mosto in uscita è comunque caratterizzato da una certa frazione di M.O.G., influenzata da diversi parametri e dalle loro interazioni (tipologia di diraspatrice utilizzata e sue regolazioni, fragilità dei tessuti legnosi, quantità di foglie, bagnatura della massa in arrivo in cantina, cultivar, ecc.).

La macchina vendemmiatrice, scuotendo la fila, raccoglie tutto ciò che abbia un indice di distaccamento (inteso come resistenza al distacco dalla pianta) tale da non reggere l'azione meccanica della macchina. Questo significa che, a differenza della raccolta manuale, la raccolta meccanica non è in grado di effettuare alcuna selezione del raccolto: ciò si traduce in un rischio maggiore per quanto riguarda la pulizia delle uve e conseguentemente dei mosti (Martelli 2006).

Da tempo esiste la convinzione che la rimozione del M.O.G. con i tradizionali sistemi di cernita (cernita manuale su tavoli a nastro) sia un mezzo indispensabile per migliorare la qualità del vino, ma in realtà poco si conosce sia sull'effettiva efficienza operativa di questi sistemi, sia sugli effetti negativi imputabili ai materiali che non sono uva (M.O.G.: Materials Other than Grapes) e che entrano di fatto nelle linee di vinificazione superando

anche la diraspapigiatrice e contribuendo alla composizione chimico-organolettica del vino (Scaglione *et al.* 2002; Blouin *et al.* 2000). La bibliografia disponibile al riguardo è scarsa ed in molti casi questo problema viene approcciato esclusivamente in maniera empirica (valutazione visiva delle uve).

Per la quantificazione del M.O.G. presente nelle uve raccolte con i vari sistemi è stato utilizzato una metodica semplice messa a punto per la presente sperimentazione e dettagliatamente descritta successivamente. La misurazione del M.O.G. è stata effettuata sia sulle uve vendemmiate a mano che su quelle vendemmiate a macchina ed è stata fatta sempre dopo il passaggio dalla diraspatrice in quanto l'obiettivo della ricerca è stata la valutazione del materiale che effettivamente entra nelle vasche di vinificazione, oltrepassando quindi tutti i consueti passaggi di lavorazione.

Le conoscenze acquisite con questa sperimentazione dovrebbero fornire delle indicazioni per organizzare i cantieri di raccolta e cernita in modo tale da ottimizzare la qualità delle uve in ingresso per la successiva lavorazione in cantina.

5. Uve a scarsa maturazione (A.S.M.)

Un altro problema particolarmente sentito per la produzione di vini di elevata gamma è la possibile presenza di percentuali di acini a scarsa maturazione (A.S.M.) che presumibilmente influiscono negativamente sulla qualità dei vini prodotti. Infatti gli A.S.M. hanno un minor grado zuccherino, una più alta acidità, un minor contenuto in antocianine e maggiori quantitativi di tannino provenienti dai vinaccioli che possono causare aumento dell'astringenza e dell'amaro nei vini (Kontoudakis *et al.* 2011).

Ma quanto influiscono questi A.S.M. sulla qualità dei vini prodotti e a che percentuali sono influenti? E come è possibile definire un acino a bassa maturazione? È difficile fornire una definizione oggettiva ed assoluta. Nell'ambito della presente sperimentazione, gli acini a scarsa maturazione sono stati definiti, in accordo tra i ricercatori ed i committenti, come tutti gli acini aventi un grado Brix inferiore a 21,5. Essi rappresentano la frazione di acini che non sono ancora riusciti a giungere a maturazione completa. In funzione della loro quantità percentuale all'interno del mosto possono comportare diminuzioni qualitative del prodotto finale. L'obiettivo della loro definizione è stata quella di controllare, attraverso la misura di questo parametro, la qualità delle uve in ingresso e conseguentemente dei vini prodotti. Tale parametro è stato scelto con questo valore in quanto la sperimentazione è stata effettuata su uve Sangiovese toscane per la produzione di vini di qualità.

Generalmente le aziende viticole al problema della presenza di A.S.M. nella massa da vinificare, hanno tentato di rispondere con sistemi di cernita manuale che però sono ritenuti dispendiosi lenti e la cui efficacia è dubbia e comunque molto legata agli operatori.

Al fine di scegliere con consapevolezza le strategie di raccolta e per poter mettere a punto dei sistemi tesi a diminuire la presenza di uva poco matura, è indispensabile innanzitutto conoscere il danno causato dalla presenza di acini a scarsa maturazione; soprattutto sarebbero da stabilire quali siano le quantità minime che determinano variazioni apprezzabili dal punto di vista organolettico e quali siano le quantità massime accettabili. Si rende quindi necessario conoscere la percentuale di soglia causante danno rilevabile con analisi chimiche ed eventualmente a livello sensoriale e la percentuale massima tollerabile con varie prove sperimentali in cui sono stati aggiunti quantitativi noti di acini scarsamente maturi.

Il mercato offre sistemi di selezione meccanizzata specifici per uve, alcuni dei quali risultano essere molto evoluti ed in grado di separare gli acini diraspati sulla base del loro grado di maturità.

6. Sistemi di individuazione del grado di maturità

Seguire l'evoluzione della maturazione si scontra con le difficoltà dovute alla grande variabilità della composizione degli acini. Se ci si propone di ottenere dei dati attendibili, che permettano confronti tra i diversi costituenti dell'uva, tra un vigneto e l'altro, tra una settimana e l'altra, le modalità di prelievo dei campioni hanno un'importanza fondamentale. Infatti, l'uva proveniente dallo stesso vigneto risulta essere molto eterogenea, anche se campionata nello stesso modo e per la stessa varietà.

Anche sulla stessa pianta e anche sullo stesso grappolo, i diversi acini presentano una certa variabilità di livello di maturazione.

Tenuto conto di questa grande eterogeneità, l'ottenimento di un corretto controllo della maturazione nello stesso appezzamento necessita della realizzazione di prelievi regolari e di un campionamento rappresentativo. Per ottenere una buona rappresentatività dell'appezzamento bisogna moltiplicare il numero di prelievi (Kontoudakis *et al.* 2011).

Il procedimento più utilizzato consiste nel raccogliere con le forbici 'grappolini' di 3-4 acini su un centinaio di ceppi, prelevandoli sia su grappoli nascosti dalle foglie, sia su altri esposti alla luce, prendendoli alternativamente da un lato e dall'altro del filare, a diversa altezza del ceppo.

Se si tratta di varietà con grappoli compatti, questo metodo non considera gli acini situati all'interno del grappolo, spesso meno maturi ed è quindi preferibile prelevare grappoli interi per avere un'idea precisa del livello di maturazione dell'appezzamento.

Su tali acini è possibile effettuare l'analisi rifrattometrica direttamente in campo e le analisi di laboratorio, che forniscono generalmente almeno i valori di concentrazione zuccherina e di acidità.

Tanto più il succo analizzato proviene dallo schiacciamento di un numero di acini più grande tanto più sarà rappresentativo di un valore medio del livello di maturazione del vigneto. Tanto più i gruppi di acini raccolti

ed analizzati vengono tenuti separati, tanto più, oltre il valore medio, sarà possibile percepire la variabilità esistente in campo.

In quest'ottica stanno prendendo sempre più piede i campionamenti eseguiti tenendo conto delle mappe di vigore delle piante, in parallelo con l'evoluzione della viticoltura di precisione o viticoltura sito-specifica.

Questo temine descrive la gestione informatizzata del più alto numero di informazioni possibili riguardanti non tanto un appezzamento quanto porzioni del medesimo: queste porzioni possono essere, a seconda delle necessità, anche molto piccole, sino a giungere alla singola vite. Il grande traguardo della viticoltura di precisione è quello di conoscere lo stato, la salute, il vigore e le necessità fisiologiche della singola vite ed adeguare le tecniche colturali in maniera puntuale alle esigenze.

Le mappe di vigore permettono di monitorare la vigoria delle viti, con un notevole dettaglio all'interno della singola parcella, 'fotografandone' lo stato vegetativo e quantificandone la biomassa fotosinteticamente attiva.

Alcune aziende hanno iniziato a vinificare separatamente le uve provenienti da lotti differenti all'interno dello stesso vigneto identificati sulla base delle indicazioni contenute nelle mappe di vigore, indirizzando ciascun lotto di produzione a diverse linee di vinificazione ed ottenendo così un maggiore potenziale enologico. La tecnologia consente così di volgere a proprio favore la disomogeneità della produzione e delle sue caratteristiche qualitative all'interno del vigneto, cosa che, normalmente, gioca a sfavore del produttore.

Resta comunque sempre presente la problematica della disomogeneità di maturazione che è presente perfino all'interno del singolo grappolo. Per questo motivo abbiamo ritenuto che il parametro A.S.M. fosse comunque un fattore rilevante e da controllare.

7. Organizzazione delle prove sperimentali

Nell'ottica di conoscere le caratteristiche qualitative (in termini di contenuto di M.O.G. e A.S.M.), delle uve vendemmiate a mano e a macchina e sottoposte a diverse tipologie di cernita post-vendemmia, è stato messo a punto un disegno sperimentale che ha previsto prove mirate sia allo studio di quanto tali fattori possano caratterizzare i diversi cantieri raccolta/cernita post-vendemmia, che all'incidenza di tali fattori sui vini, studiando gli effetti sia a livello chimico che sensoriale.

Sulla base di questi presupposti, il disegno sperimentale è stato formulato come separato in due sezioni:

- Una prima sezione (Sezione 1), mirata a valutare la qualità delle uve raccolte, in termini di M.O.G. e A.S.M., provenienti dalle diverse linee di vendemmia e cernita post-vendemmia al fine di riuscire a quantifi-

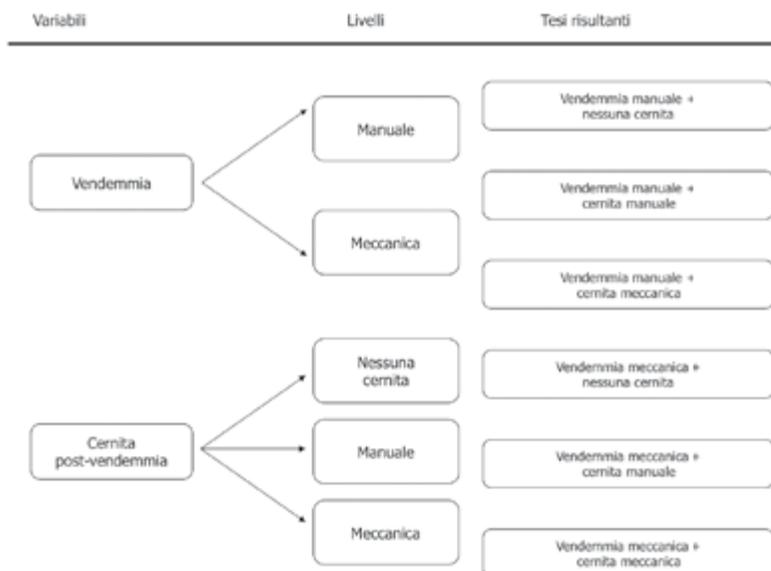
care qualitativamente l'efficienza di ciascun cantiere di raccolta preso in considerazione.

- La seconda sezione (Sezione 2), specifica per la comprensione dell'incidenza dei parametri M.O.G. e A.S.M. sulla qualità del vino. A tal fine sono state allestite 9 vinificazioni in vasche da 10hl, ripetute in triplice replica (totale 27 vasche), con aggiunte ponderali di M.O.G. e A.S.M. a diversi livelli grazie alle quali sono stati valutati gli effetti di tali parametri sulla qualità dei vini finiti, sia considerandoli singolarmente che in combinazione tra di loro.

Sezione I

I cantieri raccolta/cernita presi in considerazione sono riportati nello schema sottostante (Fig. 2). Lo schema sperimentale è stato progettato in modo fattoriale e le tesi risultanti sono quindi 6. Per ciascuna tesi sono stati misurati i valori di M.O.G. e di A.S.M. in triplice replica. La sperimentazione è stata ripetuta per 4 volte per un totale di 12 repliche (4x3) per ciascuna tesi. Le prove sono state ripetute per due anni su uve Sangiovese presso l'azienda "Tenuta Le Mortelle" sita in provincia di Grosseto, a circa 9 km da Castiglione della Pescaia.

Fig. 2. Schema sperimentale del monitoraggio delle uve provenienti da vendemmia meccanica e manuale associate a diverse tipologie di cernita post-vendemmia



I cantieri presi in considerazione si riferiscono a due tipi di vendemmia:

- Vendemmia manuale
- Vendemmia meccanica effettuata dopo aver effettuato una selezione manuale in vigneto al fine di rimuovere eventuali acini o grappoli immaturi, ammuffiti, marci ecc.

e a tre tipologie di cernita post-vendemmia ovvero:

- Nessuna cernita (controllo)
- Cernita manuale effettuata su uve diraspate per entrambi i metodi di vendemmia utilizzando un tavolo di cernita con nastro trasportatore
- Cernita meccanica tramite l'utilizzo di una cernitrice (cernitrice meccanica TRIVITI Tribaie, Amos distribution, mod. S6TAV620, anno di costruzione 2006) in grado di allontanare dalle uve il M.O.G. con sistemi meccanici e di separare, con metodo densimetrico, una massa di uva in ingresso in due masse con diverso livello di maturazione.

La macchina vendemmiatrice, che sicuramente può influenzare la qualità delle uve raccolte, è stata utilizzata nelle stesse condizioni operative scelte dall'azienda per il suo normale lavoro di raccolta che si assume come ottimale per tempistiche e modalità operative.

Come già detto, il M.O.G. e gli A.S.M. sono stati sempre misurati sulle uve a valle dei sistemi di cernita e della diraspatrice al fine di valutare le reali condizioni con cui le uve entrerebbero in vasca. Per quanto riguarda la cernita meccanica, dato che la macchina utilizzata separa la massa di uva in ingresso in due insiemi a diversa maturità, generando quindi una massa di prima scelta ed una di seconda scelta, le misurazioni puntuali sono state effettuate solo sulla prima scelta.

8. Metodo per la separazione e caratterizzazione degli A.S.M.

Il metodo per la quantificazione degli A.S.M. è stato messo a punto specificatamente per il presente progetto di ricerca. Il contenuto di A.S.M. è stato valutato attraverso la separazione con metodo densimetrico sfruttando lo stesso principio di separazione utilizzato dalla cernitrice meccanica ma, al fine di avere una maggiore precisione, in maniera statica e non dinamica.

È nota infatti la correlazione positiva fra la densità degli acini ed il loro contenuto di zuccheri, ovvero, che le basse concentrazioni zuccherine degli acini immaturi corrispondono ad una densità media inferiore rispetto alle densità degli acini a piena maturazione. Sulla base di questa evidenza è stato messo a punto il metodo utilizzato per la sperimentazione.

Per la separazione degli A.S.M. dalla massa iniziale di uva campionata, gli acini diraspati sono stati riversati in una vasca contenente circa 40l di

una soluzione acqua e zucchero ad una densità di 1.095 g/l pari a 24°Brix a 25°C (Fig. 3).

Tale soluzione è stata mantenuta costante per i 3 anni di sperimentazione. Prove preliminari, effettuate misurando per via rifrattometrica le popolazioni degli acini galleggianti e affondanti, avevano permesso di stabilire che tale soluzione separa gli acini ad un Brix di 21,5, dando quindi origine a 2 categorie di uve:

- uva con Brix<21.5, definite per la presente sperimentazione come A.S.M.
- uva con Brix>21.5, definite come uve completamente mature.

Per la valutazione degli A.S.M. sono stati prelevati tre campioni di uva di circa 10 kg ciascuno, prelevati dopo ogni sistema di cernita ed il contenuto di A.S.M. è stato espresso come percentuale in peso sul totale di uva analizzata.

Fig. 3. Separazione densimetrica degli acini



Dopo la separazione delle uve in due classi e la determinazione della percentuale delle frazioni di A.S.M. e delle uve completamente mature, ogni frazione è stata caratterizzata mediante la misurazione del grado Brix medio (ammostando gli acini delle due popolazioni) utilizzando un Refracto30PX Mettler Toledo.

9. Sistema di separazione del M.O.G.

Per la separazione del M.O.G. sono stati utilizzati 5 setacci 40x60 cm costituiti da pareti in legno e rete a maglia esagonale con una apertura media di circa 1,5 cm. Questi sono stati impilati, uno ruotato rispetto al precedente in modo da riuscire ad intercettare quanto più M.O.G. possibile, al di sopra di una vasca in plastica per raccogliere le uve (Fig. 4).

Le uve da analizzare sono state prelevate dai contenitori usati per il campionamento e una massa di circa 2.5 kg è stata rovesciata sulla pila di setacci appena descritti. Manualmente si è proceduto alla rimozione di tutti i frammenti, in parte intercettati dai setacci ed in parte recuperati nella

vasca di raccolta delle uve sottostante. Il M.O.G. (Fig. 5) recuperato è stato raccolto, pesato ed il quantitativo è stato espresso in percentuale sul peso dell'uva iniziale.

Fig. 4. Disposizione dei setacci per la separazione del MOG dagli acini



Fig. 5. M.O.G. separato dalle uve



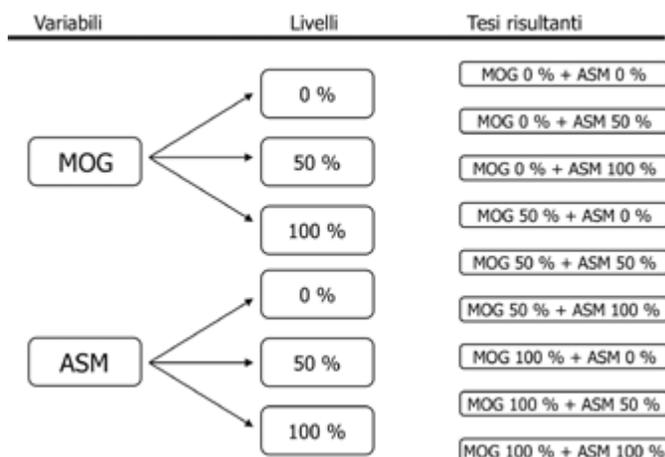
Sezione 2

Questa Sezione come già spiegato nella descrizione del piano sperimentale, ha riguardato le vinificazioni effettuate con aggiunte ponderali di M.O.G. e di A.S.M.

Presso la cantina sperimentale del Consorzio Tuscania sono state effettuate 9 vinificazioni in serbatoi da 10hl, ripetute in 3 repliche, per un totale di 27 serbatoi. È stata creata una massa omogenea di uve raccolte a mano e sono stati aggiunti artificialmente, secondo il protocollo riportato di seguito (Fig. 6), quantitativi noti di M.O.G. e di A.S.M. al fine di ricreare le 9 tesi in esame.

Le prove sono state ripetute per due anni su uve Sangiovese, opportunamente randomizzate al fine di ottenere una massa unica omogenea.

Fig. 6. Schema sperimentale delle prove di vinificazione Sezione B.1.1



Il disegno sperimentale, in quanto strutturato con schema fattoriale, ha permesso di valutare, mediante analisi statistica sui dati analitici, l'effetto dei due fattori (M.O.G. e A.S.M.) a vari livelli sulla qualità del vino e delle loro interazioni. Tutte le tesi sono state vinificate con un protocollo standard.

10. Aggiunte di M.O.G.

Il M.O.G. è stato aggiunto sotto forma di raspi a tre diversi livelli, ovvero assente (0% = 0 g/kg), medio (50% = 15 g/kg) e alto (100% = 30 g/kg) con percentuali determinate in peso. Nella vendemmia 2008 questi sono stati aggiunti sotto forma di raspi interi, mentre nel 2009 il M.O.G. è rimasto costituito da raspi, ma per simulare al meglio le caratteristiche qualitative che può apportare ai vini, tali raspi sono stati sminuzzati da un bio-tritatore elettrico.

II. Aggiunte di A.S.M.

Le aggiunte di Acini a Scarsa Maturazione sono state utilizzate per 'sporcare' una massa di uva definita 'Uva base' ed indicante uva proveniente da zone del vigneto ad alto e basso vigore opportunamente omogeneizzate con un complesso processo di randomizzazione. Gli A.S.M. sono stati invece raccolti in zone del vigneto ad altissima vigoria, individuate tramite la valutazione degli indici NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) ricavati da immagini acquisite con rilievi aerei.

Anche per gli A.S.M. sono stati valutati 3 livelli crescenti: basso (0%), medio (50%) e alto (100%). A differenza del M.O.G., che è stato aggiunto in modalità costanti nei due anni, le percentuali di A.S.M., dipendendo fortemente dalla concentrazione iniziale dell'uva raccolta, sono variate sia tra i due anni che nei 3 giorni di sperimentazione all'interno dello stesso anno. Le percentuali reali di A.S.M. aggiunti sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Livelli reali di A.S.M. aggiunti e differenziale medio tra le diverse percentuali di A.S.M. aggiunti

	A.S.M. 0%	A.S.M. 50%	A.S.M. 100%
18/09/2008	19	25	36
19/09/2008	12	25	36
20/09/2008	13	25	36
Differenziale medio 2008	10		11
07/10/2009	35	46	57
08/10/2009	38	49	60
09/10/2009	32	43	54
Differenziale medio 2009	11		11

Confrontando i dati dei due anni si nota una diversità nei valori assoluti di A.S.M. assunti nei tre livelli (0%, 50%, 100%). Ciò è imputabile alla diversa maturazione delle uve presente nelle due annate e al conseguente diverso livello di A.S.M. nell'uva di base (A.S.M. 0%), valore ovviamente non modificabile. Mentre nel 2008 le uve di base contenevano mediamente il 15% di A.S.M., nel 2009 la base presentava mediamente il 35% di A.S.M., evidentemente a causa della variabilità stagionale che, come detto, influenza fortemente lo stato ed i livelli di maturazione.

Per i due anni di sperimentazione invece di ricreare le stesse percentuali in valore assoluto di livelli di A.S.M., si è preferito, considerando anche la variabilità stagionale, mantenere i differenziali tra i livelli più possibile simili. Questo pensando che ci potesse ampliare la conoscenza sugli effetti dei diversi livelli di A.S.M. in relazione all'annata.

Analisi chimiche

Su tutti i vini prodotti sono state effettuate analisi spettrofotometriche, aromatiche, microbiologiche e chimiche. Il DEISTAF si è occupato dello svolgimento delle analisi spettrofotometriche, mentre per le determinazioni aromatiche e microbiologiche si è avvalso della collaborazione di altri dipartimenti sempre dell'Università di Firenze e per le analisi chimiche di base di laboratori esterni. Durante la fermentazione alcolica i prelievi sono stati giornalieri fino al giorno della svinatura compreso. Le analisi spettrofotometriche sono state fatte su tutti i campioni, mentre le analisi aromatiche in gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) sono state fatte solo ad inizio, metà e fine fermentazione. La metà fermentazione è stata determinata su base densimetrica. Dal termine della fermentazione in poi sono state fatte analisi sia spettrofotometriche che aromatiche in GC-MS a 6 mesi e a 18 mesi dalla svinatura.

Analisi spettrofotometriche

Queste analisi sono state utilizzate per la determinazione del colore e della componente polifenolica. Nello specifico i parametri misurati sono stati:

- Intensità Colorante (IC)
- Tonalità (T)
- Antociani liberi + Complessi TA decolorabili con metabisolfito di potassio (AI+TA)
- Complessi TAT (tannino-antociano-tannino) non decolorabili con metabisolfito di potassio (TAT)
- Flavonoidi Totali (FT)
- Flavonoidi Non Antocianici (FNA)
- Antociani Totali (ANTOT).

Analisi sensoriali

A sei mesi dalla svinatura tutti i vini sono stati degustati dal panel interno del Consorzio Toscana costituito ed addestrato allo scopo.

12. Risultati sezione I

La Sezione 1 è stata messa a punto per determinare la qualità dei cantieri di lavoro più utilizzati nelle aziende viticole toscane che producono vini rossi di qualità elevata.

A causa di problematiche tecnico-organizzative, il primo anno il lavoro è stato svolto su uve Cabernet-Sauvignon, mentre nei 2 anni successivi

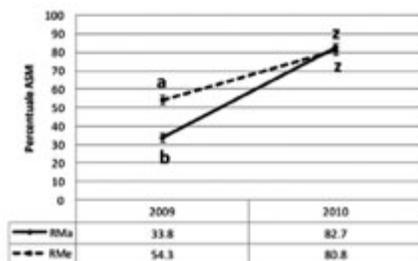
(2009 e 2010) su uve Sangiovese come previsto dal protocollo di ricerca. Saranno discussi qui solo i risultati relativi al Sangiovese.

Effetto della raccolta e della cernita sulla presenza di A.S.M. nelle uve in ingresso in cantina

Fattore raccolta

I dati elaborati statisticamente hanno evidenziato una interazione significativa tra il fattore raccolta e l'anno della vendemmia. Questo sta a significare che i comportamenti misurati nei due anni relativi alla presenza di A.S.M. con i due metodi di raccolta (manuale e meccanica) sono stati diversi. Per questo motivo sono riportati e discussi separatamente (Figura 7).

Fig. 7. Percentuale media di A.S.M. per la vendemmia manuale e meccanica nei due anni di sperimentazione. Lettere diverse all'interno dello stesso anno indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$ in accordo con test di Tukey)



RMA: Raccolta Manuale RMe: Raccolta Meccanica

Nel 2009 è stata evidenziata una differenza significativa fra la raccolta meccanica e la raccolta manuale sulla percentuale di A.S.M. a vantaggio di quella manuale con una differenza media di circa il 20%, mentre nel 2010 le uve raccolte con i due sistemi non hanno presentato differenze significative. Tale comportamento può essere imputato presumibilmente alla diversa qualità delle uve prodotte nei due anni (come già precedentemente riportato) o a strategie operative aziendali diverse.

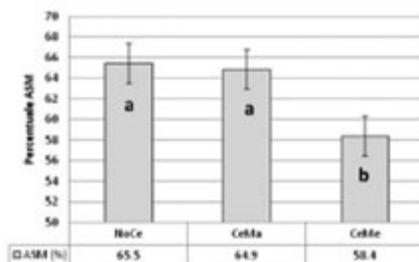
Una possibile spiegazione al fatto che la vendemmia manuale risulti migliore negli anni con un livello di maturazione più elevato è riconducibile al possibile diverso approccio dei vendemmiatori che nel caso di uve di buona maturazione riescono probabilmente ad effettuare una efficace cernita visiva durante la raccolta, individuando i grappoli da eliminare. Negli anni in cui la maturazione è ridotta (2010), tale capacità visiva sembra non essere sufficiente a determinare un effetto positivo sulla riduzione della percentuale degli A.S.M. In ultimo, c'è da

evidenziare che l'operazione di cernita prevendemmia, che probabilmente viene effettuata con maggiore velocità e minore attenzione rispetto all'operazione di raccolta vera e propria, in questo ambito operativo, è risultata avere una minore efficacia influenzando negativamente la raccolta meccanica.

Fattore cernita

Per quanto riguarda l'effetto della cernita, la statistica ha evidenziato come questa incida significativamente sulla percentuale degli A.S.M. L'andamento è stato analogo per i due anni e nel grafico sono quindi riportati i valori medi (Figura 8).

Fig. 8. Percentuali medie di A.S.M. nei due anni di vendemmia per i diversi tipi di cernita. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$ in accordo con test di Tukey)



NoCe: nessuna cernita CeMa: cernita manuale CeMe: cernita meccanica

I dati esposti nella figura 8 mostrano l'inefficacia della cernita manuale sulla percentuale di A.S.M. che realmente entrano in vasca e che rimangono presenti in percentuali del tutto simili ai campioni non cerniti (64,9% contro 65,5%). Tale risultato, se si considerano 2 anni sufficienti a trarre delle conclusioni definitive, è un'indicazione estremamente importante dal punto di vista di gestione operativa aziendale in quanto l'operazione di cernita manuale comporta grossi investimenti di manodopera che alla luce di quanto rilevato risulta del tutto inefficace per quanto riguarda la rimozione degli acini immaturi.

Il sistema di cernita meccanica è riuscito invece ad eliminare una percentuale significativa di A.S.M. migliorando quindi di fatto la qualità delle uve (riduzione media degli A.S.M. di circa il 7%). Questo è confermato dai valori medi di Brix dell'ordine di 22°Bx per la cernita meccanica contro circa 21°Bx per il cernito manualmente e il non cernito.

Il sistema di cernita meccanica produce due masse differenziate, che negli anni di sperimentazione sono state di circa 70% prima scelta e 30% seconda scelta, lasciando inalterate le impostazioni definite dai tecnici dell'azienda. Ciò dipende evidentemente dal grado densimetrico del mo-

sto utilizzato come mezzo di cernita e quindi definibile preventivamente. Tale sistema quindi non ‘pulisce’ tutta la massa ma la divide in due aliquote con diversa qualità. Nelle uve di seconda scelta sono stati misurati una percentuale di A.S.M. pari all’80% e un Brix medio di 20,5. Tale sistema sarà quindi utile in aziende che possono gestire in maniera idonea (anche commercialmente) queste diverse tipologie di uve che ovviamente daranno diversi tipi di prodotto.

Effetto della raccolta e della cernita sul M.O.G.

Fattore raccolta

La statistica ha messo in evidenza un comportamento diverso per i due anni di sperimentazione relativamente alle quantità di M.O.G. misurati nelle uve raccolte manualmente e meccanicamente.

Le differenze rilevate sono state comunque abbastanza piccole con valori di M.O.G. piuttosto bassi rispetto a precedenti rilevazioni (Parenti *et al.* 2005). Nel 2009 è risultata migliore la raccolta meccanica (5,96 g/kg contro 10,61 g/kg della manuale) mentre nel 2010 la raccolta manuale (6,03 g/kg contro 11,91 g/kg della meccanica). Una possibile spiegazione di questo andamento potrebbe essere riconducibile alle diverse tipologie di uve prodotte nei due anni come precedentemente discusso. È presumibile infatti che l’andamento stagionale abbia influenzato non solo la maturazione dei frutti, ma anche la composizione e le caratteristiche fisico meccaniche della parete fogliare e dalle altre parti verdi.

Fattore cernita

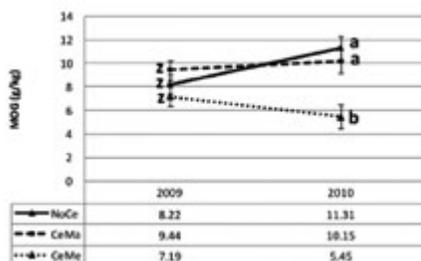
Anche la cernita rispetto ai valori di M.O.G. rilevati ha mostrato andamenti diversi nei due anni di sperimentazione (Figura 9).

Non sono state rilevate differenze significative tra i diversi sistemi di cernita nel 2009, mentre la cernita meccanica ha fornito uve con minore quantità di M.O.G. rispetto alle altre due tesi nel 2010.

La cernita manuale risulta anche per il M.O.G. del tutto inefficace mantenendosi su valori di M.O.G. sempre non significativi rispetto a quelli rilevati nel caso di nessuna cernita. I valori assoluti (non significativi statisticamente) che alcune volte risultano più alti nella cernita manuale rispetto all’uva di partenza sono probabilmente da imputare alla variabilità del campionamento e del sistema di misura adottato.

La cernitrice meccanica si è dimostrata efficace nell’anno 2010 con valori che dimezzano i valori di partenza (no cernita). Presumibilmente le maggiori dimensioni dei frammenti vegetali raccolti insieme all’uva nel 2010 (fattore rilevato visivamente e causato dalla peggiore annata) hanno reso più efficace l’azione di pulizia meccanica della cernitrice meccanica, rendendola significativamente diversa dagli altri tipi di cernita.

Fig. 9. Valori medi delle quantità di M.O.G. misurate nei due anni sulle uve sottoposte a diversi tipi di cernita. Lettere diverse all'interno dello stesso anno indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$ in accordo con test di Tukey)



NoCe: nessuna cernita CeMa: cernita manuale CeMe: cernita meccanica

13. Risultati sezione 2

Si riportano i dati analizzati statisticamente relativi ai parametri studiati sui vini a 6 mesi dalla svinatura. Si ritiene infatti di avere a questo momento una stabilità sufficiente per poter trarre delle indicazioni sugli effetti dei trattamenti studiati.

Vale la pena ricordare che lo scopo di questa linea di ricerca è stato quello di 'pesare' i decrementi qualitativi (e non solo di evidenziarli, anche perché il trend di alcuni di essi risulta ovvio) che si ottengono per le varie tesi e interazioni analizzate in quanto riteniamo che solo attraverso tale quantificazione sia possibile fornire alle aziende dei parametri utili per effettuare scelte operative consapevoli. Sapere ad esempio che con una certa qualità di uva si ha una riduzione di antociani del 5% non è assolutamente lo stesso che sapere che avremo semplicemente una riduzione. Questa indicazione dà il modo di valutare, ammesso ci siano, i costi-benefici delle eventuali contromisure da adottare per migliorare qualitativamente il prodotto di partenza.

Risultati delle analisi spettrofotometriche

L'analisi statistica ha preso in esame ogni parametro analitico suddetto (paragrafo Analisi Chimiche) in relazione con i diversi valori di M.O.G. e A.S.M. aggiunti e le loro eventuali interazioni, ovvero gli effetti combinati dei due fattori studiati.

L'analisi statistica non ha evidenziato in nessun caso interazioni tra M.O.G. e A.S.M. Un primo risultato di questa linea di ricerca è quindi il fatto che i due fattori non interagiscono fra di loro, ma influiscono in maniera indipendente sulle caratteristiche dei vini prese in esame. A livello pratico la ricaduta di questo risultato è che le scelte operative relative al miglioramento o meno di uno dei due parametri, agisce solo ed esclusivamente su

quello. Per tale motivo, i risultati verranno sempre riportati e discussi separatamente per i due fattori.

Influenza del fattore A.S.M.

La maggiore presenza di A.S.M. ha determinato, come era lecito aspettarsi, una diminuzione significativa dei parametri Intensità Colorante, Antociani Totali, complessi instabili costituiti da Antociani Liberi e complessi Tannino-Antociano e complessi stabili Tannino-Antociano-Tannino, mentre non ha avuto influenza sui parametri quali Flavonoidi Totali e Flavonoidi Non Antocianici.

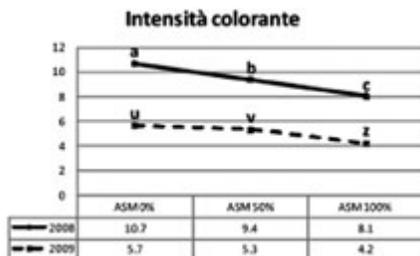
Per quanto riguarda l'Intensità Colorante e il contenuto in Antociani Totali, per entrambi gli anni è stata misurata una diminuzione della loro concentrazione del 20% circa, passando dal livello più basso quello più alto di A.S.M. aggiunti.

Sempre confrontando i vini ottenuti con uve a più bassi valori di A.S.M. con quelle con valori massimi, complessi instabili costituiti da Antociani Liberi e complessi Tannino-Antociano ed i complessi stabili Tannino-Antociano-Tannino sono diminuiti mediamente del 25%.

Il contenuto tannico è apparso invece quantitativamente equivalente per le varie tesi. Probabilmente la tipologia e la qualità dei tannini potrebbe essere diversa ma, vista la tipologia di analisi adottata per questa ricerca, non siamo stati in grado di evidenziarlo analiticamente.

Fra questi parametri a titolo esemplificativo si riporta il grafico dell'Intensità Colorante (Figura 10).

Fig. 10. Media dei valori di Intensità Colorante nei due anni separatamente. Lettere diverse relative allo stesso anno indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$ in accordo con test di Tukey)



All'aumentare della percentuale di acini a scarsa maturazione si osserva una diminuzione dell'Intensità Colorante pari fino al 25% del valore iniziale con un incremento della percentuale di A.S.M. dal 15 al 36% (vendemmia 2008). Nel 2009, con uve sostanzialmente diverse come riportato nella tabella 1 l'effetto dell'ulteriore aggiunta di A.S.M. ha determinato una

diminuzione del colore dei vini che ha seguito lo stesso andamento evidenziato per il 2008.

In entrambi gli anni si è verificato che un aumento di circa il 20% di presenza degli A.S.M. ha determinato un decremento pari a circa il 25% dell'intensità colorante indipendentemente dal quantitativo di acini scarsamente maturi presenti nell'uva di base e quindi dalla qualità di quest'ultima.

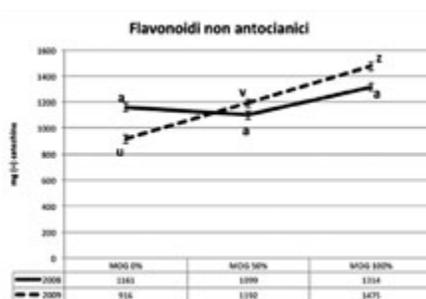
La minore intensità colorante è facilmente giustificata dal minor contenuto in Antociani Totali nei vini a 6 mesi dalla svinatura che presentano sia l'andamento che i decrementi del tutto analoghi all'Intensità Colorante.

Influenza del fattore M.O.G.

La presenza di percentuali più alte di M.O.G. ha determinato un effetto significativo sui complessi Antociani Liberi sommati ai complessi Tannino-Antociano, sui Flavonoidi Totali e sui Flavonoidi Non Antocianici.

Le differenze nel contenuto di Antociani Liberi sommati ai complessi Tannino-Antociano, seppur statisticamente significative sono comunque risultate estremamente piccole in valore assoluto e con significatività solo fra i due valori estremi di aggiunta di M.O.G.

Fig. 11. Media dei valori di Flavonoidi non antocianici nei due anni separatamente. Lettere diverse relative allo stesso anno indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$ in accordo con test di Tukey)



Generalmente si pensa che la 'contaminazione' da M.O.G. possa incidere principalmente a livello della composizione tannica dei vini ed in particolare sulle caratteristiche organolettiche legate a questi composti. La figura 11 mostra che, all'aumentare dei livelli di M.O.G. (M.O.G. 0%=0g/kg; M.O.G. 50%=15g/kg; M.O.G. 100%=30g/kg), si è avuto un aumento significativo nei livelli di Flavonoidi non Antocianici (ovvero tannini) nell'anno 2009, mentre tale aumento non è stato significativo nel 2008, sebbene le percentuali di M.O.G. aggiunto fossero esattamente le stesse. La differenza tra i due anni di sperimentazione sta nel fatto che nel 2009 il M.O.G. aggiunto sotto forma di raspi (come l'anno precedente) è stato preventivamente smi-

nuzzato, pratica non adottata invece l'anno precedente. Lo sminuzzamento ha naturalmente causato un aumento della superficie di contatto con il vino e quindi una maggiore possibilità di rilascio delle sostanze polifenoliche presenti nei raspi. Nel 2009 infatti si è avuto un aumento in Flavonoidi Totali di circa il 50% nelle tesi con aggiunta di M.O.G. al 100% (30g/kg) rispetto a quelle con M.O.G. pari a zero. Questo dato porta a concludere che è necessario porre attenzione non solo alla quantità di M.O.G. presente nelle uve, ma soprattutto alle dimensioni di tale M.O.G.: più i frammenti risultano piccoli e quindi con più superficie di contatto e maggiore sembra essere la loro influenza sulla composizione del vino. Da notare infine che i frammenti piccoli, che appaiono quindi così pericolosi, sono sicuramente quelli più difficili da togliere sia con i sistemi di cernita manuali che probabilmente con quelli meccanici.

I flavonoidi totali essendo costituiti anche dai flavonoidi non antocianici risultano avere lo stesso andamento di quest'ultimi che rappresentano, in questo caso, la gran parte di questa classe di composti imponendone quindi il trend.

Risultati delle analisi chimiche dei vini

Alla svinatura i vini ottenuti sono stati analizzati chimicamente per la determinazione del grado alcolico, del pH, dell'acidità totale, volatile e per il controllo di parametri quali il contenuto in SO₂ libera e totale e il contenuto in acido malico per verificare l'eventuale avanzamento della fermentazione malo-lattica.

Qui di seguito sono riportati graficamente i risultati dell'analisi della varianza relativi al titolo alcolometrico, all'acidità totale e al pH dei vini derivanti dalle tesi sperimentali.

Sia i parametri A.S.M. che M.O.G. sono risultati avere una influenza significativa nel determinare il titolo alcolometrico volumico dei vini ottenuti al variare delle relative concentrazioni. Come era prevedibile, all'aumentare della concentrazione degli acini scarsamente maturi, sono stati ottenuti vini con gradazione alcolica inferiore. Anche in questo caso è possibile quantificare che, con un aumento medio pari a circa il 20% nella presenza di A.S.M. si è ottenuta una gradazione alcolica media del 7% più bassa rispetto alla vinificazione di sole uve mature.

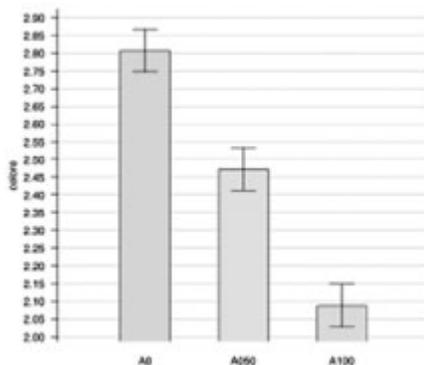
Anche le quantità di M.O.G. aggiunto hanno influenzato la gradazione alcolica. Questo dato, è confermato per entrambi gli anni di sperimentazione seppure le differenze siano relativamente piccole, con una riduzione di circa il 0,4 gradi alcolici sul totale prodotto (3% espresso in percentuale), passando da M.O.G. 0 g/kg a M.O.G. 30 g/kg. Una possibile ipotesi, ovviamente da riconfermare con successive prove mirate, farebbe supporre che la presenza del M.O.G. riduca l'efficienza del processo fermentativo (o della riproduzione cellulare) causando una minore produzione di alcol.

Risultati significativi relativi alle degustazioni sui vini

Colore

Il parametro si riferisce all'intensità del colore percepita visivamente. Come si osserva dal grafico nella figura 12, la percentuale di A.S.M. ha avuto una influenza altamente significativa su questo parametro. Percentuali massime di A.S.M. hanno determinato un colore meno intenso con valori medi assegnati dai giudici nella scala da 1 a 4 di circa 2.1 contro 2.8 per i vini ottenuti da uve senza nessuna aggiunta di A.S.M. Tale risultato trova diretta conferma con le analisi spettrofotometriche inerenti al colore discusse precedentemente.

Fig 12 Media dei valori assegnati dai giudici del panel relativi al colore dei vini (vendemmia 2008)



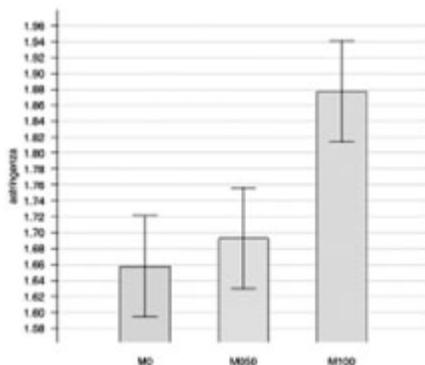
A0=A.S.M. 0%; A50=A.S.M. 50%; A100=A.S.M. 100%

Astringenza

Astringenza, intensità tannica e secchezza si riferiscono a sensazioni tattili legate molto alla presenza di composti tannici. Come riportato nei grafici nella figura 13 si osserva una significatività del fattore M.O.G. sul parametro astringenza, dato dalla maggiore presenza di tannini provenienti dall'aggiunta di raspi. Tale dato conferma le differenze evidenziate per i tannini (Flavonoidi Non Antocianici) rispetto al parametro M.O.G. discusse precedentemente.

I risultati delle analisi organolettiche del secondo anno di sperimentazione (2009) relativi all'intensità di colore percepita e astringenza hanno confermato i risultati ottenuti durante il primo anno di prove.

Fig. 13 Media dei valori assegnati dai giudici del panel relativi all'astringenza dei vini



M0=M.O.G. 0%; M50=M.O.G. 50%; M100=M.O.G. 100%

14. Conclusioni

Il progetto di ricerca inerente alla “Tecniche di raccolta, pulizia e cernita delle uve” sviluppatosi in tre anni ha portato a diverse considerazioni che crediamo possano utilmente contribuire alla messa a punto aziendale dei sistemi di raccolta e cernita delle uve.

Pur non volendo dare valore assoluto ai risultati ottenuti, in quanto comunque relativi ad alcune realtà aziendali specifiche, sembrano particolarmente importanti le indicazioni sulla raccolta meccanica che, se effettuata su vigneti ben preparati, garantisce praticamente la stessa qualità della vendemmia manuale con evidenti vantaggi di economicità e di tempestività di intervento.

Per quanto riguarda i sistemi di cernita appare estremamente efficace la cernita meccanica che migliora sensibilmente la qualità delle uve, prodotto di partenza del processo enologico. C'è da considerare però che tale sistema, oltre a rappresentare per l'azienda un investimento piuttosto importante, produce due tipologie di uva e quindi risulta essere sostenibile in realtà aziendali di medio-grandi dimensioni dove diverse varietà di vino trovano comunque collocazione. La cernita manuale risulta altresì poco o pochissimo efficace e quindi dettata più da scelte di 'tendenza' e/o di marketing che non da un reale miglioramento della qualità delle uve in ingresso in cantina.

Per quanto riguarda l'azione dei fattori depauperanti le uve, la ricerca è riuscita a quantificare gli effetti sui vini prodotti di quantità crescenti dei 'contaminanti' esaminati (M.O.G. e A.S.M.), fornendo quindi un quadro di lettura più definito delle relazioni esistenti fra materia prima e vino

prodotto. Riteniamo che tali valutazioni possano utilmente contribuire alle scelte operative aziendali in quanto i protocolli seguiti hanno simulato in tutto e per tutto una situazione operativa industriale.

Bibliografia

- Blouin J., Guimberteau G. (2000), *Maturation et maturité du raisin*, Feret Ed., Bordeaux, 14: 356-370.
- Clary Carter D., Steinhauer Robert E., Frisinger James E., Pepper. Thomas E. (1990), *Evaluation of machine- vs. hand-harvested Chardonnay*, «Am. J. Enol. Vitic.», 41, 2: 176-181.
- Coletta A., Caputo A.R., Catalano V. (2002), *Costs of manual and mechanical grape harvest in some viticultural zones of South of Italy*, *Vitis vinifera L.*, «Vignevini», 3: 50-59.
- Cutler L., (2008), *Industry Roundtable: Winemaking with Mechanically Harvested Grapes*, Wine business monthly, 15 novembre 2008.
- Falconer R., Liebich B., Hart A. (2006), *Automated color sorting of hand- harvested Chardonnay*, «Am. J. Enol. Vitic.», 57, 4: 491-496.
- Kontoudakis N., Esteruelas M., Fort F., Canals J.M., De Freitas V. e Zamora F. (2011), *Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality*, «Food Chemistry», 124 (3): 767-774.
- Marone E., Rotundo A., Scaglione G. (2003), *Winegrapes mechanical harvest in southern Italy. Quantitative and qualitative aspects*, «Riv. Vitic. Enol.», 2/3: 3-12.
- Martelli E. (2006), *Raccolta meccanica e qualità del vino: influenza del M.O.G., delle ossidazioni e dell'uva a bassa maturazione*, Tesi di Laurea, D.I.A.F. – Università degli Studi di Firenze: 48-49.
- Morris J.R. (1998), *Factors influencing grape juice quality*, «HortTechnology», 8(4): 471-478.
- Pandolfi de Fernandez C., Quini de Andfa C., Romano de Panelia E., Marziani R. (2000), *Incidence of the mechanical harvest of grape on the relation grape/wine*, «Viticoltura-Enologfa-Profesional (Espana)», May-Jun 68: 25-36.
- Parenti A., Spinelli S., Di Blasi S. (2007), *Mechanical harvesting quality: Antinori case study, Tignanello estate*, «The Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker», 522: 27-31.
- Parenti A., Spugnoli P., Baldi F., Vieri M. (2005), *Vendemmia meccanica, M.O.G. e qualità del vino. L'ingegneria agraria per lo sviluppo sostenibile dell'area mediterranea*, Codice lavoro: 3063,
- Petrucci V.E., Siegfried R. (1976), *The Extraneous Matter in Mechanically Harvested Wine Grapes*, «Am. J. Enol. Vitic.», 27: 40-41.
- Scaglione G., Pasquarella C., Santitoro A., Nadal M. (2002), *Vendemmia meccanica: effetti su produzione e qualità del Fiano di Campania*, «Vignevini», 1/2: 50-52.
- Troncoso Javier C., Riquelme Jorge S., Laurie Felipe G., Abarca Juan G. (2002), *Evaluation of the relative advantages of mechanical harvesting of wine grapes in Central Chile*, «Agricultura técnica (Chile)», 6, 2 (2): 310-320.

Massimizzazione del potenziale enologico per mezzo di diverse tecniche di vinificazione

L. Calamai*, F. Valori, I. Lozzi, O.L. Pantani

I. Introduzione

Uno degli obiettivi enologici principali nella moderna produzione vinicola è quello di ottenere e preservare il massimo livello qualitativo rispetto alla potenzialità intrinseca delle uve di partenza. Varie tecniche di vinificazione e affinamento possono essere applicate allo scopo di ottenere un risultato qualitativo diverso. Questa scelta include tecniche prefermentative quali gestione delle uve alla raccolta, temperature di conservazione, trattamenti termici ed enzimatici, gestione delle fermentazioni – temperature di fermentazione, scelta dei ceppi di lievito, strategie nutrizionali e ossigenazioni – e infine, riguardo alle vinificazioni in rosso, tecniche di estrazione del colore quali: durata della macerazione, frequenza e durata di follature e rimontaggi, durata della macerazione postfermentativa, etc.

Nella maggior parte dei casi la combinazione con cui tali tecniche vengono associate è patrimonio dall'esperienza di cantina.

Nella durata complessiva di 3 anni, la linea di ricerca B.0.4, ha affrontato la valutazione di alcune tecniche di vinificazione su uve di cultivar Sangiovese in purezza, per la produzione di vini di alta gamma. Fra le varie possibili tecniche applicabili alla produzione di tali vini – *temperatura di fermentazione*, utilizzo di legno, inoculi di lieviti diversi, uso di tannini e coadiuvanti enologici, inoculi scalari, fermentazioni a fasi separate, rimontaggi, *salasso*, *macerazione prefermentativa*, macerazione postfermentativa, governo, *deléstage* (Ribéreau-Gayon *et al.* 2003) – sono state messe a confronto diverse tecniche di macerazione prefermentativa, due diverse temperature di fermentazione e la tecnica del salasso. Queste scelte sono scaturite da alcune considerazioni di carattere enologico.

* Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali, del Suolo e dell'Ambiente Agroforestale, Università degli Studi di Firenze, Italia.

1.1 La temperatura di fermentazione

Questo fattore condiziona diversi altri parametri che influiscono sulla qualità del vino finito quali la velocità di fermentazione, le capacità riproduttive e fermentative dei diversi ceppi di lievito, la produzione e rilascio di acetaldeide, acido piruvico e di molecole del colore, la resa in alcol – con fermentazioni a temperatura bassa, si ha solitamente una maggiore resa in alcol, una minore formazione di metaboliti secondari ed una minore produzione di glicerolo – e una maggiore concentrazione di prodotti volatili in fermentazioni che avvengono a temperature più basse.

Per questo le variazioni della temperatura sono di norma utilizzate per ottenere diverso contenuto di sostanze estrattive, aromatiche e prodotti secondari della fermentazione. Generalmente il controllo che si esercita sulla temperatura nelle fermentazioni in rosso è volto al contenimento della sola temperatura massima sotto i 30°C, e gli interventi di regolazione, quando disponibili in cantina, sono effettuati al solo scopo di impedire blocchi di fermentazione. Nelle vinificazioni in bianco è invece noto come le basse temperature siano necessarie per ottenere quadri aromatici fruttati e ricchezza aromatica.

1.2 Macerazione prefermentativa (MPF)

Per quanto riguarda i vini bianchi negli ultimi anni sono state messe a punto delle tecniche ormai consolidate di utilizzo di gas inerti – azoto liquido o anidride carbonica allo stato solido – per il raffreddamento e la protezione dei mosti dalle ossidazioni. Anche per quanto riguarda i vini rossi si sono avute recentemente sperimentazioni su cultivar internazionali e nazionali come Pinot nero, Merlot, Cabernet, ed altri. In generale questa tecnica prevede l'uso di temperature comprese in un intervallo tra i 5 e i 16°C, con lo scopo principale di mantenere la fase prefermentativa e di evitare l'avvio di fermentazioni spontanee (non desiderate), più che quello di sfruttare l'effettiva azione delle frigoriferie erogate. Inoltre la macerazione a freddo è stata ottenuta generalmente con l'uso di scambiatori di calore, e le esperienze che riguardavano l'aggiunta diretta di criogeni al mosto o al pigiato si sono generalmente limitate all'uso di CO₂ solida – neve carbonica o ghiaccio secco in pellet. Nello specifico della cultivar Sangiovese, nonostante la tecnica della macerazione prefermentativa a freddo abbia recentemente trovato un fiorente utilizzo e sviluppo, in termini sperimentali i risultati sono ancora molto lontani dall'essere definitivi ed universalmente accettati.

La MPF rappresenta nella sua semplicità concettuale una tecnica con molte variabili che possono condizionare fortemente il risultato dell'operazione. Temperatura, tempo di esposizione, uso eventuale di un criogeno, ne sono solo un semplice esempio. In generale si considera la tecnica

di MPF come un allungamento della fase di macerazione in fase acquosa, grazie alle basse temperature. Questa tecnica quindi favorisce gli scambi tra buccia e mosto in assenza di alcol i quali determinano l'estrazione preferenziale del colore senza avere un'estrazione spinta dei tannini dei vinacoli solitamente non graditi in elevate concentrazioni.

I vini ottenuti con la tecnica MPF generalmente presentano diminuzione dell'acidità totale, netto aumento dei composti fenolici, intensità colorante maggiore, miglioramento nell'estrazione di tannini ed antociani, miglioramento delle caratteristiche organolettiche non correlato ad una maggiore estrazione polifenolica, vini più durevoli e persistenti, struttura più rotonda e armoniosa, miglior equilibrio, note più fruttate, migliore estrazione dei composti presenti nelle bucce.

1.3 Crioestrazione

Questa tecnica consiste nel sottoporre ad un trattamento diretto l'uva diraspata non pigiata, spruzzando sulla superficie un criogeno a bassissima temperatura, estremizzando quindi di fatto il concetto di macerazione prefermentativa. Per aumentare l'efficienza del trattamento il mosto derivante dall'ammestamento viene separato prima del trattamento. Il principale scopo della crioestrazione è quello di favorire l'estrazione in fase prefermentativa delle sostanze contenute nella buccia, in particolare polifenoli ed aromi. Dopo alcuni anni di studio sulla tecnica della crioestrazione prefermentativa (Parenti *et al.* 2004) si è giunti all'utilizzo dell'azoto liquido come criogeno e alla messa a punto di una metodica che lavora a fasi separate al fine di ottimizzare l'utilizzo delle frigoriferie erogate. Come altre tecniche volte a favorire l'estrazione, anche in questo caso l'efficacia del trattamento è fortemente legata alla tipologia dell'uva in ingresso. Per questo motivo, l'idea ingegneristica di base è quella di fornire una macchina che tratti quasi esclusivamente la buccia e che sia in grado di modulare l'intensità del trattamento. Dopo alcuni anni di prove con macchine diverse, si è giunti alla versione utilizzata per il progetto Toscana costituita da un tunnel di trattamento in cui l'uva diraspata e sgrondata avanza su di un nastro trasportatore.

L'erogazione del criogeno avviene tramite uscita dell'azoto liquido da tre barre forate posizionate in prossimità dell'uscita del tunnel. Nelle condizioni ottimizzate finali il trattamento richiede:

- Utilizzo di 250-300g di N₂/kg di uva.
- Costo del trattamento di circa 5€ cent/kg di uva.

Analoghe ricerche riportate nella letteratura scientifica sono state condotte a micro scala di laboratorio. In questa ricerca si è scelto invece di operare a meso-scala di cantina al fine di ottenere dati trasferibili alla pratica e

alla gestione aziendale. È noto infatti che lo scale-up delle tecniche provate nei microcosmi alle condizioni di cantina si traduce frequentemente in una serie di insuccessi.

1.4 Salasso

In generale la tecnica del salasso consiste nel sottrarre una certa quantità di mosto dalla vasca di fermentazione subito dopo la pigiadiraspatura, in modo che, col proseguimento della macerazione/fermentazione, il mosto rimasto si arricchisca di sostanze aromatiche e di fenoli, giungendo infine ad ottenere un vino rosso più concentrato e più strutturato. In generale il salasso favorisce la concentrazione dei composti polifenolici delle bucce in una quantità di mosto minore, il quale potrà risultare più colorato e con più alte concentrazioni di sostanze fenoliche rispetto alla fermentazione tradizionale. I vini ottenuti possiedono normalmente un elevato contenuto in sostanze estrattive, un diverso equilibrio organolettico e aromatico.

2. Parte sperimentale

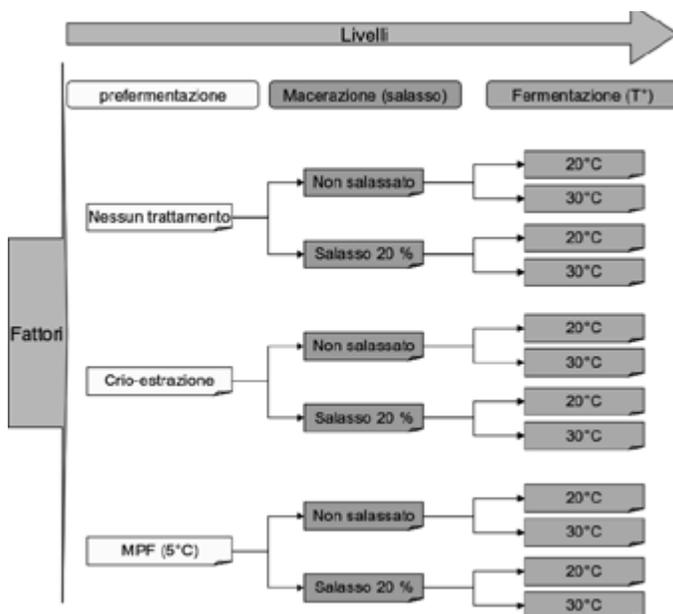
Le variabili prese in considerazione sono quindi state: la temperatura di fermentazione, i trattamenti prefermentativi di MPF e crioestrazione, e il salasso. Poiché esiste la possibilità che gli effetti di tali trattamenti possano fra loro interagire, è stato adottato un disegno sperimentale in grado di mettere in evidenza queste sinergie, dette interazioni, quando esse siano presenti, in aggiunta all'effetto dei singoli trattamenti. Un tale schema sperimentale (detto a fattori fissi) può essere ottenuto combinando tutti i livelli di tutte le variabili, e prevedendo un adeguato numero di repliche per ogni singola combinazione.

Lo schema sperimentale del progetto è riassunto nello schema nella figura 1.

Ogni tecnica (*fattore*) oggetto di sperimentazione ha uno o più *livelli*. Incrociando i fattori e i livelli si ottengono 12 combinazioni diverse (tesi sperimentali). Ogni tesi è stata ripetuta in triplo (12×3), per un totale di 36 tesi.

Poiché è noto che i risultati di ottenuti a scala di micro vinificazione (es. 100 L) producono risultati che sono difficilmente ripetibili alla scala di cantina, si è scelto di implementare il disegno sperimentale ad una scala di 10 hL in grado di garantire un trasferimento dei risultati alla pratica enologica. Ciò ha richiesto 36 serbatoi di fermentazione in acciaio inox da 10 hL termocondizionati e accessoriati con un sistema di controllo e gestione computerizzata di temperature e rimontaggi. La scala di lavoro scelta ha chiaramente influenzato la quantità di uva necessaria ogni anno per effettuare l'esperimento (circa 320 q.li di uva raccolta ogni anno per avere i serbatoi riempiti all'80%).

Figura 1. Disegno sperimentale della linea B4

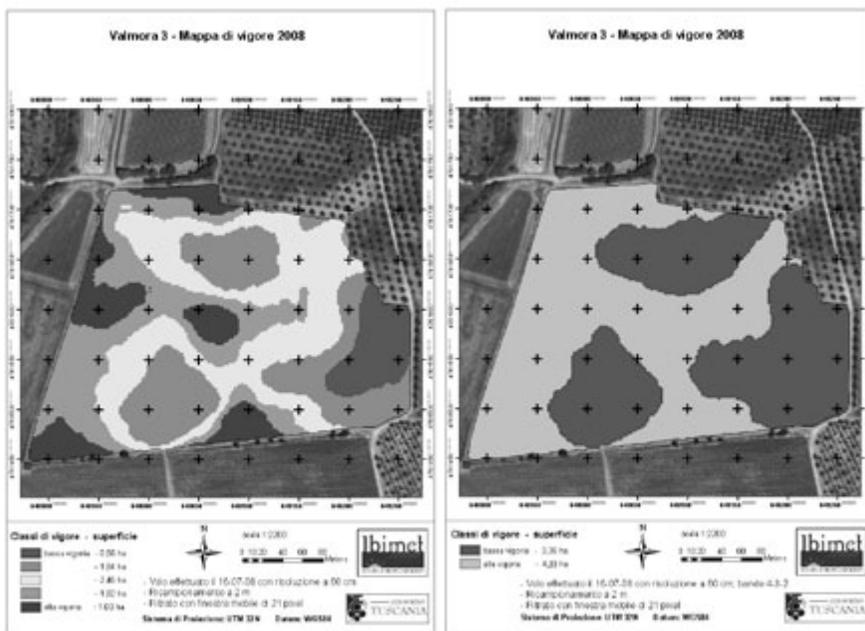


2.1 Raccolta delle uve

Per effettuare l'esperimento alla scala scelta era necessario disporre di una grande quantità di uva (320 q.li), il che ha posto il quesito di come ottenere l'omogeneità di un così grande quantitativo, in modo da non attribuire differenze nella qualità dei vini ottenuti con i vari trattamenti alle differenze delle uve in ingresso. Assumendo una produttività media di 70 q.li/ha, sarebbero necessari circa 5 ettari di vigneto per portare a termine l'esperimento. Inoltre, non essendo possibile raccogliere manualmente tutta la quantità di uva in un solo giorno (anche in base alla ricettività della cantina), la vendemmia è stata suddivisa in tre giorni diversi. L'uva raccolta nei tre giorni non poteva tuttavia essere considerata come una vera replica dello stesso trattamento provenendo da zone diverse del vigneto, con vigoria e grado di maturazione diversa, così come diverse erano le condizioni ambientali della raccolta. Per questo motivo per ogni giorno di raccolta sono state riempite 12 vasche corrispondenti ad una replica di tutti gli incroci dei fattori sperimentali. Per assicurare almeno giornalmente l'omogeneità delle uve si è suddiviso il vigneto secondo mappe di vigoria. Tali mappe sono state ottenute sulla base della valutazione degli indici di NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) ricavati da immagini acquisite con rilievi aerei effettuate nel luglio

precedente alla raccolta, grazie alle quali sono state individuate le zone a diversa vigoria vegetativa in 5 classi diverse. Per verificare l'effettiva corrispondenza delle mappe di vigoria con la qualità dell'uva, sono stati effettuati diversi rilievi di campo prima dell'inizio della vendemmia campionando le zone di alto e basso vigore e misurando il grado zuccherino delle uve. Questo al fine di poter raccogliere uva omogenea per l'intero progetto ma anche e soprattutto di mantenere lo stesso rapporto di alto/basso vigore nei diversi giorni di raccolta. La superficie totale campionata sulla base dei risultati ottenuti in campo e con le mappe di vigore (in questo caso elaborate e suddivise in sole due classi) sono state riportate direttamente sui vigneti mediante nastro fettucciato. L'utilizzazione delle mappe a 5 classi di vigoria avrebbe complicato infatti eccessivamente le operazioni di gestione del cantiere di vendemmia. Le mappe di vigore a 5 e 2 classi sono riportate nelle figure 2 e 2a.

Figure 2 e 2a. Mappe di vigore a 5 e a 2 classi utilizzate per la randomizzazione delle uve



Ciò ha permesso di ottenere durante la vendemmia uve separate in cassette provenienti da zone del vigneto ad alto o basso vigore; mediante randomizzazione delle due tipologie di uva raccolte sono state ottenute masse omogenee destinate al riempimento dei diversi serbatoi. Le aree dei vigneti fisicamente riportate in campo sono state poi suddivise in zone di raccolta per i 3 giorni di vendemmia in aree con percentuali di alto/

basso vigore identiche e con la stessa quantità di uva da vendemmiare giornalmente.

Le cassette raccolte con le due tipologie di uva sono state poi riversate in bins da 5 hL nelle proporzioni definite, in maniera randomizzata. Questo sistema ha permesso di ottenere una serie di bins dal contenuto di uve omogeneo diminuendo la probabilità di confondere l'effetto dei trattamenti. Questa procedura è stata ripetuta nei tre giorni e nei tre anni di sperimentazione.

Campionamenti giornalieri sono stati effettuati dall'apposito assaggiavino di ogni vasca mediante lo stesso protocollo con una identificazione univoca della vasca, data del prelievo e chiavi di codifica corrispondenti alle diverse fasi del processo – fermentazione, svinatura, pressati, etc.

Non essendo possibile effettuare le analisi in tempo reale i campioni prelevati sono stati addizionati di un composto antifermentativo (NaF, 0,2 % aggiunto in polvere).

Le vials campionate giornalmente sono state centrifugate per eliminare il deposito solido e suddivise in diverse aliquote a seconda delle diverse analisi da effettuare.

2.2 Vinificazione

L'uva, proveniente dalle zone di raccolta in bins di 4 q.li di capienza tramite camion refrigerato, a fine giornata viene trasferita in un locale refrigerato (15°C) in modo da poterla lavorare la mattina seguente.

Dopo pigiadiraspatatura, i bins contenenti il pigiadiraspatato sono stati pesati, assegnati al serbatoio in maniera randomizzata, in modo da rendere casuali eventuali differenze dovute all'uva tra le varie tesi, e immediatamente solfitati (15 g/q.le metabisolfito di potassio).

Le vasche delle tesi con temperatura di fermentazione a 20°C o 30°C sono state mantenute a tali temperature mediante controllo elettronico per tutta la durata della fermentazione tumultuosa. Il pigia-diraspatato per il trattamento MPF è stato portato a +5°C entro le vasche stesse mediante sistema di raffreddamento computerizzato e mantenuto a +5°C per 48 ore, dopodiché riportato a +20°C e inoculato dei lieviti.

Nelle tesi sottoposte a salasso i serbatoi sono stati completamente riempiti con il pigiadiraspatato e subito portati al livello degli altri (da 10 a 8 hL) togliendo solamente la frazione liquida portando così il rapporto bucce/liquido all'interno della vasca dal normale 30:70%, a circa 50:50%. Il trattamento di criomacerazione prefermentativa (CRIO) è stato effettuato con il crio-estrattore sopra descritto della ditta Parsec, funzionante ad azoto liquido. Le uve diraspatate, deposte in monostrato su di un tapis-roulant in maglia d'acciaio inox, vengono fatte avanzare in un tunnel dove l'azoto liquido viene spruzzato a pressione sulla superficie degli acini, causando uno 'shock col freddo' delle cellule dell'epidermide. Successivamente vengono pigiate e introdotte nelle vasche di fermentazione.

La MPF è stata ottenuta raffreddando il pigiadiraspato immediatamente dopo il riempimento delle vasche mediante lo scambio termico delle camicie refrigeranti fino alla temperatura di 5°C, alla quale sono state lasciate per un periodo di 48 ore. Successivamente la temperatura è stata riportata rapidamente a 20 o 30°C (a seconda della tesi prevista).

Alla fine della giornata le vasche sono state inoculate con lieviti secchi attivi (Lalvin EC 1118, alla dose di 28 gr/q.le). È seguito un rimontaggio per omogeneizzare l'inoculo, e, per tutta la durata della fermentazione, sono stati eseguiti rimontaggi di 200 litri ciascuno, con frequenza variabile a seconda dell'andamento della fermentazione. I dettagli delle frequenze e durate dei rimontaggi sono riportati sul sito web del progetto (www.consorziotuscania.it, 05/12). Dopo 14 giorni le vasche sono state svinate. Da ogni serbatoio sono stati ottenuti circa 450 litri di vino fiore e 50 litri di pressato. I vini pressati sono stati riuniti per tesi (3 pressati → 1 tesi), mentre il vino fiore (100 L) è stato conservato in cella climatica a 20°C per indurre la fermentazione malo-lattica. Dopo la stabilizzazione per 12 mesi il vino è stato imbottigliato.

Ulteriori dettagli del protocollo di vinificazione sono riportati in sul sito web del consorzio Toscana (http://www.consorziotuscania.it/data/files/finale/1_Linea_B4_Dssnp_Relazione_finale.pdf, 05/12).

2.3 Analisi di mosti e vini

Le analisi effettuate durante la fermentazione e nel prosieguo della maturazione dei vini hanno riguardato l'evoluzione della componente del colore e del profilo aromatico. Per l'analisi del colore si è usato un metodo spettrofotometrico che, a partire dallo spettro UV-visibile del vino, ricava il contenuto in antociani sulla base dell'intensità del picco a 520 nm e il contenuto in polifenoli totali alla misura del picco emerso a 280 nm. (Di Stefano e Cravero 1990). Inoltre, sottraendo il contributo dei composti antocianici a 280 nm – calcolato sulla base delle assorbanze a 520 nm, mediante un opportuno fattore di conversione – è possibile calcolare la concentrazione dei polifenoli non antocianici. Poiché per i vini di alta gamma appare interessante la frazione del colore stabilizzata, sono state misurate le intensità coloranti dopo trattamento decolorante con SO₂. È noto infatti che i pigmenti coloranti stabilizzati sono insensibili alla decolorazione (Somers 1982) e in un recente studio (Versari *et al.* 2008) è stata confermata una elevata e significativa correlazione con la determinazione quantitativa mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) dei complessi tannini-antociani e i dati ottenuti per misura del colore dopo decolorazione con SO₂. Per la determinazione del profilo aromatico è stato messo a punto un metodo di estrazione e concentrazione delle componenti volatili dei campioni mediante la tecnica della microestrazione in fase solida dallo spazio di testa dei campioni di vino e mosto (HS-SPME),

successiva separazione degli analiti mediante gascromatografia e rivelazione per spettrometria di massa (GC-MS). Su circa trenta composti identificati è stata eseguita un'analisi quantitativa con costruzione di curve di calibrazione con standard chimici ed impiego di standards interni deuterati. Ulteriori dettagli del metodo sono riportati sul sito web del consorzio Tuscania (http://www.consorziotuscania.it/data/files/finale/1_Linea_B4_Dssnp_Relazione_finale.pdf, 05/12).

2.4 Elaborazione statistica dei risultati

Lo schema sperimentale prevede lo studio delle interazioni dei diversi trattamenti, al fine di valutare se eventuali differenze significative riscontrate siano sinergiche o competitive su un dato parametro studiato mediante un approccio statistico di analisi della varianza (ANOVA), sia sui vini ottenuti alla svinatura sia durante la fase di maturazione ed affinamento.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati raccolti durante la fermentazione è stato tuttavia elaborato un diverso approccio statistico, che fosse in grado di confrontare gli andamenti nel tempo, mediante un modello a contrasti funzionali.

I dati sul profilo aromatico contengono informazioni sui molti composti aromatici presenti, quindi si è resa necessaria una sintesi per evidenziare le differenze fra i trattamenti e/o i livelli di trattamento. Questi dati quantitativi sono stati sottoposti ad analisi delle componenti principali (PCA), in modo da costruire delle variabili latenti (PCA scores) sulla base delle quali procedere ad una analisi discriminante lineare (LDA) capace di evidenziare le differenze che esistono fra le tesi adottate. Con questo approccio si possono prendere in considerazione tutti i composti assieme – ciascuno pesato per la propria importanza – e valutare la differenza complessiva nel quadro dei composti volatili risultanti dalle varie tesi.

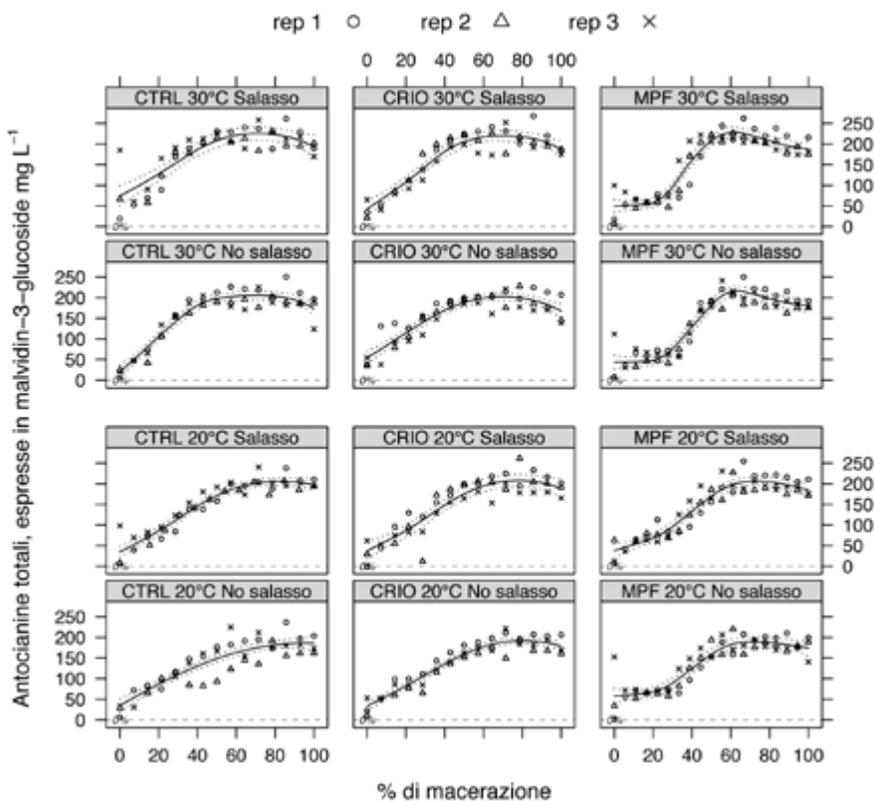
I composti che sono più importanti nella discriminazione vengono ricavati dai cosiddetti 'loadings' delle componenti principali. Inoltre la procedura LDA viene validata mediante la cosiddetta 'leave one out' o 'jackknifed classification': viene cioè considerato un campione alla volta come incognito, dopo aver costruito il modello di classificazione, e riattribuito ad uno dei gruppi. Tanto più alta risulterà la percentuale di classificazione, tanto migliore sarà il modello di classificazione (Beebe *et al.* 1998).

3. Risultati e Discussione

3.1 Evoluzione dei parametri del colore durante la fermentazione

Le uve dell'annata 2008 si presentavano di buona qualità e con buona estraibilità del colore. Durante la trasformazione del mosto in vino si è se-

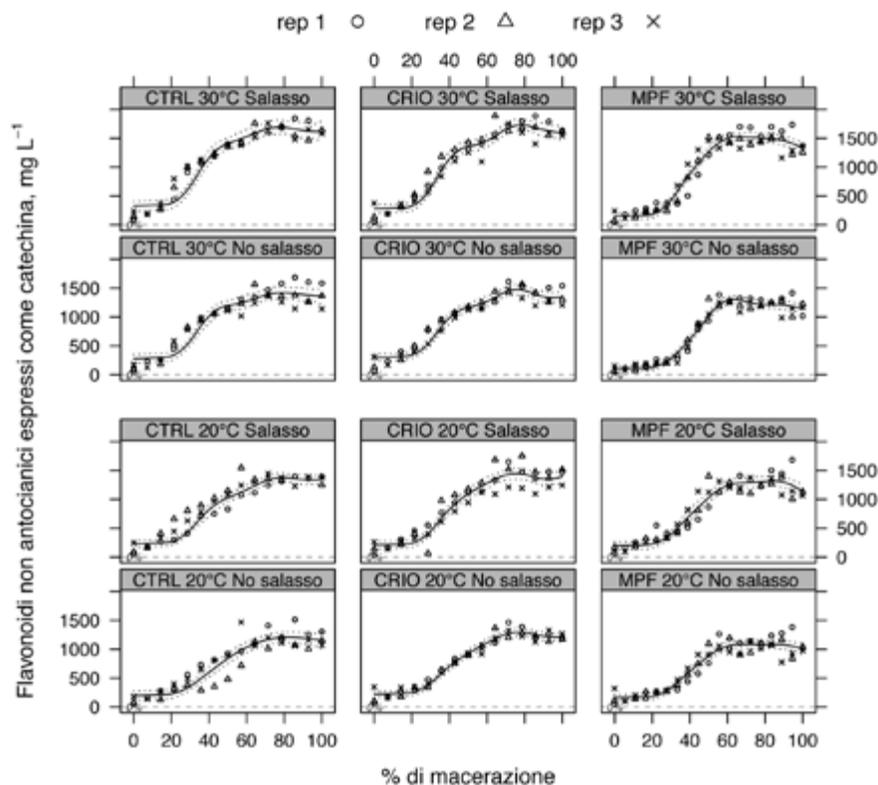
Figura 3. Cinetica di estrazione degli antociani totali durante la fermentazione



guita la dinamica della concentrazione delle componenti polifenoliche colorate e non colorate. Per gli antociani totali, si è osservato un andamento di tipo sigmoide nel tempo, con un aumento che raggiunge un massimo prima della svinatura, a cui segue una diminuzione della concentrazione di antociani totali alla svinatura. Un analogo andamento viene riscontrato per i polifenoli non antocianici. Gli andamenti degli antociani totali e delle componenti polifenoliche non colorate sono riportati nelle figure 3 e 4, rispettivamente.

Nelle tesi MPF si osserva un ritardo della estrazione dei polifenoli e antociani probabilmente a causa del periodo in cui il mosto viene mantenuto a 5°C in cui si ha poca estrazione del colore. Questo dimostra che per il Sangiovese l'estrazione del colore avviene molto lentamente a basse tem-

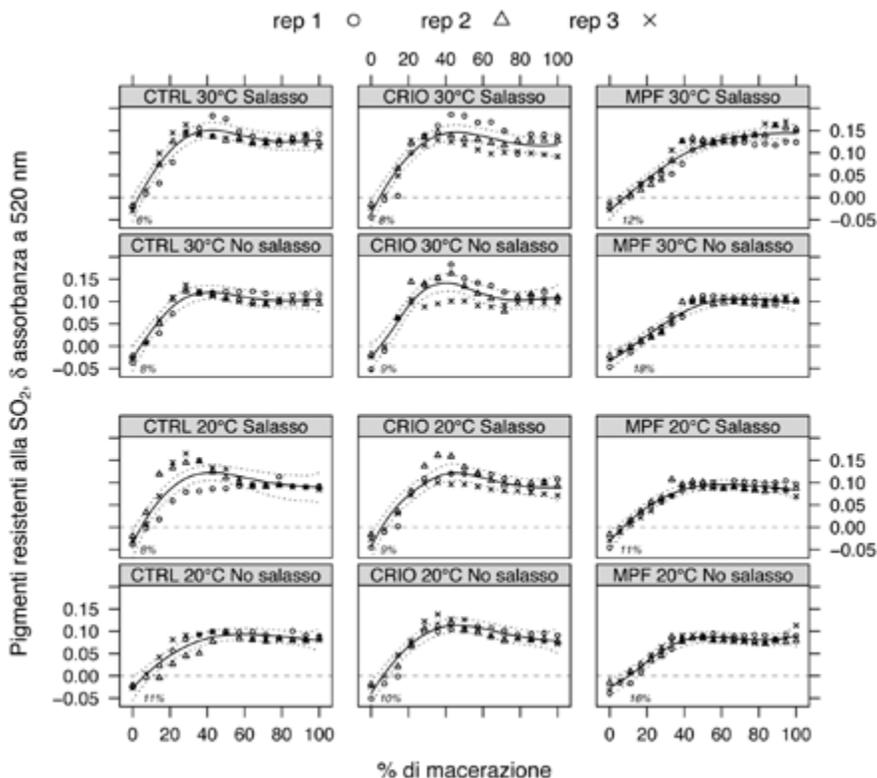
Figura 4. Cinetica di estrazione dei polifenoli non antocianici durante la fermentazione



perature. Nelle tesi CRIO si ha invece una solubilizzazione del colore più rapida, analoga a quella dei relativi controlli, tuttavia la concentrazione finale sembra non essere influenzata da questi trattamenti. Le concentrazioni minori di polifenoli e antociani sono risultate quelle delle tesi condotte a 20°C né salassate né trattate in prefermentazione. Da notare inoltre che anche nei trattamenti che permettono di ottenere una maggiore estrazione durante la fermentazione, si osserva una successiva perdita che vanifica alla svinatura, l'effetto dei trattamenti. Probabilmente, interventi di stabilizzazione del colore potrebbero permettere di capitalizzare questi guadagni.

Un andamento simile si riscontra anche nella concentrazione dei TAT (Figura 5) dove soltanto nelle prove sottoposte a MPF si ha un progressivo aumento dei complessi TAT fino alla svinatura.

Figura 5. Concentrazione dei complessi TAT durante la fermentazione alcolica



3.2 Analisi dei vini dopo la svinatura

Nell'annata 2008, malgrado tutti gli accorgimenti adottati per rendere le uve omogenee, in quasi tutti i parametri si rileva una differenza statisticamente significativa del fattore replica per tutti i parametri misurati. Ciò indica che esiste una variabilità iniziale delle uve pur provenienti dallo stesso appezzamento, in funzione della diversa vigoria delle viti, che non può essere totalmente superata alla scala di raccolta usata, neppure mediante parcellizzazione in base alla vigoria e randomizzazione delle cassette.

Maggiore intensità colorante si rileva nelle tesi sottoposte a salasso ed in quelle fermentate ad alta temperatura. Inoltre, esiste un effetto cooperativo (interazione positiva) fra i due trattamenti, ovvero l'effetto dei due trattamenti combinati risulta maggiore della somma dei due trattamenti presi separatamente. Ciò indica che per massimizzare l'effetto estrattivo del salasso bisogna condurre la fermentazione a più alta temperatura. Non

si rilevano differenze significative nell'intensità colorante in funzione dei trattamenti prefermentativi.

Figura 6. Intensità colorante delle tesi significativamente diverse alla svinatura

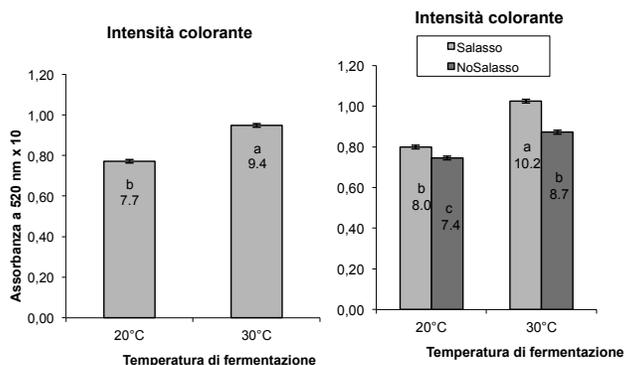
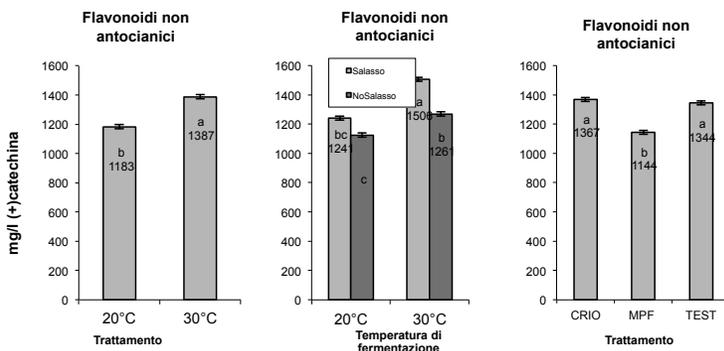


Figura 7. Flavonoidi non antocianici nelle tesi significativamente diverse alla svinatura



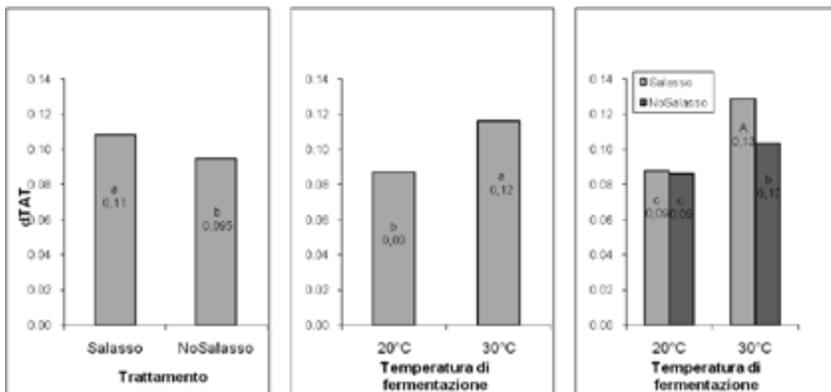
Anche considerando il contenuto in antociani totali si rilevano guadagni significativi nel contenuto per le tesi sottoposte a salasso e a più alta temperatura di fermentazione, oltre alla interazione positiva fra due trattamenti e un non significativo effetto dei trattamenti prefermentativi in accordo con quanto già evidenziato per il colore.

Per quanto riguarda i flavonoidi non antocianici, l'analisi della varianza indica significatività per tutti i trattamenti. In particolare risulta più elevata l'estrazione dei flavonoidi totali nelle tesi a 30°C rispetto alle corrispondenti a 20°C, come atteso dalle conoscenze di letteratura, e nelle tesi sottoposte a salasso in confronto a quelle non salassate. Fra i trattamenti prefermentativi risultano significativamente più basse le tesi sottoposte a MPF, mentre

le tesi di controllo e quelle criomacerate risultano non significativamente diverse. Varie ipotesi possono essere formulate per spiegare queste evidenze, dalla precipitazione di sostanze polifenoliche durante la permanenza del mosto a bassa temperatura nelle tesi MPF, alla più bassa estrazione dovuta alla temperatura, all'ossidazione durante la fase prefermentativa. Questi dati sono comunque in accordo con quanto riportato in letteratura sulla minore tannicità dei vini ottenuti per MPF.

Per quanto riguarda i complessi TAT si ha un aumento significativo dovuto a salasso e temperatura, analogamente a quanto rilevato per la temperatura di fermentazione, così come una positiva interazione fra i due trattamenti.

Figura 8. Complessi TAT nelle tesi significativamente diverse alla svinatura



Gli stessi vini, analizzati a sei mesi dalla svinatura quando cioè i processi di stabilizzazione erano ormai presumibilmente portati a termine, evidenziano una differenza statisticamente significativa del fattore replica in quasi tutti i parametri analitici. Vengono confermate le differenze viste alla svinatura per i trattamenti salasso e temperatura di fermentazione, con maggiore intensità colorante nei vini ottenuti a temperature di 30°C e in quelli sottoposti a salasso. Non risultano più significative le interazioni fra i trattamenti salasso e temperatura evidenziate invece alla svinatura.

Per quanto riguarda gli antociani totali si confermano i contenuti più alti nel salasso e la temperatura di 30°C visti alla svinatura. Per i flavonoidi non antocianici risultano significativi i trattamenti CRIO, temperatura e salasso. In particolare risulta più elevata l'estrazione dei flavonoidi totali nelle tesi CRIO, mentre il valore più basso si trova nei testimoni. Questa situazione indica una diversa evoluzione della componente polifenolica fra i diversi trattamenti di macerazione nei primi sei mesi. Infatti le tesi MPF che erano le più basse alla svinatura, dopo sei mesi sono intermedie fra le tesi CRIO a contenuto polifenolico più alto e i testimoni (valori più bassi).

Ciò è dovuto probabilmente ad una maggiore perdita di queste componenti nelle tesi testimone dovute a precipitazioni.

Per i complessi TAT si evidenziano valori significativamente più alti nelle tesi sottoposte a salasso e in quelle fermentate a 30°C. Anche in questo caso tutti i trattamenti di macerazione non hanno avuto effetti significativi. Ciò indica che dal punto di vista polifenolico i vantaggi ottenuti con i trattamenti di macerazione fino alla svinatura non vengono mantenuti nel tempo, probabilmente perché l'entità della polimerizzazione antociani/tannini, che avviene in tutti le tesi in sei mesi, risulta di gran lunga superiore a quella inizialmente presente alla svinatura.

Dopo 18 mesi dalla svinatura in tutti i parametri analizzati le repliche risultano essere ancora significative, e i valori dell'intensità colorante risultano incrementati rispetto ai 6 mesi. Ciò indica che la componente polifenolica ha continuato ad evolversi positivamente nel tempo pur con la conservazione in acciaio. I vini sottoposti a salasso risultano sempre significativamente più colorati rispetto ai non salassati con un più alto contenuto di antociani totali e TAT, a conferma che tale trattamento incide in modo durevole sul colore. Stesse considerazioni possono essere fatte anche per i vini prodotti a temperatura più alta. Si perdono invece le significatività per i trattamenti prefermentativi, come già si era visto dopo 6 mesi, ad indicare che gli aumenti che si registrarono alla svinatura e dopo 6 mesi – per i polifenoli non antocianici – sono da considerarsi transitori e vengono perduti durante l'invecchiamento.

Nell'annata 2009 le uve di partenza si presentavano di qualità nettamente peggiore rispetto all'anno precedente.

Alla svinatura l'intensità colorante mostrava significativi incrementi nelle tesi sottoposte a salasso, in quelle fermentate a temperatura più alta (come nel 2008) e nelle tesi CRIO, in questo caso contrariamente a quanto osservato nel 2008. L'andamento delle tesi MPF mostravano una intensità colorante più bassa rispetto a quelle CRIO, ma non diverse dal controllo.

I FNA risultavano significativamente più alti solo nel salasso. Anche l'effetto della temperatura ha mostrato lo stesso andamento del 2008, salvo la differenza della macerazione – in accordo con il risultato dei flavonoidi totali – e dell'interazione fra i due fattori. Questo ultimo dato confermerebbe la mancanza di effetto dei trattamenti di macerazione, ma una conferma definitiva deve essere ricercata nelle analisi relative ai tempi successivi.

Gli antociani totali hanno mostrato valori più alti nel salasso come previsto ed a conferma del dato 2008, ed un effetto significativo dei trattamenti di macerazione. L'effetto delle tecniche prefermentative, MPF in testa, è risultato evidente solo sulla componente antocianica. In particolare MPF mostra valori superiori al CRIO ed al testimone. Anche il CRIO rispetto al testimone differisce positivamente.

Per quanto riguarda i complessi TAT alla svinatura risultano significativi tutti i trattamenti. In particolare per quanto riguarda la macerazione il

trattamento CRIO è significativamente più elevato rispetto agli altri trattamenti. Le tesi sottoposte a salasso e temperatura di 30°C confermano il loro significativo incremento in TAT.

Nell'analisi dei vini 2009 a 6 mesi dalla svinatura il trattamento salasso ha prodotto valori più alti per tutti i parametri analizzati. Come per il 2008 la temperatura influisce positivamente sull'intensità del colore. L'effetto della macerazione come già visto per i vini del 2008 si perde dopo 6 mesi dalla svinatura

Per gli FNA rispetto alla svinatura del 2009 ed ai 6 mesi del 2008 il comportamento della macerazione è assai diverso. Infatti la MPF si colloca a valori paragonabili al testimone mentre è il trattamento CRIO che ha l'effetto maggiore. Nei vini del 2008 il trattamento MPF era inizialmente il più basso fra i valori di flavonoidi totali. Mentre nel 2009 MPF si attestava in un valore intermedio. Una spiegazione potrebbe essere il miglioramento del sistema di crioestrazione messo in atto per le uve 2009. La maggiore efficienza potrebbe aver portato a differenze più marcate rispetto al 2008 e quindi un appiattimento delle differenze fra test e MPF nei vini del 2009. Pertanto questo dato potrebbe non essere in contraddizione con quanto riscontrato nel 2008.

Negli svinati dell'annata 2010 viene confermato un più alto contenuto in antociani totali nelle tesi sottoposte a salasso e fermentazione a 30°C. Risulta altresì significativa l'interazione fra i due trattamenti, come nell'annata 2008, e il trattamento CRIO fornisce vini a contenuto di antociani significativamente più alto rispetto a MPF e controllo.

Per i flavonoidi non antocianici si conferma la maggiore estrazione dovuta a salasso e alta temperatura di fermentazione, mentre l'estrazione nelle tesi sottoposte a MPF è più bassa che in quelle CRIO e controllo, che risultano non diverse fra loro.

I grafici relativi alle annate 2009 e 2010 e ulteriori dettagli sui vini di queste annate sono reperibili al sito web Toscana (http://www.consortiotuscania.it/data/files/finale/1_Linea_B4_Dssnp_Relazione_finale.pdf, 05/12).

3.3 Profilo aromatico

I composti identificati e quantificati mediante GC-MS sono riportati nella tabella 1.

Gran parte di essi sono prodotti di origine secondaria – prodotti dall'attività dei lieviti direttamente o a partire da precursori presenti nelle uve – o loro prodotti di reazione ad esempio gli esteri di acidi grassi con etanolo. Dal confronto delle concentrazioni di questi prodotti mediante PCA e LDA i vini alla svinatura dell'annata 2008 provenienti dai vari trattamenti prefermentativi non possono essere distinti, né quelli provenienti dalle tesi salassate, ma sono invece significativamente diverse le tesi fermentate

Tabella 1. Composti volatili identificati nei vini alla svinatura

composto	classe	origine
1,1 dietossietano	eteri	secondaria
etil acetato	esteri	secondaria
Propanoic acid, ethyl ester	esteri	secondaria
Butanoic acid, ethyl ester	esteri	secondaria
alcool amilico+isoamilico	esteri	secondaria
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	esteri	secondaria
etil esanoato	esteri	secondaria
etil lattato	esteri	secondaria
Decanoato di etile	esteri	secondaria
dodecanoato di etile tic	esteri	secondaria
tetradecanoato di etile tic	esteri	secondaria
esadecanoato di etile	esteri	secondaria
diacetile	chetoni	secondaria
2-Butanone, 3-hydroxy-	OH-chetoni	secondaria
acido acetico	acidi	secondaria
acido esanoico	acidi	secondaria
acido ottanoico	acidi	secondaria
acino n-decanoico	acidi	secondaria
tetradecanoico tic	acidi	secondaria
acido esadecanoico tic	acidi	secondaria
1-Propanol, 2-methyl-	alcoli	secondaria
1-Octanolo	alcoli	secondaria
1-Dodecanol	alcoli	secondaria
1-esanolo	alcoli	secondaria
benzil alcool	alcoli	secondaria
feniletil alcool	alcoli	secondaria
1-butanolo	alcoli	secondaria
beta-damascenone	terpenoidi	primaria
linalolo	terpenoidi	primaria
alfa terpineolo	terpenoidi	primaria
benzaldeide	aldeidi	primaria
Benzaldehyde, 4-ethyl	aldeidi	primaria

a 30°C rispetto a quelle a 20°C. Questo risultato è in accordo con quanto conosciuto e implementato con le pratiche enologiche impiegate su vini bianchi, in cui temperature controllate (peraltro inferiori ai 20°C da noi utilizzati) si impiegano al fine di massimizzare il quadro aromatico. Anche i vini provenienti da una delle repliche risultano significativamente diversi da quelli delle altre due, in accordo con quanto già evidenziato dall'analisi delle componenti estrattive a conferma della eterogeneità delle uve.

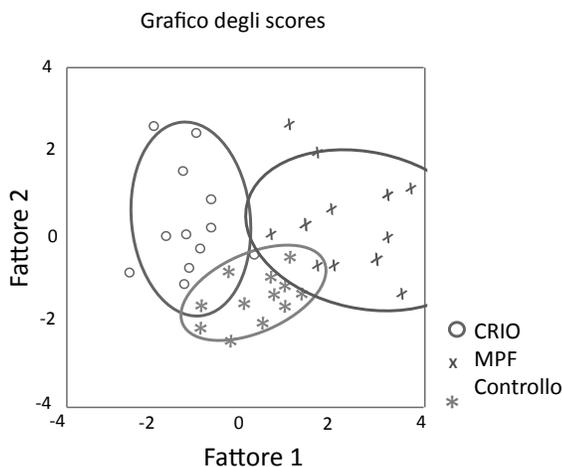
Tabella 2. Significatività dei diversi trattamenti alla svinatura secondo l'analisi PCA-LDA

trattamenti prefermentativi	Trattamenti		
	temperatura	salasso	replica
NS	S	NS	S

Le analisi dei vini 2008 eseguite dopo 6 e 12 mesi confermano queste differenze per quanto riguarda la temperatura di fermentazione, mentre le differenze fra le repliche perdono di valore con la maturazione del vino e sempre non significative appaiono le differenze fra le varie tesi prefermentative e salasso.

Ferme restando le differenze tra il profilo aromatico dei vini ottenuti a 20 e 30°C, le differenze fra i vini ottenuti con le diverse tecniche prefermentative diventano invece evidenti nel vino analizzato dopo 18 mesi (Figura 9). Questo significa che, seppure non immediatamente evidenti, le differenze fra le tecniche esistono e si manifestano solo dopo il riassetto del quadro delle sostanze aromatiche che si raggiunge dopo maturazione e invecchiamento.

Figura 9. Analisi discriminante sui composti volatili dei vini 2008 a 18 mesi



Per i vini dell'annata 2009 si confermano le differenze nel quadro aromatico dovute alla temperatura di fermentazione, risultano non significative le differenze fra le tesi salassate e non salassate in accordo con quanto osservato nel 2008.

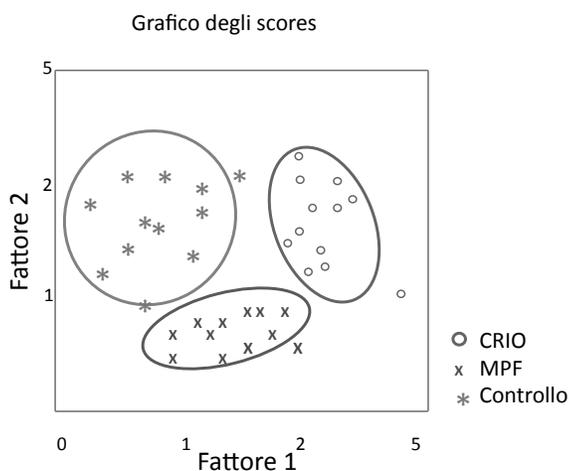
A differenza dell'annata 2008 risultano invece significativamente diverse da subito le tesi CRIO, come si può vedere dalla riattribuzione mediante la procedura di leave-one-out. Non significativamente diverse appaiono invece le tesi MPF e controllo.

Tabella 3. Matrice di classificazione per i trattamenti prefermentativi annata 2009 alla svinatura

	crio	mpf	test	% correct
crio	12	0	0	100
mpf	1	7	4	58
test	2	3	7	58
Total	15	10	11	72

Come per il 2008, anche per il 2009 le repliche alla svinatura risultano significativamente diverse, sulla base del profilo aromatico. Lo stesso quadro si osserva nell'analisi del profilo aromatico dopo 6 mesi, dove si confermano le differenze evidenziate alla svinatura.

Figura 10. Analisi PCA-LDA per i vini 2009 alla svinatura



Il test di verifica indica che solo le tesi CRIO risultano in effetti significativamente diverse con la riattribuzione di oltre l'80% dei campioni. Non ci sono invece riattribuzioni significative per CRIO e MPF e viene quindi sostanzialmente conservata la situazione osservata alla svinatura.

Per i vini dell'annata 2010 alla svinatura non si osservano differenze fra i trattamenti prefermentativi o il salasso e le sole differenze sono state riscontrate per le tesi fermentate a più alta temperatura dove la procedura di verifica (leave-one-out) riclassifica la totalità dei campioni, in accordo con quanto osservato nell'annata 2008.

4. Conclusioni

La tecnica del salasso e la fermentazione a temperatura di 30°C mostrano una profonda influenza sulla estrazione del colore nelle uve Sangiovese,

producendo vini più colorati, con un maggiore contenuto in antociani totali e polifenoli non antocianici. Questo effetto si verifica sempre indipendentemente dall'annata (e quindi dalla qualità delle uve) e almeno per l'annata 2008 di cui si dispone del riscontro a 18 mesi e 2009 in cui il riscontro è per adesso solo a sei mesi, sembra duraturo nel tempo.

Dal punto di vista della componente volatile invece, i vini provenienti da salasso non mostrano significative differenze, mentre la diversa temperatura di fermentazione produce vini a corredo volatile diversissimo fin dalla svinatura e nei campionamenti successivi.

I trattamenti prefermentativi si sono invece dimostrati variabili come efficacia in funzione della qualità delle uve di partenza. In particolare, con uve di buona qualità l'estrazione della componente polifenolica e antocianina del trattamento CRIO non si è discostata dai controlli, mentre si è avuta una peggiore estrazione della componente antocianica, ma soprattutto di quella polifenolica nel trattamento MPF. Con uve a qualità inferiore e peggiore estraibilità degli antociani si ha invece un positivo effetto della tecnica CRIO alla svinatura.

Per la componente polifenolica i trattamenti prefermentativi tendono comunque a perdere il loro effetto con la maturazione del vino.

Per quanto riguarda la componente aromatica invece si osserva un diverso comportamento fra le annate. Nel 2008 contrariamente alla componente colore le differenze fra i trattamenti prefermentativi, anche quando non evidenti alla svinatura, emergono dopo maturazione del vino e diventano evidenti nei vini a 18 mesi.

I composti identificati e quantificati sono in gran parte composti di origine secondaria, derivati cioè direttamente o indirettamente dalla attività di lieviti.

Per i vini del 2009 invece, le differenze fra i trattamenti prefermentativi risultano significative già alla svinatura e si mantengono tali anche dopo 6 mesi. Come per l'annata precedente ci sono differenze significative fra le due temperature di fermentazione, e non ci sono differenze nel quadro volatile per il trattamento del salasso, sia alla svinatura che a sei mesi.

Questi risultati portano a concludere che l'attività dei lieviti, direttamente mediante produzione di sostanze volatili o indirettamente mediante la sintesi di precursori, che poi si potranno ricombinare durante l'invecchiamento, è il fattore chiave che condiziona il quadro dei profili volatili nei vini.

Appare fondamentale proseguire le analisi dei vini nel tempo (per i vini ottenuti nelle annate del 2009 e 2010) per confermare queste tendenze. Interessante appare anche un'analisi a più lungo invecchiamento (36 mesi) su tutti i vini, per poter valutare la tenuta di questi vini con un invecchiamento comparabile con la tipologia dei vini Sangiovese toscani di alta gamma.

Bibliografia

- Beebe K.R., Pell R.J. e Seusholtz M.B. (1998), *Chemometrics: a practical guide*, Wiley, New York.
- Cuenat P., Lorenzini F., Bregy C., Zufferey E. (1996), *La macération préfermentative à froid du Pinot noir. Aspects technologiques et microbiologiques*, «Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture», 28: 259-265.
- Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini M. (1989), *Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini*, «L'enotecnico», 5: 83-89.
- Parenti A., Spugnoli P., Calamai L., Ferrari S., Gori C. (2004), *Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape*, «European Food Research and Technology», A 218: 360-366.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubordieu D. (2003), *Handbook of enology. Volume 2. The chemistry of wine. Stabilization and treatments*, Wiley, New York.
- Stefanini F., Pantani O.L. (2009), Sviluppo di reti probabilistiche di supporto alle decisioni in viticoltura ed enologia, <<http://www.consorziotuscania.it/content.php?page=70&action=39>> (05/12)
- Versari A., Boulton R.B. e Parpinello G.P. (2007), *Analysis of SO₂-Resistant Polymeric Pigments in Red Wines by High-Performance Liquid Chromatography*, «Am. J. Enol. Vitic», 58: 523-525.

Miglioramento della qualità dei vini mediante l'impiego di inoculi misti

P. Domizio, L. Lencioni*, C. Romani*, M. Ciani**, F. Comitini**,
M. Gobbi**, I. Mannazzu***

I. Introduzione

È noto che la qualità del vino è fortemente dipendente da quel complesso di sostanze derivanti dall'uva e dal metabolismo dei lieviti e batteri e che costituiscono il flavour del prodotto.

Molte vie di formazione dei composti del vino percepibili per via gustativa ed olfattiva operano contemporaneamente. In particolare, sia i processi chimici che le attività enzimatiche dell'uva, dei lieviti e dei batteri concorrono a modificare le sostanze (precursori) presenti nell'uva e quelle formate nei successivi stadi di vinificazione, fornendo al vino flavour complessi in grado di condizionare le caratteristiche percepibili dei prodotti finiti. La possibilità di intervenire sulla formazione del flavour con azioni mirate, salvaguardando nel contempo il patrimonio compositivo dei vini, diventa per i produttori un'esigenza vitale per il raggiungimento e il mantenimento delle peculiarità dei propri prodotti.

L'impiego di sostanze diverse, quali enzimi commerciali e agenti chiarificanti, così come di trattamenti correntemente utilizzati per conseguire e stabilizzare alcune caratteristiche qualitative dei vini, oltre agli effetti ricercati, può determinare modificazioni indesiderate che si traducono in perdita dei caratteri distintivi e quindi nell'appiattimento dei prodotti. In questo contesto, interventi specifici e mirati, come ad esempio l'impiego di starter

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia.

** Dipartimento S.A.I.F.E.T., Sezione Microbiologia Alimentare, Industriale e Ambientale, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia.

*** Dipartimento di Scienze Ambientali, Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italia.

con peculiari attività enzimatiche e di differenti modalità di fermentazione, costituiscono strumenti innovativi per conseguire e salvaguardare i contenuti di qualità dei vini.

Per migliorare le caratteristiche sensoriali del vino, ed evitare allo stesso tempo la proliferazione di lieviti alterativi, è d'altra parte indispensabile il controllo della crescita microbica durante il processo di vinificazione.

Attualmente, il pronto avvio della fermentazione alcolica e la costanza qualitativa delle vinificazioni si ottengono principalmente mediante l'aggiunta di SO₂ e l'impiego di colture selezionate di *Saccharomyces cerevisiae*, divenute ormai pratiche di uso corrente. Tuttavia, sebbene l'inoculo di *S. cerevisiae* come starter renda sufficientemente sicuro il decorso fermentativo, esso provoca anche l'inibizione della microflora spontanea che invece potrebbe contribuire ad aumentare la complessità del prodotto finale. L'insediamento del lievito selezionato consente infatti di inibire/controllare lo sviluppo dei microrganismi presenti naturalmente nel mosto, fra cui anche di quei ceppi di lievito spesso ritenuti, a priori, responsabili dell'insorgenza di difetti nei vini e di problemi nel processo fermentativo.

Rispetto al decorso fermentativo, molteplici studi ecologici, condotti nelle diverse aree vitivinicole per valutare la microflora associata alla fermentazione naturale del mosto, hanno messo in evidenza che i lieviti apiculati (*Hanseniaspora/Kloeckera*) dominano le prime fasi del processo fermentativo, per essere poi sostituiti da quelli ellittici che proseguono e portano a termine la fermentazione (Amerine *et al.* 1980; Mendoza *et al.* 2007; Povhe Jemec *et al.* 2001). Nel corso del processo fermentativo, sono spesso rinvenuti altri lieviti non-*Saccharomyces*, appartenenti ai generi *Candida*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces* e *Metschnikowia* (Fleet *et al.* 1984; Heard e Fleet 1985; Pardo *et al.* 1989).

Altri studi (Fleet *et al.* 1984; Pardo *et al.* 1989; Mora *et al.* 1990; Ciani e Rosini 1993) hanno evidenziato la partecipazione dei lieviti non-*Saccharomyces* (anche a livelli significativi), non solo nel corso delle fermentazioni naturali ma anche in vinificazioni inoculate con colture selezionate.

Queste ricerche hanno portato a rivalutare il ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario (Fleet e Heard 1993; Ciani 1997). La loro presenza e persistenza durante vinificazioni inoculate e non inoculate è ben documentata così come il loro contributo alla composizione analitica e alle caratteristiche sensoriali del vino (Romano *et al.* 1992; Shütz e Gafner 1993; Herraiz *et al.* 1990; Egli *et al.* 1998; Ciani e Maccarelli 1998). Molti studi, infatti, hanno rilevato che i lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono a rendere più complesso l'aroma dei vini e quindi a migliorarne la qualità (Romano *et al.* 1997a, 1997b; Egli *et al.* 1998; Ciani e Maccarelli 1998; Henick-Kling *et al.* 1998). Ciò rende i lieviti non-*Saccharomyces* interessanti per il loro impiego nell'industria enologica e questo va in parte attribuito alle loro attività enzimatiche. Numerose ricerche condotte negli ultimi anni, infatti, hanno evidenziato che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario sono in

grado di secernere enzimi, quali proteasi, esterasi e beta-glucosidasi che influiscono positivamente sulla qualità del vino (Rosi *et al.* 1994; Fernandez *et al.* 2000; Strass *et al.* 2001; Ferriera *et al.* 2001; Zohre e Erten 2002).

Questi studi, sottolineando il ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* nel miglioramento del profilo aromatico e sensoriale dei vini, hanno portato ad ipotizzarne l'uso in fermentazioni miste controllate.

Il processo fermentativo naturale, infatti, anche se è preferito da taluni proprio per migliorare le caratteristiche analitico-sensoriali e rendere più complesso il vino, rimane un processo incontrollato, con la successione indefinita di varie specie che, lasciando al caso la presenza quali-quantitativa della microflora, può portare a clamorosi insuccessi.

L'uso controllato di lieviti non-*Saccharomyces* è in realtà oggetto di studio da diversi anni. Ad esempio, *Schizosaccharomyces pombe* in combinazione con *S.cerevisiae* è stato proposto per la disacidificazione dei mosti già nel 1973 da Snow e Gallender, e successivamente da Yokotsuka *et al.* (1993). Anche altri autori (Ciani e Ferraro 1996; Ciani 2001) hanno evidenziato che utilizzando ceppi di lievito appartenenti alla specie *Candida stellata* è possibile incrementare e raggiungere livelli elevati di glicerolo, composto che conferisce maggiore morbidezza al vino. Altri studi sono stati condotti negli anni successivi per determinare l'impatto di questi lieviti sulla composizione e sulle proprietà sensoriali del vino (Swiegers *et al.* 2005; Renouf *et al.* 2007; Domizio *et al.* 2007; Fleet 2008).

Dall'insieme delle sperimentazioni fatte risulta che l'ecologia dei lieviti nel processo di fermentazione è assai più complessa di quanto si possa pensare e che le specie di lieviti non-*Saccharomyces* hanno un ruolo rilevante sulla complessità aromatica del prodotto finale.

La possibilità di utilizzare inoculi misti controllati di starter di *Saccharomyces* insieme a lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario, può rappresentare perciò un interessante approccio applicativo per raggiungere prodotti con caratteristiche originali e peculiari.

Come esiste all'interno del genere *Saccharomyces* un'ampia variabilità tra i ceppi per la produzione di differenti composti secondari, così anche all'interno delle specie di non-*Saccharomyces* di ambito vinario è presente altrettanta variabilità per i principali caratteri legati alla vinificazione sui quali effettuare operazioni di selezione (Ciani e Maccarelli 1998; Romano 2002).

Pertanto, così come la selezione operata tra i lieviti *Saccharomyces* ha consentito l'ottenimento di ceppi con caratteristiche peculiari, un'analogha operazione di selezione sui lieviti non-*Saccharomyces* potrà consentire di individuare ceppi con interessanti potenzialità applicative.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi lavori sui diversi aspetti sopra considerati (Kapsopoulou *et al.* 2005; Ciani *et al.* 2005), alcuni dei quali proprio su inoculi misti di lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* (Hermle *et al.* 2005; Languet *et al.* 2005; Ciani e Comitini 2006; Pérez-Neva-

do *et al.* 2006; Kapsopoulou *et al.* 2007; Ciani *et al.* 2010; Comitini *et al.* 2011; Domizio *et al.* 2011) dando conto del rinnovato interesse per questa prospettiva di gestione delle diverse fermentazioni vinarie.

2. I lieviti non-*Saccharomyces* in vinificazione: ruolo e caratteristiche

L'impiego controllato di inoculi misti con lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* può consentire di migliorare da una parte e tipizzare dall'altra i vini, in relazione all'incremento di composti positivi e/o alla riduzione di quelli indesiderati, risultanti dalle interazioni tra lieviti di specie differenti.

Una maggiore complessità dei vini dovuta all'azione di più specie di lievito, infatti, è stata spesso evocata dai fautori delle fermentazioni naturali. Nel caso dell'impiego di inoculi misti controllati questa maggiore complessità potrà essere raggiunta evitando i problemi legati al mancato controllo del processo fermentativo che rende spesso incostanti i risultati. La possibilità quindi di 'mimare' una fermentazione naturale, mantenendo però il controllo del processo fermentativo e rendendolo così più ripetibile, è sicuramente un interessante aspetto dell'applicazione di tale approccio in vinificazione.

In tale contesto, è fondamentale conoscere le caratteristiche e le attitudini enologiche dei diversi lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario. Già da tempo alcuni ricercatori hanno indagato sulle naturali attitudini enologiche di alcuni generi di lievito appartenenti al gruppo dei non-*Saccharomyces* proponendone l'utilizzo come colture starters in enologia (Ribeau-Gayon e Peynaud 1960; Fleet 1993; Ciani 1997).

I lieviti appartenenti alla specie *Schizosaccharomyces pombe*, ad esempio, sono capaci di metabolizzare l'acido malico riducendone l'eccessiva presenza nel mosto e nel vino. Tali lieviti presentano inoltre una tolleranza relativamente alta a pH acidi e ad elevate concentrazioni di SO₂. Tuttavia, a causa della loro tendenza a produrre composti aromatici sgradevoli, sono pochi i ceppi appartenenti a questa specie effettivamente utilizzabili in ambito enologico. Questo lievito fu identificato per la prima volta da Lindner nel 1893 dalle birre di miglio dell'Africa orientale. Il nome della specie *pombe* deriva, infatti, dal termine che in Swahili si usa per indicare la birra. Dal punto di vista morfologico *S. pombe* ha una forma cellulare allungata (2-3 µm x 7-14 µm); la moltiplicazione vegetativa avviene per scissione invece che per gemmazione. Nel 2002 è stata pubblicata la sua sequenza genomica, sesto genoma di organismo eucariote ad essere sequenziato. *S. pombe* è oggi ampiamente studiato anche al fine di chiarire i meccanismi di risposta del ciclo cellulare ai danni e ad errori di replicazione del DNA.

Anche l'uso di colture selezionate appartenenti a *Torulaspora delbrueckii* (precedentemente classificata come *Saccharomyces rosei* e *Torulaspora rosei*) è stato da tempo proposto in considerazione dell'elevata purezza fermenta-

tiva di questa specie di lievito e della sua relativamente elevata tolleranza all'alcol (12-13%).

Inoculi sequenziali di *T. delbrueckii* e di *S. cerevisiae* rappresentano una naturale strategia per ridurre notevolmente la concentrazione di acido acetico nel vino. Dal punto di vista morfologico, *Torulaspota* presenta cellule globose o ellittiche (2-5 μm x 3-6 μm), più piccole e sferiche rispetto al *Saccharomyces*, con possibile formazione di pseudoife e cellule vegetative prevalentemente aploidi.

Altri lieviti, come quelli appartenenti alle specie *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata* e *Hanseniaspora uvarum* sono invece caratterizzati da una attività fermentativa relativamente bassa.

In particolare, *Candida stellata* (recentemente riclassificata e suddivisa in diverse specie: *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Starmerella bombicola*) mostra in genere un'elevata purezza fermentativa e una buona capacità di produrre glicerolo (fino a 12-15 g/l). Recenti applicazioni su scala pilota in fermentazioni miste con *S. cerevisiae* e *S. bombicola* (Ferraro e Ciani 2000) hanno messo in evidenza un'elevata produzione non solo di glicerolo ma anche di acido succinico e una rilevante riduzione del contenuto alcolico. Si tratta di un lievito osmofilo che può crescere su substrati con concentrazioni fino a 60% di zuccheri che ne giustifica la maggiore frequenza di isolamento in uve affette da marciume nobile da *Botrytys cinerea* dove la concentrazione zuccherina può raggiungere anche il 40%. Altra caratteristica della specie è la fermentazione selettiva del fruttosio. Dal punto di vista morfologico le cellule sono piccole e allungate.

Riguardo ai lieviti apiculati, è noto che quelli appartenenti ai generi *Kloeckera* e *Hanseniaspora* colonizzano largamente la superficie delle bacche d'uva e predominano nelle prime fasi del processo fermentativo spontaneo. Le specie più diffuse, *K. apiculata* e *H. uvarum*, sono abbastanza sensibili alla SO_2 (50 mg/l) e la loro attività, nella gran parte dei casi, cessa quando si arriva a 3-4 gradi alcolici. Questi lieviti sono anche noti per l'attitudine a produrre acido acetico sebbene tale tendenza risulti ceppo specifica. L'aspetto morfologico delle cellule rende caratteristico e facilmente riconoscibile tale gruppo di lieviti. Infatti, con il termine 'apiculati' si identifica una morfologia nella quale la cellula gemmando si allunga agli apici. Le cellule che hanno quindi gemmato assumono una tipica forma a limone.

Tra i lieviti non-*Saccharomyces* va annoverato anche il genere *Metschnikowia*, che comprende varie specie tra cui *M. pulcherrima*, la più interessante dal punto di vista enologico. Questo microrganismo viene frequentemente ritrovato sulla superficie della bacca d'uva a maturazione. In particolare, nei mosti provenienti da uve sane raggiunge una concentrazione di 10^3 - 10^4 cellule/ml, mentre in quelli provenienti da uve danneggiate sale intorno a 10^5 cellule/ml. Questo lievito ha un metabolismo di tipo ossidativo-fermentativo ed è caratterizzato da una modesta produzione di alcol (3-6%).

Morfologicamente *M. pulcherrima* presenta cellule sferiche, alcune molto grandi, spesso contenenti un corpuscolo lipidico, e spore aghiformi.

I lieviti appartenenti al genere *Zygosaccharomyces* sono dotati di notevole osmofilia e per questo sono fra i principali responsabili delle alterazioni di succhi di frutta, marmellate e mieli (concentrazione zuccherina superiore a 70%) ed, in ambito enologico, si ritrovano spesso nel corso di fermentazioni spontanee di mosti con elevate concentrazioni zuccherine quali quelli per la produzione di vini passiti. Fermentano preferibilmente il fruttosio ed hanno anche una elevata resistenza alla SO_2 che li rende molto interessanti per un possibile loro uso in vinificazione. Le specie più diffuse sono *Z. bailii* e *Z. rouxii*; ubiquitari e dotati di buona attività fermentativa, possono essere impiegati per realizzare fermentazioni scalari. Le specie di questo genere si moltiplicano per gemmazione multilaterale, hanno cellule globose, ellittiche e cilindriche. Durante la coniugazione, che precede la sporificazione, presentano la caratteristica forma a occhiale.

In ambito vinario saltuariamente sono stati isolati anche lieviti appartenenti al genere *Lachancea* (ex *Kluyveromyces*) dove la loro presenza è perciò da considerarsi occasionale. La specie più frequentemente isolata da uve e mosti in fermentazione è *Lachancea thermotolerans*, già conosciuta dapprima come *Saccharomyces veronae* (Lodder e Kreger van Rij, 1952) successivamente come *Kluyveromyces veronae* e quindi come *Kluyveromyces thermotolerans* (Lodder e Kreger van Rij, 1970). *L. thermotolerans* fermenta vigorosamente il glucosio, il saccarosio ed il raffiniosio. L'inoculo di tale specie è stato proposto per fermentazioni scalari per ridurre la produzione di acidità volatile nei vini, in quanto specie basso-produttrice di acido acetico. Fra le specie affini troviamo *K. lactis* e *K. marxianus*, molto studiate per il loro interesse nella produzione industriale di bioetanolo. Le cellule, ovoidali, ellissoidali e cilindriche allungate, possono formare uno pseudomicelio.

Al genere *Saccharomyces* appartiene un'unica specie (*S. ludwigii*), che presenta un'alta resistenza all'anidride solforosa. Tale specie è stata infatti isolata da mosti mutizzati in fermentazione. Molti ceppi possiedono un buon potere fermentativo, paragonabile a quello di *S. cerevisiae*. Dal punto di vista morfologico tale specie è facilmente riconoscibile per le sue dimensioni, superiori a tutti gli altri lieviti di interesse enologico. Ha una morfologia a limone, tipica dei lieviti apiculati e a birillo e non mostra pseudo micelio.

Le caratteristiche morfologiche ed enologiche dei principali lieviti non-*Saccharomyces* sono riportate nella tabella 1.

In generale, per l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste, si selezionano ceppi capaci di produrre elevati livelli di composti secondari desiderati (specialmente quelli legati al miglioramento del profilo aromatico) e nel contempo basse quantità di composti negativi, primi fra tutti l'acido acetico e l'acetaldeide. Come è noto, nel processo di degradazione degli zuccheri, l'acetaldeide è il prodotto della decarbossilazione del

piruvato e gioca un ruolo fondamentale nella fissazione della SO_2 ; a parità di pH e temperatura, elevate concentrazioni di acetaldeide portano alla riduzione della frazione libera di SO_2 (frazione con attività antimicrobica). Tra i lieviti non-*Saccharomyces*, solo *T. delbrueckii* sembra si caratterizzi per una produzione di acetaldeide inferiore a quella di *S. cerevisiae* ma, per avere una casistica sufficientemente valida, dovranno essere condotte ulteriori indagini.

Ad eccezione del genere *Torulasporea*, generalmente le specie non-*Saccharomyces* sono alte produttrici di acetoino, composto chiave nella via metabolica che porta alla formazione di 2,3 butandiolo e diacetile, molecole tipiche dell'aroma di burro.

Tra i prodotti volatili della fermentazione troviamo anche l'etilacetato. Come è noto, questo metabolita aumenta la fragranza del vino a concentrazioni inferiori a 50 mg/l, mentre a più alte concentrazioni (> 150 mg/l) porta a profili odorosi devianti. In generale, tutti i lieviti apiculati producono quantità molto elevate di etilacetato, mentre *T. delbrueckii* e *S. bombicola* ne formano quantità simili a *S. cerevisiae*.

Tra i diversi composti di origine microbica che vanno a definire la percezione in bocca del vino, ci sono l'acido succinico e il glicerolo. Il succinico è l'acido prodotto in maggiore quantità dai lieviti fermentanti; la sua produzione è ceppo-dipendente, anche se la presenza di fonti di azoto (acido glutammico in particolare) è capace di modularne la concentrazione. Generalmente i lieviti non-*Saccharomyces* sono alti produttori di acido succinico, particolarmente *S. bombicola*.

Il glicerolo, dopo l'etanolo e la CO_2 , è il maggiore prodotto della fermentazione alcolica e rappresenta quindi un importante costituente del vino. Le quantità formate durante la fermentazione dei mosti variano da 1 a 15 g/l. Oltre ad essere correlato con la sensazione del 'volume' del vino, il glicerolo ne influenza anche la percezione della dolcezza.

Infine, una classe molto importante di composti secondari sulla base della quale è opportuno operare una selezione, è rappresentata dagli alcoli superiori. A basse concentrazioni essi conferiscono una maggiore complessità all'aroma del vino ma, a più alti livelli (superiori a 200-300 mg/l a seconda dei vini), possono risultare sgradevoli. La produzione di tali alcoli in fermentazione è influenzata da vari fattori (ossigeno, temperatura, nutrienti, etc.). Generalmente, i lieviti non-*Saccharomyces* comunque producono meno alcoli superiori rispetto a *S. cerevisiae*.

Nel complesso, tutti i generi di lievito sopra descritti sono caratterizzati da cinetiche fermentative più lente e minore purezza di fermentazione rispetto a *S. cerevisiae*. Tuttavia, la selezione di ceppi specifici e la messa a punto delle condizioni ottimali per gli inoculi sequenziali potrebbero rappresentare un valido compromesso per sfruttare la capacità dei lieviti non-*Saccharomyces* di produrre composti aromatici complessi senza ridurre le performances fermentative tipiche dei lieviti *Saccharomyces*.

Tabella 1. Caratteristiche morfologiche ed enologiche dei principali lieviti non-Saccharomyces di interesse enologico

Genere	Specie	Morfologia cellulare	Riproduzione asessuata	Aschi e spore	Caratteristiche enologiche
<i>Candida</i>	<i>C. vini</i>	Cellule sferiche, ellittiche, cilindriche, ovoidali;	Gemmazione multilaterale	No spore	Molte specie con ridotto potere fermentativo e sviluppo alla superficie dei liquidi (<i>C. vini</i> , fioretta). Interessante dal punto di vista enologico <i>C. zemplinina</i> per buon potere fermentativo, fruttosofila e produzione di glicerolo
	<i>C. stellata</i> <i>C. zemplinina</i>	presenza di pseudoife ed ife settate			
<i>Hanseniaspora</i> <i>Kloeckera</i>	<i>H. guilliermondii</i>	Cellule ovali o allungate;	Gemmazione bipolare	Aschi persistenti o deiscienti; spore ad elmetto, a cappello o sferiche, da 1 a 4 per asco	Basso potere alcoligeno, scarsa resistenza alla solforosa. Elevata attività proteolitica e beta-glucosidasi
	<i>H. occidentalis</i> <i>H. osmophila</i> <i>H. uvarum</i> <i>H. valbyensis</i> <i>H. viniae</i> <i>K. apiculata</i>	pseudoife assenti o rudimentali			
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. thermotolerans</i>	Cellule ovoidali, ellissoidali e cilindriche allungate	Gemmazione multilaterale	Aschi deiscienti, spore lisce sferiche, da 1 a 4 per asco	Buon potere fermentativo.
	<i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i>				Alcune specie termotolleranti
<i>Metschnikowia</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Cellule sferiche, alcune molto grandi spesso contenenti una goccia lipidica; pseudomicelio rudimentale	Gemmazione multilaterale	Aschi allungati; spore aghiformi, da 1 a 2 per asco	Basso potere alcoligeno, scarsa resistenza alla solforosa. Attività esterasica e beta-glucosidasi

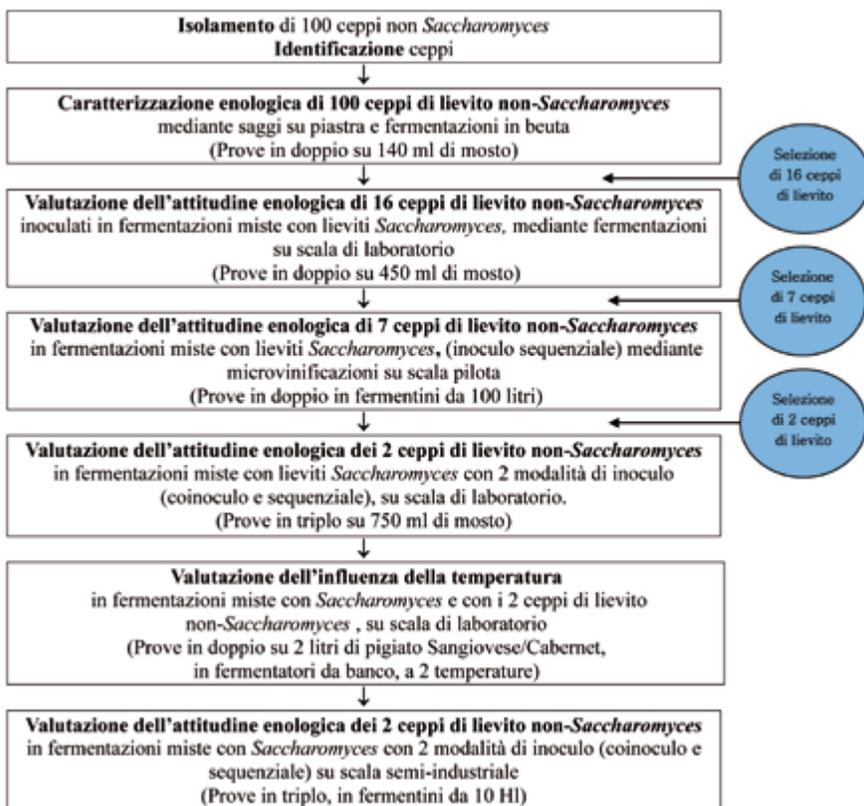
	<p><i>T. delbrueckii</i> <i>T. globosa</i> <i>T. pretoriensis</i></p>	<p>Cellule sferiche o ellittiche; presenza di pseudoife</p>	<p>Gemmazione multilaterale</p>	<p>Aschi persistenti, spore sferiche, da 1 a 4 per asco</p>	<p>Buon potere fermentativo, buona resistenza alla solforosa. Alcuni ceppi resistenti ad alte concentrazioni zuccherine. Ridotta produzione di acidità volatile</p>
	<p><i>S. ludwigii</i></p>	<p>Cellule apiculate, allungate; pseudoife assenti o rudimentali</p>	<p>Gemmazione bipolare, gemme a collo largo con setto (schizoblastogonia)</p>	<p>Aschi persistenti; spore sferiche, in genere 4 per asco</p>	<p>Elevato potere alcoligeno. Forte resistenza alla SO₂ (presente nei mosti muti)</p>
	<p><i>S. pombe</i> <i>S. japonicus</i> <i>S. malidevorans</i> <i>S. octosporus</i></p>	<p>Cellule globose, cilindriche; presenza di ife</p>	<p>Scissione</p>	<p>Aschi deiscenti; spore sferiche, ovoidali, reniformi, da 1 a 4 per asco</p>	<p>Elevato potere alcoligeno, forte resistenza alla SO₂, osmotollerante. Responsabile fermentazione maloalcolica</p>
	<p><i>Z. bailii</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. cidri</i> <i>Z. fermentanti</i> <i>Z. florentinus</i> <i>Z. ellipsoides</i> <i>Z. mrakii</i> <i>Z. rouxii</i></p>	<p>Cellule sferiche, ellittiche o allungate; presenza di pseudoife</p>	<p>Gemmazione multilaterale</p>	<p>Aschi persistenti; spore sferiche o ellittiche, da 1 a 4 per asco</p>	<p>Elevato potere alcoligeno, elevata resistenza ad alte concentrazioni zuccherine</p>

Obiettivo del presente studio è stato pertanto quello di individuare ceppi di lievito non-*Saccharomyces* che, impiegati in fermentazioni miste con ceppi di *S. cerevisiae*, consentissero l'ottenimento di vini con caratteristiche peculiari e un miglioramento della loro qualità complessiva.

3. Schema delle prove e risultati

Il presente progetto di ricerca, svoltosi nell'arco di tre anni, è stato articolato in diverse fasi, come di seguito descritto (Fig. 1).

Figura 1. Schema delle prove sperimentali



3.1 Identificazione dei lieviti non-*Saccharomyces*

Un centinaio di ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, isolati da diversi ambiti vinari, sono stati identificati a livello di specie, mediante osservazione macro e microscopica degli isolati, saggi fisiologici e metodi molecolari.

Dei 100 ceppi di lievito saggiati, 13 sono risultati appartenere al genere *Candida*, 13 al genere *Hanseniaspora/Kloeckera*, 5 al genere *Kluyveromyces*, 1 al genere *Issatchenkia*, 7 al genere *Metschnikowia*, 18 al genere *Pichia*, 12 al genere *Saccharomyces*, 1 al genere *Schizosaccharomyces*, 9 al genere *Torulaspora* e 18 al genere *Zygosaccharomyces* (Tab. 2).

Tabella 2. Lieviti oggetto di studio

Genere	Specie	Codice ceppo
<i>Candida</i>	<i>apicola</i>	Ca 70; Ca 71; Ca 77
	<i>beechei</i>	Ca 67
	<i>bombicola</i>	Ca 73
	<i>canterellii</i>	Ca 76
	<i>diversa</i>	Ca 10
	<i>montana</i>	Ca 68
	<i>tropicalis</i>	Ca 69
	<i>vinaria</i>	Ca 74; Ca 75; Ca 79
	<i>zemplanina</i>	Ca 22
<i>Hanseniaspora</i>	<i>osmophila</i>	Ha 25; Ha 27; Ha 32
	<i>uvarum</i>	Ha 19; Ha 20; Ha 21; Ha 23; Ha 29; Ha 30; Ha 31
	<i>valbyensis</i>	Ha 26; Ha 28
	<i>vineae</i>	Ha 24
<i>Kluyveromyces</i>	<i>thermotolerans</i>	Kl 93; Kl 101; Kl 103; Kl 105; Kl 107
<i>Issatchenkia</i>	<i>terricola</i>	Is 14
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	Me 45; Me 46; Me 47; Me 48; Me 52; Me 53; Me 54
<i>Pichia</i>	<i>anomala</i>	Pi 9; Pi 110
	<i>fermentans</i>	Pi 1; Pi 2; Pi 3; Pi 4; Pi 5; Pi 6
	<i>fluxuum</i>	Pi 11; Pi 13
	<i>kluyveri</i>	Pi 16
	<i>guilliermondii</i>	Pi 7
	<i>membranifaciens</i>	Pi 8; Pi 12; Pi 15; Pi 17; Pi 18;
	<i>spp</i>	Pi 99
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Sc 44; Sc 49; Sc 102; Ec1118
<i>Saccharomyces</i>	<i>ludwigii</i>	Sd 55; Sd 56; Sd 57; Sd 58; Sd 59; Sd 60;
		Sd 61; Sd 62; Sd 63; Sd 64; Sd 65; Sd 66
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>	S 95
<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	To 33; To 34; To 35; To 37; To 38;
		To 39; To 40; To 92; To 94
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bailii</i>	Zy 80; Zy 82; Zy 84; Zy 87; Zy 88; Zy 89
	<i>bisporus</i>	Zy 83; Zy 85; Zy 86; Zy 90; Zy 97; Zy 98
	<i>fermentati</i>	Zy 91
	<i>florentinus</i>	Zy 41; Zy 42; Zy 43; Zy 96
	<i>rouxii</i>	Zy 81

Come controlli sono stati utilizzati quattro ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*: uno starter del commercio (EC1118), largamente utilizzato nelle cantine, e tre ceppi selezionati nel corso di nostre precedenti indagini e provenienti da ambiente di cantina.

3.2 Valutazione dei principali caratteri enologici dei 100 ceppi di lievito non-*Saccharomyces*

I ceppi sopra identificati sono stati saggiati mediante screening su piastra per valutare la resistenza alla SO₂, la presenza del carattere killer, la produzione di idrogeno solforato (H₂S) e la presenza di attività enzimatiche, mentre la loro attitudine fermentativa è stata valutata con prove di fermentazione su scala di laboratorio (mosto con concentrazione zuccherina di 26,3%).

Le analisi condotte hanno messo in evidenza un'ampia variabilità intra ed interspecifica per i caratteri enologici presi in esame.

L'elaborazione dei dati ottenuti, attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA), ha consentito infine di selezionare, sulla base della valutazione delle attitudini enologiche e di altri caratteri utili ai fini fermentativi, 16 ceppi, due all'interno di ciascun genere, ad eccezione di *Schizosaccharomyces* e *Metschnikowia* per i quali ne è stata selezionata solo una specie (Fig. 2, Tab. 3).

I 16 lieviti selezionati sono stati utilizzati in successive prove di fermentazione in coltura mista con lieviti *Saccharomyces*.

Figura 2. Analisi delle Componenti Principali (PCA) dei fermentati ottenuti con inoculi in coltura pura di lieviti non-*Saccharomyces* (pubblicato su VQ numero cinque – giugno 2010)

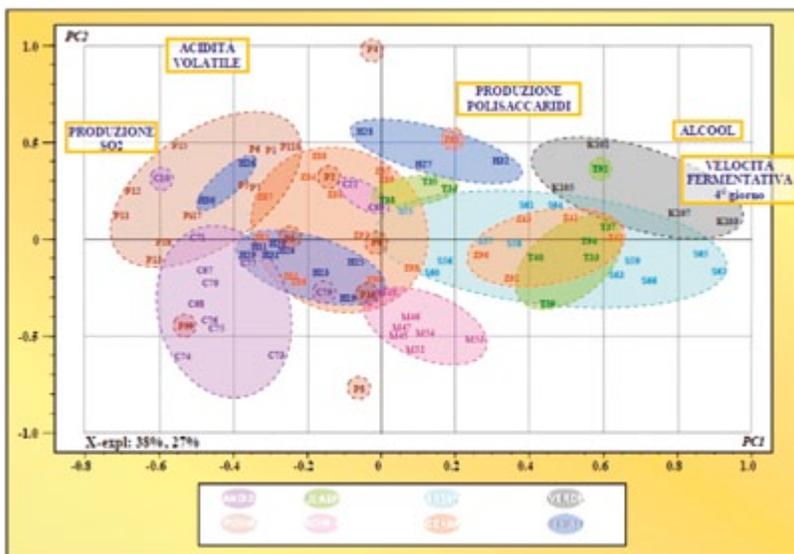


Tabella 3. Ceppi selezionati e relativi caratteri enologici

Genere	Codice ceppi	Caratteri enologici
<i>Candida</i>	Ca 22 Ca 69	Buon potere alcoligeno; elevata purezza fermentativa; fermentato con il maggiore contenuto di polisaccaridi (ceppo n. 69)
<i>Hanseniaspora</i>	Ha 25 Ha 32	Buon potere alcoligeno; buona purezza fermentativa; attività glucosidasi elevata (ceppo n. 25)
<i>Kluyveromyces</i>	Kl 101 Kl 103	Buona purezza fermentativa; buon potere alcoligeno (ceppo n. 101); attività glucosidasi; fermentato con contenuto elevato di polisaccaridi (ceppo n. 103)
<i>Metschnikowia</i>	Me 46	Attività esterasica e glucosidasi; fermentato con contenuto medio di polisaccaridi
<i>Pichia</i>	Pi 4 Pi 9	Buon potere alcoligeno; buona purezza fermentativa; fermentati con contenuto elevato di polisaccaridi
<i>Saccharomyces</i>	Sd 62 Sd 64	Buon potere alcoligeno; buona purezza fermentativa e fermentati con contenuto elevato di polisaccaridi
<i>Torulasporea</i>	To 92 To 94	Buon potere alcoligeno; fermentati con contenuto medio-elevato di polisaccaridi
<i>Zygosaccharomyces</i>	Zy 42 Zy 89	Buon potere alcoligeno; buona purezza fermentativa; fermentati con buon contenuto di polisaccaridi
<i>Schizosaccharomyces</i>	S 95	Buon potere alcoligeno; buona purezza fermentativa; fermentato con il contenuto di polisaccaridi significativamente più elevato rispetto a tutti gli altri generi

3.3 Valutazione dell'attitudine enologica dei 16 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces* in fermentazioni su scala di laboratorio

I 16 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces*, sono stati utilizzati in prove di fermentazione (mosto pastorizzato e standardizzato per contenuto zuccherino al 23,1%) in coinoculo con uno starter commerciale (EC1118) appartenente alla specie *S. cerevisiae*. Le prove sono state allestite seguendo lo schema sperimentale riportato nella tabella 4.

Nella tabella 5 sono riportati in sintesi i risultati ottenuti nelle diverse tesi.

Tabella 5. Riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle diverse tesi (coinoculo *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces*) comparati con quelli dei controlli (colture pure di *S. cerevisiae*)

142 La ricerca applicata ai vini di qualità

Tabella 4. Schema delle prove per la valutazione dell'attitudine enologica dei 16 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces* in fermentazioni su scala di laboratorio

Tesi 1	10 ⁷ cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10 ⁷ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Tesi 2	10 ⁷ cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10 ⁵ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Tesi 3	10 ⁷ cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10 ³ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Controlli	<i>S. cerevisiae</i> (coltura pura) 10 ⁷ cell/ml <i>S. cerevisiae</i> (coltura pura) 10 ⁵ cell/ml <i>S. cerevisiae</i> (coltura pura) 10 ³ cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> (coltura pura) 10 ⁷ cell/ml

Tabella 5. Riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle diverse tesi (coinoculo *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces*) comparati con quelli dei controlli (colture pure di *S. cerevisiae*)

Ceppo non- <i>Saccharomyces</i> in coinoculo	Tesi	Cinetica fermentativa	Etanolo	Ac. volatile	Ac. totale	Glicerolo	Polisaccaridi
<i>Candida zemplinina</i> 22	1 2 3	≈ - -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ +	+ + ++
<i>Candida tropicalis</i> 69	1 2 3	≈ -- --	≈ ≈ ≈	≈ ≈ -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	+ + ++
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 25	1 2 3	≈ ≈ -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ -	- - -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 32	1 2 3	≈ - --	≈ ≈ ≈	≈ - -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	+ ++ ++
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 46	1 2 3	≈ - -	≈ ≈ ≈	-- -- --	- - -	≈ ≈ +	+ + ++
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> 101	1 2 3	≈ -- --	≈ ≈ ≈	- - -	≈ ++ ++	+ ++ ++	+ + ++
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> 103	1 2 3	≈ - -	≈ ≈ ≈	- -- --	≈ ≈ +	≈ ≈ ≈	+ ++ ++
<i>Pichia fermentans</i> 4	1 2 3	≈ -- --	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	- - -	≈ ≈ ≈	+ ++ ++

(continua)

<i>Pichia anomala</i>	1	≈	≈	≈	≈	≈	+
	2	--	≈	++	≈	≈	+
	9	--	≈	++	+	≈	++
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1	-	≈	≈	≈	≈	++
	2	--	≈	≈	≈	≈	++
	62	--	≈	≈	-	+	++
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1	-	≈	≈	≈	++	++
	2	--	-	-	≈	++	++
	64	--	--	-	≈	++	+++
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	≈	≈	-	--	++	++++
	2	-	≈	-	--	+++	+++++
	95	-	≈	-	--	+++	+++++
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1	≈	≈	-	≈	≈	+
	2	--	≈	-	≈	≈	++
	92	--	≈	-	≈	≈	++
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1	≈	≈	-	≈	≈	≈
	2	--	≈	--	≈	≈	+
	94	--	≈	--	≈	≈	++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1	≈	≈	≈	≈	≈	≈
	2	-	≈	≈	≈	≈	+
	89	--	≈	≈	≈	+	++
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	1	≈	≈	≈	≈	≈	≈
	2	-	≈	-	≈	≈	++
	42	--	≈	-	≈	≈	++

≈ simile al rispettivo controllo *cerevisiae* in coltura pura

- inferiore al rispettivo controllo *cerevisiae* in coltura pura

+ superiore al rispettivo controllo di *Saccharomyces cerevisiae* in coltura pura

3.4 Valutazione dell'attitudine enologica dei 7 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces* in microvinificazioni su scala pilota

Tra i lieviti testati nelle microfermentazioni su scala di laboratorio, sono stati selezionati sette ceppi di lievito non-*Saccharomyces* con cui sono state allestite microvinificazioni in scala pilota. Le fermentazioni sono state effettuate presso la cantina sperimentale del consorzio Toscana, in serbatoi di acciaio da 100 litri, riempiti con 70 litri di pigiato di uve sangiovese. In ciascuna vasca, è stato inoculato un ceppo di lievito non-*Saccharomyces* e, dopo 3 giorni, uno starter commerciale di *S. cerevisiae*.

I risultati ottenuti sono riportati in sintesi nella tabella 6.

L'elaborazione dei dati ha permesso di individuare per ciascuna associazione non-*Saccharomyces/S.cerevisiae* alcune caratteristiche enologiche interessanti. In particolare, in coltura mista, in funzione anche dei diversi rapporti di inoculo, sono state osservate le seguenti peculiarità:

- riduzione della concentrazione di etanolo (*Saccharomyces*)
- riduzione dell'acidità volatile (*Torulaspora*)

Tabella 6. Riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi (inoculo sequenziale non-*Saccharomyces/S. cerevisiae*) comparati con quelli dei controlli (inoculo di solo *S. cerevisiae*) nelle prove di microvinificazione in cantina

Ceppo non- <i>Saccharomyces</i>	Cinetica di fermentazione	Etanolo	Ac. volatile	Ac. totale	Glicerolo	Polisaccaridi	Composti volatili
<i>Candida zemplinina</i> 22	≈	-	+	+	++	++	Diminuzione alcoli amilici; incremento di isobutanolo e 2 fenil etanolo
<i>Hanseniaspora osmophila</i> 32	-	-	++	+	≈	≈	Diminuzione di amilico attivo; incremento di etil acetato, isobutanolo, 2 fenil etanolo e feniletil acetato
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> 103	-	≈	+	+	+	+++	Incremento di isobutanolo, isoamilico, etil lattato, 2 fenil etanolo e acido butirrico
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 46	-	-	≈	+	+	+	Incremento di isoamilico, isobutanolo, etilacetato e, notevole incremento di 2 fenil etanolo
<i>Pichia fermentans</i> 4	≈	-	+	+	≈	++	Incremento di isobutanolo e 2 fenil etanolo
<i>Torulasporea delbrueckii</i> 92	-	-	≈	++	+	++	Incremento di isoamilico, isobutanolo e notevole incremento di 2 fenil etanolo
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> 42	≈	--	≈	++	≈	+	Diminuzione alcoli amilici; incremento di isobutanolo e 2 fenil etanolo

≈ simile al controllo

- inferiore al controllo

+ superiore al controllo

- incremento di acidità totale (*Kluyveromyces*)
- incremento di polisaccaridi (vari generi)
- incremento di isoamil acetato, 2-fenil etanolo, fenil etil acetato (vari generi).

Sulla base di queste osservazioni e tenendo conto anche della differenza di competitività (intesa come presenza e persistenza durante il processo fermentativo) che hanno mostrato i ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, sono stati selezionati i ceppi Kl101 e Zy42, appartenenti rispettivamente alla specie *K. thermotolerans* e *Z. florentinus*.

K. thermotolerans (KL101) in coltura mista ha mostrato infatti un'ottima competitività, una buona capacità acidificante (già nota in letteratura) e una minore produzione di acidità volatile; inoltre si è riscontrato capace di incrementare i livelli di glicerolo, polisaccaridi e di alcuni composti volatili come il 2-fenil etanolo.

Z. florentinus (Zy42) è stato selezionato per la buona competitività, per la minore produzione di acidità volatile, rispetto a *S. cerevisiae* in coltura pura, nei relativi fermentati e, inoltre, è risultato in grado di incrementare i livelli finali di polisaccaridi e di composti volatili, come il 2-fenil etanolo e il fenil etil acetato.

3.5 Valutazione dell'attitudine enologica dei 2 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste su scala di laboratorio.

I due ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, *K. thermotolerans* (KL101) e *Z. florentinus* (Zy42), sono stati quindi valutati in prove di fermentazione in triplo, su scala di laboratorio, in combinazione con uno starter commerciale (EC1118) appartenente alla specie *S. cerevisiae*. Le colture di lievito non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* sono state inoculate secondo lo schema riportato nella tabella 7.

I principali risultati ottenuti sono riassunti nella tabella 8

Tabella 7. Schema delle prove per la valutazione dell'attitudine enologica dei 2 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces*, in fermentazioni miste su scala di laboratorio

Inoculo non- <i>Saccharomyces</i> (coltura pura)	10^7 cell/ml non- <i>Saccharomyces</i>
Inoculo <i>Saccharomyces</i> (coltura pura)	10^6 cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Coinoculo	10^7 cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10^6 cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Inoculo sequenziale (<i>Saccharomyces</i> dopo 24 h)	10^7 cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10^6 cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Inoculo sequenziale (<i>Saccharomyces</i> dopo 48 h)	10^7 cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10^6 cell/ml <i>S. cerevisiae</i>

Tabella 8. Riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle diverse tesi (in coinoculo o inoculo sequenziale non-Saccharomyces/Saccharomyces) comparati con quelli dei controlli (colture pure di *S. cerevisiae*)

Ceppo	Tesi	Cinetica di fermentazione	Etanolo	Ac. volatile	Ac. totale	Glicerolo	Polisaccaridi	Composti volatili
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> (ceppo 101)	coinoculo	-	-	-	++	+	++	Diminuzione di isobutanolo, isoamilico, isoamilacetato, etil ottanoato, etil esanoato e fenil etil acetato;
	sequenziale 24 h	-	--	---	++	++	+	Incremento di amilico attivo, etil acetato, etil lattato (seq 48h), propanolo, 2 fenil etanolo e dietil succinato.
	sequenziale 48 h	-	--	--	++	+	+	
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> (ceppo 42)	coinoculo	≈	≈	--	≈	-	+	Diminuzione di isobutanolo, incremento di 2 fenil etanolo e feniletilacetato
	sequenziale 24 h	--	≈	-	+	-	++	
	sequenziale 48 h	-	≈	-	++	-	++	

≈ simile al controllo di *cerevisiae* in coltura pura

- inferiore al controllo di *cerevisiae* in coltura pura

+ superiore al controllo di *cerevisiae* in coltura pura

Tabella 9. Schema delle prove per la valutazione dell'influenza della temperatura in fermentazioni miste con i 2 ceppi selezionati di lievito non-Saccharomyces, su scala di laboratorio

Coinoculo non-Saccharomyces/ Saccharomyces	20°C	10 ⁷ cell/ml non-Saccharomyces + 10 ⁶ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
	30°C	
Inoculo Saccharomyces (coltura pura)	20°C	10 ⁶ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
	30°C	

Tabella 10. Riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle tesi (*coinculo non-Saccharomyces/S. cerevisiae*) comparati con quelli dei controlli (colture pure di *S. cerevisiae*) a due differenti temperature

Ceppo	Tesi	Cinetica di fermentazione	Etanolo	Ac. volatile	Ac. totale	Glicerolo	Polisaccaridi	Composti volatili
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> (ceppo 101)	Prova a 20°C	-	-	+	+	++	+++	Diminuzione di acetaldeide. Incremento di etil acetato, isoamilico, isobutanolo, etil lattato, propanolo, amilico attivo
	Prova a 30°C	-	≈	-	+	+	+++	Incremento di isoamilico
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> (ceppo 42)	Prova a 20°C	≈	-	≈	+	+	++	Diminuzione di acetaldeide e propanolo. Incremento di amilico attivo e isobutanolo
	Prova a 30°C	≈	≈	-	+	+	++	Diminuzione di etil acetato e incremento di isoamilico e amilico attivo

≈ simile al rispettivo controllo *cerevisiae* in coltura pura
 - inferiore al rispettivo controllo *cerevisiae* in coltura pura
 + superiore al rispettivo controllo *cerevisiae* in coltura pura

3.6 Valutazione dell'influenza della temperatura in fermentazioni miste con i 2 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces*, su scala di laboratorio.

Per valutare l'influenza della temperatura sul decorso delle fermentazioni condotte con colture miste, i due ceppi di lievito selezionati, *K. thermotolerans* (K1101) e *Z. florentinus* (Zy42), sono stati utilizzati in prove di fermentazione a due diverse temperature in associazione con con uno starter commerciale di *S. cerevisiae* (EC1118). Per le prove sono stati utilizzati fermentatori da banco da 3 litri (equipaggiati per la rilevazione in continuo ed il controllo di diversi parametri operativi quali temperatura, ossigeno disciolto e pH) riempiti con mosto ottenuto da uve Sangiovese e Cabernet (25,4% di zuccheri), previa pastorizzazione.

Le prove di fermentazione sono state allestite in doppio, secondo lo schema riportato nella tabella 9.

I principali risultati ottenuti sono riassunti nella tabella 10.

3.7 Valutazione dell'attitudine enologica dei 2 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste su scala semi-industriale

Lo starter commerciale di *S. cerevisiae* (EC1118) e i due ceppi di lievito *K. thermotolerans* (K1101) e *Z. florentinus* (Zy42), sono stati inoculati in fermentini da 10 HL secondo lo schema riportato nella tabella 11.

Tabella 11. Schema delle prove per la valutazione dell'attitudine enologica dei 2 ceppi selezionati di lievito non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste, su scala semi-industriale

Inoculo <i>Saccharomyces</i> (controllo)	10 ⁶ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Coinoculo	10 ⁷ cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10 ⁶ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>
Inoculo sequenziale (<i>Saccharomyces</i> dopo 2 giorni)	10 ⁷ cell/ml non- <i>Saccharomyces</i> + 10 ⁶ cell/ml <i>S. cerevisiae</i>

Il mosto di uve sangiovese utilizzato per le prove aveva la seguente composizione:

pH: 3,24; acidità totale: 7,35 g/l; zuccheri: 22,23 %; SO₂: 39,50 mg/l.

Per il monitoraggio molecolare di *Kluyveromyces thermotolerans* nel corso delle fermentazioni con starter misti (*S. cerevisiae*/*K. thermotolerans*), sono stati appositamente disegnati primer impiegabili in reazioni di Real Time PCR (RT-PCR).

Tabella 12. Riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle tesi su scala semi-industriale (in coinoculo e sequenziale di non-Saccharomyces/S. cerevisiae) comparati con quelli dei controlli (inoculo con solo S. cerevisiae)

Ceppo	Tesi	Cinetica di fermentazione	Etanolo	Ac. volatile	Ac. totale	Glicerolo	Polisaccaridi	Composti volatili
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> (ceppo 101)	Coinoculo	≈	≈	≈	+	≈	≈	Diminuzione di etil acetato. Incremento di isoamilico ed etil lattato
	Sequenziale	≈	-	++	++	+	≈	Diminuzione di propanolo. Incremento di isobutanolo e notevole di etil lattato
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> (ceppo 42)	Coinoculo	≈	≈	≈	≈	≈	≈	Diminuzione di etil acetato e propanolo
	Sequenziale	≈	≈	+	≈	+	≈	Diminuzione di propanolo e acetaldeide. Incremento di isobutanolo e etil acetato

≈ simile

- inferiore

+ superiore

Durante i processi fermentativi sono stati fatti vari prelievi per valutare sia il consumo degli zuccheri e la produzione dell'acidità volatile sia l'evoluzione della popolazione dei lieviti inoculati e della microflora indigena. Dopo il primo travaso, i vini sono stati caratterizzati per i parametri di base (pH, acidità volatile, acidità totale, alcol, zuccheri residui) e per il contenuto livello di polisaccaridi, glicerolo e di alcuni composti volatili.

Il vino fiore di ciascuna prova è stato poi inoculato con batteri lattici del commercio e mantenuto a 20°C fino al termine della fermentazione malolattica. I vini sono stati quindi imbottigliati, dopo opportuna stabilizzazione, per la loro successiva valutazione organolettica.

I principali risultati ottenuti dalle fermentazioni delle diverse tesi sono riassunti nella tabella 12.

4. Conclusioni

La presente sperimentazione ha rappresentato una tappa importante per la conoscenza delle interazioni tra lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* nel corso di fermentazioni vinarie, in vista della messa a punto di un processo di fermentazione multistarter per il miglioramento della qualità complessiva dei vini.

I risultati ottenuti hanno permesso non solo di evidenziare l'ampia variabilità inter e intraspecifica dei lieviti non-*Saccharomyces*, ma anche di rivalutarne il ruolo durante il processo fermentativo.

L'aggiunta di lieviti non-*Saccharomyces* nella preparazione di starter di vinificazione può consentire, infatti, non solo il controllo microbiologico del processo, ma anche l'ottenimento di particolari profili analitici e sensoriali dei vini.

Lo *scale-up* delle prove ha riguardato solo due lieviti non-*Saccharomyces* appartenenti alle specie *Kluyveromyces thermotolerans* e *Zygosaccharomyces florentinus*, per i quali sono state ottenute informazioni utili in vista di un loro possibile utilizzo pratico in cantina.

Tuttavia, anche i ceppi di lievito appartenenti alle altre specie esaminate meritano ulteriori approfondimenti, in quanto hanno mostrato interessanti caratteri come ad esempio:

- riduzione dell'acidità volatile e produzione di composti volatili per i ceppi di *T. delbrueckii*;
- attività esterasica e beta-glucosidasica (che andrebbe ulteriormente valutata in substrati dove siano presenti precursori dei composti aromatici), per i ceppi appartenenti al genere *M. pulcherrima*;
- capacità di interagire positivamente con *S. cerevisiae*, migliorando il profilo dei prodotti delle fermentazioni miste con le colture appartenenti ai generi *Pichia* e *Hanseniaspora* (in particolare con la specie *H. osmophila*).

Publicazioni prodotte durante la sperimentazione

- Domizio P., Lencioni L., Romani C., Ciani M., Comitini F., Landolfo S., Mannazzu I. (2009), *Miglioramento della qualità dei vini mediante l'impiego di inoculi misti*. Atti Convegno Enoforum "Innovazione ed eccellenza", Piacenza 21-23 aprile 2009: 104.
- Domizio P., Romani C., Comitini F., Gobbi M., Ciani M., Lencioni L., Mannazzu I. (2009), *Characterization of potential spoilage wine yeasts and their possible use in winemaking process*. Atti "II International Symposium Microsafetywine: wine microbiology and safety: from the vineyard to the bottle", Martina Franca (Taranto), 19-20 november 2009: 83.
- Domizio P., Romani C., Comitini F., Gobbi M., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Potential spoilage non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with Saccharomyces cerevisiae*, «ann microbiol.», 61: 137-144.
- Domizio P., Ciani M., Mannazzu I., Romani C., Gobbi M., Comitini F., Lencioni L. (2010), *Alla ricerca della complessità perduta, «VQ»*, numero cinque – giugno 2010: 36-39. Romani C., Domizio P., Lencioni L., Gobbi M., Comitini F., Ciani M., Mannazzu I. (2010), *Polysaccharides and glycerol production by non-Saccharomyces wine yeasts*. Atti: "Third International Symposium Macrowine 2010 on macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine", Torino 16-18 June 2010: 86.
- Gobbi M., Comitini F., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2010), *non-Saccharomyces yeasts in controlled mixed culture fermentation in winemaking: the role of metabolic interactions*. Atti "14th International Biotechnology symposium and exhibition: Biotechnology for the sustainability of Human Society", Rimini 14-18 settembre 2010.
- Romani C., Domizio P., Lencioni L., Gobbi M., Comitini F., Ciani M., Mannazzu I. (2010), *Polysaccharides and glycerol production by non-Saccharomyces wine yeasts in mixed fermentation*". Proceeding of "Third International Symposium MACROWINE 2010 on macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine. Torino 16-18 June 2010", «Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino», 2009-2010, 31: 185-189.
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae*, «Food Microbiol.», (5): 873-882.
- Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Outlining a future for non-Saccharomyces yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with Saccharomyces cerevisiae for must fermentation*, «int. J. Food Microbiol.», 147(3): 170-180.
- Romani C., Lencioni L., Domizio P., Di Blasi S., Gobbi M., Comitini F., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Comportamento fermentativo di starter misti Saccharomyces/Kluyveromyces e Saccharomyces/Zygosaccharomyces in prove di cantina*. Enoforum 2011, Arezzo 3-5 maggio 2011: 110.
- Romani C., Domizio P., Lencioni L., Biondi Bartolini A., Gobbi M., Comitini F., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Microvinificazioni con inoculi multistarter di lieviti non-Saccharomyces/Saccharomyces*. Enoforum 2011, Arezzo 3-5 maggio 2011: 110.

- Oro L., Gobbi M., Comitini F., Domizio P., Lencioni L., Romani C., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Influenza delle modalità di inoculo sulle fermentazioni miste controllate con lieviti Saccharomyces e non-Saccharomyces*. Enoforum 2011, Arezzo 3-5 maggio 2011: 105.
- Gobbi M., Comitini F., Romani C., Domizio P., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Influenza della temperatura nelle fermentazioni multi starter controllate*. Enoforum 2011, Arezzo 3-5 maggio 2011: 105.
- Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Inoculo di starter misti Saccharomyces cerevisiae/non-Saccharomyces per il miglioramento della qualità dei vini*. Enoforum 2011, Arezzo 3-5 maggio 2011: 43.

Bibliografia

- Amerine M.A., Kunkee R.E., Ough C.S., Singleton V.L. e Webb A.D. (1980), *The technology of Wine Making*, AVI Publishing, Westport.
- Ciani M., Rosini G. (1993), *Vinificazioni industriali in purezza microbiologica*, «Industrie delle Bevande», 22, 202-206.
- Ciani m. (1997), *Role, enological properties and potential use of non-Saccharomyces wine yeasts*, in *Recent Res. Develop. Microbiol.*, Vol. 1, ed. s. G. Pandalai, research Signpost, Kerala, India: 317-331.
- Ciani M. e Maccarelli F. (1998), *Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making*, «World J. Microbiol. Biotechnol.», 14: 199-203.
- Ciani M. e Ferraro L. (1998), *Combined use of immobilized Candida stellata cells and Saccharomyces cerevisiae to improve the quality of wines*, «J. Appl. Microbiol.», 85: 247-254.
- Ciani M. (2001), *Allestimento di starter con culture microbiche miste*, «Industrie delle Bevande», 30: 35-39.
- Ciani M., Beco L., e Comitini F. (2006), *Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations*, «Int. J. Food Microbiol.» 108: 239-245.
- Ciani M. e Comitini F. (2006), *Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of Candida stellata in mixed fermentation with Saccharomyces cerevisiae*, «World J. Microbiol. Biotechnol.», 22 (6): 619-623.
- Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P. (2010), *Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in wine-making*, «FEMS Yeast Res.», 10: 123-33.
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae*, «Food Microbiol.», 28(5): 873-882.
- Domizio P., Lencioni L., Ciani M., Di Blasi S., Pontremolesi C. e Sabatelli M.P. (2007), *Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions*, «Int. J. Food. Microbiol.», 115: 281-289.
- Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M. (2011), *Outlining a future for non-Saccharomyces yeasts: selection of putative*

- spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation, «Int. J. Food Microbiol.», 147(3): 170-180.
- Egli C.M., Ediger W.D., Mitrakul C.M. e Henick-Kling T. (1998), *Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines*, «J. Appl. Microbiol.», 85: 779-789.
- Farkas G., Rezessy-Szabo J.m., Zakany F., Hoschke A. (2005), *Interaction of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeast strains in an alcoholic fermentation process*, «Acta Alimentaria», 34 (1): 81-90.
- Fernandez M., Ubeda J.F., Briones A.I. (2000), *Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making*, «Int. J. Food Microbiol.», 59: 29-36.
- Ferreira A.M., Climaco M.C., Faia A.M. (2001), *The role of non-Saccharomyces species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – a preliminary study*, «J. Appl. Microbiol.», 91: 67-71.
- Fleet G.H. e Heard G.M. (1993), *Yeasts-growth during fermentation*, in *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G.H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland: 27-54.
- Fleet G.H., Lafon-Lafourcade S. e Ribéreau-Gayon P. (1984), *Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines*, «Appl. Environ. Microbiol.», 48: 1034-1038.
- Fleet G.H. (2008), *Wine yeasts for the future*, «FEMS Yeast Res.», 8: 979-995.
- Heard G.M. e Fleet G.H. (1985), *Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines*, «Appl. Environ. Microbiol.», 50: 727-728.
- Henick-Kling T., Ediger W.D., Daniel P. e Monk P. (1998), *Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine*, «J. Appl. Microbiol.», 84: 865-876.
- Hermle S., Calmonte S., Frei A., Hoffmann-Boller P., Gafner J., Schütz M. (2005), *Populations dynamik von Weinhefe-Mischkulturen*, «schweiz. Z. Obst Weinbau», 141 (8): 7-9.
- Herraiz T., Reglero G., Herraiz M., Martin-Alvarez P.J. e Cabezudo M. (1990), *The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide*, «Am. J. Enol. Vitic.» 41, 313-318.
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H. e Pretorius I.S. (2006), *The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production*, «S. Afr. J. enol. Vitic.», 27: 15-38.
- Kapsopoulou K., Kapaklis A., Spyropoulos H. (2005), *Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast Kluyveromyces thermotolerans isolated in Greece*, «World J. Microbiol. Biotechnol.», 21 (8-9): 1599-1602.
- Kapsopoulou K., Mourtzini A., Anthoulas M., Nerantzis E. (2007), *Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of Kluyveromyces thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae*, «World J. Microbiol. Biotechnol.», 23 (5): 735-739.
- Languet P., Aguera E., Samson A., Ortiz-Julien A., Salmon J.M. (2005), *Valorization aromatique des mouts par l'utilisation séquentielle des levures d'espèces non-Saccharomyces et Saccharomyces*, «Rev. Oenolog.», 117: 31-33.
- Lema C., Garcia-Jares C., Orriols I., Angulo L. (1996), *Contribution of Saccharomyces and non-Saccharomyces populations to the production of some compounds of Albarino wine aroma*, «Am. J. Enol. Vitic.», 47: 206-216.

- Mendoza L. M., Manca De Nadra M. C., Farías M.E. (2007), *Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of Klöeckera apiculata and Saccharomyces cerevisiae wine related strains*, «Biotechnology Letters», 29: 1057-1063.
- Mora J., Barbas J.I. e Mulet A. (1990), *Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with Kluyveromyces thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae*, «Am. J. Enol. Vitic.», 41: 156-159.
- Moreira N. (2005), *Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts*, «Int. J. Food Microbiol.», 103: 285-290.
- Pardo I., García M.J., Zuniga M. e Uruburu F. (1989), *Dynamics of microbial populations during fermentations of wines from the Utiel Requena region of Spain*, «Appl. Environ. Microbiol.», 55: 539-541.
- Pérez-Nevado F., Albergarla H., Hogg T., Girio F. (2006), *Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with Saccharomyces cerevisiae*, «Int. J. Food Microbiol.», 108: 336-345.
- Renouf V., Claisse O. e Lonvaud-Funel A. (2007), *Inventory and monitoring of wine microbial consortia*, «Appl. Microb. Cell. Physiol.», 75: 149-164.
- Romano P., Suzzi G., Comi G. e Zironi R. (1992), *Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts*, «J. Appl. Bacteriol.», 73: 126-130.
- Romano P., Suzzi G., Comi G., Zironi R. e Maifreni M. (1997), *Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts*, «J. Appl. Microbiol.», 82: 615-618.
- Romano P., Suzzi G., Domizio P., Fatichenti F. (1997), *Secondary products formation as a tool for discriminating non-Saccharomyces wine strain*, «Antonie Van Leeuwenhoek», 71: 239-242.
- Romano P. (2002), *Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine*, in *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*, ed. Ciani M., Research Signpost, Kerala, India: 99-109.
- Rosi I., Domizio P., Fia G. (1997), *Characterization of esterase activity in wine related yeasts*. Book of Abstract 18th ISSY – Yeast Nutrition and natural Habitats – 24-29 August, Bled, slovenia, Raspor P. et al. eds.), published by Biotechnological Faculty, University of Ljubljana: P9-03.
- Rosi I., Vinella M., Domizio p. (1994), *Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin*, «J. Appl Bacteriol.», 77: 519-527.
- Snow P.G. e Gallender J.F. (1979), *Deacidification of white table wines through partial fermentation by Schizosaccharomyces pombe*, «Am. J. Enol. Vitic.», 30:45-48.
- Strauss M.L.A., Jolly N.P., Lambrechts M.G., Van Rensburg P. (2001), *Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts*, «J. Appl. Microbiol.», 91: 182-190.
- Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A. e Pretorius I.S. (2005), *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*, «Aust. J. Grape Wine Res.», 11: 139-173.
- Yokotsuka K., Otaky A., Naitoh A. e Tanaka H. (1993), *Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of high-acid grape must using two immobilized yeasts, Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae*, «Am. J. Enol. Vitic.», 44: 371-377.

Il controllo della fermentazione malolattica per la tutela della qualità del vino

L. Granchi*, S. Guerrini*, M. Bronzini*

I. Introduzione

Nella trasformazione del mosto d'uva in vino la fermentazione malolattica è un processo che di solito segue temporalmente la fermentazione alcolica e consiste principalmente nella conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico e anidride carbonica. Dal punto di vista biochimico la fermentazione malolattica in realtà non è una vera e propria fermentazione, ma consiste in una reazione di decarbossilazione ad opera dei batteri malolattici, nella maggior parte dei casi appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*. La diretta conseguenza della trasformazione di un acido di-protico in uno mono-protico è la riduzione dell'acidità e di conseguenza il conferimento al vino di un gusto più morbido. Tuttavia, la fermentazione malolattica non è una semplice reazione di disacidificazione, come si riteneva in passato, ma possiede un significato enologico assai più complesso. Negli ultimi anni, infatti, numerose ricerche sulla fermentazione malolattica hanno attribuito a questo processo un'azione decisiva nel conferire al vino una maggiore complessità aromatica grazie alle numerose attività metaboliche dei batteri malolattici a carico di substrati diversi dall'acido malico (Lonvaud-Funel 1999). Questi aspetti hanno reso la fermentazione malolattica particolarmente desiderata non solo nei vini rossi ma, più recentemente, anche nei vini bianchi. Oltre alla riduzione dell'acidità e alle modificazioni delle proprietà organolettiche, alla fermentazione malolattica è stata tradizionalmente attribuita anche la capacità di conferire al vino una maggiore stabilità microbiologica. Per molto tempo, infatti, è stato ritenuto che il consumo dell'acido malico e la degradazione di altre sostanze, come ad

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia.

esempio l'acido citrico, avessero come conseguenza una minore probabilità di sviluppo microbico indesiderato. Analogamente, veniva attribuita una valenza positiva al consumo, da parte dei batteri lattici, di altri composti come aminoacidi e vitamine, trattandosi di un ulteriore esaurimento di substrati potenzialmente utilizzabili da altri microrganismi indesiderati. Tuttavia, in base alle attuali conoscenze, questa è una visione troppo generalizzata e semplicistica dato che in vino si possono verificare complesse situazioni che non necessariamente conducono ad una stabilità biologica (Granchi *et al.* 2005a). A determinare l'esito finale in vino concorrono, infatti, molteplici fattori tra loro interattivi, quali la tipologia delle uve e il loro stato sanitario, la tecnica e le condizioni di vinificazione, i ceppi batterici intervenuti e la loro persistenza ed, infine, le possibili interazioni tra batteri lattici ed altri microrganismi tra cui, in primo luogo, i lieviti. Quindi, per poter interpretare l'effettivo ruolo svolto dai batteri lattici ai fini della stabilità microbiologica di un vino, per prima cosa, è indispensabile conoscere le proprietà delle specie batteriche o dei ceppi che hanno condotto la fermentazione malolattica. Un esempio di ciò è rappresentato dall'attività degradativa a carico degli aminoacidi che, se da un lato può incrementare la stabilità microbiologica del vino, dall'altro può portare alla formazione di composti dotati di proprietà negative per la salute dell'uomo quali le amine biogene (AB). A questo proposito, numerosi studi condotti negli ultimi anni su vini prodotti in diversi Paesi Europei (Vincenzini *et al.* 2009; Landete *et al.* 2007; Mangani *et al.* 2006; Marcobal *et al.* 2006; Guerrini *et al.* 2002; Lonvaud-Funel 2001), hanno evidenziato che nel processo di vinificazione la fermentazione malolattica è da ritenersi la fase più critica per l'accumulo di queste sostanze.

Le AB sono basi organiche a basso peso molecolare che possono essere presenti in diversi alimenti principalmente in seguito alla decarbossilazione microbica dei corrispondenti amminoacidi precursori (Ten Brink *et al.* 1990) (Tab. 1). Tali sostanze sono ritenute responsabili di vari effetti tossici e di reazioni allergiche nell'uomo che sono funzione della tipologia di AB, della loro concentrazione e della sensibilità individuale (Silla Santos *et al.* 1996). La tossicità delle AB è principalmente legata al fatto che molte di queste sostanze svolgono importanti funzioni biologiche nell'uomo: in particolare, le amine psicoattive come la tiramina agiscono a livello del sistema nervoso centrale come veri e propri neurotrasmettitori, mentre quelle vasoattive come l'istamina a livello del sistema cardio-vascolare (Shalaby 1996). Queste sostanze sono state trovate in un'ampia varietà di alimenti, quali ad esempio prodotti a base di pesce, carne, frutta, cioccolata, oltre a numerosi prodotti fermentati come insaccati, formaggi e vino. Il consumo di alimenti contenenti AB è stato considerato responsabile di numerosi effetti che spaziano dalle più lievi intolleranze alimentari alle intossicazioni vere e proprie, come la sindrome sgombroide o la *cheese effect*. Le AB con la maggiore tossicità sono l'istamina e la tiramina. I sintomi più

frequenti che l'istamina è in grado di provocare includono eruzioni cutanee, nausea, vomito, diarrea, crampi addominali, mal di testa, palpitazione cardiaca, dilatazione dei vasi sanguigni e, nei casi peggiori, anche crisi respiratorie. L'effetto tossico più grave che la tiramina è in grado di provocare è la crisi ipertensiva (*cheese effect*), ma può anche essere responsabile di cefalee, di problemi respiratori ed infine di lacrimazione e salivazione eccessiva. Negli alimenti si possono trovare anche alcune poliammine, come la putrescina, la cadaverina, l'agmatina, la spermina e la spermidina. Tali sostanze non possiedono un'elevata tossicità e la loro presenza di per sé negli alimenti non rappresenta un pericolo per la salute del consumatore, a meno che non siano contemporaneamente presenti altre AB (effetto sinergico). La tossicità di putrescina e cadaverina, infatti, è dovuta prevalentemente alla loro capacità di competere con le AB più tossiche per i sistemi di detossificazione intestinali che si realizzano attraverso l'azione di enzimi quali le monoammino e/o diammino-ossidasi. Putrescina e cadaverina possono anche avere effetti negativi sulla qualità sensoriale del vino in quanto possono mascherare alcune note aromatiche. Inoltre, le AB possono essere precursori di sostanze potenzialmente cancerogene come le nitrosamine.

Nonostante il vino contenga quantitativi di AB piuttosto bassi se confrontati con quelli riscontrati in altri alimenti fermentati, l'azione tossica di queste sostanze risulta potenziata sia dalla loro presenza congiunta, sia dall'etanolo, che è noto svolgere una azione inibitrice sulle monoammino-ossidasi intestinali, ovvero sul sistema naturale di detossificazione presente nell'uomo.

Tabella 1. Amine biogene e relativi aminoacidi precursori

Aminoacido precursore	Enzima coinvolto	Amine biogene
Istidina	Istidina decarbossilasi	Istamina
Tirosina	Tirosina decarbossilasi	Tiramina
Lisina	Lisina decarbossilasi	Cadaverina
Fenilalanina	Fenilalanina decarbossilasi	Fenilettilamina
Ornitina	Ornitina decarbossilasi	Putrescina, spermina, spermidina
Arginina	Arginina decarbossilasi	Agmatina
Serina	Serina decarbossilasi	Etanolamina

2. La concentrazione di amine biogene nei vini

La presenza di istamina in alcuni vini è stata segnalata per la prima volta negli anni '50 e più tardi, in una rassegna apparsa nel 1975 sugli Annali dell'Istituto per l'Enologia di Asti, venivano riportati dati che sembravano attribuire alla fermentazione malolattica un ruolo centrale nel processo di accumulo di questa sostanza. Da allora, oltre l'istamina, altre AB, quali ad

esempio putrescina, cadaverina, tiramina e feniletilamina, sono state segnalate in vino da vari autori (Mafra *et al.* 1999; Marcobal *et al.* 2005). Dai dati della letteratura, riassunti nella tabella 2, risulta che la concentrazione di AB in vino è soggetta ad una forte variabilità, la cui origine può essere attribuita alla varietà dell'uva, alla regione di produzione e all'annata del vino. Il processo di vinificazione, secondo quanto riportato da alcuni autori (Herbert *et al.* 2005), potrebbe addirittura modificare completamente l'eventuale effetto dei fattori varietali o ambientali sopra elencati.

Tabella 2. Concentrazioni di amine biogene in vino secondo dati della letteratura (valore minimo–massimo o valore medio \pm deviazione standard; nr = non rilevabile) (Vincenzini *et al.* 2009)

Vino (Origine)	Numero campioni	Istamina (mgL ⁻¹)	Tiramina (mgL ⁻¹)	Putrescina (mgL ⁻¹)	Fonte bibliografica
Bianco (Grecia)	47	nr - 5.95	nr - 2.54	nr - 3.22	Soufleros <i>et al.</i> 2007
Rosso (Grecia)	45	nr - 2.11	nr - 3.65	nr - 5.23	Soufleros <i>et al.</i> 2007
Rosé (Grecia)	8	nr - 4.43	nr - 1.64	nr - 1.85	Soufleros <i>et al.</i> 2007
Rosso (Italia)	33	6.1 \pm 5.3	3.5 \pm 2.8	15.5 \pm 17.5	Mangani <i>et al.</i> 2006
Rosso (Spagna)	224	4.46 \pm 5.7	3.13 \pm 4.42	6.05 \pm 10.6	Marcobal <i>et al.</i> 2006
Rosso (Turchia)	30	nr - 1.97	nr - 0.29	nr	Anli <i>et al.</i> 2004
Rosso (Spagna)	6	2.75 \pm 1.54	2.91 \pm 1.92	9.59 \pm 5.61	Romero <i>et al.</i> 2002
Rosé (Spagna)	7	1.81 \pm 1.31	1.31 \pm 0.71	6.04 \pm 2.98	Romero <i>et al.</i> 2002
Bianco (Spagna)	6	1.17 \pm 0.99	0.48 \pm 0.67	4.31 \pm 4.21	Romero <i>et al.</i> 2002
Rosso (USA)	59	5.4 \pm 5.6	1.3 \pm 2.3	20.9 \pm 32.3	Gloria <i>et al.</i> 1998
Rosso (Francia)	54	6.7 \pm 13.5	3.7 \pm 2.3	10.8 \pm 6.7	Bauza <i>et al.</i> 1995
Rosé (Francia)	15	22.0 \pm 7.3	2.3 \pm 1.7	2.5 \pm 0.9	Bauza <i>et al.</i> 1995
Bianco (Francia)	15	3.7 \pm 8.9	2.2 \pm 1.4	1.9 \pm 0.7	Bauza <i>et al.</i> 1995

Nonostante la presenza di AB in vino sia un fenomeno diffuso, non esiste ancora una legislazione che fissi i valori limite per queste sostanze nei vini, ma diversi Paesi europei hanno comunque raccomandato, ai fini della commercializzazione del prodotto, il rispetto di tenori massimi di istamina a seconda del Paese: 2 mgL⁻¹ in Germania, 6 mgL⁻¹ nel Belgio, 10 mgL⁻¹ in Austria, 8 mgL⁻¹ in Francia e 4 mgL⁻¹ in Olanda (Landete *et al.* 2005). Anche la Svizzera fino a poco tempo fa fissava a 10 mgL⁻¹ il limite massimo di istamina raccomandato nei vini, ma dal settembre 2010 tale limite è stato rimosso. È da sottolineare che i valori limite sopra elencati sono, a seconda dei casi, nettamente inferiori ai valori medi riscontrati in alcuni vini (vedi Tab. 2). In ogni caso, l'importanza della problematica per il settore vitivinicolo è evidenziata anche dal fatto che l'*Organization International de la Vigne et du Vin* (OIV) ha approvato, nel corso dell'Assemblea Generale che si è tenuta a Porto (Portogallo) il 24 giugno 2011, l'adozione di un *Codice delle corrette pratiche vitivinicole atte a limitare al massimo la presenza di ammine biogene nei vini* (Risoluzione OIV-CST_369-2011).

Nell'ambito di questa problematica, uno studio condotto su vini prodotti in Toscana (Guerrini *et al.*, 2005), prendendo in considerazione 33 campioni di vini rossi, di cui 15 appartenenti alle D.O.C.G. *Brunello di Montalcino* e *Chianti Classico* e 18 ad Indicazione Geografica Tipica ha mostrato come, circa il 45% dei vini sia risultato caratterizzato da concentrazioni di istamina maggiori di 6 mgL^{-1} , mentre il 30% maggiori di 10 mgL^{-1} ; per quanto riguarda i contenuti di putrescina, la maggior parte dei vini (circa il 70%) presentava quantitativi inferiori a 13 mgL^{-1} , mentre circa il 30% concentrazioni comprese tra 14 e 83 mgL^{-1} . Da questa indagine è anche emersa una significativa presenza di tiramina, a concentrazioni inferiori a 5 mgL^{-1} nel 76% dei casi e a concentrazioni comprese tra 6 e 10 mgL^{-1} nel restante 24%. Da questi dati risulta evidente come il fenomeno della formazione di AB sia diffuso anche nei vini toscani di qualità e quanto questo problema non possa essere ignorato dalle aziende vitivinicole italiane, non solo perché questo potrebbe comportare problemi inerenti l'esportazione in quei Paesi in cui sono consigliati dei valori-soglia, ma anche perché la presenza di sostanze ritenute tossiche andrebbe a discapito della qualità enologica attribuita a molti vini italiani.

Malgrado sia ormai appurata la possibile presenza di AB in vino, i processi che determinano l'accumulo di queste sostanze, insieme ai fattori che ne influenzano la concentrazione e la tipologia, non sono stati ancora completamente chiariti e alcune volte è possibile riscontrare risultati discordanti tra i dati riportati in letteratura (Herbert *et al.* 2005). La maggior parte degli autori, pur riconoscendo che alcune AB come la putrescina possono essere presenti in vino per effetto del metabolismo vegetale, concorda sul fatto che sia l'attività metabolica dei microrganismi ad avere il peso maggiore nel determinare l'accumulo delle AB in vino.

3. Fattori che influenzano il contenuto di amine biogene nei vini

Sono molti i fattori che possono influenzare il tenore di AB nei vini e il fenomeno risulta essere molto complesso da descrivere in quanto ciascuno di essi è influenzato dalla concomitante presenza degli altri. Comunque sia, è possibile raggruppare tali fattori in tre categorie principali:

1. *Fattori biologici* quali ad esempio la tipologia e l'entità delle popolazioni microbiche presenti, le loro capacità metaboliche (attività decarbossilatica, proteolitica, autolitica, ecc.), il loro stato fisiologico, le interazioni tra popolazioni microbiche diverse.
2. *Fattori ambientali* quali la composizione chimica del vino in termini di aminoacidi e/o proteine, il pH, il contenuto di etanolo, la temperatura, ecc.;
3. *Fattori tecnologici* come ad esempio i trattamenti del mosto, l'uso degli *starter*, l'aggiunta di coadiuvanti di fermentazione, i tempi di contatto del vino con le fecce, ecc.

3.1 Fattori biologici: il ruolo dei lieviti

Alcune ricerche hanno dimostrato come alcuni ceppi di lievito, appartenenti a specie di interesse vinario, siano capaci di produrre AB (Caruso *et al.* 2002). In particolare, tali studi hanno mostrato come *Brettanomyces bruxellensis* sia risultato il maggior produttore di feniletilamina, mentre *Saccharomyces cerevisiae* si sia dimostrato in grado di rilasciare etanolamina e agmatina. Uno studio analogo riportato da Granchi *et al.* (2005b) su un numero significativo di ceppi di lievito, appartenenti alle specie più frequentemente riscontrate in vino, ha mostrato come in fermentazioni di laboratorio su mosto d'uva *B. bruxellensis* fosse il lievito maggiormente capace di produrre AB seguito da *S. cerevisiae* e *Metschnikowia pulcherrima* (Tab. 3). Più in dettaglio, l'agmatina rappresentava oltre il 50% delle AB totali rilasciate dalle specie *Kloeckera apiculata* e *Candida stellata*, mentre la feniletilamina raggiungeva la stessa percentuale per *M. pulcherrima* and *B. bruxellensis*. I ceppi di *S. cerevisiae* invece producevano concentrazioni di agmatina e etanolamina in concentrazioni simili e ciascuna di esse rappresentava circa il 40% del totale delle AB prodotte da questi lieviti. Infine, istamina, putrescina, cadaverina e metanolamina erano prodotte a concentrazioni inferiori a 2 mgL^{-1} , indipendentemente dalla specie di appartenenza. Nonostante ciò, uno studio riportato da Mangani *et al.* (2006) ha mostrato come durante la fermentazione alcolica la formazione di AB non sia mai rilevante. In particolare, questo studio condotto su tre vinificazioni commerciali ha mostrato come la concentrazione di AB durante la fermentazione alcolica non solo non incrementasse ma, in due casi, addirittura diminuisse rispetto al contenuto presente nel mosto di partenza. Tale diminuzione risultava a carico della putrescina ed era evidente soltanto nelle vinificazioni caratterizzate da una rilevante presenza di lieviti non-*Saccharomyces* nelle fasi iniziali del processo fermentativo. Pertanto, secondo questi risultati, i lieviti non sembrano contribuire direttamente all'accumulo di AB in vino. Per contro, i lieviti sono indirettamente coinvolti in tale processo rendendo più o meno disponibili gli aminoacidi precursori delle AB per i batteri malolattici che normalmente si sviluppano dopo il completamento della fermentazione alcolica. In questa fase, i batteri hanno a disposizione non solo gli aminoacidi non utilizzati dai lieviti ma anche quelli eventualmente rilasciati per effetto dell'autolisi delle cellule di lievito. Al riguardo, è noto che il fenomeno dell'autolisi comporta il rilascio di azoto sotto forma di proteine, peptidi e aminoacidi liberi. L'effetto dell'autolisi sull'accumulo di AB in vino è stato indagato da Guerrini *et al.* (2005) prendendo in esame un numero significativo di ceppi appartenenti alle principali specie di lieviti vinari (*S. cerevisiae*, *C. stellata*, *M. pulcherrima*, *K. apiculata*). I dati ottenuti per ciascuna specie in seguito ad autolisi indotta hanno mostrato come il rilascio di azoto α -aminoacidico (FAN) fosse nettamente superiore rispetto all'azoto proteico. Il rilascio di sostanze azotate da parte di *S. cere-*

visiae è risultato significativamente maggiore rispetto a quello delle altre specie di lievito, mentre non sono state rilevate differenze significative tra *M. pulcherrima* e *K. apiculata*. Mettendo in relazione il rilascio di azotato con il volume cellulare medio calcolato per ciascuna specie di lievito, è stato possibile evidenziare come i lieviti che mostravano un volume maggiore fossero anche quelli che rilasciavano le maggiori concentrazioni di azoto totale per unità di cellule. In ogni caso, inoculando tutti gli autolisati di lievito con un ceppo malolattico di *O. oeni* decarbossilasi positivo è stata osservata la produzione di tutte le AB che questo batterio lattico era in grado di produrre, confermando come l'autolisi dei lieviti possa svolgere effettivamente un ruolo nella formazione di AB in vino.

3.2 Fattori biologici: il ruolo dei batteri lattici

Dal punto di vista microbiologico, la capacità di produrre AB è stata per molto tempo attribuita a batteri lattici appartenenti ai generi *Pediococcus* e *Lactobacillus*, ma più recentemente è stato dimostrato che anche *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente responsabile della fermentazione malolattica spontanea ed indotta in vino, è capace di produrre AB quali istamina, cadaverina, putrescina e tiramina, con differenze quali-quantitative in funzione del ceppo considerato (Guerrini *et al.* 2002; Lucas *et al.* 2008; Rosi *et al.* 2009). Infatti, tale capacità è limitata a quei ceppi batterici che sono in possesso dei geni codificanti le decarbossilasi, ovvero gli enzimi che catalizzano la decarbossilazione degli aminoacidi precursori delle singole AB, e che mostrano attiva la loro espressione. A tale proposito, studi condotti da Lonvaud-Funel *et al.* (1994) hanno dimostrato l'esistenza di ceppi appartenenti alla specie *O. oeni* capaci di produrre istamina, e, in seguito, ulteriori indagini (Guerrini *et al.* 2002) hanno evidenziato come all'interno della specie *O. oeni* alcuni ceppi fossero capaci di produrre altre amine come putrescina e cadaverina. Uno *screening* condotto su 42 ceppi di *O. oeni* da Guerrini *et al.* (2002) ha mostrato, infatti, come la capacità di produrre AB fosse piuttosto diffusa all'interno della specie *O. oeni*, sebbene la tipologia di AB e la quantità formata fosse strettamente dipendente dal ceppo. In effetti, il 45% dei ceppi saggiati si è dimostrato capace di produrre istamina, mentre un ulteriore 17%, in aggiunta all'istamina, anche putrescina e cadaverina (Fig. 1). Nel complesso, quindi, il 62% dei ceppi di *O. oeni* si è mostrato capace di produrre AB. Da sottolineare che nessuno degli isolati saggiati ha prodotto tiramina confermando la bassa diffusione di questa capacità all'interno della specie *O. oeni* (Moreno-Aribas *et al.* 2000).

Tra le AB che *O. oeni* può essere capace di formare, la putrescina risulta essere quella presente in vino con maggiore frequenza e a concentrazioni più elevate (Gloria *et al.* 1998; Soufleros *et al.* 1998) oltre ad essere l'amina che più efficacemente potenzia l'effetto tossico dell'istamina. Per tali motivi alcuni studi sono stati rivolti ai fattori capaci di influenzare la produzio-

Figura 1. Percentuali di ceppi di *O. oeni* che si sono dimostrati capaci di rilasciare le diverse AB (Put: putrescina, Cad: cadaverina, Ist: istamina, NP: non produttori)

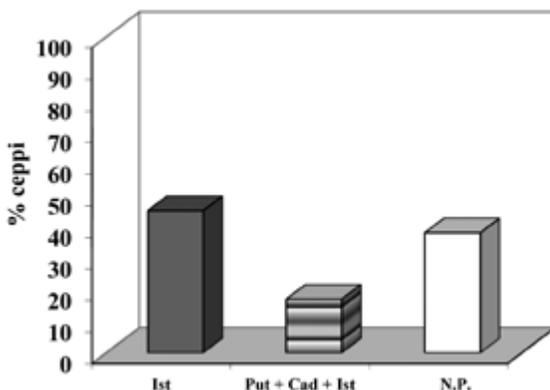
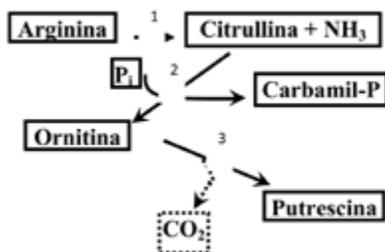


Figura 2. Via metabolica di formazione di putrescina da arginina: degradazione dell'arginina a ornitina attraverso l'ADI pathway (1: arginina deiminasi, 2: ornitina transcarbamilasi) e la decarbossilazione dell'ornitina (3: ornitina decarbossilasi)



ne di putrescina in vino, tra cui, primo fra tutti, la concentrazione dell'aminoacido precursore di questa AB ovvero dell'ornitina. In genere, questo aminoacido è poco presente in vino, per cui la formazione di putrescina a partire da ornitina libera non giustifica l'elevata concentrazione di questa AB usualmente riscontrata in vino. Tuttavia, l'ornitina può essere anche prodotta da *O. oeni* in seguito alla degradazione dell'arginina, uno degli aminoacidi maggiormente presenti in mosto ed in vino. In effetti, contrariamente a quanto ritenuto in passato, *O. oeni* è capace di degradare arginina tramite la via metabolica dell'arginina deiminasi (ADI) (Fig. 2) anche se questa proprietà risulta essere ceppo-dipendente (Granchi *et al.* 1998). A tale proposito, in uno studio condotto da Guerrini *et al.* (2002), è stata dimostrata l'esistenza di ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina a partire da arginina, dotati pertanto di tutto il corredo enzimatico della via ADI e

capaci di decarbossilare l'ornitina a putrescina. Nello stesso lavoro è stata dimostrata anche l'esistenza sia di ceppi di *O. oeni* capaci di metabolizzare arginina ad ornitina ed ammoniaca senza formare putrescina, sia di ceppi capaci di trasformare ornitina in putrescina ma incapaci di utilizzare arginina. Questa osservazione ha permesso di ipotizzare che la putrescina si possa accumulare in vino anche grazie ad uno scambio di metaboliti fra microrganismi che possiedono capacità metaboliche diverse. Questo tipo di fenomeno prende il nome di metabiosi ed è stato dimostrato in vino da Mangani *et al.* (2005). L'aspetto di questa ricerca che ricopre un maggior interesse da un punto di vista pratico è il fatto che la formazione di putrescina da arginina si origini al termine della fermentazione malolattica, mentre quella da ornitina avvenga contemporaneamente ad essa. È chiaro quindi che per evitare la formazione in vino di putrescina da arginina, potrebbe essere sufficiente eliminare i batteri lattici (ad esempio mediante aggiunta di anidride solforosa o di lisozima) non appena questi abbiano completato la fermentazione malolattica e prima che inizino a degradare l'arginina.

È importante sottolineare, ai fini di una corretta interpretazione del fenomeno di formazione delle AB in vino, che da un punto di vista della fisiologia microbica la capacità di degradare aminoacidi è un vantaggio per la cellula batterica in quanto consente a questa di ottenere energia quando i substrati fermentescibili sono quasi completamente esauriti (Vincenzini *et al.* 2009). Il vantaggio energetico sarebbe costituito dalla creazione di una forza protonica motrice (dall'esterno della cellula verso l'interno) generata grazie al basso pH del vino e al citoplasma reso più basico grazie alla formazione delle AB e della CO₂ (Moolenaar *et al.* 1993; Vincenzini *et al.* 2009). È chiaro quindi come lo stato fisiologico della popolazione microbica possa influenzare la formazione di AB in vino.

Per finire, i batteri lattici possono influenzare la formazione di AB in vino anche grazie alla loro attività proteolitica. In particolare, studi condotti da Manca de Nadra *et al.* (1999) hanno dimostrato come alcuni ceppi di *O. oeni* possiedano capacità proteolitiche a carico delle proteine del vino e come l'aminoacido maggiormente rilasciato da questa attività sia proprio l'arginina, contribuendo a giustificare ancora di più il fatto che la putrescina sia una delle amine più presenti nei vini.

Da quanto esposto, è inevitabile riconoscere ai batteri lattici e in secondo luogo alla fermentazione malolattica un ruolo centrale nella formazione di AB in vino, come mostrato nella figura 3 dove a titolo di esempio sono riportati i contenuti di AB prima e dopo la fermentazione malolattica in tre vinificazioni commerciali. Nella figura 4 invece sono riportate le cinetiche di crescita della popolazione lattica durante la fermentazione malolattica e l'accumulo di AB in due vinificazioni commerciali. È possibile notare come la formazione più significativa di AB si realizzi quando la popolazione di *O. oeni* è massima. Il ruolo centrale della fermentazione malolattica nella formazione di AB in vino è evidenziato anche dai dati sperimentali riporta-

Figura 3. Contenuto di amine biogene, espresso come mgL^{-1} prima e dopo il compimento della fermentazione malolattica, in tre vinificazioni commerciali, indicate con A, B e C (Put = putrescina; Cad: cadaverina, Ist: istamina, Tir: tiramina) (Guerrini et al. 2005)

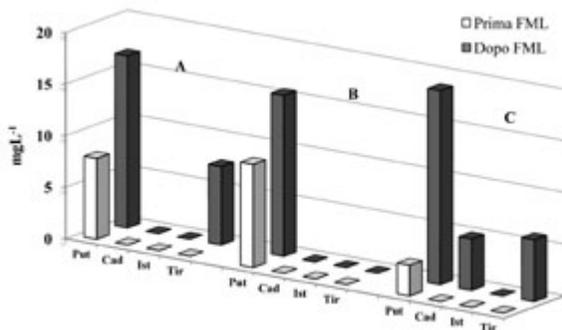
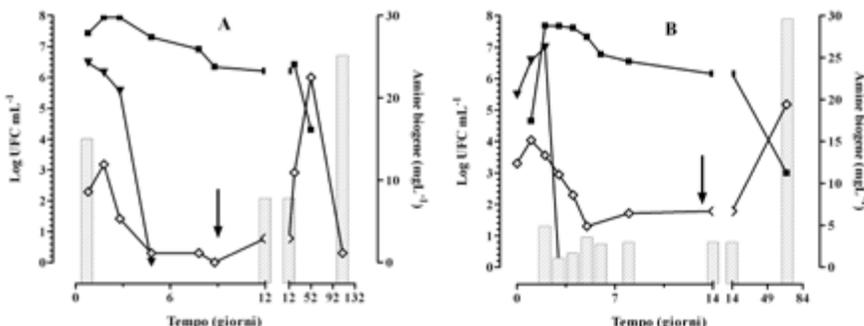


Figura 4. Cinetiche microbiche e concentrazione di amine biogene (istogrammi) in due vinificazioni commerciali (A e B). *S. cerevisiae* (■), lieviti non-Saccharomyces (▼), batteri lattici (◇), le frecce indicano il momento in cui *O. oeni* inizia a crescere (Granchi et al. 2005)



ti da vari autori che mostrano come i vini rossi, per i quali a differenza dei bianchi il processo produttivo comprende quasi sempre la fermentazione malolattica, siano spesso quelli che possiedono le concentrazioni di AB più elevate.

Nonostante alcuni ceppi di *O. oeni* siano in grado di produrre AB, nel 2009 l'European Food Safety Authority (EFSA) ha incluso questa specie nella lista dei microrganismi *Qualified presumption of safety* per il fatto che i ceppi di questa specie con attività decarbossilasica sembra che tendano naturalmente a perdere tale capacità quando sono ripetutamente coltivati in laboratorio.

3.3 Fattori ambientali

Al fine di una corretta gestione della fermentazione malolattica per il controllo della produzione di AB, risulta indispensabile conoscere i possibili effetti dei parametri intrinseci (contenuto in aminoacidi, pH, etanolo, solforosa) ed estrinseci (temperatura) sul rilascio di tali sostanze in vino da parte di *O. oeni* (Marcobal *et al.* 2006; Soufleros *et al.* 2007). La comprensione dei fattori che influenzano la produzione di AB in vino dovrebbe consentire, infatti, di pianificare gli interventi possibili per limitare il problema e, allo stesso tempo, di individuare le situazioni a rischio che possono compromettere la qualità igienico-sanitaria del prodotto finito.

3.3.1 Parametri intrinseci

Dal momento che la formazione di AB in vino, oltre a richiedere la presenza di batteri in possesso del corredo enzimatico necessario alla produzione di queste sostanze, presuppone la disponibilità di aminoacidi precursori, è possibile supporre che l'abbondanza delle AB in vino sia strettamente correlata alla quantità di azoto (aminoacidi e proteine) residua al termine della fermentazione alcolica. Se ciò fosse vero, l'uso eccessivo di integratori azotati, che molto spesso vengono utilizzati nella pratica di cantina all'inizio o durante la fermentazione alcolica, potrebbe rappresentare un rischio per la formazione di AB. A tale proposito, in uno studio condotto da Guerrini *et al.* (2005) sono stati messi in relazione i contenuti di azoto α -aminoacidico (FAN) di cinque mosti d'uva con i quantitativi di AB ritrovati al termine della fermentazione malolattica nei vini ottenuti su scala industriale dagli stessi mosti. I dati riportati nella tabella 4 mostrano come non sembri sussistere una relazione diretta tra il contenuto di AB nel prodotto finito e quello iniziale di FAN: il mosto che presentava il tenore più basso di azoto α -aminoacidico è stato anche quello che, al termine della vinificazione, possedeva i quantitativi maggiori di AB. I risultati ottenuti lascerebbero supporre un ruolo centrale dei microrganismi nella formazione di AB in vino, al punto da far risultare secondaria la composizione aminoacidica del mosto di partenza. In altre parole, il contenuto di precursori delle AB a disposizione della popolazione malolattica non dipenderebbe solo dalla concentrazione di queste sostanze nel mosto di partenza, ma anche dalla quantità e dalla tipologia di aminoacidi rimossi dai lieviti durante la fermentazione alcolica ed eventualmente rilasciati in vino durante il processo di autolisi, dalla capacità proteolitica dei batteri lattici che conducono la fermentazione malolattica ed infine dalla capacità ceppo-specifica dei batteri lattici a formare AB. Una correlazione positiva è stata invece riscontrata da Guerrini *et al.* (2005) tra il contenuto di AB riscontrato al termine della fermentazione malolattica e il FAN misurato al termine della fermentazione alcolica in 11 vinificazioni commerciali che

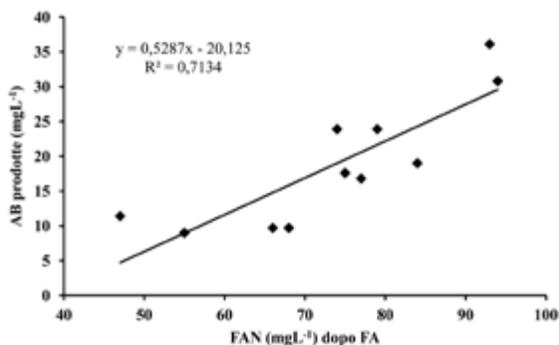
Tabella 3. Produzione di amine biogene (AB) da parte di specie diverse di ceppi di lievito in fermentazioni di laboratorio condotte su mosto d'uva (modificata da Granchi et al. 2005)

Specie di lievito	AB totali (mgL ⁻¹)		
	min.	max.	media
<i>S. cerevisiae</i>	9,6	25,4	13,7
<i>K. apiculata</i>	4,2	13,2	9,7
<i>C. stellata</i>	5,1	11,2	7,8
<i>M. pulcherrima</i>	4,6	30,8	13,3
<i>B. bruxellensis</i>	9,9	31,3	20,0

Tabella 4. Contenuto di azoto α -aminoacidico (FAN) nel mosto e di amine biogene (AB) nel prodotto finito riscontrati in cinque vinificazioni commerciali (Guerrini et al. 2005)

Vinificazioni	FAN nel mosto (mgL ⁻¹)	AB nel vino finito (mgL ⁻¹)
V1	73	25,0
V2	100	3,36
V3	144	8,30
V4	156	29,6
V5	336	15,6

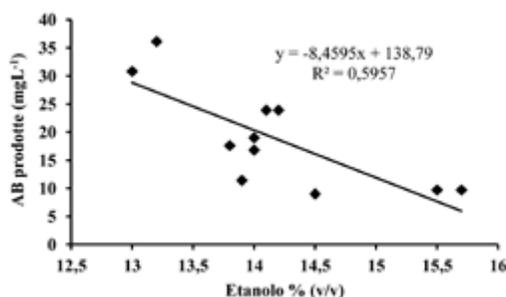
Figura 5. Correlazione lineare tra il contenuto di amine biogene (AB) riscontrato in undici vinificazioni commerciali al termine della fermentazione malolattica e il contenuto di azoto α -aminoacidico (FAN) quantificato al termine della fermentazione alcolica (FA)



presentavano una popolazione di *O. oeni* con attività decarbossilasica (Fig. 5). Sempre nello stesso studio il contenuto di AB riscontrato al termine della fermentazione malolattica è stato messo in relazione anche con la concentrazione di etanolo, con il pH e con il contenuto di solforosa. Mentre

nessuna correlazione è stata riscontrata tra la concentrazione di AB e il pH o il contenuto di solforosa, una correlazione negativa è stata riscontrata con l'etanolo (Fig. 6). Infine, uno studio condotto da Gardini *et al.* (2005), in cui in un sistema modello è stata saggiata la capacità di produrre tiramina da parte di un ceppo appartenente alla specie *O. oeni*, ha mostrato come maggiori concentrazioni di questa amina fossero rilasciati quando i valori di pH erano più alti e la concentrazione di etanolo più bassa. In altre parole, quando le condizioni ambientali erano meno stressanti per la fisiologia cellulare il rilascio di tiramina era più significativo.

Figura 6. Correlazione lineare tra la percentuale di etanolo e il contenuto di amine biogene (AB) riscontrato in undici vinificazioni commerciali al termine della fermentazione malolattica



3.3.2 Parametri estrinseci

L'unico parametro estrinseco che è stato preso in considerazione dalla letteratura per quanto riguarda la formazione di AB nei vini è la temperatura a cui questi sono mantenuti durante l'invecchiamento e la conservazione. In particolare, Marcobal *et al.* (2006) hanno dimostrato come questo parametro abbia un effetto non eccessivamente significativo sulla produzione della maggior parte delle AB. A questo però fa eccezione l'istamina che si è accumulata maggiormente nei vini conservati a 20°C rispetto a quelli mantenuti a temperature più estreme (4 o 35°C).

3.4 Fattori tecnologici

I tenori di AB in vino possono essere influenzati anche dalle pratiche di coltivazione, di vendemmia e di vinificazione delle uve. In particolare, il contenuto nei vini delle AB di origine vegetale può dipendere:

1. dalla varietà di uva utilizzata;
2. dalle condizioni colturali: ad esempio gli stress salini e la deficienza di minerali (come il potassio) possono incrementare la concentrazione di

AB nelle uve, mentre gli stress idrici non sembrano influenzare il contenuto di queste sostanze (Bover-Cid *et al.* 2006);

3. dalle tecniche agronomiche: sono consigliate quelle che consentano di conservare l'acidità e prevenire incrementi di pH;
4. dal sistema di trasporto dell'uva in cantina: il trasporto rapido sfavorisce la formazione di AB;
5. dal sistema di ottenimento del mosto: l'uso della pigia-diraspatrice riduce il contatto con i raspi e quindi la presenza di AB nel mosto.

Tenendo presente poi che la formazione di AB in vinificazione è legata alla presenza di microrganismi con capacità decarbossilasica e alla disponibilità dei precursori aminoacidici, è chiaro che il tenore di queste sostanze nei vini può essere influenzato dai sistemi di vinificazione scelti, quali ad esempio:

1. l'aggiunta di nutrienti azotati contenenti i precursori delle AB;
2. l'impiego o meno di preparati *starter* commerciali;
3. l'invecchiamento dei vini sulle fecce.

Alla luce di quanto descritto in precedenza, è chiaro che sia l'impiego di coadiuvanti di fermentazione sia l'invecchiamento sulle fecce (Alcaide-Hidalgo *et al.* 2007) possono arricchire il vino di aminoacidi (liberi o complessati in peptidi o proteine) e conseguentemente di AB, ma solo nel caso in cui la popolazione microbica possieda attività decarbossilasica. Per quanto riguarda l'impiego di *starter* invece, la problematica risulta meno immediata e assai più complessa da affrontare. Tenendo presente che l'accumulo di AB nei vini è prevalentemente attribuibile alla popolazione lattica, l'impiego di *starter* malolattici incapaci di produrre AB potrebbe limitare la formazione di queste sostanze in vino. Perché ciò si realizzi è prima di tutto necessario che lo *starter* prenda il sopravvento sulla microflora indigena per evitare che quest'ultima sviluppi a numeri sufficienti da provocare accumuli di AB rilevabili. Nella pratica, malgrado le maggiori conoscenze e le innovazioni tecnologiche (ceppi selezionati sulla base di precise proprietà enologiche, batteri con membrane cellulari resistenti all'etanolo, ecc.), difficilmente si riesce a realizzare questo controllo sulla microflora indigena e la principale causa è la scarsa capacità di sopravvivenza degli *starter* una volta inoculati in vino (Vincenzini e Granchi, 2007). In questi termini la gestione della fermentazione malolattica appare ancora oggi estremamente difficile da realizzare, soprattutto per quanto riguarda il controllo sulla formazione di AB. Oltre alla problematica della sopravvivenza degli *starter* una volta inoculati in vino, si deve anche tener presente che alcuni studi condotti negli ultimi anni hanno ipotizzato che i batteri lattici siano in grado acquisire la capacità di produrre AB tramite plasmidi, mediante cioè trasferimento orizzontale dei geni delle decarbossilasi, in particolare

il gene *hdc* per la produzione di istamina (Lucas *et al.* 2008) e il gene *odc* per la produzione di putrescina (Marcobal *et al.* 2006). È chiaro che, se questo fenomeno si dovesse realizzare in vino, l'impiego di uno starter incapace di produrre AB non potrebbe garantire che queste sostanze non siano comunque formate per effetto del trasferimento orizzontale dei geni per le decarbossilasi dalla microflora indigena allo starter stesso.

Sempre per quanto riguarda gli *starter* è interessante sottolineare che i lieviti commerciali, molto spesso impiegati per condurre la fermentazione alcolica, non sono necessariamente colture pure, nel senso che, secondo la risoluzione dell'*Organization International de la Vigne et du Vin* (OIV) numero 329 del 2009, sono tollerati in questi preparati un certo numero di batteri contaminanti (fino a 10^5 UFC/g per i batteri lattici e fino a 10^4 UFC/g per i batteri acetici). A tale proposito uno studio condotto su vari *starter* commerciali di lievito ha dimostrato la presenza, tra i batteri lattici contaminanti, di ceppi capaci di produrre AB ed in particolare istamina e tiramina in particolare (Costantini *et al.* 2009).

4. Strategie di controllo delle amine biogene in cantina

Sulla base di quanto fin qui esposto, è possibile elencare le strategie che possono contribuire a limitare la presenza di AB nei vini:

1. abbassare il pH dei mosti che mostrano valori di questo parametro intorno a 3,6-3,7;
2. evitare aggiunte di nutrienti azotati con alto contenuto di aminoacidi precursori di AB (es. autolisati di lievito);
3. effettuare aggiunte appropriate di solforosa in funzione del pH per evitare lo sviluppo di batteri lattici indigeni potenzialmente produttori di AB;
4. per condurre la fermentazione alcolica utilizzare lieviti *starter* selezionati bassi produttori di AB e con bassa capacità autolitica;
5. per condurre la fermentazione malolattica utilizzare batteri malolattici selezionati per essere bassi produttori di AB;
6. utilizzare il sistema del co-inoculo lieviti/batteri lattici, ma solo se si conoscono le possibili interazioni metaboliche tra le due popolazioni microbiche;
7. eliminare i batteri malolattici appena terminata la fermentazione malolattica utilizzando l'anidride solforosa oppure il lisozima;
8. ridurre il tempo di contatto del vino con le fecce.

Le strategie sopra elencate possono contribuire a limitare la formazione di AB in vino, ma di fatto non forniscono un effettivo strumento di controllo, in quanto risulta assai difficile controllare ciò che di fatto non si conosce e cioè le capacità metaboliche delle popolazioni microbiche indigene. Lo

sviluppo di metodi diagnostici rapidi che permettano il riconoscimento e la quantificazione dei ceppi di *O. oeni* capaci di decarbossilare gli aminoacidi precursori delle AB, potrebbe rappresentare una valida strategia per il controllo della fermentazione malolattica in modo da contribuire alla tutela della qualità del vino assicurando, non solo un prodotto con determinate caratteristiche organolettiche desiderate, ma anche un prodotto sicuro ai fini della salute del consumatore. Tali strumenti, infatti, renderebbero possibile da un lato, la selezione di ceppi batterici incapaci di formare AB da impiegare come colture *starter* per indurre la fermentazione malolattica e, dall'altro, il monitoraggio dei ceppi batterici naturalmente presenti in vino in modo da intervenire tempestivamente per ridurre o comunque limitare la formazione di questi composti indesiderati. Come già detto, infatti, l'uso dello *starter*, anche nel caso riesca a condurre con successo la fermentazione malolattica, non garantisce che la microflora naturalmente presente in vino non rilasci AB, e pertanto diventa necessario un attento monitoraggio della popolazione microbica presente. Inoltre, al fine di una corretta gestione della fermentazione malolattica per il controllo della produzione di AB, risulta indispensabile conoscere in modo più approfondito i possibili effetti delle condizioni ambientali e/o dei parametri nutrizionali sul rilascio di tali sostanze in vino da parte di *O. oeni* (Marcobal *et al.* 2006; Soufleros *et al.* 2007). La comprensione dei fattori che influenzano la produzione di AB in vino dovrebbe, infatti, consentire di pianificare gli interventi possibili per limitare il problema e, allo stesso tempo, individuare le situazioni a rischio che possono compromettere la qualità igienico-sanitaria del prodotto finito.

5. Il progetto finanziato dal Consorzio Toscana

Il progetto di ricerca ha previsto la messa a punto di strategie di controllo della fermentazione malolattica per contribuire alla tutela della qualità del vino includendo non solo le caratteristiche chimiche ed organolettiche, ma anche quelle salutistiche. In particolare, ha riguardato lo studio di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre istamina che, come già precedentemente riportato, è l'amina che manifesta la maggior tossicità per l'uomo, e putrescina, l'amina che in genere viene trovata in elevate quantità in vino e che più efficacemente potenzia l'effetto tossico dell'istamina. A tal fine sono stati individuati i seguenti obiettivi:

1. sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina;
2. sviluppo di un metodo in *Real-Time* PCR per la quantificazione della popolazione di *O. oeni* capace di produrre istamina e putrescina;
3. applicazione dei protocolli PCR *End Point* e *Real-Time* PCR nel corso di FML su scala pilota;

4. definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che influenzano la formazione di AB in vino da parte di *O. oeni*.

5.1 Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina

Lo scopo di questa fase della ricerca è stato quello di mettere a punto una metodica rapida per individuare la presenza o meno di ceppi di *O. oeni* potenzialmente in grado di produrre istamina e putrescina in vino, prima che queste sostanze risultino quantificabili chimicamente. La scelta del metodo è ricaduta inizialmente sulla messa a punto di protocolli di PCR (Polymerase Chain Reaction) *End Point* capaci di amplificare i geni *hdc* e *odc* in modo tale che potessero essere applicati sia su colonia, sia direttamente in vino senza passare attraverso la semina in piastra.

Innanzitutto sono stati verificati i protocolli PCR disponibili in letteratura per l'amplificazione di questi geni su alcuni ceppi di *O. oeni* presenti nella collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (DiBA). Le due coppie di *primer* CL1_{mod'} JV17HC e HDC3, HDC4, riportate in letteratura per l'amplificazione del gene *hdc*, hanno dimostrato di non amplificare questo gene, ma regioni diverse del genoma di *O. oeni*. Ciò è stato dimostrato mediante sequenziamento degli ampliconi. Le sequenze ottenute sono state analizzate tramite Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e ricondotte sulla base della loro omologia a sequenze genetiche depositate all'interno di Gen Bank. Dall'allineamento delle sequenze dei frammenti ottenuti con i *primer* CL1_{mod'} JV17HC sono stati ottenuti valori di omologia tra il 99 e il 100%, a dimostrazione dell'identità della regione amplificata nei diversi ceppi saggiati. Il frammento sequenziato ha riportato una dimensione di 400 bp. Tuttavia, effettuando una ricerca tramite BLAST nelle banche dati del sito <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>, è stato ottenuto che la sequenza non corrispondeva al gene *hdc* ma ad una porzione del DNA del ceppo *O. oeni* PSU-1 corrispondente al gene per la sintesi della proteina fattore di elongazione Ts (EF-TS) nei ribosomi. Dal sequenziamento effettuato sui prodotti di amplificazione ottenuti con i *primer* HDC3, HDC4 è stato osservato anche questa volta che tutte le sequenze avevano fra loro una omologia prossima al 100% e, analogamente a quanto descritto precedentemente, è stato fatto il BLAST per individuare le sequenze depositate con il più alto livello di affinità. Anche in questo caso il sequenziamento del frammento non ha confermato il risultato atteso, infatti, la coppia di *primer* HDC3, HDC4 amplificava il gene per l'rRNA 23S presente nel DNA di *O. oeni* PSU-1 invece del gene *hdc*. Alla luce dei risultati ottenuti è stato necessario sintetizzare dei *primer ex-novo* (HDC241 e HDC4).

I *primer* OdR e OdF (Granchi *et al.* 2005c), essendo risultati specifici per l'amplificazione del gene *odc* codificante l'ornitina decarbossilasi in *O. oeni*, hanno permesso lo sviluppo e la validazione di un metodo rapido per l'in-

dividuaione di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre in vino putrescina. Infine, l'amplificazione di DNA di *O. oeni* estratto direttamente da vino è stata ottenuta mediante l'impiego di un kit disponibile in commercio dopo opportune modifiche.

5.2 Sviluppo di un metodo in *Real-Time* PCR per la quantificazione della popolazione di *O. oeni* capace di produrre istamina e putrescina

La seconda fase della ricerca ha avuto la finalità di sviluppare, mediante la tecnica della *Real-Time* PCR, un metodo rapido per quantificare, all'interno di una popolazione totale di *O. oeni* presente in un vino, i ceppi batterici potenzialmente capaci di produrre istamina e putrescina. Infatti, questa tecnica, denominata anche PCR quantitativa (Q-PCR), a differenza dei metodi tradizionali di PCR cosiddetti *end-point*, permette di quantificare il prodotto di amplificazione in tempo reale, ovvero mentre la reazione è in corso, mediante la misura di un segnale fluorescente che è proporzionale alla quantità della sequenza di DNA bersaglio (Orlando *et al.* 1998). Il ciclo di PCR in cui viene rilevato un aumento significativo della fluorescenza è definito come ciclo soglia (Ct). Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie di DNA bersaglio presente inizialmente. Paragonando questo valore con quello ottenuto da una curva standard è possibile determinare con accuratezza la quantità di DNA o di cellule inizialmente presenti nel campione. L'attività sperimentale si è articolata nelle seguenti fasi operative:

1. determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino mediante *Real-Time* PCR;
2. determinazione quantitativa di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina mediante *Real-Time* PCR;
3. messa a punto di una Multiplex *Real-Time* PCR.

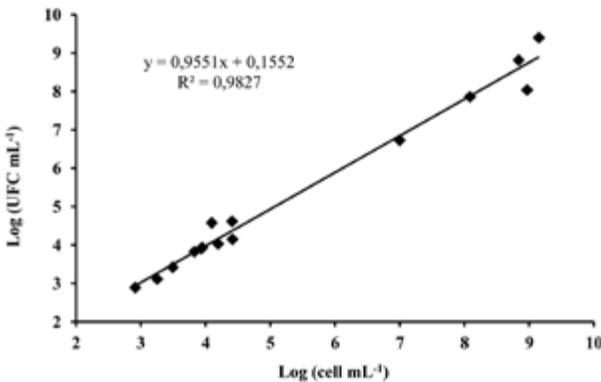
5.2.1 Determinazione quantitativa di *Oenococcus oeni* in vino mediante *Real-Time* PCR

Nella prima fase, allo scopo di quantificare la popolazione totale di *O. oeni* mediante la tecnica della *Real-Time* PCR è stato scelto come DNA bersaglio una porzione del gene codificante l'enzima malolattico specifica per *O. oeni* (sequenza NCBI: X82326) secondo quanto riportato da Pinzani *et al.* (2004).

Il protocollo di *Real-Time* PCR inizialmente è stato applicato per la determinazione quantitativa di *O. oeni* in coltura pura. A tal fine sono stati presi in considerazione 15 colture batteriche condotte in triplo in mezzo sintetico a diversi tempi di incubazione in modo da avere teoricamente una variabilità di concentrazioni cellulari. Inoltre, al fine di individuare il limite delle

cellule rilevabile col metodo molecolare, sono state analizzate diluizioni di un fattore pari a 10^6 di una delle colture considerate. I risultati conseguiti con il protocollo di *Real-Time* PCR sono stati correlati con quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra (Fig. 7). Dal confronto dei dati ottenuti con le due tecniche è emersa una ottima correlazione ($R^2=0,983$) a dimostrazione della validità del metodo rapido ai fini della quantificazione delle popolazioni di *O. oeni* in coltura pura in mezzo sintetico. Inoltre, la coltura diluita ha presentato un valore dell'ordine di 10^2 UFCmL⁻¹, che può essere considerato come il limite di rilevabilità del metodo attualmente messo a punto. È stata valutata anche la specificità della reazione di PCR amplificando il DNA estratto sia da ceppi diversi di *O. oeni* che da specie diverse di batteri lattici, ma strettamente correlate ad *O. oeni* dal punto di vista filogenetico. Inoltre, considerando che in vino sono spesso presenti, contemporaneamente ai batteri lattici, elevate densità di lieviti, sono stati analizzati quattro campioni contenenti una quantità fissa di cellule di *O. oeni* e concentrazioni cellulari del ceppo *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lalvin) comprese tra 10^5 e 10^8 UFCmL⁻¹. L'analisi statistica (t-test di Student, $p < 0,05$) dei risultati ottenuti in termini di cicli soglia non ha mostrato differenze significative tra i campioni analizzati, escludendo qualunque interferenza nella misura della densità cellulare batterica attribuibile alla presenza di altre specie di batteri lattici o di lieviti.

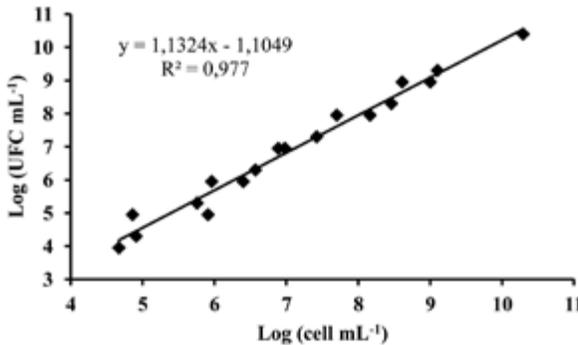
Figura 7. Relazione tra il numero di cellule di *O. oeni* per millilitro determinato mediante *Real-Time* PCR (cell mL⁻¹) e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra per 15 campioni in mezzo sintetico



Al fine di validare il protocollo di *Real-Time* PCR per la determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino è stato effettuato l'inoculo di ceppi batterici a diverse densità cellulari in campioni di vino sterilizzato per filtrazione.

Il DNA è stato estratto tramite il kit Nucleo Spin® Food (Macherey-Nagel) dopo trattamento con polivinilpirrolidone (PVP) per rimuovere gli inibitori della PCR come riportato da Jara *et al.* (2008). Effettuando la correlazione tra i risultati conseguiti con il protocollo di *Real-Time* PCR e quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra è stata ottenuta la retta mostrata nella figura 8 che presenta un valore del coefficiente $R^2 = 0,977$, a dimostrazione che il metodo di quantificazione di una popolazione di *O. oeni* è efficace anche quando viene applicato a campioni di vino inoculati artificialmente. Il metodo è stato validato anche su campioni commerciali di vino che contenevano concentrazioni di *O. oeni* compresi tra 10^6 e 10^7 UFCmL⁻¹.

Figura 8. Relazione tra il numero di cellule di *O. oeni* per millilitro determinato mediante *Real-Time* PCR (cell mL⁻¹) e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra dopo inoculo in vino sterile



5.2.2 Determinazione quantitativa di *Oenococcus oeni* produttori di putrescina e istamina mediante *Real-Time* PCR

L'obiettivo è stato quindi rivolto alla quantificazione della popolazione di *O. oeni* potenzialmente in grado di produrre putrescina e istamina in vino. Mediante EVA Green® *Real Time* qPCR sono stati analizzati gli stessi geni target utilizzati precedentemente nella classica PCR *End Point*, ovvero il gene *hdc* che codifica l'istidina decarbossilasi e il gene *odc* che codifica l'ornitina decarbossilasi, i due enzimi responsabili della sintesi delle due AB considerate. I primer impiegati per il gene *odc* sono stati i seguenti (*primer* di nuova sintesi):

primer FORWARD Modc F = 5'-CCTACGGATTTATTGGTGGC-3'
primer REVERSE Modc R = 5'-GCCTTAGCTTTTCAGGGTC-3'

Per il gene *odc* sono stati saggiati anche i primer riportati da Nannelli *et al.* (2008). Un ceppo batterico non produttore è stato utilizzato come controllo negativo.

Dall'analisi di regressione lineare deriva che le rette hanno presentato i seguenti valori:

- retta standard ottenuta con i primer Nannelli *et al.* 2008:
valore di *slope* (coefficiente angolare) = -3,291
coefficiente di regressione lineare $r = 0,999$
Efficienza della reazione = 101,3%
- retta standard ottenuta con i primer di nuova sintesi:
valore di *slope* (coefficiente angolare) = -3,186
coefficiente di regressione lineare $r = 0,996$
Efficienza della reazione = 106,0%.

Tenendo conto che il *range* teorico per l'efficienza della reazione di amplificazione è = 90 -100% con valori di *slope* compresi tra 3,6 e 3,1, possiamo dedurre che tutti i risultati ottenuti per le tre curve standard sono da considerarsi idonei ai fini del loro impiego per la quantificazione delle popolazioni di *O. oeni* potenzialmente produttori di putrescina ed istamina.

Per l'amplificazione del gene *hdc* sono stati impiegati primer riportati da Lucas *et al.* (2008) e i risultati per la retta standard sono stati i seguenti:

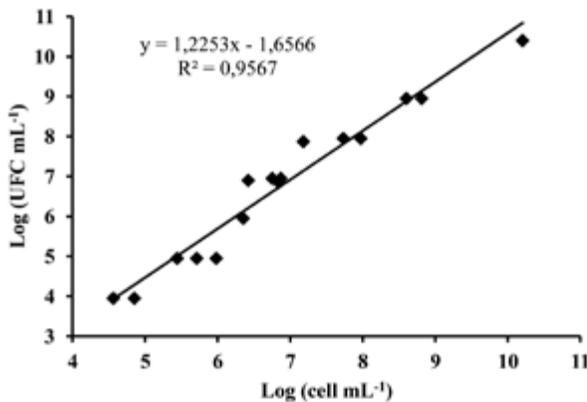
- Retta standard ottenuta con i primer per il gene *hdc*:
valore di *slope* (coefficiente angolare) = -3,555
coefficiente di regressione lineare $r = 0,979$
Efficienza della reazione = 91,1%.

Al fine di validare il protocollo di *Real-Time* PCR per la determinazione quantitativa in vino di ceppi di *O. oeni* potenzialmente produttori di putrescina, ceppi batterici dotati del gene *odc* sono stati inoculati a diverse densità cellulari in campioni di vino sterilizzato per filtrazione. Il DNA è stato estratto tramite il kit Nucleo Spin® Food (Macherey-Nagel) dopo trattamento con polivinilpirrolidone (PVP). Parallelamente gli stessi campioni di vino sono stati sottoposti alla semina su piastra per la determinazione delle UFCmL⁻¹. Il coefficiente di correlazione lineare tra i dati ottenuti con le due tecniche (espressi come valori logaritmici) ha presentato un elevato valore ($R^2 = 0,957$) dimostrando la validità della metodica rapida sviluppata (Fig. 9).

Infine, la sperimentazione ha previsto, in analogia a quanto fatto per i ceppi produttori di putrescina, l'applicazione del protocollo di *Real-Time* PCR in campioni di vino inoculati artificialmente con i ceppi che in precedenza erano risultati *hdc* positivi e che avevano mostrato produzione di istamina. Tuttavia, l'amplificazione, effettuata con i primer pubblicati da Lucas *et al.* (2008), contrariamente all'attesa, non ha prodotto alcun segnale

di amplificazione. Pertanto, gli stessi ceppi batterici sono stati nuovamente saggiati per la loro capacità di produrre istamina in mezzo sintetico sia mediante metodiche molecolari, sia mediante analisi HPLC dei fermentati. I risultati ottenuti hanno mostrato incapacità a produrre istamina e assenza del gene lasciando supporre che la perdita del gene avvenga perché questo potrebbe essere situato su plasmide come proposto da Lucas *et al.* (2008). Se questo fosse vero spiegherebbe la perdita del gene che si verifica durante le sub-colture in laboratorio. I tentativi compiuti con appositi kit commerciali per isolare il plasmide hanno però dato esiti negativi. Ulteriori studi saranno necessari per approfondire tale aspetto.

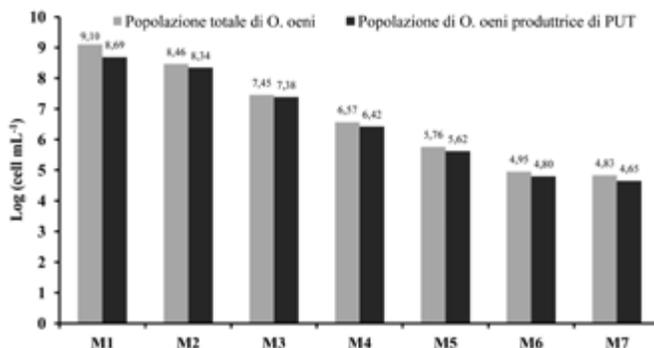
Figura 9. Relazione tra il numero di cellule di *O. oeni* produttori di putrescina determinato mediante Real-Time PCR (cell mL^{-1}) e i valori di UFC mL^{-1} ottenuti mediante conta su piastra dopo inoculo in vino sterile



5.2.3 Messa a punto di una Multiplex Real-Time PCR

Con le stesse coppie di *primer*, è stato messo a punto un protocollo in Real-Time PCR per quantificare contemporaneamente la popolazione totale di *O. oeni* e la popolazione dei ceppi batterici potenzialmente produttori di putrescina. A tal fine una coltura di un ceppo di *O. oeni* produttore di putrescina ed una coltura di un ceppo non produttore cresciute in mezzo sintetico fino alla fase stazionaria sono state utilizzate per ottenere una coltura batterica mista composta dal 70% del ceppo produttore e dal 30% del ceppo non produttore. La coltura mista così allestita è stata sottoposta a diluizioni decimali in modo da ottenere in totale 6 campioni da analizzare. La determinazione quantitativa della popolazione produttrice di putrescina rispetto alla popolazione batterica totale conseguita mediante il protocollo di Real-Time PCR (Fig. 10) è risultata prossima a quella attesa.

Figura 10. Quantificazione della popolazione di *O. oeni* potenzialmente produttrice di putrescina rispetto alla popolazione batterica totale conseguita mediante il protocollo di multiplex Real-Time PCR



5.3 Applicazione dei protocolli di PCR e di Real-Time PCR nel corso di una fermentazione malolattica su scala pilota

Durante lo svolgimento della FML presso la Cantina sperimentale del Consorzio Toscana, sono stati prelevati dei campioni di vino che sono stati sottoposti ad analisi in Real-Time PCR per la determinazione quantitativa della popolazione totale di *O. oeni*, dato che la FML era stata indotta mediante inoculo di ceppi commerciali.

Inoltre, nella stessa cantina, *tanks* da 25L sono stati inoculati in triplo (prove A, B e C) con tre ceppi di batteri malolattici appartenenti alla collezione del DiBA. I ceppi scelti provenivano da vini diversi (ceppo A: Chianti, ceppo B: Brunello di Montalcino, ceppo C: Chardonnay) che avevano portato a termine la FML in modo spontaneo, senza problemi, in tempi ragionevoli e senza formazione di AB. Prima dell'impiego di questi ceppi nella sperimentazione è stata comunque verificata sia la loro incapacità a produrre AB in mezzo sintetico (analisi HPLC dei surnatanti), sia l'assenza dei geni *odc* e *hdc* (PCR End Point). Per ottenere la biomassa necessaria all'inoculo in vino, ciascun ceppo è stato coltivato separatamente secondo lo schema riportato nella figura 11 in modo tale che nella fase finale il volume totale di coltura fosse di ca 7,5 litri. Questa quantità di coltura è stata centrifugata a 5000xg per 20 minuti a 4°C e la biomassa è stata raccolta ed utilizzata per inoculare 75 litri di vino suddivisi in tre diversi *tank*. Le cellule per l'inoculo in vino sono state prelevate in fase di crescita stazionaria, quando cioè *O. oeni* è maggiormente capace di resistere allo shock da etanolo (Granchi *et al.* 1996). L'inoculo è stato eseguito in modo tale da ottenere una concentrazione iniziale di cellule in vino di circa 10⁸ UFCmL⁻¹ in ciascun *tank*.

Figura 11. Schema per la preparazione dell'inoculo in vino dei batteri malolattici

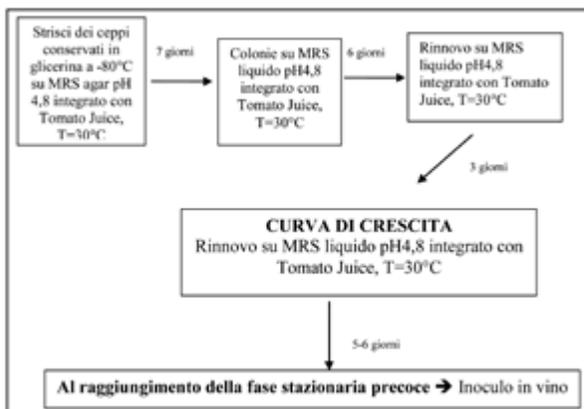
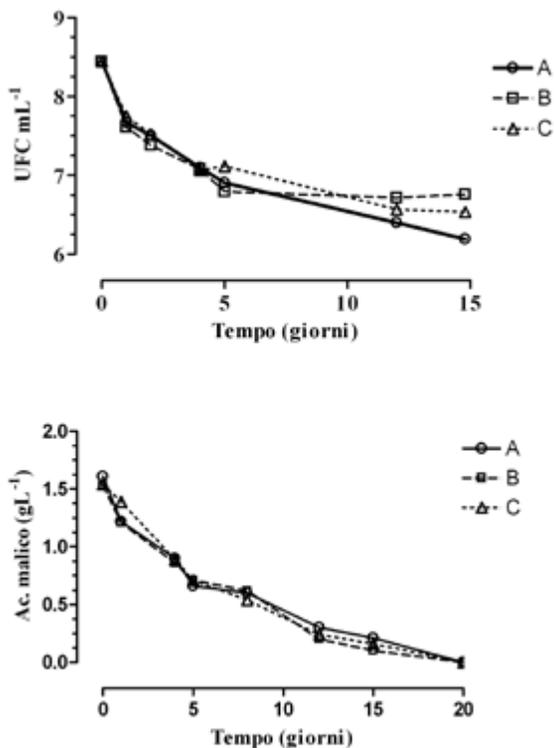


Figura 12. Andamento della popolazione vitale di *O. oeni* dopo inoculo in vino (sopra) e degradazione dell'acido malico (sotto) in tre tank A, B e C



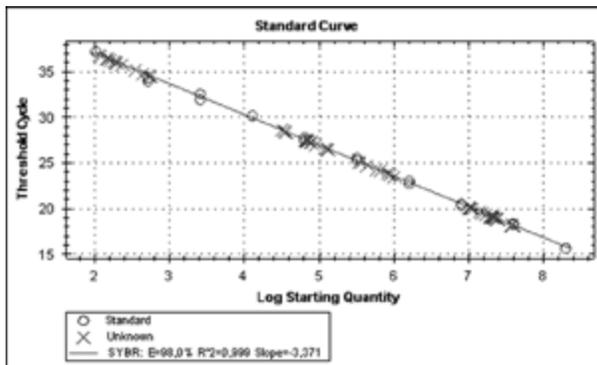
Conte vitali delle cellule sono state eseguite anche con il metodo classico di semina su piastra al momento dell'inoculo e durante lo svolgimento della FML. Parallelamente è stata determinata la concentrazione dell'acido L-malico mediante metodo enzimatico.

I dati ottenuti sono mostrati nella figura 12 che riporta l'andamento sia della popolazione vitale di *O. oeni* che della degradazione dell'acido malico. Dall'analisi dei risultati si evidenzia che nonostante le cellule batteriche, una volta inoculate in vino, vadano incontro ad una fase di morte, al quinto giorno si stabilizzano raggiungendo un valore dell'ordine di 10^6 UFCmL⁻¹. A questo andamento della popolazione vitale corrisponde una analoga cinetica di degradazione dell'acido malico che, dopo circa 5 giorni ha presentato una diminuzione del 53% circa.

Dopo un periodo di 15-20 giorni, la FML è stata completata, dimostrando l'efficacia dell'inoculo.

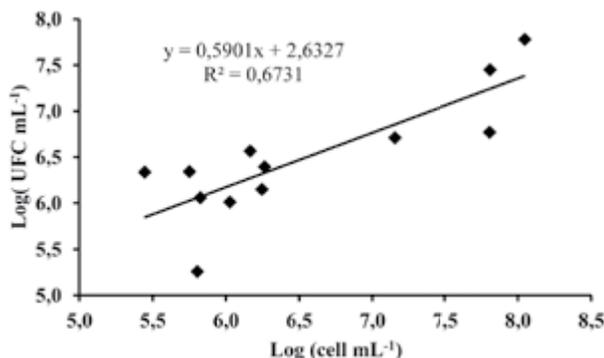
Durante lo svolgimento della FML, come detto in precedenza, campioni di vino prelevati da diversi *tank* inoculati con ceppi di *O. oeni* sono stati analizzati mediante il protocollo di *Real-Time* PCR, messo a punto nel corso del secondo anno di attività, che prevedeva la determinazione quantitativa della popolazione batterica totale. Nella figura 13 vengono mostrati i risultati della quantificazione del DNA estratto dai campioni di vino in relazione alla curva standard. Tali risultati riportati sono stati correlati con quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra, ottenendo la retta riportata nella figura 14. Dal confronto dei dati ottenuti con le due tecniche non è emersa una correlazione molto elevata ($R^2=0,673$), tuttavia il protocollo deve essere applicato ad un maggiore numero di campioni prima di poter trarre delle conclusioni definitive. In effetti, le differenze riscontrate tra le due tecniche sembrano casuali e sono molto probabilmente

Figura 13. Valore dei cicli soglia (x) ottenuti mediante il protocollo di *Real-Time* PCR per i campioni di vino in relazione alla concentrazione di DNA e alla curva standard (o)



da attribuire ad un problema di efficienza di estrazione del DNA dal vino. In ogni caso, dall'analisi dei dati emergono differenze quantitative della popolazione di *O. oeni* che non sono molto significative dal punto di vista enologico.

Figura 14. Relazione lineare tra il numero di cellule di *O. oeni* per millilitro determinato mediante Real-Time PCR e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra per 12 campioni di vino analizzati



5.4 Condizioni ambientali e nutrizionali che influenzano la formazione di amine biogene in vino da parte di *Oenococcus oeni*

L'impossibilità di disporre di ceppi appartenenti alla specie *O. oeni* con una capacità stabile a produrre istamina ha imposto dei cambiamenti all'approccio sperimentale classico. A tale scopo è stata valutata la possibilità di utilizzare un vino commerciale, che aveva appena terminato la fermentazione malolattica e che presentava un contenuto di istamina di circa 2,5 mgL⁻¹, come fonte di ceppi microbici appartenenti alla specie *O. oeni* produttori di AB senza utilizzare l'approccio microbiologico classico che prevede in successione: la semina in piastra del vino, l'isolamento delle colonie, la purificazione, l'identificazione, il mantenimento in collezione ed infine l'impiego sperimentale. Pertanto, sapendo che i vini che permangono per tempi lunghi sulle fecce sono maggiormente soggetti a incrementi nel contenuto di AB (Pérez-Serradilla e Luque de Castro 2008), dal fondo della botte contenente il vino che presentava istamina sono stati prelevati alcuni litri di vino feccioso con lo scopo di utilizzare questo materiale come fonte di batteri con capacità decarbossilasica per valutare l'influenza dei vari fattori intrinseci sulla formazione di AB in vino. Prima di allestire la sperimentazione è stata condotta un'indagine per valutare le caratteristiche microbiologiche del vino feccioso. I risultati ottenuti hanno mostrato come questo materiale contenesse *O. oeni*

come unica specie malolattica e come il 15% circa degli isolati di questa popolazione fosse in grado di produrre istamina, mentre circa il 25% putrescina. Pertanto, questo vino è stato utilizzato per valutare in che modo la presenza del materiale feccioso, la disponibilità di aminoacidi e quella di acido malico potessero influenzare il rilascio di AB da parte di *O. oeni*. Innanzi tutto, dai dati riportati nella tabella 5 risulta chiaro come la separazione del vino dalle fecce induca la morte della popolazione lattica, nonostante l'aggiunta di acido malico e aminoacidi. La scomparsa di una popolazione vitale di *O. oeni* corrispondeva ad una mancata formazione di AB. Per valutare l'influenza della disponibilità di aminoacidi e di acido malico sul rilascio di AB da parte di *O. oeni*, il vino feccioso è stato quindi integrato o meno con istidina, tirosina e acido malico. Dai risultati riportati nella tabella 6 è possibile osservare come le concentrazioni di AB totali fossero significativamente maggiori in presenza degli aminoacidi precursori per la tiramina e l'istamina. Allo stesso tempo, la presenza di acido malico corrispondeva ad un accumulo minore di AB. In

Tabella 5. Vino contenente la popolazione di *O. oeni* capace di produrre amine biogene (AB) separato dalle fecce e integrato o meno con istidina, tirosina e acido malico

	AB (mgL ⁻¹)		<i>O. oeni</i> (UFCmL ⁻¹)	
	giorni		giorni	
	0	100	0	100
Vino	37,7 ± 0,5	28,7 ± 0,3	3,00x10 ⁵	< 10
Vino con istidina e tirosina	37,7 ± 0,5	32,0 ± 0,1	3,00x10 ⁵	< 10
Vino con istidina, tirosina e acido malico	37,7 ± 0,5	29,9 ± 0,6	3,00x10 ⁵	< 10

Tabella 6. Vino feccioso contenente la popolazione di *O. oeni* capace di produrre amine biogene (AB) e integrato o meno con istidina, tirosina e acido malico

Campioni	AB (mgL ⁻¹)		<i>O. oeni</i> (UFCmL ⁻¹)	
	giorni		giorni	
	0	100	0	100
Vino feccioso	30,1 ± 8,49	173,7 ± 1,10 ^a	2,60x10 ⁶	9,10x10 ⁶
Vino feccioso con istidina e tirosina	30,1 ± 8,49	320,2 ± 13,70 ^b	2,60x10 ⁶	6,00x10 ⁶
Vino feccioso con istidina	45,9 ± 8,60	368,1 ± 25,41 ^b	2,60x10 ⁶	1,47x10 ⁷
Vino feccioso con istidina e ac. malico	45,9 ± 8,60	301,8 ± 8,90 ^b	2,60x10 ⁶	7,50x10 ⁶
Vino feccioso con tirosina	45,9 ± 8,60	430,6 ± 33,40 ^c	2,60x10 ⁶	7,20x10 ⁶
Vino feccioso con tirosina e ac. malico	45,9 ± 8,60	315,8 ± 4,60 ^b	2,60x10 ⁶	5,80x10 ⁶

realtà le differenze osservate erano solo a carico della putrescina, mentre i rilasci di tiramina e istamina non erano influenzati significativamente dalla disponibilità o meno di acido malico (ANOVA $p < 0,05$). A parità di concentrazione dei precursori, infatti, nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nel contenuto di istamina e di tiramina in presenza o assenza di acido malico. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra il rilascio di AB osservato quando gli aminoacidi precursori erano aggiunti singolarmente oppure insieme. Pertanto, è possibile affermare che il rilascio di istamina e tiramina osservato sia semplicemente funzione della disponibilità dell'aminoacido precursore. Per quanto riguarda la formazione di putrescina, l'AB formata in concentrazioni maggiori, occorre sottolineare che in nessuna prova è stato aggiunto l'aminoacido precursore e che quindi la sua cinetica di formazione potrebbe essere funzione del rilascio sia dell'arginina che dell'ornitina da parte delle molte cellule di lievito morte che si trovano nelle fecce. In ogni caso, i risultati ottenuti fanno ipotizzare che la disponibilità di acido malico porti ad una riduzione nella formazione di putrescina.

I risultati fin qui ottenuti hanno mostrato come la produzione di AB sia strettamente dipendente dalla disponibilità degli aminoacidi precursori e dallo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni* presente in vino che a densità cellulari adeguate è capace di formare AB fino ad esaurire i precursori disponibili. In altre parole, questa indagine ha mostrato come l'assenza di fecce, e quindi presumibilmente una condizione più stressante per le cellule, conduca ad un accumulo minore di AB. È chiaro quindi come lo stato fisiologico delle cellule sia essenziale ai fini del rilascio di AB in vino: se le cellule batteriche non si trovano in un adeguato stato fisiologico, la disponibilità degli aminoacidi precursori non determina alcuna produzione di AB. Da quanto fin qui esposto risulta evidente che l'influenza dei fattori nutrizionali sul rilascio di AB in vino sembri essere secondaria rispetto a quella di fattori che possono influenzare lo stato fisiologico della cellula. Pertanto, è stata condotta un'indagine su come parametri intrinseci del vino, quali pH e etanolo, possano influenzare la formazione di AB in vino da parte di *O. oeni*. Questo studio è stato condotto allestendo le combinazioni di pH ed etanolo in un mezzo che simula la composizione del vino riportate nella tabella 7. Su questo mezzo è stato inoculato il materiale feccioso contenente la popolazione di *O. oeni* capace di formare AB. Ad intervalli regolari per circa due mesi sono state eseguite conte vitali per seguire le cinetiche di crescita della popolazione di *O. oeni*, analisi in HPLC per quantificare il rilascio di AB, analisi enzimatiche per monitorare l'andamento della fermentazione malolattica. Infine, reazioni di PCR specie-specifiche sono state eseguite per confermare la sola presenza di *O. oeni* durante lo svolgimento di tutte le prove. Le cinetiche di crescita della popolazione lattica e di produzione

di AB sono state elaborate statisticamente mediante studi di correlazione e i risultati ottenuti hanno consentito di fare le seguenti generalizzazioni:

1. maggiore è la velocità di crescita di *O. oeni*, maggiori sono gli accumuli di tiramina e putrescina;
2. la concentrazione di etanolo non è correlata con la persistenza di *O. oeni*, ma è inversamente correlata con il rendimento di crescita, con la velocità di crescita e di conseguenza anche con la formazione di tiramina e putrescina;
3. una maggior persistenza di *O. oeni* non sembra essere correlata con un maggior rilascio delle diverse AB;
4. la concentrazione di istamina osservata durante la fase stazionaria non è risultata correlata con nessuna delle variabili considerate, mentre è risultata strettamente correlata con quella della tiramina durante la fase di morte;
5. nella fase di morte delle cellule batteriche il rilascio di istamina è risultato inversamente correlato con l'etanolo.

Tabella 7. Combinazione delle variabili nel disegno sperimentale composito centrale

Prova	pH	Etanolo % (v/v)
1 e 2	3,6	12
3	3,6	8
4	3,6	16
5	3,8	10
6	3,8	14
7	3,4	10
8	3,4	14
9	3,2	12
10	4,0	12

I rilasci di istamina, tiramina e putrescina monitorati nella presente sperimentazione sono stati elaborati insieme ai valori di pH e etanolo al fine di ottenere equazioni polinomiali di secondo grado a tre variabili capaci di descrivere le dinamiche di rilascio delle diverse AB da parte di *O. oeni* decarbossilasi positivi in funzione del pH e dell'etanolo. Le diverse equazioni, infatti, forniscono le concentrazioni massime che le AB possono raggiungere in quelle condizioni di pH ed etanolo, a patto che sia presente una popolazione di *O. oeni* capace di produrre AB. Le concentrazioni teoriche che si possono ricavare dall'elaborazione saranno quelle massime possibili poiché le equazioni sono state ricavate in sistemi in cui gli aminoacidi precursori non erano mai a concentrazioni limitanti. È evidente che se l'a-

minoacido precursore risulterà presente in vino in concentrazioni inferiori rispetto a quelle potenzialmente utilizzabili dalla popolazione microbica, il contenuto dell'AB che se ne ricaverà nella pratica sarà minore di quello previsto.

Concludendo, le condizioni necessarie e sufficienti perché si formino AB nel vino sono la presenza di una popolazione microbica capace di formare AB (solitamente *O. oeni* durante e dopo la fermentazione malolattica) e la presenza di aminoacidi precursori. Una volta che si sono verificate queste due condizioni, la cinetica di rilascio e la quantità delle AB alla fine del processo produttivo del vino saranno funzione delle condizioni ambientali in cui il microorganismo si trova a operare. A tale proposito la sperimentazione condotta ha fornito i seguenti risultati:

1. la disponibilità o meno di acido malico non influenza la capacità di *O. oeni* di formare AB;
2. l'influenza dei fattori nutrizionali sulla produzione di AB sembra secondaria rispetto a quella di fattori che possono influenzare lo stato fisiologico della cellula;
3. nonostante si ritenga che il ruolo fisiologico della formazione di AB sia quello di incrementare il pH intracellulare, il pH extracellulare non sembra essere correlato con la produzione di queste sostanze in vino;
4. l'etanolo sembra influenzare direttamente lo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni* (velocità di crescita e rendimento di crescita) e di conseguenza il rilascio di AB: migliore è lo stato fisiologico delle cellule (basso grado alcolico, pH elevato) maggiore è il rilascio di AB;
5. una maggior persistenza di *O. oeni* non sembra essere correlata con un maggior rilascio delle singole AB.

5.5 Conclusioni

La presente ricerca, finalizzata al controllo della fermentazione malolattica (FML) per la tutela della qualità del vino, si è incentrata sul problema della produzione delle amine biogene (AB) da parte dei batteri lattici dal momento che tali sostanze per la loro tossicità possono determinare effetti negativi sulla salute del consumatore.

L'approccio utilizzato ha riguardato principalmente due aspetti: da un lato si è cercato di mettere a punto strumenti diagnostici rapidi per il monitoraggio delle popolazioni batteriche capaci di produrre amine biogene in vino, dall'altro di determinare le condizioni che durante il processo di vinificazione possono favorire la formazione delle AB. I risultati conseguiti hanno consentito di raggiungere i seguenti due obiettivi principali:

1. Metodi rapidi per individuare e monitorare *O. oeni*, la specie principalmente responsabile della FML, sia come popolazione totale che come ceppi capaci di produrre istamina e putrescina, (due AB importanti, in quanto la prima è ritenuta la più tossica e la seconda perché è quella più abbondante in vino);
2. Individuazione dei fattori intrinseci in grado di influenzare il rilascio di AB in vino da parte di popolazioni di ceppi di *O. oeni* capaci di produrre queste sostanze.

Per quanto riguarda il primo obiettivo, sono state messe a punto una serie di reazioni PCR (*End Point* e *Real-Time*) che si sono dimostrate utili strumenti per un rapido monitoraggio della fermentazione malolattica. In particolare, sono state messe a punto sia una serie di reazioni di multiplex PCR *End Point* per individuare ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina, sia reazioni di *Real-Time* PCR capaci di quantificare in vino nel giro di 24 ore (contro i 7-10 giorni dei metodi microbiologici classici) non solo la popolazione totale di *O. oeni*, ma anche quella capace di produrre istamina e/o putrescina. Tutte le reazioni di *Real-Time* PCR messe a punto hanno dimostrato un'efficienza molto elevata (range 92-101%). Andando però a confrontare i risultati ottenuti con la *Real-Time* rispetto a quelli ottenuti con la conta vitale in piastra, si sono ottenuti risultati non sempre in linea. Infatti, quando la popolazione di *O. oeni* era quantificata in un mezzo di coltura o in vino sterile artificialmente inoculato, la correlazione che si ricavava dai dati ottenuti con le due tecniche era ottimale ($R^2=0,983$ e $R^2=0,977$ rispettivamente). Viceversa, quando la quantificazione veniva eseguita in campioni reali di vino, la correlazione diminuiva ($R^2=0,673$). Considerando l'efficienza delle reazioni messe a punto è ipotizzabile che la fase critica della metodica *Real Time* sia da individuarsi nell'estrazione del DNA da vino, pertanto successivi studi saranno necessari in tal senso per migliorare tale protocollo. La metodica comunque sembra offrire prospettive applicative assai promettenti.

Infine, per quanto riguarda il secondo obiettivo, i risultati ottenuti dalla sperimentazione hanno dimostrato come lo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni* sia il fattore che influenza maggiormente la produzione di AB in vino. In particolare, migliore è lo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni*, maggiore sarà il rilascio di AB e tale rilascio sarà direttamente proporzionale alla disponibilità di aminoacido precursore, indipendentemente dalla presenza o meno di acido malico. Pertanto, se in un vino è presente una popolazione di *O. oeni* che possiede il corredo genetico necessario per produrre AB, tali sostanze saranno prodotte in concentrazioni più significative se la popolazione microbica si troverà in condizioni fisiologiche meno restrittive per la crescita e la sopravvivenza, cioè in presenza di valori di pH non eccessivamente bassi e a concentrazioni di etanolo non eccessivamente alte. Pertanto, vini con bassi tenori alcolici sono potenzialmente più esposti al problema della formazione di AB.

Bibliografia

- Alcailde-Hidalgo J.M., Moreno-Aribas M.V., Martin-Alvarez P.J., Polo M.C. 2007, *Influence of malolactic fermentation, post fermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compound of red wines*, «Food Chemistry», 103: 572-581.
- Bover-Cid S., Iquiedo-Pulido M., Marinè-Font A., Vidal-Carou M.C. 2006, *Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influences of limited irrigation*, «Food Chemistry», 96 (1): 43-47.
- Caruso M., Fiore C., Contursi M., Salzano G., Paparella A., Romano P. 2002, *Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts*, «World Journal of Microbiology and Biotechnology», 18: 150-163.
- Costantini A., Vaudano E., Del Prete V., Danei M., Garcia-Moruno E. 2009, *Biogenic amines production by containing bacteria found in starter preparation used in wine making*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 57 (22): 10664-10669.
- Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F. 2005, *Factors influencing biogenic amine production by a strain of Oenococcus oeni in a model system*, «Food Control», 16 (7): 609-616.
- Gloria M., Watson B., Simon-Sarcadi L., Daeschel M. 1998, *A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines*, «American Journal of Enology and Viticulture», 49: 279-282.
- Granchi L., Paperi R., Rosellini D., Vincenzini M. 1998, *Strain variation of arginine catabolism among malolactic Oenococcus oeni strain of wine origin*, «Italian Journal Food Science», 4: 351-357.
- Granchi L., Guerrini S., Vincenzini M. 2005a, *I batteri lattici e la fermentazione malolattica*, in *Microbiologia del Vino*, Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. (a cura di), Casa Editrice Ambrosiana (ed. orig. 2005), 261-288.
- Granchi L., Roman P., Mangani S., Guerrini S., Vincenzini M. 2005b, *Production of biogenic amines by wine microorganisms*, «Le bullettin de L'OIV», 78 (895-896): 595-609.
- Granchi L., Talini D., Rigacci S., Guerrini S., Berti A., Vincenzini M. 2005c, *Detection of putrescine-producer Oenococcus oeni strains by PCR*, «Book of Abstracts 8th symposium on Lactic Acid Bacteria», Egmond aan Zee, NL, August 28-1 September, C030.
- Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M. 2002, *Biogenic ammine production by Oenococcus oeni*, «Current Microbiology», 44: 374-378.
- 2005, *Ruolo dei microrganismi nella produzione di amine biogene nel vino*, «VQ», 2: 8-16.
- Herbert P., Cabrita M. J., Ratola N., Laureano O., Alves A. 2005, *Free amino acids and biogenic amines in wines and must from Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage*, «Journal of Food Engineering», 66 (3): 315-322.
- Landete J.M., Ferrer S., Polo L., Pardo I. 2005, *Biogenic amines in wines from three Spanish regions*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 53: 1119-1124.
- Landete J.M., de La Rivas B., Marcobal A., Munõz R. 2007, *Molecular methods for the detection of biogenic ammine-producing bacteria on foods*, «International Journal of Journal Food Microbiology», 117: 258-269.

- Lonvaud-Funel A., Joieux A. 1994, *Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of Leuconostoc oenos*, «Journal of Applied Microbiology», 77 (4): 401-407.
- Lonvaud-Funel A. 1999, *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*, «Antonie van Leeuwenhoek», 76: 317-331.
- 2001, *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*, «FEMS Microbiology Review», 199: 9-13.
- Lucas P.M., Claisse O., Lonvaud-Funel A. 2008, *High frequency of histamine-producing bacteria in the oenological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype*, «Applied Environmental Microbiology», 74: 811-817.
- Manca de Nadra M.C., Farías M.E., Moreno-Arribas M.V., Pueyo E., Polo M.C. 1999, *A proteolytic effect of Oenococcus oeni on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine*, «FEMS Microbiology Letters», 174: 41-47
- Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. 2005, *Putrescine accumulation in wine: role of Oenococcus oeni*, «Current Microbiology», 51: 6-10.
- Mangani S., Galli C., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. 2006, *Sviluppo delle popolazioni microbiche ed accumulo di ammine biogene in vinificazione*, «Vignevini», 6: 79-83.
- Mafrá I., Herbert P., Santos L., Barros P., Alves A. 1999, *Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives*, «American Journal of Applied Microbiology», 50(1): 128-132.
- Marcobal A., de las Rivas B., Moreno-Arribas M.V., Muñoz R. 2005, *Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods*, «Journal of Food Protection», 68: 874-878.
- Marcobal A., Polo M.C., Martín-Álvarez P.J., Polo M.C., Muñoz R., Moreno-Arribas, M.V. 2006, *Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine*, «Journal of Food Protection», 69: 397-404.
- Moolenaar D., Bosscher J.S., ten Brink B., Driessen A.J.M., Konings W.N. 1993, *Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in Lactobacillus buchneri*, «Journal of Bacteriology», 175: 2864-2870.
- Moreno-Arribas V., Torlois S., Joyeux A., Bertrand A., Lonvaud-Funel A. 2000, *Isolation, properties and behavior of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine*, «Journal of Applied Microbiology», 88: 584-593.
- Nannelli F., Claisse O., Gindreau E., de Revel G., Lonvaud-Funel A., Lucas P.M. 2008, *Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods*, «Letters in Applied Microbiology», 47: 549-599.
- Orlando C., Pinzani P., Pazzagli M. 1998, *Development in quantitative PCR*, «Clinical Chemistry and Laboratory Medicine», 36: 255-269.
- Pérez-Serradilla J.A., Luque de Castro M.D. 2008, *Role of lees in wine production: A review*, «Food Chemistry», 111: 447-456.
- Pinzani P., Bonciani L., Pazzagli M., Guerrini S., Granchi L. 2004, *Rapid detection of Oenococcus oeni in wine by real-time quantitative PCR*, «Letters in Applied Microbiology», 38: 118-124.

- Rosi I., Nannelli F., Giovani G. 2009, *Biogenic amine production by Oenococcus oeni during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of Saccharomyces cerevisiae*, «LWT Food Science and Technology», 42(2): 525-530.
- Shalaby Ali R. 1996, *Significance of biogenic amines to food safety and human health*, «Food Research International», 29: 675-690.
- Silla Santos M.H. 1996, *Biogenic amines: their importance in food*, «International Journal of Food Microbiology», 29: 213-231.
- Soufleros E.H., Barrios M., Bertrand A. 1998, *Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds*, «American Journal of Enology and Viticulture», 49: 266-278.
- Soufleros E., Bouloumpasi E., Zotou A., Loukou Z. 2007, *Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration*, «Food Chemistry», 101: 704-716.
- Ten Brink B., Damink C., Joosten H.M.L.J., Huis in 't Veld J.H.J. 1990, *Occurrence and formation of biologically active amines in foods*, «International Journal of Food Microbiology», 11 (1): 73-84.
- Vincenzini M., Granchi L. 2007, *I processi di vinificazione: la fermentazione malolattica*, in *Storia regionale della vite e del vino in Italia. Toscana*, Accademia dei Georgofili, Edizioni Polistampa, Firenze (ed. orig. 2007), 547-559.
- Vincenzini M., Guerrini S., Mangani S., Granchi L. 2009, *Amino Acid Metabolisms and Production of Biogenic Amines and Ethyl Carbamate*, in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, König H., Uden G., Frohlich J. (ed. orig. 2009), Springer-Verlag, 167-180.

L'analisi metabolomica descrive come cambia la composizione del vino durante la micro-ossigenazione, sotto l'effetto combinato di ossigeno e ferro

F. Mattivi*, P. Arapitsas*, D. Perenzoni*, U. Vrhovsek*

I. Introduzione

I.1 Descrizione della linea di ricerca

L'attività di questo progetto, svolto in collaborazione tra la Fondazione Edmund Mach, l'Università di Padova ed il Consorzio Toscana, si è focalizzata sulla micro-ossigenazione del Sangiovese. In base alla valutazione analitica delle partite disponibili, effettuata nel 2009, è stato scelto per la prova un vino Sangiovese della vendemmia 2009, ottenuto presso la cantina sperimentale Toscana. La prima fase di micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione alcolica e si è completata subito prima della fermentazione malo-lattica. Il vino (240 hl) è stato diviso in 24 vasche in acciaio da 10 hl e sottoposto a 7 settimane di micro-ossigenazione controllata in 8 diverse condizioni, ciascuna condotta in triplicato. Le variabili investigate sono state la quantità di ossigeno (quattro livelli, 0-5-10-15 mg per litro per mese) e la concentrazione di ferro (due livelli, 1.5 e 2.0 mg/l). Tutte le altre condizioni sono state strettamente standardizzate e monitorate. Sia durante che dopo le prove di micro-ossigenazione, sono state misurate sia la composizione del vino che le caratteristiche sensoriali (per queste ultime, che sono strettamente correlate, visita il sito www.consorziotoscana.it). Tra i parametri più strettamente monitorati come parametro di processo, oltre alle sopra citate periodiche valutazioni sensoriali, la concentrazione di ossigeno sia disciolto che nello spazio di testa di ciascun serbatoio, attraverso misura diretta per oxo-luminescenza effettuata

* Fondazione Edmund Mach, Centro Ricerca ed Innovazione Iasma, Area Alimentazione, San Michele all'Adige (TN), Italia.

a cura del Consorzio Toscana con lo strumento PreSens (Nomacorc) e la concentrazione della acetaldeide nei vini, seguita in FEM per via gascromatografica. La seconda fase di micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione malo-lattica e, come la precedente, è stata attuata su 24 vasche permettendo di testare, in triplicato, l'effetto di 4 differenti dosaggi di ossigeno (0,1,2,3 mg per litro per mese) in presenza di due livelli di ferro (1.7 contro 2.6 mg/L), durante tre mesi di trattamento.

Gli aspetti salienti di questa prova si possono così sintetizzare: i) scala di vinificazione, durata della prova ed intervallo di concentrazioni dei fattori studiati rappresentativi delle condizioni reali di cantina; ii) stretto monitoraggio chimico e sensoriale di tutte le fasi della lavorazione, iii) disegno sperimentale con adeguato numero di repliche e iv) misura degli effetti attraverso esperimenti di 'metabolomica' basati sulla spettrometria di massa. Questo ultimo fattore rappresenta in assoluto una novità, in quanto propone un approccio esplorativo in precedenza mai applicato allo studio del processo di micro-ossigenazione.

2. Materiali e Metodi

2.1 Analisi metabolomica dei vini

Si è provveduto ad analizzare i campioni di vino provenienti dalle varie fasi del processo di micro-ossigenazione, utilizzando una metodica che registra il profilo metabolomico dei campioni, appositamente messa a punto presso i laboratori della Fondazione Mach. Ogni campione, dei 24 serbatoi, è stato analizzato sia tal quale che concentrato cinque volte. Le analisi sono state effettuate con un sistema cromatografico Waters Acquity UPLC accoppiato con un spettrometro di massa Synapt HDMS Q-TOF, controllato dal MassLynx 4.1 software.

Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando la tecnica di ionizzazione ESI (electrospray ionization) sia in modalità positiva che negativa (ottenuta con corse cromatografiche separate), ed a due livelli di energia (bassa ed alta) per ciascuna delle due modalità, operando in un intervallo di massa (m/z) da 50 fino a 3000 amu. Tutte le analisi sono state realizzate in duplicato.

I cromatogrammi sono stati processati ed analizzati in un primo livello dal software XCMS ed esportati per la successiva elaborazione verso R-package, CAMERA e Matlab™. Per maggiori informazioni vedi Arapitsas *et al.* 2012.

3. Risultati e Discussione

Negli ultimi anni la metabolomica è diventata una 'tecnologia abilitante' in diversi settori scientifici, dalla diagnosi delle malattie fino alla tecnologia degli alimenti. Si tratta di un approccio scientifico innovativo, che

punta ad analizzare tutti i metaboliti, o ampi gruppi di metaboliti, come un insieme. Il vino è una matrice che contiene un elevato numero di metaboliti primari e secondari, le concentrazioni ed i rapporti tra i quali determinano la qualità ed il carattere del vino. In letteratura fino ora ci sono pochi studi metabolomici ancora pionieristici applicati al settore enologico, focalizzati alla valutazione della origine geografica del vino, della cultivar del vitigno e dell'annata (Cuadros-Inostroza *et al.* 2010; Vaclavik *et al.* 2011). Uno studio particolarmente interessante ha permesso di descrivere i composti caratteristici della spuma degli Champagne (Liger-Balair *et al.* 2009). Ad oggi non ci risulta siano mai stati tentati studi metabolomici sulla influenza della pratica enologica della micro-ossigenazione.

3.1 Numero di features

Si ricorda che per 'feature' si intende una coppia univoca di valori di massa accurata e di tempo di ritenzione. Viene usata negli esperimenti di metabolomica perché in questo modo si acquisiscono e conservano le informazioni rispetto a tutti i composti rilevabili, ossia che possano lasciare una traccia nelle condizioni della analisi, inclusi quelli, e sono la maggior parte, ad oggi non ancora identificati. Questo genera dei dati estremamente completi e complessi da analizzare, che contengono una quantità di informazione incomparabilmente superiore di quella proveniente dai consueti esperimenti su composti target. In questi ultimi infatti, l'informazione che riguarda i composti non specificamente cercati viene preventivamente rimossa, o dove acquisita va comunque persa durante il processo di processamento del dato.

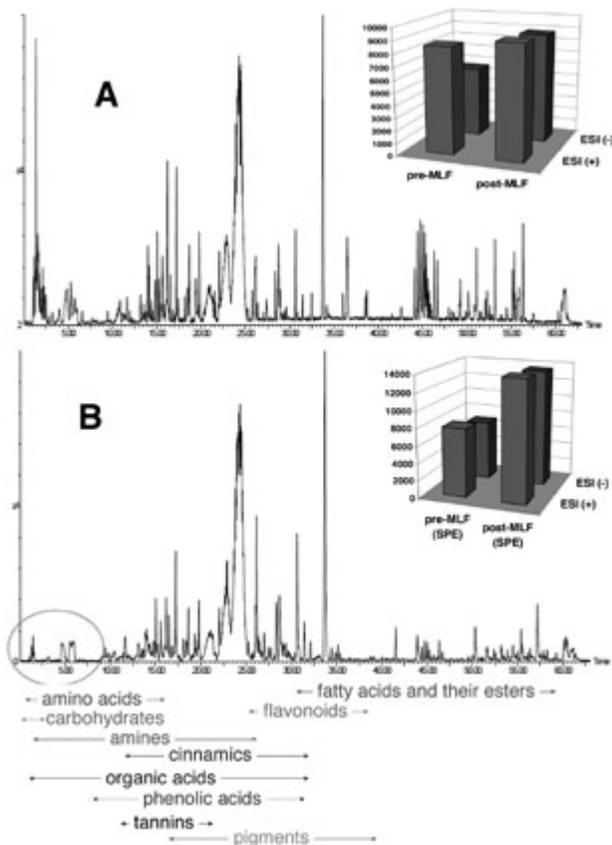
Analizzando i dati sperimentali delle analisi UPLC-MS, dopo il loro processamento con XCMS sono state rilevate per i campioni di vini dell'esperimento di micro-ossigenazione in fase I (prima della fermentazione malo-lattica o *pre-MLF*), analizzati tal quali, per l'analisi in modalità di ionizzazione ESI positiva 8526 features (raggruppate in 3188 insiemi), e 5620 features (raggruppate in 2151 insiemi) per quella ESI negativa.

Per gli stessi campioni ma concentrati cinque volte (via SPE) prima della iniezione, in ESI positiva sono state rilevate 7972 features (3180 insiemi) e 6904 features (2758 insiemi) in ESI negativa.

Per quanto riguarda i campioni di vini relativi all'esperimento di micro-ossigenazione in fase II (dopo la fermentazione malo-lattica o *post-MLF*) le features sono state, per i campioni tal quali, in modalità positiva 9134 (3121 insiemi), e in negativa 8843 (2864 insiemi); e per i campioni concentrati cinque volte, in modalità positiva 13991 (5607 insiemi) e in negativa 13589 (5400 insiemi) (Figura 1). Un insieme è un gruppo di features che appartengono allo stesso picco cromatografico. Questi possono essere ascritti ad isotopi, addotti e frammenti.

Come si può vedere dalla figura 1, il numero di features è stato maggiore nei vini dopo concentrazione via SPE. Anche se va sottolineato che con

Figura 1. Tipici cromatogrammi LC-MS dello stesso campione di vino analizzato tal quale (A) e dopo concentrazione via SPE (B). In alto a destra, in istogramma, il numero di features rilevate con modalità di rilevazione positiva ESI (+) o negativa ESI (-), nei due esperimenti di micro-ossigenazione effettuati prima (pre-MLF) o dopo (post-MLF) della fermentazione malolattica



questa procedura una gran parte dei composti che eluiscono nei primi minuti della corsa cromatografica sono stati eliminati. Si tratta di metaboliti solubili in acqua come zuccheri, amine, amino acidi ed acidi organici, non trattenuti dalla cartuccia di fase inversa utilizzata per concentrare il campione. Il trend ed uno dei obiettivi principali delle analisi metabolomiche è di concentrarsi verso procedure che richiedono la minima manipolazione del campione, perchè possono modificare la composizione del campione compromettendo in tal modo una analisi olistica. I campioni di vino tal quale, preparato in atmosfera inerte per prevenire contatti con l'ossigeno,

rispettano in pieno questo principio. Invece la procedura di concentrazione utilizzata per concentrare 5 volte i vini prima della iniezione porta ad eliminare nelle fasi di caricamento e lavaggio una quota elevata dei composti, prevalentemente metaboliti primari, mentre consente di concentrare ed accedere ad una quantità superiore di informazioni sui metaboliti secondari presenti in tracce (Theodoridis *et al.* 2012).

3.2 Annotazione dei picchi

In base a queste features sperimentali sono stati tentativamente identificati nei vini più di 200 composti, tramite il doppio confronto della loro frammentazione e tempo di ritenzione con quelli di appositi standard. Dalla modalità ESI positiva sono stati identificati (o tentativamente identificati) più di 150 composti, e dalla modalità ESI negativa più di 140 composti (diversi composti erano identificati in entrambe le modalità). Per l'identificazione dei composti, le analisi dei campioni dopo SPE sono state di grande utilità dato che gli spettri registrati erano di migliore qualità se ottenuti dopo la concentrazione e con la eliminazione degli interferenti. Del resto questa è una delle ragioni principali del vasto impiego di tecniche SPE per la preparazione dei campioni per le analisi target. I composti identificati nei vini fanno parte di numerose categorie di metaboliti primari o secondari come polifenoli (pigmenti, flavonoidi, tannini, stilbeni, acidi fenolici, acidi cinnamici etc.), carboidrati, bioammine, acidi organici, amino acidi, acidi grassi, esteri, etc.

Tabella 1. Elenco dei composti di cui è stata completata l'annotazione

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
pigments			
malvidin 3-glucoside galocatechin	15,70	-	797,194
cyanidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside catechin	16,22	-	883,205
malvidin 3-glucoside catechin	18,40	-	781,197
cyanidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside catechin	18,54	-	883,209
cyanidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside catechin	20,65	-	883,209
delphinidin 3-glucoside*	21,03	463,087	465,103
cyanidin 3-glucoside*	22,30	447,092	449,107
petunidin 3-glucoside*	22,50	477,103	479,117
pyrano delphinidin 3-glucoside	23,07	-	489,102
carboxypyran delphinidin 3-glucoside	23,82	-	533,103
peonidin 3-glucoside*	24,02	461,108	463,123
malvidin 3-glucoside*	24,25	491,118	493,134
phenol-vinylpyrano cyanidin 3-glucoside	24,61	-	591,149
carboxypyran peonidin 3-glucoside	24,09	-	531,112

(continua)

194 La ricerca applicata ai vini di qualità

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
catechol-vinylpyrano petunidin 3-glucoside	25,19	-	637,157
carboxypyranocyanidin 3-glucoside	25,47	-	517,096
pyranopetunidin 3-glucoside	25,62	-	503,119
carboxypyranopetunidin 3-glucoside	26,43	-	547,109
phenol-vinylpyranomalvidin 3-glucoside	26,61	-	635,174
pyranopeonidin 3-glucoside	26,82	-	487,123
petunidin 3-glucoside ethylcatechin	26,99	-	795,212
catechinpyranomalvidin 3-glucoside	27,00	-	805,196
malvidin 3-glucoside ethylprocyanidin	27,28	-	1098,293
pyranomalvidin 3-glucoside	27,48	-	517,132
petunidin 3-glucoside ethylepicatechin	27,97	-	795,212
pyranopeonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside	28,28	-	529,135
peonidin 3-glucoside ethylcatechin	28,63	-	779,214
carboxypyranomalvidin 3-glucoside	28,42	-	561,123
peonidin 3-glucoside ethylcatechin	28,68	-	779,220
malvidin 3-(6'-acetyl)-glucoside*	28,90	-	535,144
malvidin 3-glucoside ethylcatechin	28,94	-	809,229
malvidin 3-glucoside ethylgalocatechin	29,02	-	825,216
peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside*	29,20	503,120	505,136
malvidin 3-glucoside ethylgalocatechin	29,26	-	825,222
peonidin 3-glucoside ethylcatechin	29,69	-	779,220
malvidin 3-glucoside ethylcatechin	29,71	-	809,229
malvidin 3-glucoside ethylcatechin	30,14	-	809,230
peonidin 3-glucoside ethylcatechin	30,40	-	779,219
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31,59	-	771,445
4-vinylcatechol			
carboxypyranomalvidin			
3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31,66	-	707,161
cyanidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31,70	-	595,144
petunidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31,76	-	625,155
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31,90	-	787,187
4-vinylsyringol			
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside*	32,40	637,156	639,171
carboxypyranopetunidin			
3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	32,54	-	693,148
pyranomalvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	32,73	-	663,172
peonidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside*	32,97	607,146	609,160
carboxypyranomalvidin 3-(6'-acetyl)-glucoside	33,66	-	603,158
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside			
ethylcatechin	33,73	-	955,265
petunidin 3-glucoside 4-vinylcatechol	33,82	-	611,140
petunidin 3-glucoside 4-vinylphenol	34,76	-	595,144

(continua)

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol	35,23	-	625,155
xanthilium salt	35,82	-	619,144
malvidin 3-glucoside 4-vinylphenol	36,11	-	609,160
malvidin 3-glucoside 4-vinylsyringol	36,24	-	669,153
malvidin 3-glucoside 4-vinylguaiacol	36,39	-	639,171
peonidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside 4-vinylphenol	37,50	-	725,186
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside 4-vinylphenol	37,90	-	755,195
tannins			
proanthocyanidin dimer	11,22	593,124	-
prodelfhinidin dimer	11,46	609,124	611,138
carboxymethine-flavanol dimers	12,08	635,143	-
procyanidin type-B trimer	12,99	865,212	867,214
carboxymethine-flavanol dimers	13,23	635,146	-
prodelfhinidin dimer	13,86	-	611,140
procyanidin trimer digallate	14,03	1169,219	-
procyanidin type-D	14,05	863,682	-
proanthocyanidin dimer	14,09	593,129	595,144
gallo catechin*	14,51	305,066	307,080
proanthocyanidin dimer	14,90	593,130	595,144
proanthocyanidin dimer	15,22	593,126	595,144
procyanidin trimer digallate	15,85	1169,216	-
procyanidin trimer digallate	16,30	1169,216	-
proanthocyanidin dimer	16,44	593,133	595,144
proanthocyanidin tetramer	16,60	1169,266	-
procyanidin type A dimer	16,83	-	577,136
procyanidin B3*	16,86	577,135	579,150
prodelfhinidin dimer	17,03	-	611,138
procyanidin B1*	17,29	577,134	579,148
procyanidin tetramer	17,45	1153,264	-
procyanidin B trimer	17,55	865,200	867,214
proanthocyanidin dimer	17,74	593,133	595,144
procyanidin B trimer	18,36	865,200	867,214
procyanidin trimer digallate	18,45	-	1171,273
epigallocatechin*	18,50	305,067	307,081
procyanidin B4*	18,50	577,135	579,149
catechin*	18,70	289,071	291,087
proanthocyanidin dimer	18,87	593,133	595,144
procyanidin type-B dimer	19,19	577,139	-

(continua)

196 La ricerca applicata ai vini di qualità

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
proanthocyanidin dimer	19,48	593,124	595,144
procyanidin B2*	19,92	577,136	579,151
procyanidin B trimer	21,20	865,203	-
proanthocyanidin tetramer	21,26	1169,264	-
procyanidin B trimer	21,47	865,200	867,213
procyanidin type-B dimer	21,70	577,136	-
epicatechin*	22,23	289,072	291,087
(-)-epicatechin gallate*	24,86	441,045	-
flavonoids			
dihydromyricetin derivative	20,34	319,045	-
taxifolin*	25,27	303,050	-
quercetin 3,4-diglucoside*	26,08	625,141	-
myricetin 3-hexoside	26,78	479,831	-
myricetin 3-glucuronide	26,44	493,062	-
miricetin 3-glucoside*	28,30	463,087	465,103
quercetin 3-arabinoside*	28,30	-	303,050
myricetin 3-rhamnoside*	28,30	-	319,045
quercetin-3-glucuronide*	28,67	477,067	303,050
quercetin 3-glucoside*	29,10	463,087	303,051
quercetin 3-rutinoside*	29,25	611,16	303,051
phloridzin*	29,60	435,129	-
kaempferol 3-glucuronide*	30,86	461,070	-
myricetin*	30,89	317,029	319,046
eriodictyol*	31,03	287,056	-
quercitrin*	31,10	447,092	-
isorhamnetin 3-glucoside*	31,53	477,104	317,065
laricitrin 3-hexoside	31,53	493,099	-
syringetin 3-hexoside* (sum of glucoside and galactoside)	31,57	507,114	347,075
naringenin*	33,75	271,060	273,075
quercetin*	33,96	301,034	303,049
laricitrin*	34,67	331,045	333,059
kaempferol*	36,61	285,040	-
isorhamnetin*	37,07	-	317,065
syringetin*	37,40	345,061	-
stilbenoids			
piceatanol*	26,54	243,066	245,082
astringin*	22,70	405,118	-
<i>trans</i> -piceid*	25,30	389,122	413,120

(continua)

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
<i>trans</i> -resveratrol*	29,10	227,071	229,086
<i>cis</i> -piceid*	29,20	389,124	413,120
<i>cis</i> -resveratrol*	31,60	227,071	229,086
phenolic acids			
gallic acid*	9,00	169,014	-
protocatechuic acid*	13,90	153,017	155,034
2,6 dihydroxybenzoic*	16,90	153,020	-
vanillic acid*	20,30	167,035	-
syringic acid*	21,90	197,045	-
benzoic acid*	26,20	-	123,046
ellagic acid*	30,39	300,998	303,014
ethyl gallate*	23,04	197,046	199,060
ethyl caffate*	32,10	207,064	209,080
cinnamics			
<i>cis</i> -caftaric acid	14,37	311,041	335,038
<i>trans</i> -caftaric acid*	15,50	311,040	335,038
<i>cis</i> -coutaric acid	17,46	295,050	-
<i>trans</i> -coutaric acid	18,23	295,050	-
<i>cis</i> -fertaric acid	19,46	325,056	-
<i>trans</i> -fertaric acid	19,76	325,056	-
caffeic acid*	20,70	179,033	163,039
rosmarinic acid	21,46	359,096	-
vanillic acid*	21,66	-	169,050
dicaffeoyl tartaric	22,01	-	474,087
<i>p</i> -cumaric acid*	24,30	163,038	147,045
ethyl <i>p</i> -coumarate	35,21	191,071	193,086
fatty acids & fatty acid esters			
hexanoic acid*	30,90	115,077	-
octanoic acid*	40,09	143,109	-
decanoic acid*	45,71	171,139	173,154
dodecanoic acid*	49,59	199,170	-
tetradecanoic acid*	52,37	227,202	229,216
9- <i>cis</i> -hexadecenoic acid*	53,18	253,217	-
<i>cis</i> , <i>cis</i> -9,12-octadecadienoic acid*	53,60	279,231	-
hexadecanoic acid*	54,40	255,233	257,249
<i>cis</i> -9-octadecenoic acid*	54,80	281,248	-
octadecanoic acid	56,12	283,264	-
eicosenoic acid*	56,36	309,280	-

(continua)

198 La ricerca applicata ai vini di qualità

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
docosanoic acid*	58,70	339,327	-
methyl jasmonate*	38,45	223,151	225,148
methyl tetradecanoate*	54,50	241,217	243,231
methyl <i>cis</i> -9-hexenoate*	54,90	-	269,247
methyl <i>cis, cis</i> -9,12-octadecadienoate*	55,50	-	295,262
methyl hexadecanoate*	56,43	269,239	271,267
methyl octadec-9-enoate*	56,63	-	297,278
ethyl pentadecanoate	55,08	269,232	271,263
ethyl tetradecanoate*	55,11	255,233	257,249
ethyl hexadecanoate	56,12	283,264	-
ethyl octadecanoate	57,44	311,297	-
organic acids			
glucuronic acid*	1,27	193,035	-
mucic acid*	1,30	209,030	-
glutamic acid*	1,30	-	148,059
L-saccharopine*	1,35	275,124	277,137
L-threonic acid*	1,40	135,030	-
2-keto- <i>d</i> -gluconic acid*	1,40	193,034	-
D-gluconic acid*	1,40	195,049	-
galacturonic acid*	1,40	193,034	217,033
5-keto-D-gluconic acid*	1,44	193,034	-
tartaric acid*	1,52	149,005	-
glycolic acid*	1,60	75,009	-
glyceric acid*	1,60	105,019	-
dehydroascorbic acid*	1,74	173,009	-
pyruvic acid*	1,78	97,009	-
malic acid*	2,01	133,012	322,970
ascorbic acid*	2,37	175,022	-
2-ketoglutaric acid*	2,40	145,014	-
lactic acid*	2,50	89,024	-
maleic acid*	2,90	115,003	-
ribonic acid or hydroxy-glutaric acid*	3,16	147,015	-
citric acid*	3,92	191,017	-
propionic acid*	4,63	73,030	-
succinic acid*	4,95	117,018	-
citramalic acid*	5,17	147,028	-
pantothenic acid*	14,30	218,103	220,118
adipic acid*	15,50	145,050	169,046
<i>m</i> -hydroxybenzoic acid*	17,50	-	139,039
isopropyl malic acid*	18,13	175,060	199,058
abscisic acid*	31,30	263,129	247,134

(continua)

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
amino acids			
histidine*	1,20	-	156,077
arginine*	1,20	-	175,120
glycine*	1,20	-	203,053
alanine*	1,30	-	90,056
homoserine*	1,30	-	120,065
threonine*	1,30	-	120,065
L-glutamine*	1,30	-	130,040
proline*	1,59	114,055	116,071
valine*	2,20	-	72,081
norvaline*	2,20	-	72,081
leucine*	4,96	130,087	86,096
phenylalanine*	11,50	164,068	120,075
tryptophan*	16,00	203,082	188,071
amines			
spermidine*	1,02	-	146,165
agmatine*	1,03	-	131,129
L-cystathionine*	1,22	221,060	-
propylamine*	1,35	-	60,081
gaba*	1,40	-	104,071
uridine*	7,01	243,062	-
3 indolelactic acid*	24,60	204,066	206,081
tryptophol*	26,20	-	162,091
carbohydrates			
hexol*	1,24	179,056	-
hexol*	1,40	-	183,088
pentose*	1,40	149,045	-
hexose*	1,40	179,056	203,055
hexose*	1,45	-	203,055
trehalose*	1,50	341,108	325,111
quinic acid*	1,61	191,071	-
raffinose*	2,14	503,161	-
miscellaneous			
choline*	1,40	-	104,106
betaine*	1,50	-	118,087
adenine*	2,33	-	136,061
guanine*	3,25	-	152,057
glutathione*	3,44	-	308,091

(continua)

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
uric acid*	4,00	167,022	169,036
hypoxanthine*	4,50	135,033	137,048
xanthine*	6,03	151,024	153,040
glutathione ox*	9,65	611,145	-
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde*	20,30	-	123,044
riboflavin*	23,90	375,130	377,145
pomonic acid	50,97	-	473,362
ursolic acid*	53,53	455,351	-
lanosterol*	58,32	425,364	-

* Identification confirmed also via comparison of retention time and MS-data with authentic standard.

3.3 Effetto Ossigeno-Metallo

Tutti i composti identificati sono stati integrati separatamente e la loro tendenza nei vari esperimenti è stata valutata considerando i vari livelli di ossigeno e metallo. Da questa procedura sono stati individuati alcuni composti markers la cui concentrazione è risultata, negli esperimenti condotti, influenzata dall'ossigeno o/e dal metallo.

In letteratura i composti che principalmente sono indicati essere fortemente influenzati dalla micro-ossigenazione sono i pigmenti (Figura 2). Infatti questa tecnica viene utilizzata principalmente per favorire la stabilizzazione del colore dei vini rossi. Gli antociani, che sono i pigmenti responsabili del colore dei vini rossi, quando sono in forma libera (e.g. *cyanidin 3-glucoside* – Figura 2) hanno una bassa stabilità e tendono con il tempo a degradarsi, con risultati negativi sulla tenuta del colore del vino (Atanasova *et al.* 2002; Gómez-Plaza *et al.* 2011; Cano-Lopez *et al.* 2006; Ribèreau-Gayon *et al.* 2000).

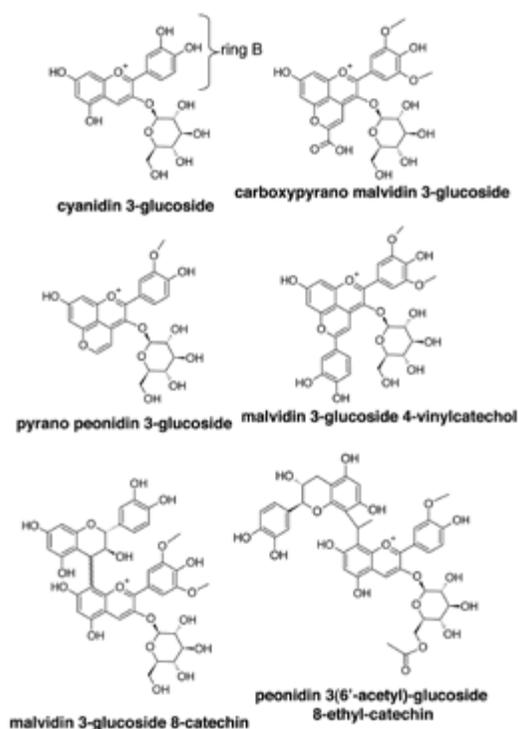
Durante la micro-ossigenazione, ed in generale l'invecchiamento dei vini, gli antociani partecipano in diverse reazioni chimiche ed biochimiche che formano dei prodotti pigmentati più stabili, come:

- reazioni fra antociani ed acidi organici (i.e. acido piruvico), o aldeidi (e.g. acetaldeide) o acidi cinnamici (e.g. acido caffeico) per dare pigmenti della serie delle vitisine (e.g. *carboxypyranol malvidin 3-glucoside* – Figura 2) e pinotine (e.g. *malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol* – Figura 2);
- reazioni fra antociani e flavanoli mediante aldeidi (e.g. acetaldeide) che generano pigmenti del tipo della *peonidin 3-(6' acetyl)-glucoside 8-ethylcatechin* (Figura 2);
- reazioni dirette fra antociani e flavanoli (monomeri, dimeri, trimeri etc di catechina e/o epicatechina), che generano pigmenti come la *malvidin 3-glucoside 8-catechin* (Figura 2).

Infatti, anche in questo esperimento di metabolomica non-target è stato possibile ricostruire con precisione come le varie dosi di ossigeno e metallo influiscano in modo positivo o negativo sulla concentrazione dei diversi tipi di pigmenti. Nella figura 3 vengono riportati alcuni esempi.

La maggior parte delle variazioni dei pigmenti dovuti alla micro-ossigenazione dei vini, sono stati molto più significativi per l'esperimento realizzato prima della fermentazione malo-lattica (pre-MLF). Anche questa osservazione è in accordo con l'esperienza pratica, e con i dati bibliografici, essendo stata dimostrata una variazione più significativa se la micro-ossidazione avviene dopo la fermentazione alcolica e subito prima di quella malo-lattica (Gómez-Plaza *et al.* 2011).

Figura 2. Strutture di pigmenti identificati nel vino Sangiovese



I pigmenti della classe delle vitisine (che ricomprende pirano e carbossipirano antociani) in pre-MLF hanno la tendenza ad aumentare (e.g. *pyranopeonidin 3 glucoside* – Figura 2 e Figura 3a), mentre in micro-ossigenazione post-MLF hanno la tendenza a diminuire (e.g. *carboxypyranomalvidin 3-glucoside* – Figura 2 e Figura 3c). Questo andamento è tipico per le vitisine, cioè di essere tra i primi pigmenti a formarsi in condizioni di micro-ossigenazio-

ne, mentre in seguito la loro concentrazione inizia a diminuire con il proseguire del trattamento (Cejudo-Bastante *et al.* 2011; Alcalde-Eon *et al.* 2006).

Fra i pigmenti favoriti dall'azione dell'ossigeno, sia in pre-MLF che post-MLF, vi sono i prodotti delle reazioni fra antociani e flavonoli (e.g. *malvidin 3-glucoside catechin* Figura 2 e Figura 3d) e i pigmenti del tipo pinotine. Soprattutto le pinotine, ma anche i flavano-antociani, sono dei pigmenti che si formano in concentrazioni significative dopo il primo anno in vini che non hanno subito micro-ossidazione ma sono stati conservati in bottiglia (Alcalde-Eon *et al.* 2006; Castañeda-Ovando *et al.* 2009).

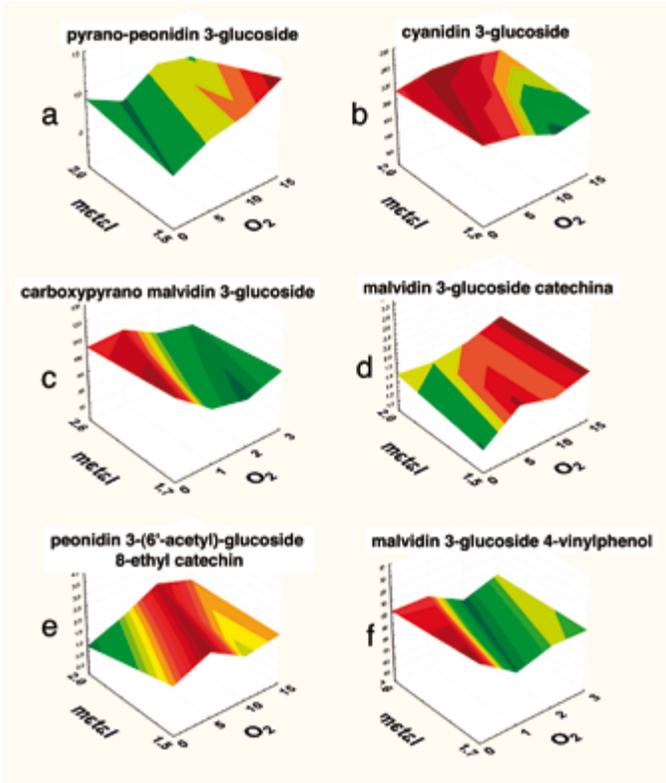
Va osservato che, nel nostro esperimento, alcune delle pinotine (e.g. *malvidin 3-(6'-p-coumaroyl)-glucoside 4-vinylphenol* e *malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol*), insieme con la maggioranza dei pigmenti tipo antociano-etil-flavonolo (e.g. *peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside 8-ethyl-catechin* Figura 2 e Figura 3e) hanno presentato dei massimi alle medie dosi di ossigeno. È un aspetto questo particolarmente interessante considerando che ci attendiamo, almeno per alcune delle reazioni osservate, un effetto bifasico (quindi non lineare) dell'ossigeno apportato. Quelle classi di composti che seguono questo andamento sono dei possibili marcatori di processo che potrebbero aiutarci a capire quando la dose somministrata è ottimale.

Alcuni altri pigmenti come la *malvidin 3-glucoside 4-vinylphenol* (Figura 3f), in post-MLF, hanno presentato dei minimi nelle medie dosi di ossigeno. Nonostante le dosi di ossigeno testate in questi due esperimenti (pre-MLF e post-MLF) fossero in un ristretto range di concentrazioni, tipici della vinificazione reale di vini Sangiovese e senza aggiungere per scopi sperimentali nessun valore estremo (di forzatura), sono stati diversi i composti che hanno presentato un effetto bifasico, cioè con delle concentrazioni massime o minime alle medie dosi di ossigeno. Questo fenomeno era stato da noi ipotizzato in fase di impostazione dell'esperimento. La pratica invalsa negli studi di laboratorio, di espandere lo studio a valori estremi e superiori – talora anche 1 o 2 ordini di grandezza – a quelli normalmente considerati ottimali, facilita la evidenziazione delle relazioni ma sposta il campo di osservazione verso valori superiori, dove frequentemente il comportamento è lineare. Questo non è specifico del vino ma è comune a diversi settori di ricerca dove l'ormesi è stata non sufficientemente investigata, quali ad esempio la tossicologia e la nutrizione (Calabrese 2008-2009; Hayes 2010).

Studi fatti in soluzioni modello simulanti la composizione del vino hanno proposto che il meccanismo della formazione delle pinotine avviene tramite una reazione fra l'antociano monomero ed un acido cinnamico, cioè ad esempio fra la *malvidin 3-glucoside* e l'acido caffeico nel caso della formazione della *malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol* (Schwarz *et al.* 2003). Alla luce della similarità della struttura delle vitisine e le pinotine, e in più dal fatto che le pinotine si formano durante la diminuzione delle vitisine, si può ipotizzare anche un altro meccanismo alternativo per la formazione delle pinotine che abbia come intermedio le vitisine. Una ipotesi da ap-

profondire perché se confermata evidenzia la capacità degli esperimenti di metabolomica di fornire un quadro particolarmente completo delle complesse ed interconnesse reazioni.

Figura 3. Alcuni esempi della variazione delle concentrazione di pigmenti del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro. È riportata sugli assi la diversa dose di ossigeno esplorata, quella più elevata si riferisce agli esperimenti pre-MLF

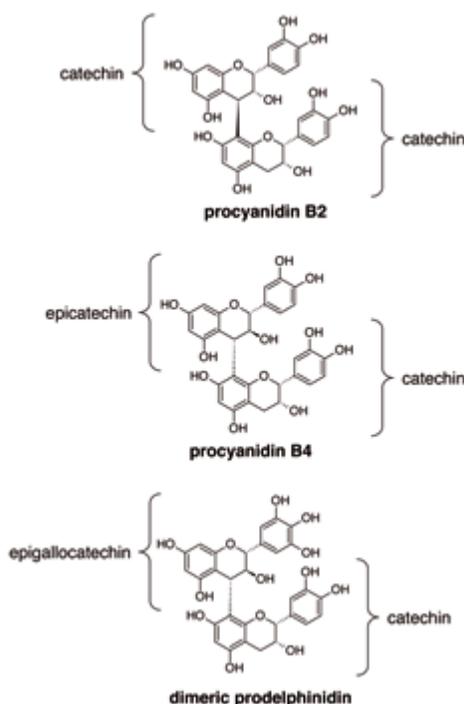


Un gruppo di pigmenti per i quali vale la pena tentare di correlare il loro andamento con la concentrazione di acetaldeide fra i due esperimenti, pre-MLF and post-MLF (vedi anche materiale supplementare) sono quelli del tipo antociano-etil-flavonolo (e.g. *malvidin 3-glucoside 8-ethyl-catechin* e *peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside 8-ethyl-catechin*). Il loro profilo pre-MLF presenta dei massimi alle dosi intermedie di ossigeno, cioè ha un effetto bifasico entro le tesi studiate. All'esperimento post-MLF questi pigmenti hanno ancora un leggero aumento correlato con le dosi di ossigeno fino alla massima dose di ossigeno testata (3 mg/L/mese). D'altra parte, la concentrazione dell'acetaldeide pre-MLF cresce fino ai valori medi di ossigeno e poi si stabilizza, mentre in post-MLF ha una relazione proporzionale in tutto

l'intervallo dei valori di ossigeno provati (vedi anche materiale supplementare). Siccome per la formazione di questi pigmenti, l'acetaldeide è uno dei tre elementi che reagiscono insieme per formare l'antociano-etil-flavonolo (Drinkine *et al.* 2007), la differenza dell'andamento di questi pigmenti tra pre- e post-MLF potrebbe essere spiegata anche dal turnover della acetaldeide, la quale si forma a seguito della ossidazione e partecipa in diverse reazioni. Altre reazioni dirette possono in ipotesi essere più favorite rispetto a quella degli antociano-etil-flavonoli che richiede un meccanismo multistadio in cui partecipano tre separate molecole.

Peraltro, fra i composti sperimentalmente trovati correlati con il livello di ossigeno, oltre ai pigmenti, rientrano anche ammine, amminoacidi, tannini, acidi grassi, acidi fenolici, acidi organici, acidi cinnamici e i loro esteri.

Figura 4. Strutture di procianidine e prodelfinidine identificate nel vino Sangiovese



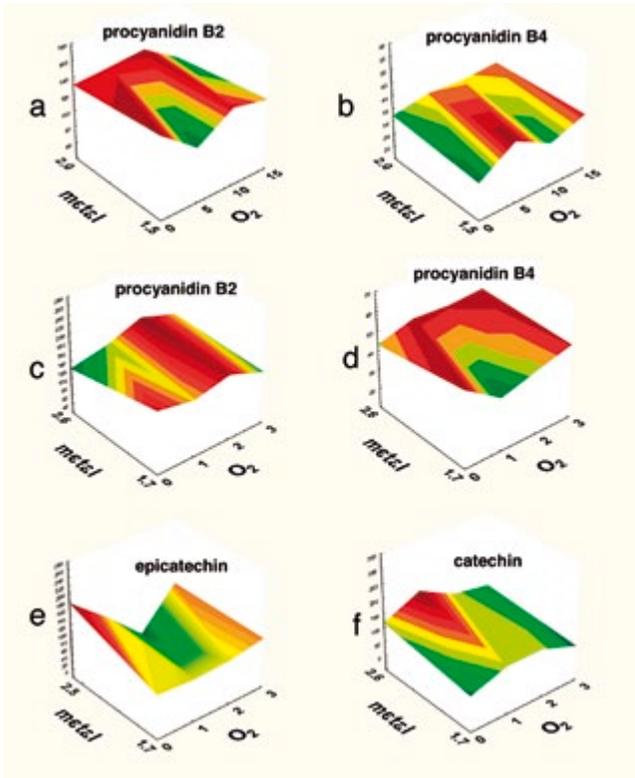
I tannini da una parte reagiscono con gli antociani e aiutano così la stabilità del colore dei vini rossi; e dall'altra parte reagiscono anche fra di loro e/o con altri composti, creando dei polimeri i quali migliorano il gusto e la struttura dei vini (Mattivi *et al.* 2009). È stato riportato che tra le catechine, la (-)-epicatechina reagisce più fortemente in presenza di ossigeno, rispetto alla (+)-catechina. In più, nel caso dei dimeri tipo B, quelli dove la parte su-

periore della struttura è (+)-catechina reagiscono più velocemente rispetto a quelli con (-)-epicatechina (Ribèreau-Gayon *et al.* 2000).

La correlazione del profilo di questi composti con l'ossigeno è stata riscontrata anche nel nostro esperimento. In particolare, le procianidine del tipo B (quelle più comuni, con il legame interflavanico 4à8), nell'esperimento condotto prima della fermentazione malolattica, potrebbero essere divise in due gruppi in base al tipo di struttura presente come unità superiore del dimero (Figura 4). Le *procyanidin B3* e *B4*, dove il flavonolo superiore è la *catechin*, dimostrano dei massimi alle medie dosi di ossigeno. L'effetto diverso si nota per le *procyanidin B1* e *B2*, dove il flavonolo superiore è la *epicatechin* (Figura 5a-5b).

Gli stessi composti, durante l'esperimento post-MLF, possono di nuovo essere divisi con lo stesso modo, anche se questa volta presentano dei effetti diversi. Le *procyanidin B1* e *B2* aumentano con l'aumento della dosi di ossigeno, invece le *B3* e *B4* presentano dei minimi alle dosi medie (Figura 5c-5d).

Figura 5. Alcuni esempi di variazione delle concentrazione di catechine e proantocianidine del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro. È riportata sugli assi la diversa dose di ossigeno esplorata, quella più elevata si riferisce agli esperimenti pre-MLF



Anche i building block di questi composti, ossia i due flavanoli monomeri *catechin* ed *epicatechin*, presentano un andamento influenzato non solo dalla dosi di ossigeno ma anche dalla dosi di metallo (Figura 5e-5f). Questa potrebbe essere una informazione importante, non necessariamente per i vini Sangiovese, dove nel nostro caso in base alla analisi target LC-MS (Mattivi *et al.* 2009) avevamo livelli di partenza di flavanoli monomeri di circa 52 mg/L di cui 28 e 13 mg/L rispettivamente per catechina ed epicatechina, 9 di gallo catechina e 2 di epigallo catechina, ma soprattutto per altre varietà di vino che generano vini giovani con contenuti di diverse centinaia di mg/l in questi composti, quali ad esempio Pinot Nero, Nebbiolo, Sagrantino di Montefalco.

Pure le prodelfinidine dimeriche (Figura 4), del tipo gallo catechina-catechina, e le procianidine del tipo C identificate in questo studio hanno presentato dei profili molto interessanti. In pochi casi avevano una correlazione lineare positiva con la dose di ossigeno, ma la regola era un effetto bifasico, facendo questa classe di composti un altro importante generatore di marcatori per ottimizzare la tecnica di micro-ossigenazione, con analisi non target.

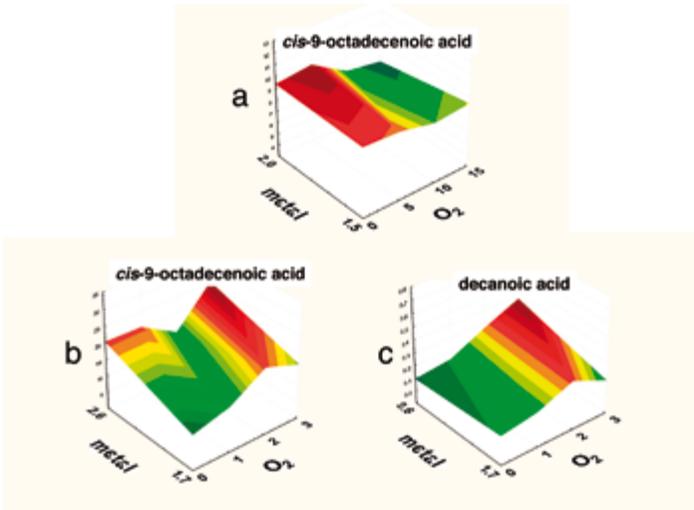
Questo è particolarmente interessante se consideriamo la composizione dei tannini, caratterizzati subito prima dell'inizio delle prove tramite analisi LC-MS dopo depolimerizzazione con floroglucunolo (Gris *et al.* 2011). Le procianidine nel Sangiovese risultavano piuttosto complesse, con un elevato grado medio di polimerizzazione (9.5), quindi con un peso medio intorno ai 3000 Dalton. La presenza di proantocianidine era dell'ordine di 950 mg/L, di cui 94 mg/L circa come unità terminali ed il restante 90% come unità superiori. Le unità terminali erano costituite per circa 53 mg/L da catechina, seguita da epicatechina (23 mg/L), gallo catechina (13 mg/L) ed epigallo catechina (5 mg/L). Invece le unità superiori avevano una composizione marcatamente differente, essendo costituite essenzialmente da unità di epigallo catechina (476 mg/L) ed epicatechina (347 mg/L) con copresenza solo in tracce di catechina (11 mg/L) ed epicatechina gallata (25 mg/L).

Un altro gruppo di metaboliti secondari che hanno mostrato di essere influenzati dalle dosi di ossigeno sono gli acidi grassi. Nel caso del *cis-9-ottadecenoic acid* (acido oleico) la correlazione era negativa per l'esperimento pre-MLF (Figura 6a), ma positiva per l'esperimento post-MLF (Figura 6b-6c).

In generale la maggior parte degli acidi grassi ed i loro metil ed etil esteri hanno un effetto simile a quello dell'acido oleico per l'esperimento post-MLF (Figura 6b-6c). Schmarr *et al.* hanno dimostrato usando un sistema di gascromatografia bidimensionale accoppiata con uno spettrometro a triplo quadrupolo una elevata correlazione positiva fra la quantità di ossigeno usato in condizioni di micro-ossigenazione dei vini e gli esteri etilici di acidi grassi a media catena (etil octanoato e etil decanoato) in fase pre-MLF, e gli esteri etilici di lunga catena (etil decaesanoato) in fase post-MLF

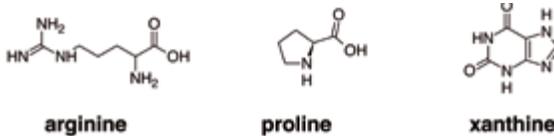
(Schmarr *et al.* 2010). Quale sia il meccanismo di questa variazione ancora non è nota. Potrebbe essere sia il risultato di una reazione chimica ma è decisamente più probabile sia un conseguenza di reazioni enzimatiche. Ad esempio i *Brettanomyces*, che sono microorganismi che appartengono molto spesso alla microflora dei vini invecchiati in botti di legno in post-MLF, anche in vini sottoposti a micro-ossigenazione, possono aumentare la concentrazione nei vini degli acidi grassi e dei loro metil esteri, soprattutto degli acidi tetradecanoico e 9-*cis* esadecanoico (Malfeito-Ferreira *et al.* 1997; Gomez-Plaza *et al.* 2011).

Figura 6. Alcuni esempi di variazione delle concentrazione di acidi grassi del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro, pre-MLF (a) e post-MLF (b e c)



Arginine e *proline*, due dei più importanti amino acidi del vino hanno delle correlazioni diverse con le dosi di ossigeno (pre-MLF), ossia negativa (in diminuzione) per *l'arginine* e positiva (in aumento) per la *prolina* (Figure 7 e 8). Vale la pena di dire che finora nessuno studio ha mai riportato che questi composti siano influenzati dalla micro-ossigenazione.

Figura 7. Strutture di tre composti azotati del vino studiati in questo lavoro

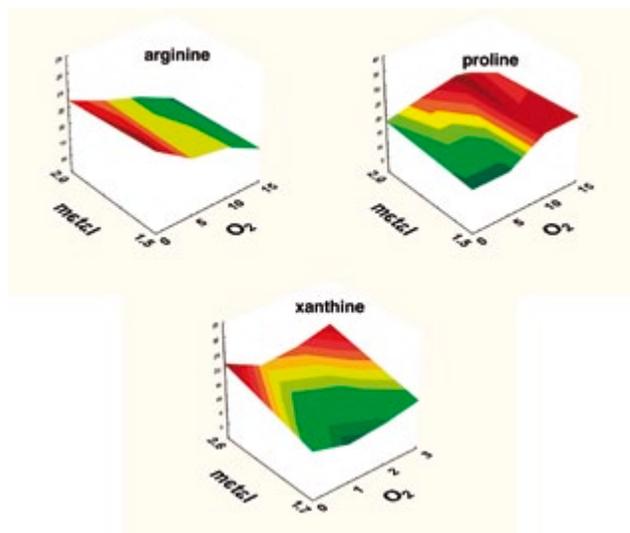


L'arginine è un amiminoacido basico, cioè in un ambiente acido, come il vino, ha una carica positiva al suo gruppo guanidinico, che può essere

facilmente delocalizzata causa il doppio legame, generare dei doppi legami, reagire con specie attive e formare nuovi composti (Figura 7). Per via enzimatica *l'arginine* partecipa a diverse reazioni che producono ammine biogene (per decarbossilazione, può produrre agmatina da cui si formano putrescina, spermina e spermidina; per deaminazione citrullina e ornitina), responsabili di alcuni difetti dei vini.

Un altro composto che in letteratura non è stato riportato finora essere influenzato dalla micro-ossigenazione è la *xanthine* (Figura 7), un alcaloide e base purinica. Il metabolismo di questo alcaloide è dall'enzima xantina ossidasi, che genera *xanthine* dalla hipoxantina e poi acido urico dalla *xanthine*, e viene catalizzato dal ferro in condizioni ossidative. La *xanthine* nel nostro esperimento (Figura 8) in post-MLF è stato uno dei pochi composti che hanno presentato una correlazione così chiara con le dosi del metallo (Luo *et al.* 2001).

Figura 8. Alcuni esempi di variazione delle concentrazione di derivati azotati del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro. È riportata sugli assi la diversa dose di ossigeno esplorata, quella più elevata si riferisce agli esperimenti pre-MLF



4. Conclusioni

In conclusione, questa sperimentazione ha dimostrato che una analisi senza nessun tipo di preparazione dei campioni e veloce, basata sulle applicazioni della metabolomica ci ha permesso di valutare l'effetto combinato di ossigeno e metallo durante la micro-ossigenazione, prima e dopo la fermentazione malo-lattica, di un vino Sangiovese. È stato possibile indentificare e

descrivere con precisione gli andamenti di diversi metaboliti primari (e.g. carboidrati, ammino acidi) e secondari (polifenoli, acidi grassi, etc), già noti per la loro importanza in questa tecnica e allo stesso tempo di generare nuove ipotesi, avendo portato alla luce elementi sperimentali nuovi, non emersi da esperimenti precedenti condotti con tecniche convenzionali.

Materiale Supplementare

Presso il sito di Toscana (www.consorziotuscandia.it) si trova tutto il materiale supplementare, per quanto riguarda in particolare la lista dettagliata di tutti i metaboliti studiati ed i grafici con il loro comportamento ai vari livelli di ossigeno e metallo.

Bibliografia

- Alcalde Eon C., Escribano-Bailon M.T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C. (2006), *Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study*, «Analytica Chimica Acta», 563: 283-254.
- Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Rastija V., Lucic B., Trinajstic N. (2007), *SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids*, «Current Medicinal Chemistry»: 827-845.
- Arapitsas P., Scholz M., Vrhovsek U., Di Blasi S., Biondi Bartolini A., Masuero D., Perenzoni D., Rigo A., Mattivi F. (2012), *A metabolomic approach to the study of wine micro-oxygenation*, «PLoS ONE», 7 (5): e37783.
- Atanasova V., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M. (2002), *Effect of oxygenation on polyphenols changes occurring in the course of wine-making*, «Analytica Chimica Acta», 458: 15-27.
- Cano-Lopez M., Pardo-Minguez F., Lopez-Roca J.M., Gómez-Plaza. (2006), *Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines*, «American Journal of Enology and Viticulture», 57 (3): 325-331.
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M.L., Paez-Hernandez M.E., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A. (2009), *Chemical studies of anthocyanins: A review*, «Food Chemistry», 113: 859-871.
- Calabrese E.J. (2008), *Hormesis: Why it is important to Toxicology and Toxicologists*, «Environmental Toxicology and Chemistry», 27: 1451-1474.
- Calabrese E.J. (2009), *Getting the dose-response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted*, «Archives of Toxicology», 83: 227-247.
- Cejudo-Bastante M.J., Hermosín-Gutierrez I., Pérez-Coello M.S. (2011), *Micro-oxygenation and oak chips treatment of red wine: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines*, «Food Chemistry», 124: 727-737.
- Cuadros-Inostroza A., Giavalisco P., Kummel J., Eckardt A., Willmitzer L., Peña-Cortés H. (2010), *Discrimination of wine attributes by metabolome analysis*, «Analytical Chemistry», 82: 3573-3580.

- Danilewicz J.C. (2003), *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper*, «American Journal of Enology and Viticulture», 54 (2): 73-85.
- Drinkine J., Lopes P., Kennedy J.A., Teissedre P., Saucier C. (2007), *Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 55: 6292-6299.
- Gomez-Plaza E., Cano-Lopez M. (2011), *A review on micro-oxygenation of red wine: Claims, benefits and underlying chemistry*, «Food Chemistry», 125: 1131-1140.
- Hayes D.P. (2010), *Nutritional Hormesis and Aging Nutritional Hormesis and Aging*, «Dose-Response», 8: 10-15.
- Liger-Belair G., Cilindre C., Gougeon R.D., Lucio M., Jeandet M., Gebefugi I., Schmitt-Kopplin P. (2009), *Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA», 106: 16545-16549.
- Luo G., Qi D., Zheng Y., Mu Y., Yan G., Yang T., Shen J. (2001), *ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron*, «FEBS Letters», 492: 29-32.
- Malfeito-Ferreira M., Tareco M., Loureico V. (1997), *Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants*, «International Journal of Food Microbiology», 38: 143-155.
- Mattivi F., Vrhovsek U., Masuero D., Trainotti D. (2009), *Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties*, «Australian Journal of Grape and Wine Research»: 27-35.
- Parish M., Wollan D., Paul R. (2000), *Micro-oxygenation. A review*, «The Australian Grapegrower and Winemaker», 438a: 47-50.
- Ribèreau-Gayon P., Glories Y., Mayjean A., Dubourdieu D. (2000), *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine stabilization and Treatments*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Waterhouse A.L., Laurie V.F. (2006), *Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypothesis*, «American Journal of Enology and Viticulture», 57 (23): 306-312.
- Schmarr H., Bernhardt J., Fischer U., Stafan A., Muller P., Durner D. (2010), *Two dimensional gas chromatography profiling as a tool for a rapid screening of the changes in volatile composition occurring due to microoxygenation of red wine*, «Analytica Chimica Acta», 672: 114-123.
- Schwarz M., Wabnitz T.C., Winterhalter P. (2003), *Pathway leading the formation of anthocyanins-vinylphenol adducts and related pigments in red wine*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 51: 3682-3687.
- Theodoridis G., Gika H., Franceschi P., Caputi L., Arapitsas P., Scholz M., Masuero D., Wehrens R., Vrhovsek U., Mattivi F. (2012), *LC-MS based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimization*, «Metabolomics», 8: 175-185.
- Vaclavik L., Lacina O., Hajslova J., Zweigenbaum J. (2011), *The use of high performance liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for the discrimination and the classification of red wines according to their variety*, «Analytica Chimica Acta», 645: 56-63.

STRUMENTI
PER LA DIDATTICA E LA RICERCA

1. Brunetto Chiarelli, Renzo Bigazzi, Luca Sineo (a cura di), *Alia: Antropologia di una comunità dell'entroterra siciliano*
2. Vincenzo Cavaliere, Dario Rosini, *Da amministratore a manager. Il dirigente pubblico nella gestione del personale: esperienze a confronto*
3. Carlo Biagini, *Information technology ed automazione del progetto*
4. Cosimo Chiarelli, Walter Pasini (a cura di), *Paolo Mantegazza. Medico, antropologo, viaggiatore*
5. Luca Solari, *Topics in Fluvial and Lagoon Morphodynamics*
6. Salvatore Cesario, Chiara Fredianelli, Alessandro Remorini, *Un pacchetto evidence based di tecniche cognitivo-comportamentali sui generis*
7. Marco Masseti, *Uomini e (non solo) topi. Gli animali domestici e la fauna antropocora*
8. Simone Margherini (a cura di), *BIL Bibliografia Informatizzata Leopardiana 1815-1999: manuale d'uso ver. 1.0*
9. Paolo Puma, *Disegno dell'architettura. Appunti per la didattica*
10. Antonio Calvani (a cura di), *Innovazione tecnologica e cambiamento dell'università. Verso l'università virtuale*
11. Leonardo Casini, Enrico Marone, Silvio Menghini, *La riforma della Politica Agricola Comunitaria e la filiera olivocolo-olearia italiana*
12. Salvatore Cesario, *L'ultima a dover morire è la speranza. Tentativi di narrativa autobiografica e di "autobiografia assistita"*
13. Alessandro Bertirotti, *L'uomo, il suono e la musica*
14. Maria Antonietta Rovida, *Palazzi senesi tra '600 e '700. Modelli abitativi e architettura tra tradizione e innovazione*
15. Simone Guercini, Roberto Piovan, *Schemi di negoziato e tecniche di comunicazione per il tessile e abbigliamento*
16. Antonio Calvani, *Technological innovation and change in the university. Moving towards the Virtual University*
17. Paolo Emilio Pecorella, *Tell Barri/Kahat: la campagna del 2000. Relazione preliminare*
18. Marta Chevanne, *Appunti di Patologia Generale. Corso di laurea in Tecniche di Radiologia Medica per Immagini e Radioterapia*
19. Paolo Ventura, *Città e stazione ferroviaria*
20. Nicola Spinosi, *Critica sociale e individuazione*
21. Roberto Ventura (a cura di), *Dalla misurazione dei servizi alla customer satisfaction*
22. Dimitra Babalis (a cura di), *Ecological Design for an Effective Urban Regeneration*
23. Massimo Papini, Debora Tringali (a cura di), *Il pupazzo di garza. L'esperienza della malattia potenzialmente mortale nei bambini e negli adolescenti*
24. Manlio Marchetta, *La progettazione della città portuale. Sperimentazioni didattiche per una nuova Livorno*
25. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Note su progetto e metropoli*
26. Leonardo Casini, Enrico Marone, Silvio Menghini, *OCM seminativi: tendenze evolutive e assetto territoriale*
27. Pecorella Paolo Emilio, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri/Kahat: la campagna del 2001. Relazione preliminare*
28. Nicola Spinosi, *Wir Kinder. La questione del potere nelle relazioni adulti/bambini*
29. Stefano Cordero di Montezemolo, *I profili finanziari delle società vinicole*
30. Luca Bagnoli, Maurizio Catalano, *Il bilancio sociale degli enti non profit: esperienze toscane*
31. Elena Rotelli, *Il capitolo della cattedrale di Firenze dalle origini al XV secolo*
32. Leonardo Trisciuzzi, Barbara Sandrucci, *Tamara Zappaterra, Il recupero del sé attraverso l'autobiografia*
33. Nicola Spinosi, *Invito alla psicologia sociale*
34. Raffaele Moschillo, *Laboratorio di disegno. Esercitazioni guidate al disegno di arredo*
35. Niccolò Bellanca, *Le emergenze umanitarie complesse. Un'introduzione*

36. Giovanni Allegretti, *Porto Alegre una biografia territoriale. Ricercando la qualità urbana a partire dal patrimonio sociale*
37. Riccardo Passeri, Leonardo Quagliotti, Christian Simoni, *Procedure concorsuali e governo dell'impresa artigiana in Toscana*
38. Nicola Spinosi, *Un soffitto viola. Psicoterapia, formazione, autobiografia*
39. Tommaso Urso, *Una biblioteca in divenire. La biblioteca della Facoltà di Lettere dalla penna all'elaboratore. Seconda edizione rivista e accresciuta*
40. Paolo Emilio Pecorella, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri/Kahat: la campagna del 2002. Relazione preliminare*
41. Antonio Pellicanò, *Da Galileo Galilei a Cosimo Noferi: verso una nuova scienza. Un inedito trattato galileiano di architettura nella Firenze del 1650*
42. Aldo Burresti (a cura di), *Il marketing della moda. Temi emergenti nel tessile-abbigliamento*
43. Curzio Cipriani, *Appunti di museologia naturalistica*
44. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Incipit. Esercizi di composizione architettonica*
45. Roberta Gentile, Stefano Mancuso, Silvia Martelli, Simona Rizzitelli, *Il Giardino di Villa Corsini a Mezzomonte. Descrizione dello stato di fatto e proposta di restauro conservativo*
46. Arnaldo Nesti, Alba Scarpellini (a cura di), *Mondo democristiano, mondo cattolico nel secondo Novecento italiano*
47. Stefano Alessandri, *Sintesi e discussioni su temi di chimica generale*
48. Gianni Galeota (a cura di), *Traslocare, riaggregare, rifondare. Il caso della Biblioteca di Scienze Sociali dell'Università di Firenze*
49. Gianni Cavallina, *Nuove città antichi segni. Tre esperienze didattiche*
50. Bruno Zanoni, *Tecnologia alimentare 1. La classe delle operazioni unitarie di disidratazione per la conservazione dei prodotti alimentari*
51. Gianfranco Martiello, *La tutela penale del capitale sociale nelle società per azioni*
52. Salvatore Cingari (a cura di), *Cultura democratica e istituzioni rappresentative. Due esempi a confronto: Italia e Romania*
53. Laura Leonardi (a cura di), *Il distretto delle donne*
54. Cristina Delogu (a cura di), *Tecnologia per il web learning. Realtà e scenari*
55. Luca Bagnoli (a cura di), *La lettura dei bilanci delle Organizzazioni di Volontariato toscane nel biennio 2004-2005*
56. Lorenzo Grifone Baglioni (a cura di), *Una generazione che cambia. Civismo, solidarietà e nuove incertezze dei giovani della provincia di Firenze*
57. Monica Bolognesi, Laura Donati, Gabriella Granatiero, *Acque e territorio. Progetti e regole per la qualità dell'abitare*
58. Carlo Natali, Daniela Poli (a cura di), *Città e territori da vivere oggi e domani. Il contributo scientifico delle tesi di laurea*
59. Riccardo Passeri, *Valutazioni imprenditoriali per la successione nell'impresa familiare*
60. Brunetto Chiarelli, Alberto Simonetta, *Storia dei musei naturalistici fiorentini*
61. Gianfranco Bettin Lattes, Marco Bontempi (a cura di), *Generazione Erasmus? L'identità europea tra vissuto e istituzioni*
62. Paolo Emilio Pecorella, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri / Kahat. La campagna del 2003*
63. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Il cervello delle passioni. Dieci tesi di Adolfo Natalini*
64. Saverio Pisaniello, *Esistenza minima. Stanze, spazi della mente, reliquiario*
65. Maria Antonietta Rovida (a cura di), *Fonti per la storia dell'architettura, della città, del territorio*
66. Ornella De Zordo, *Saggi di anglistica e americanistica. Temi e prospettive di ricerca*
67. Chiara Favilli, Maria Paola Monaco, *Materiali per lo studio del diritto antidiscriminatorio*
68. Paolo Emilio Pecorella, Raffaella Pierobon Benoit, *Tell Barri / Kahat. La campagna del 2004*
69. Emanuela Caldognetto Magno, Federica Cavicchio, *Aspetti emotivi e relazionali nell'e-learning*
70. Marco Masetti, *Uomini e (non solo) topi (2ª edizione)*
71. Giovanni Nerli, Marco Pierini, *Costruzione di macchine*
72. Lorenzo Viviani, *L'Europa dei partiti. Per una sociologia dei partiti politici nel processo di integrazione europea*
73. Teresa Crespellani, *Terremoto e ricerca. Un percorso scientifico condiviso per la caratterizzazione del comportamento sismico di alcuni depositi italiani*

74. Fabrizio F.V. Arrigoni, *Cava. Architettura in "ars marmoris"*
75. Ernesto Tavoletti, *Higher Education and Local Economic Development*
76. Carmelo Calabrò, *Liberalismo, democrazia, socialismo. L'itinerario di Carlo Rosselli (1917-1930)*
77. Luca Bagnoli, Massimo Cini (a cura di), *La cooperazione sociale nell'area metropolitana fiorentina. Una lettura dei bilanci d'esercizio delle cooperative sociali di Firenze, Pistoia e Prato nel quadriennio 2004-2007*
78. Lamberto Ippolito, *La villa del Novecento*
79. Cosimo Di Bari, *A passo di critica. Il modello di Media Education nell'opera di Umberto Eco*
80. Leonardo Chiesi (a cura di), *Identità sociale e territorio. Il Montalbano*
81. Piero Degl'Innocenti, *Cinquant'anni, cento chiese. L'edilizia di culto nelle diocesi di Firenze, Prato e Fiesole (1946-2000)*
82. Giancarlo Paba, Anna Lisa Pecoriello, Camilla Perrone, Francesca Rispoli, *Partecipazione in Toscana: interpretazioni e racconti*
83. Alberto Magnaghi, Sara Giacomozzi (a cura di), *Un fiume per il territorio. Indirizzi progettuali per il parco fluviale del Valdarno empoese*
84. Dino Costantini (a cura di), *Multiculturalismo alla francese?*
85. Alessandro Viviani (a cura di), *Firms and System Competitiveness in Italy*
86. Paolo Fabiani, *The Philosophy of the Imagination in Vico and Malebranche*
87. Carmelo Calabrò, *Liberalismo, democrazia, socialismo. L'itinerario di Carlo Rosselli*
88. David Fanfani (a cura di), *Pianificare tra città e campagna. Scenari, attori e progetti di nuova ruralità per il territorio di Prato*
89. Massimo Papini (a cura di), *L'ultima cura. I vissuti degli operatori in due reparti di oncologia pediatrica*
90. Raffaella Cerica, *Cultura Organizzativa e Performance economico-finanziarie*
91. Alessandra Lorini, Duccio Basosi (a cura di), *Cuba in the World, the World in Cuba*
92. Marco Goldoni, *La dottrina costituzionale di Sieyès*
93. Francesca Di Donato, *La scienza e la rete. L'uso pubblico della ragione nell'età del Web*
94. Serena Vicari Haddock, Marianna D'Ovidio, *Brand-building: the creative city. A critical look at current concepts and practices*
95. Ornella De Zordo (a cura di), *Saggi di Anglistica e Americanistica. Ricerche in corso*
96. Massimo Moneglia, Alessandro Panunzi (edited by), *Bootstrapping Information from Corpora in a Cross-Linguistic Perspective*
97. Alessandro Panunzi, *La variazione semantica del verbo essere nell'italiano parlato*
98. Matteo Gerlini, *Sansone e la Guerra fredda. La capacità nucleare israeliana fra le due superpotenze (1953-1963)*
99. Luca Raffini, *La democrazia in mutamento: dallo Stato-nazione all'Europa*
100. Gianfranco Bandini (a cura di), *noi-loro. Storia e attualità della relazione educativa fra adulti e bambini*
101. Anna Taglioli, *Il mondo degli altri. Territori e orizzonti sociologici del cosmopolitismo*
102. Gianni Angelucci, Luisa Vierucci (a cura di), *Il diritto internazionale umanitario e la guerra aerea. Scritti scelti*
103. Giulia Mascagni, *Salute e disuguaglianze in Europa*
104. Elisabetta Cioni, Alberto Marinelli (a cura di), *Le reti della comunicazione politica. Tra televisioni e social network*
105. Cosimo Chiarelli, Walter Pasini (a cura di), *Paolo Mantegazza e l'Evoluzionismo in Italia*
106. Andrea Simoncini (a cura di), *La semplificazione in Toscana. La legge n. 40 del 2009*
107. Claudio Borri, Claudio Mannini (edited by), *Aeroelastic phenomena and pedestrian-structure dynamic interaction on non-conventional bridges and footbridges*
108. Emiliano Scampolì, *Firenze, archeologia di una città (secoli I a.C. – XIII d.C.)*
109. Emanuela Cresti, Iørn Korzen (a cura di), *Language, Cognition and Identity. Extensions of the endocentric/exocentric language typology*
110. Alberto Parola, Maria Ranieri, *Media Education in Action. A Research Study in Six European Countries*
111. Lorenzo Grifone Baglioni (a cura di), *Scegliere di partecipare. L'impegno dei*

- giovani della provincia di Firenze nelle arene deliberative e nei partiti
112. Alfonso Lagi, Ranuccio Nuti, Stefano Taddei, *Raccontaci l'ipertensione. Indagine a distanza in Toscana*
 113. Lorenzo De Sio, *I partiti cambiano, i valori restano? Una ricerca quantitativa e qualitativa sulla cultura politica in Toscana*
 114. Anna Romiti, *Coreografie di stakeholders nel management del turismo sportivo*
 115. Guidi Vannini (a cura di), *Archeologia Pubblica in Toscana: un progetto e una proposta*
 116. Lucia Varra (a cura di), *Le case per ferie: valori, funzioni e processi per un servizio differenziato e di qualità*
 117. Gianfranco Bandini (a cura di), *Manuali, sussidi e didattica della geografia. Una prospettiva storica*
 118. Anna Margherita Jasink, Grazia Tucci e Luca Bombardieri (a cura di), *MUSINT. Le Collezioni archeologiche egee e cipriote in Toscana. Ricerche ed esperienze di museologia interattiva*
 119. Ilaria Caloi, *Modernità Minoica. L'Arte Egea e l'Art Nouveau: il Caso di Mariano Fortuny y Madrazo*
 120. Heliana Mello, Alessandro Panunzi, Tommaso Raso (edited by), *Pragmatics and Prosody. Illocution, Modality, Attitude, Information Patterning and Speech Annotation*
 121. Luciana Lazzeretti, *Cluster creativi per i beni culturali. L'esperienza toscana delle tecnologie per la conservazione e la valorizzazione*
 122. Maurizio De Vita (a cura di / edited by), *Città storica e sostenibilità / Historic Cities and Sustainability*
 123. Eleonora Berti, *Itinerari culturali del consiglio d'Europa tra ricerca di identità e progetto di paesaggio*
 124. Stefano Di Blasi (a cura di), *La ricerca applicata ai vini di qualità*