



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE “AMEDEO
AVOGADRO”

DiSIT - Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA
curriculum Agro-alimentare

TESI DI LAUREA

***Validazione del metodo OIV-MA-AS4-03 per la quantificazione di
Brettanomyces/Dekkera nel vino mediante qPCR e determinazione della soglia
di percezione sensoriale del 4-etilfenolo.***

Relatore: *Prof. Jean Daniel Coisson*

Correlatore: *Dott.ssa Nadia Cane*

Candidato: *Elisa Musso*

Anno accademico 2017/2018

*Ai miei Nonni,
alla forza che mi augurate, a quella che avete e a quella che ci regalate..*

*A Silvia,
cui auguro di trovare la determinazione per realizzare i suoi progetti.*

*Alla piccola Nene,
affinché tu possa sentirti felice e realizzata in tutto quel che farai.*

Indice:

1. Introduzione	pag. 5
1.1. Il vino	pag. 6
1.1.1. <i>Vitis vinifera</i>	pag. 7
1.1.2. Il frutto della vite	pag. 7
1.1.3. Fasi di sviluppo dell'uva	pag. 8
1.1.4. Morfologia dell'acino	pag. 9
1.1.5. Composizione del grappolo maturo	pag. 10
1.1.6. Vinificazione	pag. 11
1.1.6.1. Vinificazione in rosso	pag. 12
1.1.6.2. Vinificazione in bianco	pag. 13
1.2. La Fermentazione Alcolica	pag. 16
1.2.1 I prodotti secondari	pag. 17
1.3. La fermentazione malo-lattica	pag. 18
1.4. L'affinamento dei vini in fusti	pag. 21
1.5. Lievito di contaminazione: <i>Brettanomyces</i>	pag. 23
1.6. Gli acidi fenolici e i loro derivati	pag. 26
1.6.1 I vinil-fenoli nei vini bianchi	pag. 27
1.6.2. Gli etilfenoli nei vini rossi	pag. 28
1.7. <i>Brettanomyces</i> : da dove proviene?	pag. 31
1.8. Analisi sensoriale e "Brett character"	pag. 33
1.8.1. Classificazione dei vini in funzione del "Brett Character"	pag. 37
2. Scopo del Lavoro	pag. 40
3. Materiali e Metodi	pag. 48
3.1. Real-Time PCR	pag. 49
3.1.1. La fluorescenza	pag. 51
3.1.2. RT-PCR: metodica quantitativa	pag. 53
3.1.3. SYBR GREEN	pag. 54

3.2. Metodo OIV-OENO 414-2011	pag. 56
3.2.1. Principio del Metodo	pag. 56
3.2.2. Campo di applicazione	pag. 57
3.2.3. Reattivi e Prodotti	pag. 57
3.2.4. Apparecchiatura ed accessori	pag. 58
3.2.5. Identificazione del campione	pag. 59
3.2.6. Preparazione del campione	pag. 59
3.2.7. Procedimento per la q-PCR	pag. 61
3.2.8. Costruzione della Retta Standard	pag. 62
3.3. Analisi sensoriale: metodo per il test a scelta forzata	pag. 65
4. Risultati	pag. 72
4.1. Risultati Metodo OIV	pag. 73
4.1.1. Linearità	pag. 73
4.1.2. Ripetibilità e Riproducibilità	pag. 78
4.1.3. Limite di Rilevazione (LOD) e Limite di quantificazione (LOQ)	pag. 81
4.1.4. Melt Curve	pag. 83
4.2. Determinazione della soglia di Percezione del 4-etilfenolo	pag. 85
5. Discussioni	pag. 88
5.1. Discussioni Metodo OIV	pag. 89
5.2. Valutazione della soglia di percezione del 4-etilfenolo	pag. 92
6. Bibliografia	pag. 96
7. Allegati	pag. 103
8. Ringraziamenti	pag. 112

1. Introduzione

1.1. Il vino

Si definisce “vino” una bevanda idroalcolica ottenuta dalla fermentazione (totale o parziale) del frutto della vite (l’uva) o di un relativo mosto. In Italia (ed in tutta l’Unione Europea), per poter commercialmente indicare la bevanda come “vino”, è d’obbligo usare solo uve appartenenti alla specie *Vitis vinifera*.

Il vino è il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione alcolica totale o parziale di uve fresche, pigiate o no, o di mosti di uve.

Il vino ha un titolo alcolometrico effettivo non inferiore a 9 %vol, salvo eccezioni per vini di particolare denominazione o per vini di altri stati UE. Il vino ha un titolo alcolometrico totale non superiore a 15 %vol. Il limite massimo del titolo alcolometrico totale può superare 15 %vol per i vini a denominazione di origine protetta in Italia (DOC) prodotti senza alcun arricchimento (Regolamento CE 479/2008).

1.1.1 *Vitis vinifera*

La *Vitis vinifera*, detta anche vite comune o vite euroasiatica, è un arbusto rampicante appartenente alla famiglia delle Vitaceae. Comprende due sottospecie (*V. vinifera silvestris* e *V. vinifera sativa*) da cui si sono originate migliaia di varietà a bacca bianca o rossa.

Verso la fine del XIX° secolo arrivò dall'America del Nord un afide fitofago che devastò tutti i vigneti europei (oltre che quelli africani, australiani, neozelandesi e parte di quelli sudamericani), la fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae*) che, nutrendosi delle radici della vite, dà origine a tuberosità che man mano distruggono l'apparato radicale della pianta (DeSalle & Tattersall, 2014; Gho & Ruffa, 2014). Il rimedio definitivo fu identificato quando si scoprì che alcune varietà americane, rese immuni all'insetto da secoli di convivenza con esso, erano insensibili ai suoi attacchi e, da allora, tutte le viti impiantate in Europa sono costituite da porzioni di tralcio di *V. vinifera* europea (dette marze) innestate su una radice (detta piede o portainnesto) di vite americana (Gho & Ruffa, 2014).

1.1.2. Il frutto della vite

L'uva è una bacca classificata nel gruppo della frutta carnosa con semi che si presenta con organizzazione in grappoli di forma e dimensioni diverse a seconda della varietà (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

Ogni bacca, o comunemente "acino", è attaccata al raspo, asse centrale di natura legnosa costituente il grappolo, da un corto pedicello, cioè una struttura legnosa, contenente un insieme di fasci vascolari che lo alimentano di acqua e di sostanze nutritive (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

La struttura del grappolo (Fig. 1.1) dipende dalla lunghezza dei pedicelli; se essi sono lontani lunghi e sottili, gli acini sono lontani gli uni dagli altri e si parla di grappolo spargolo. Se invece i pedicelli sono corti, i grappoli sono compatti e gli acini sono molto serrati gli uni contro gli altri.

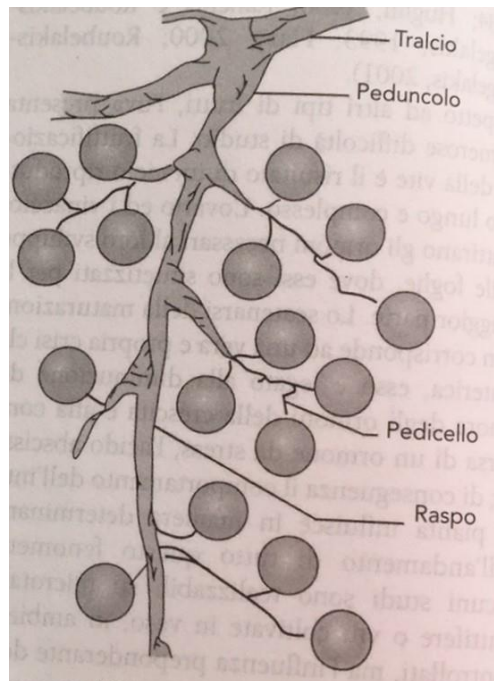


Figura 1.1: Struttura del grappolo.

I fattori genetici e le condizioni dell'ambiente hanno una grande influenza sullo sviluppo e sulla composizione a maturità del frutto.

1.1.3. Fasi di sviluppo dell'uva

Nel corso dello sviluppo, l'uva segue un'evoluzione comune in tutti gli acini che si divide generalmente in 3 fasi (Fig. 1.2):

1. Fase di rapida crescita o fase di crescita erbacea che dura da 45 a 65 giorni. La ricchezza in ormoni della crescita (gibberelline e citochinine) è correlata con il numero di vinaccioli (Ito et al., 1969).

Nel corso di questo periodo, gli acini hanno un'attività metabolica intensa caratterizzata da un'elevata intensità respiratoria e da un accumulo rapido di acidi.

2. Fase di rallentamento della crescita durante la quale si verifica l'invaiaura, caratterizzata dalla comparsa del colore. Questa fase può durare da 8 a 15 giorni, durerà di più se il periodo di fioritura è stato molto lungo.

Questa fase prevede un esaurimento della sintesi delle sostanze di crescita ed un aumento di acido abscissico, acido indolacetico ed etilene (Deyetieux-Belleau et al., 2007; Chervin et al., 2004).

3. Fase della maturazione propriamente detta durante la quale l'accrescimento cellulare riprende e si accompagna alle varie modificazione fisiologiche. Durante quest'ultimo periodo, che dura da 35 a 55 giorni, l'acino accumula zuccheri liberi, cationi, amminoacidi e composti fenolici, mentre diminuiscono le concentrazioni di acido malico e ione ammonio.

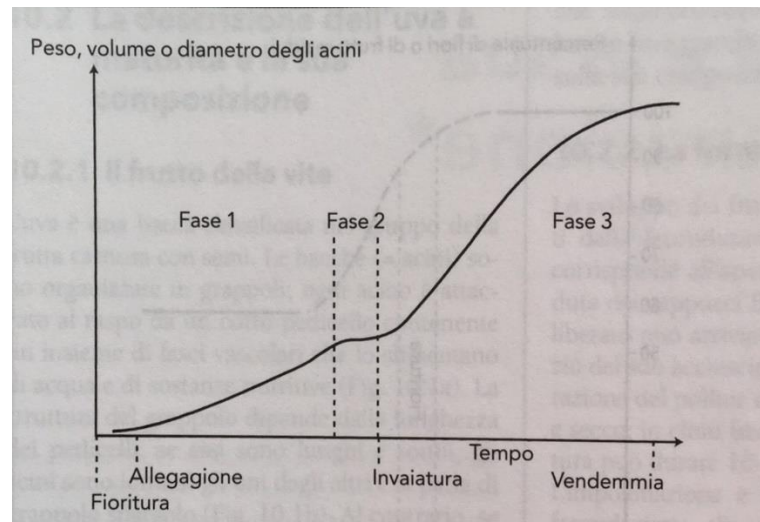


Figura 1.2: Fasi dello sviluppo dell'uva.

1.1.4. Morfologia dell'acino

Ogni acino è costituito da un insieme di tessuti, il pericarpo, che circonda i vinaccioli.

Il pericarpo è diviso in

- *esocarpo*, o più comunemente, la buccia;
- *mesocarpo*, ovvero la polpa;
- *endocarpo*, tessuto che tappezza le logge contenenti i vinaccioli, ma che non si distingue dal resto della polpa.

Partendo dall'esterno troviamo quindi (Fig. n. 1.3):

- Cuticola: ricoperta da una sostanza cerosa, la pruina, con funzione protettiva.
- Epicarpo: (o buccia) costituito dall'epidermide e dalle cellule ipodermiche; impermeabile.
- Polpa: (o sarcocarpo) composta da mesocarpo ed endocarpo.
- Vinaccioli: immersi nell'endocarpo.

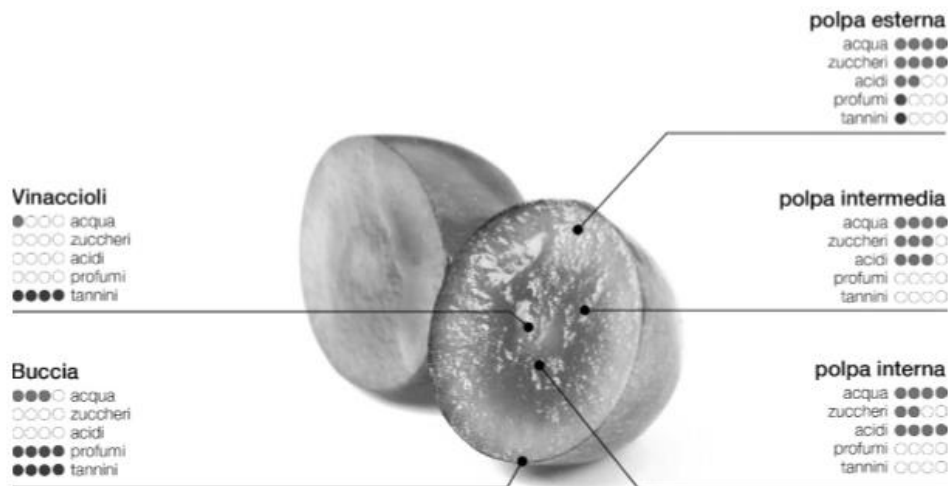


Figura 1.3: Morfologia e composizione dell'acino.

1.1..5. Composizione del grappolo maturo

- Il raspo

Il raspo rappresenta dal 3 al 7% del peso del grappolo maturo. La sua composizione chimica è simile a quelle delle foglie; è povero in zuccheri (con un tenore inferiore a 10 g/kg) e ha una ricchezza media in acidi. I raspi sono ricchi di composti fenolici e possono contenere sino al 20% dei composti fenolici totali del grappolo (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Il raspo raggiunge lo sviluppo definitivo verso l'invaiaitura, durante la maturazione rimane verde e dopo la maturazione raggiunge la sua totale lignificazione (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

- I vinaccioli.

I vinaccioli rappresentano dallo 0 al 6% del peso degli acini. Essi contengono glucidi, sostanze azotate, oleose e sostanze minerali. Inoltre, contengono anch'essi una quantità di composti fenolici, importanti nella vinificazione in rosso: i tannini condensati (o tannini di seme) (Ribéreau-Gayon et al., 2017). I vinaccioli raggiungono la loro dimensione definitiva prima dell'invaiaitura che spesso coincide con il momento in cui raggiungono la maturità fisiologica.

- La Buccia.

È caratterizzata da rilevanti quantità di prodotti secondari di fondamentale importanza enologica che si accumulano durante il processo di maturazione (composti fenolici e sostanze aromatiche) (Ribéreau-Gayon et al., 2017). A

maturità dell'uva, la famiglia dei composti fenolici è rappresentata da acidi benzoici e cinnamici, flavonoidi e tannini; questi contribuiscono al sapore acido e amaro del prodotto finito (differenziano infatti il sapore tra vini bianchi e rossi) e, inoltre, contribuiscono al colore del vino, un tempo erano definiti come “materia colorante” del vino (Peynaud, 1976; Ribéreau-Gayon et al., 2017).

Anche gli antociani appartengono alla coorte dei composti fenolici, in particolare ai flavonoidi; localizzati nelle cellule dell'ipoderma, la loro quantità varia da una varietà all'altra e, essendo pigmenti di colore rosso, si ritrovano principalmente nella varietà di uva rossa (Peynaud, 1976; Ribéreau-Gayon et al., 2017).

La buccia dell'uva matura contiene inoltre importanti quantità di sostanze aromatiche e di precursori d'aroma (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

- La polpa.

Rappresenta la parte preponderante dell'acino.

Il contenuto vacuolare delle cellule che la compongono fornirà il mosto quindi, oltre all'acqua, gli zuccheri ne sono i costituenti principali, in particolare glucosio e fruttosio con eccesso di quest'ultimo; il saccarosio è presente solo in tracce (che scompaiono durante la fermentazione), come altri zuccheri non fermentiscibili.

tra quelli identificati, si possono ricordare l'arabinosio, lo xilosio, il ramnosio, il maltosio, il raffiniosio etc.

Sono presenti nella polpa dell'uva matura anche la maggior parte degli acidi del metabolismo ma solo in tracce (piruvico, fumarico, shikimmico, etc) (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

L'acidità del mosto sarà quindi determinata essenzialmente dal contenuto di tre acidi: tartarico, malico e citrico.

Particolarmente ricca in cationi, il potassio è l'elemento principale. La diversa ripartizione del potassio provoca, spesso, una salificazione del tartrato acido di potassio nel corso della pressatura (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

1.1.6. Vinificazione

La produzione di vino non si riconduce alla sola fermentazione alcolica dei mosti o dell'uva pigiata, ma anche dal saper estrarre dalla bacca dell'uva la parte migliore, ossia la quantità ottimale di quelle sostanze determinanti per la qualità del vino,

limitando la diffusione di costituenti che potrebbero alterare le caratteristiche del futuro vino.

Andremo ora a descrivere i processi per la vinificazione dei vini bianchi e dei vini rossi.

1.1.6.1. Vinificazione in rosso

Il vino rosso è ottenuto dalla fermentazione alcolica del mosto accompagnata dalla macerazione delle vinacce, ossia dalla dissoluzione dei costituenti delle parti solide del grappolo (bucce, vinaccioli, eventualmente raspi); questa dissoluzione interessa soltanto le sostanze che apportano colori, aromi e tannini utili ai lieviti (Ribéreau-Gayon et al., 2017; Sicheri, 2007).

La macerazione è una fase importante della vinificazione in rosso, responsabile di tutte le caratteristiche visive, olfattive e gustative che differenziano i vini rossi dai bianchi: essa apporta composti fenolici quali antociani e tannini, oltre che sostanze aromatiche e azotate, pectine e minerali derivanti dalle bucce, dai vinaccioli ed eventualmente dai raspi.

Le fasi della vinificazione in rosso possono essere riassunte così (Fig. 1.4):

- Ricevimento, pigiatura e diraspatura dell'uva, ovvero una serie di operazioni di tipo meccanico sull'uva.
- Trasferimento in vasca, trasferimento in cui il mosto viene trasferito alla vasca di fermentazione, dove verrà addizionato di lieviti e di attivanti di fermentazione.
- Fermentazione alcolica e macerazione. Queste due fasi avvengono contemporaneamente e a temperature controllate in modo da evitare eventuali anomalie nel processo.
- Svinatura, separazione del fermentato dalle parti solide e pressatura, il cui prodotto è il risultato di una serie di operazione che prevedono l'aumento della pressione.
- Fermentazione malo-lattica, processo che conferisce stabilità al vino disacidificandolo.
- Affinamento e maturazione, processi che si diversificano a seconda del prodotto che si vuole ottenere.

Per vini meno pregiati, si vanno ad utilizzare contenitori di affinamento in acciaio inox; per prodotti più evoluti, si possono utilizzare contenitori in legno: questa pratica, certamente più onerosa, deve però essere valutata in base alla tipologia di prodotto che si ottiene e al possibile maggior riscontro economico. Il legno non è un materiale inattivo e cede al vino sostanze e aromi che ne modificano le caratteristiche (struttura, corpo, profumi ecc.), oltre a permettere una lenta e continua ossigenazione del vino stesso.

- Imbottigliamento.

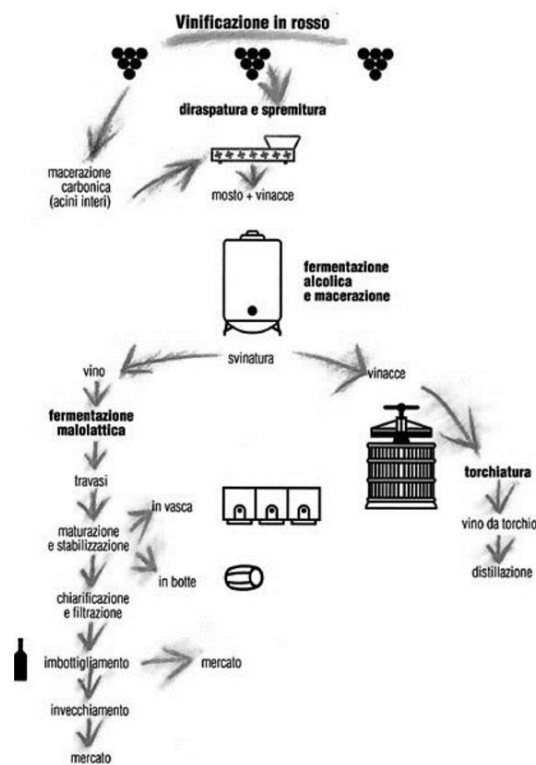


Figura 1.4: Principali passaggi della vinificazione in rosso.

1.1.6.2. Vinificazione in bianco

A differenza dei vini rossi, che derivano da una fermentazione alcolica in presenza di parti solide della bacca, i vini bianchi derivano dalla fermentazione del solo succo d'uva. L'estrazione e la chiarificazione dei mosti dei vini bianchi precedono sempre la fermentazione alcolica: il colore del vino non deriva perciò dal colore

delle uve, ma dall'assenza di macerazione delle uve ammostate durante la fase alcolica.

Le fasi di vinificazione in bianco possono essere riassunte come di seguito (Fig. 1.5.):

- Diraspatura e pigiatura (estrazione del mosto).

Dopo il conferimento in cantina, l'uva viene diraspata e pigiata; successivamente si estrae il mosto, separandolo dalla fase solida (vinacce): l'estrazione avviene per libero sgrondo o per leggera pressatura delle vinacce.

- Defecazione, ovvero fase che prevede la pulizia del mosto.

La defecazione permette di ridurre il contenuto in fecce grossolane (frammenti di buccia, terra ecc.) prima della fermentazione: si riduce così il contenuto in solidi sospesi, ricchi in sostanze polifenoliche ed enzimi ad attività ossidante.

- Fermentazione.

La fermentazione è il processo chiave della produzione del vino: in questa fase avviene la trasformazione degli zuccheri in alcol ad opera dei lieviti; in particolare, vengono prodotti anche importanti metaboliti secondari, necessari alla formazione del corpo del vino.

- Affinamento del vino
- Trattamenti stabilizzanti e di conservazione

I trattamenti stabilizzanti permettono di conservare il vino per periodi di tempo molto prolungati.

- Confezionamento.

Il confezionamento avviene in ambiente asettico: gli impianti di imbottigliamento sono in grado di insufflare gas inerti all'interno delle bottiglie, facendo così uscire l'ossigeno presente; successivamente si procede al riempimento della bottiglia. Si può aggiungere anche anidride solforosa, valutando sempre il suo contenuto all'interno del vino.

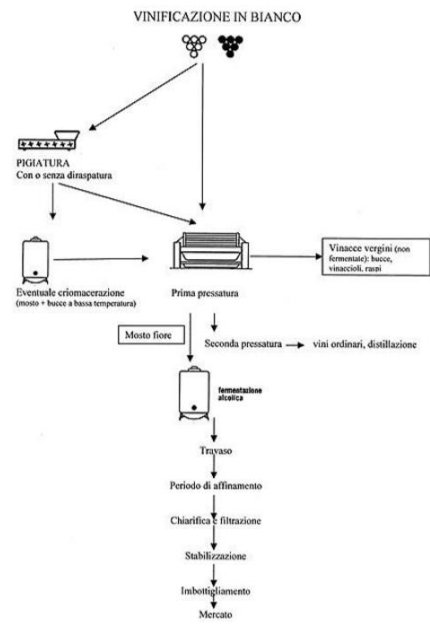
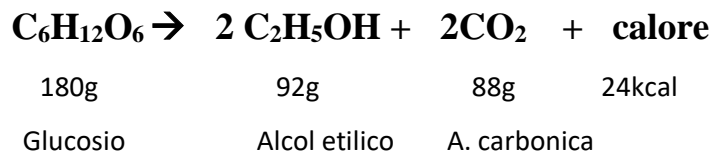


Figura 1.5: Principali passaggi della vinificazione in bianco.

1.2. La Fermentazione Alcolica

Il termine “fermentazione” deriva dal latino “fervere” che significa bollire: il mosto si intorbida, si riscalda, si liberano bolle gassose che provocano un ribollimento e perde il suo sapore dolce diventando vinoso (Peynaud, 1976).

La fermentazione alcolica è la prima fase del processo di vinificazione; è un processo condotto in condizioni di anaerobiosi ed a temperature controllate che consente di trasformare il mosto in vino e consiste essenzialmente nella trasformazione degli zuccheri (glucosio e fruttosio) in alcol etilico ad opera di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*, in particolare il *S. cerevisiae* (Sicheri, 2007). Questa trasformazione comporta anche la produzione di calore, di anidride carbonica e di altri prodotti secondari; quest’ultimi costituiscono una piccola parte della produzione totale (circa l’8%) e sono in particolare: glicerina, alcol metilico, acido acetico, acido succinico ed alcoli superiori (Gho & Ruffa, 2014; Sicheri, 2007). L’equazione generale che descrive il processo della fermentazione alcolica è quella indicata all’inizio del XIX secolo da Gay-Lussac:



I lieviti trasformano lo zucchero in acido piruvico (glicolisi) che verrà poi decarbossilato con formazione di anidride carbonica ed acetaldeide, quest’ultima verrà ridotta ad etanolo (alcol etilico) (Fig. 1.6).

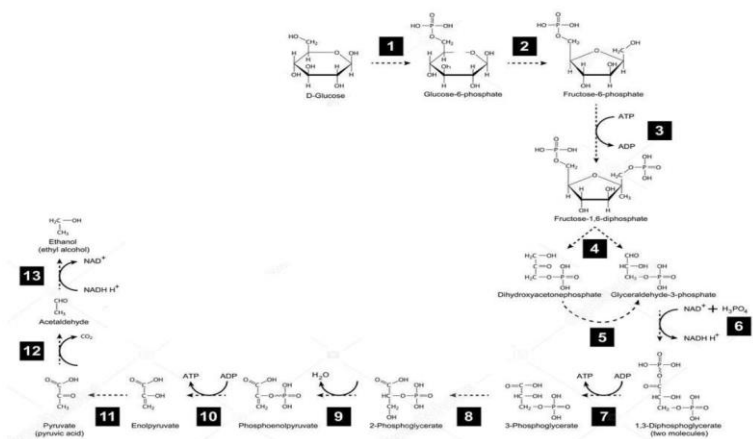


Figura 1.6: Chimica della fermentazione alcolica

1.2.1. I Prodotti Secondari

La glicerina (o glicerolo) è il primo ed il più importante prodotto secondario. Si forma all'inizio della fermentazione e in particolare nelle fermentazioni lente quando il $\text{NADH}+\text{H}^+$ non avendo a disposizione acetaldeide da ridurre, riduce il DHAP, ovvero diidrossiacetone fosfato (Fig. 1.7).

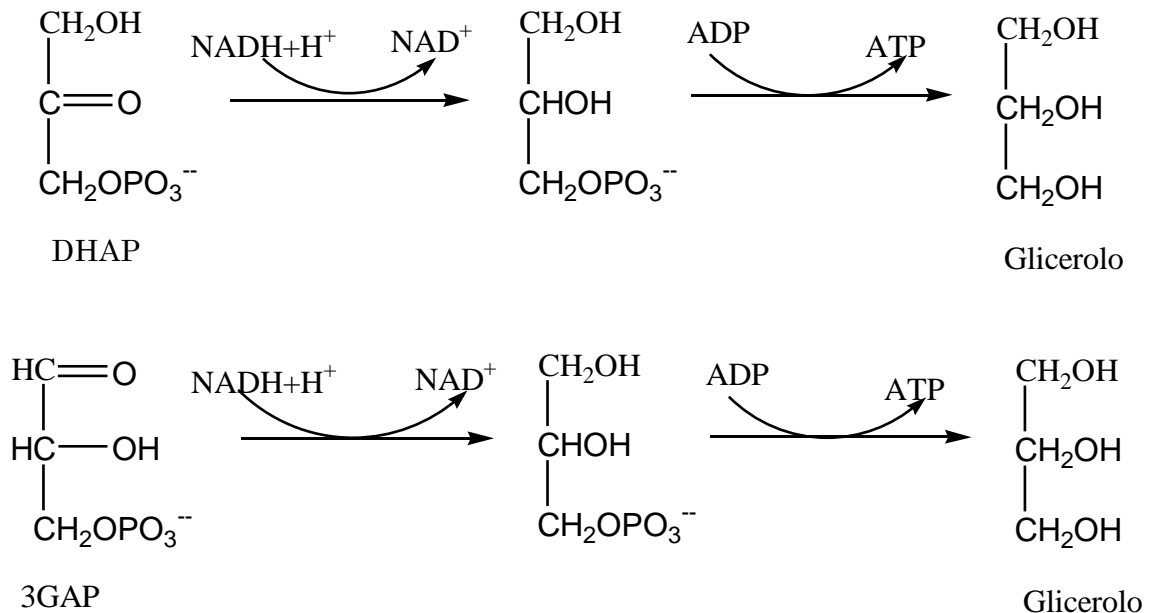


Figura 1.7: Reazione di formazione del glicerolo.

Il controllo dell'andamento della fermentazione nelle vasche è una necessità: permette di seguire le trasformazioni, di prevedere l'evoluzione e di intervenire se necessario. Il controllo della fermentazione si può realizzare determinando:

- la quantità di zuccheri consumati,
- la quantità di alcol formato
- e la quantità di CO_2 svolta

o misurando la massa volumica, o densità, che costituisce una misura del tasso di zuccheri contenuti nel mosto (Ribéreau-Gayon P., 2017).

Nel corso della fermentazione, il consumo dello zucchero e la formazione di etanolo comportano una riduzione della massa volumica.

Questo tipo di controllo va completato con altre osservazioni riguardanti:

- la velocità di fermentazione: fermentazioni lente sono quasi sempre fonte di preoccupazione per la probabile presenza di ceppi di lievito antagonisti fra di loro;
- l'eventuale degradazione dell'acido malico che deve avvenire successivamente alla completa scomparsa degli zuccheri. Il suo inizio precoce è legato a difficoltà di fermentazione alcolica e ad una solfitazione insufficiente del mosto;
- l'acidità volatile che permette di verificare una possibile contaminazione batterica;
- la verifica esatta della fine della fermentazione, controllata tramite il dosaggio degli zuccheri che devono mantenere tenori piuttosto bassi, intorno ai 2-3 g/L.

Questi ridotte concentrazioni sono necessarie per evitare i danni causati dallo sviluppo di lieviti contaminanti, come quelli del genere *Brettanomyces*, durante l'affinamento in barrique (Ribéreau-Gayon P., 2017).

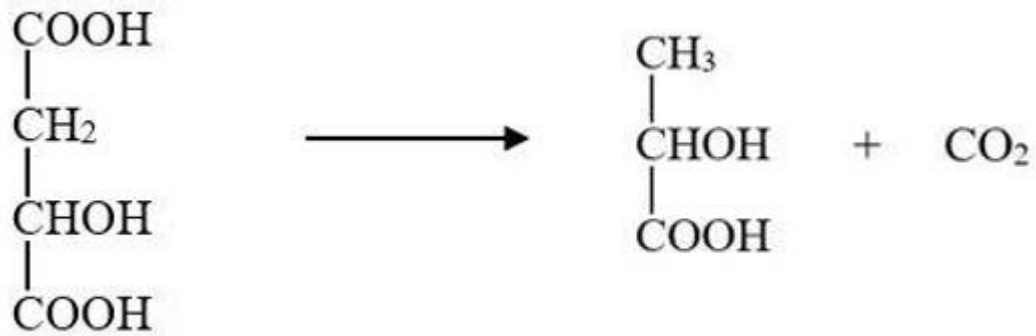
1.3. Fermentazione Malo-Lattica

La fermentazione malolattica (FML) è il processo mediante il quale si favorisce la degradazione dell'acido malico in acido lattico e anidride carbonica ad opera dei batteri lattici. Quando si verificano le giuste condizioni, si determina nel vino una disacidificazione biologica, ovvero una diminuzione dell'acidità totale e un aumento del pH.

Dal punto di vista organolettico, il vino risulterà al gusto più morbido – a causa della presenza dell'acido lattico, meno aggressivo del malico – e anche gli aromi saranno più complessi.

E' indispensabile far svolgere la fermentazione malo-lattica per ottenere vini rossi di qualità; per i vini bianchi, dipende tutto dalle qualità organolettiche che si vogliono conservare o sviluppare, ma può non essere necessaria.

Dal punto di visto chimico, la reazione si può schematizzare come segue:



e si tratta di una semplice decarbossilazione che determina la perdita di una funzione acida.

Secondo gli ultimi studi, si tratta di una decarbossilazione diretta, ovvero senza la formazione di un intermedio, catalizzata dall'enzima malolattico (deSalle & Tattersall, 2014; Ribèreau-Gayon et al., 2017).

I parametri chimico-fisici che regolano la crescita dei batteri della fermentazione malolattica nel vino sono:

- *Temperatura*: influisce sulla velocità di moltiplicazione dei batteri lattici e sulla velocità della reazione; al di sotto dei 10°C e sino a 15°C è lenta, mentre tra i 15°C e i 20°C c'è un buon sviluppo dei batteri.
- *Anidride Solforosa*: I batteri lattici ne sono più sensibili rispetto ai lieviti, pertanto, quando presente in dosi eccessive, l'anidride solforosa può anche inibire la fermentazione malolattica.
- *Il pH del vino*: se il pH è troppo basso la fermentazione malo-lattica non parte, al di sotto di 3,2 – quindi un vino molto acido – l'attivazione della fermentazione sarà molto difficoltosa. Inoltre, con valori di pH superiori a 4,5 avrà uno svolgimento molto lento.
- *Etanolo*: come per i lieviti, concentrazioni elevate di etanolo hanno un effetto tossico per i batteri e quindi ostacolano la fermentazione malo-lattica.

E' importante anche la scelta del ceppo e la popolazione di cellule, infatti l'attivazione e lo svolgimento della fermentazione malolattica richiede la presenza di una sufficiente popolazione di batteri lattici nel vino.

Oenococcus oeni è sicuramente la specie batterica che maggiormente contribuisce alla fermentazione malo-lattica.

I ceppi di *O. oeni* crescono in condizioni di pH tra 3.0-5.5 (Salema et al., 1994), ma in prevalenza il pH è sotto i 3.5 (Henick-Kling, 1992).

La fermentazione malo-lattica è comunque difficoltosa con pH inferiore a 3.2, quindi è fondamentale la scelta di ceppi appropriati (Somers, Bunte, 2007).

La densità delle cellule presenti va a determinare anche la conversione dell'acido malico: una carica batterica superiore a 10^6 CFU/ml convertirà maggiori quantità di acido malico (Maicas et al., 1999).

1.4. L'affinamento dei vini in fusti

L'affinamento è il periodo che intercorre tra il termine della fermentazione e l'imbottigliamento, la sua durata è funzione della tipologia, della composizione e della qualità del vino considerato.

Durante questo periodo, nel vino avvengono grandi trasformazioni a carica della sua composizione, l'evoluzione del colore, del sapore, del profumo, in relazione anche alle operazioni di cantina e alla natura del contenitore.

Infatti, si disciolgono nel vino quantità variabili di ossigeno in funzione della tecnica enologica impiegata e della temperatura a cui si opera. L'ossigeno molecolare si fissa su alcune sostanze (Fe^{3+} e Cu^{2+}) che sono auto-ossidanti e producono perossidi instabili in grado di ossidare altre sostanze accettrici di ossigeno, non direttamente ossidabili dall'ossigeno molecolare (in quanto ossidante molto debole). Le operazioni condotte sul vino sono quindi all'origine dei fenomeni ossidativi del vino e affinare il vino significa gestire un processo avente come scopo quello di sviluppare le sue potenzialità.

Tradizionalmente, l'affinamento dei vini rossi avviene in fusti di legno di rovere. L'impiego di questo materiale fu dettato inizialmente dall'esigenza di trasportare il vino a braccia d'uomo durante le spedizioni; solo in un secondo momento, si osservò l'influenza che questa pratica aveva sull'evoluzione delle caratteristiche del vino stesso. Negli anni 50-60 del secolo scorso, si abbandonò questa pratica a favore dell'affinamento in vasche inerti a causa dei vincoli economici e dei rischi di contaminazione microbica legati all'utilizzo dei fusti.

Dopo alcuni anni, in virtù di una situazione economica più favorevole e all'acquisita consapevolezza del ruolo svolto dal legno sull'evoluzione del vino, si assistette a un nuovo sviluppo dell'affinamento in fusti (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

Nel vino, durante l'affinamento in barrique, avvengono modificazioni dovute al fatto che il legno, rispetto alla vasca chiusa ermeticamente, non è un contenitore inerte nei confronti del vino.

In questo avvengono:

- reazioni di stabilizzazione del colore, della limpidezza e delle sostanze colloidali
- modificazioni delle strutture fenoliche (ammorbidimento dei tannini)
- sviluppo di aromi (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

Uno degli obiettivi dell'impiego dei fusti in legno nell'affinamento è quello di ottenere un carattere *boisé*, complessità aromatica dovuta alle sostanze estratte dal legno, che tuttavia deve risultare equilibrata.

Per ottenere il giusto equilibrio occorre effettuare una scelta accurata del legno e il suo grado di tostatura, intervenire sulla durata di questo processo e dosare la percentuale di vino derivante da barrique nuove negli assemblaggi. (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

Si individuano tre fenomeni associati all'affinamento e responsabili dell'evoluzione del vino:

1. Ossidoriduzione

L'apporto di ossigeno ai vini rossi proviene per il 50% dai trattamenti che il vino subisce e per la restante parte dall'origine del legno, dalla sua composizione, dal tipo di chiusura e dalla posizione del fusto stesso. L'ossigeno disciolto viene continuamente consumato dal vino in quanto ossida i suoi componenti, ma viene anche consumato dagli ellagitannini del legno che si disciolgono nel vino in quantità variabili. Inoltre, anche in assenza di ossigeno, i tannini ellagici sono in grado di modificare la struttura dei tannini del vino, di favorire le reazioni di combinazione degli antociani e di stabilizzare il colore (Jourdes et al., 2003).

2. Dissoluzione dei costituenti non volatili del legno

Oltre agli ellagitannini, il legno è responsabile della liberazione di componenti quali la lignina, le cumarine e molecole derivate dalla trasformazione di ellagitannini e lignina che contribuiscono ad aumentare il contenuto di acidi fenolici del vino, in particolare l'acido gallico (Pontallier et al., 1982). Le caratteristiche sensoriali di questi costituenti mostrano che (Vivas, 1997):

- l'acido gallico presenta sapore acido,
- le cumarine possiedono caratteristiche di durezza,
- gli ellagitannini sono astringenti, amari ed acidi.

Il legno può anche liberare polisaccaridi costituiti da emicellulose che influenzano il gusto del vino. Esso svolge dunque due effetti opposti: accentua la durezza attraverso la dissoluzione dei composti fenolici e ammorbidisce i tannini attraverso la formazione di polimeri eterogenei (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

3. Dissoluzione dei costituenti volatili del legno

Il legno di rovere grezzo contiene elevate quantità di sostanze volatili che presentano un odore particolare, si tratta di:

- *Lattoni*: in quantità eccessiva apportano note sgradevoli, legnose e quasi resinose,
- *Fenoli volatili*: derivano dalla demolizione della lignina;
- *Aldeidi fenoliche*: intervengono attivamente nella percezione dell'aroma di legno;
- *Aldeidi furaniche*: derivano dalla degradazione della cellulosa.

A seconda della sua origine, il legno risulta più o meno profumato; gli odori si sviluppano soprattutto durante la fase di essiccazione e la fabbricazione delle barriques. Il riscaldamento produce fenoli volatili e fenilchetoni (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

Durante l'affinamento del vino in fusti, si osserva un aumento dell'acidità volatile tra 0,1 e 0,2 g/L (Vivas et al., 1995). Questo aumento è dovuto all'azione di batteri lattici che concludono la degradazione dell'acido malico residuo e dei batteri acetici che possono svilupparsi e produrre acido acetico.

Oltre ad essi, la contaminazione avviene anche ad opera di lieviti come *Brettanomyces/Dekkera* che, sempre presenti nelle cantine, possono svilupparsi nei fusti in presenza o assenza di aria, continuando lo sviluppo anche in bottiglia. Il loro metabolismo si accompagna alla produzione di etilfenoli, il cui odore è sgradevole (Chatonnet P., 2002).

1.5. Lievito di contaminazione: *Brettanomyces*

I lieviti del genere *Dekkera/Brettanomyces*, appartenente alla famiglia delle Criptococcaceae, sono ritenuti microrganismi responsabili di alterazioni dei vini.

Si considerano le seguenti cinque specie: *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces nardensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces bruxellensis*.

Per *B. anomalus* e *B. bruxellensis* sono state osservate le forme telomorfe o perfette che prendono il nome di *Dekkera anomala* e *Dekkera bruxellensis* (Kurtzman e Fell, 2000).

Nel 1940, furono condotti i primi studi sistematici su *Dekkera/Brettanomyces* da Custers, che andò a descriverne la morfologia. Egli determinò le caratteristiche comuni dei ceppi come la forma ogivale delle cellule, il breve ciclo vitale e l'elevata produzione di acido acetico in presenza di ossigeno.

Il genere *Dekkera*, forma telomorfa o sporigena del lievito, presenta cellule ellissoidali spesso ogivali o cilindriche, singole, in coppia, in catenelle o a grappoli, di dimensioni 2-2,5 x 3-22 μm (Fig. 1.8).

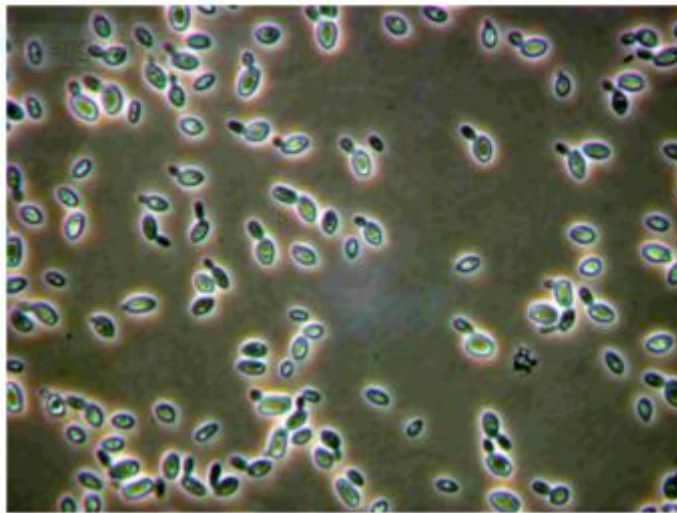


Figura 1.8: *Brettanomyces* visto al microscopio ottico.

La riproduzione è asessuale e avviene per gemmazione multilaterale o bipolare (Kurtzman et al., 2000).

Gli aschi si formano senza coniugazione e contengono da 1 a 4 ascospore; esse sono a forma di cappello o sferoidali. Entrambe le specie presentano le seguenti proprietà enologiche:

- elevata alcol tolleranza
- produzione di grandi quantità di acido acetico e fenoli volatili
- scarsa resistenza all'anidride solforosa.

Studiando il metabolismo dei lieviti appartenenti al genere *Dekkera/Brettanomyces*, Custers rilevò che la fermentazione del glucosio veniva inibita in condizioni anaerobiche. La crescita in condizioni aerobiche del lievito

Brettanomyces intermedius in un mezzo contenente glucosio ed estratto di lievito procede secondo un meccanismo particolare: durante la prima fase di crescita il glucosio viene fermentato in quantità uguali di acido acetico ed etanolo. Una volta esaurito il glucosio, la crescita continua convertendo quasi tutto l'etanolo, prodotto durante la prima fase, in acido acetico.

Dopo una lunga fase lag, la crescita continua con un consumo concomitante di acido acetico ed etanolo. Quando la coltura invece si trova in condizioni anaerobiche, in una prima fase la crescita si arresta immediatamente, così come si arrestano il consumo di glucosio e la produzione di metaboliti. L'inibizione momentanea della fermentazione alcolica in seguito alle condizioni di anaerobiosi è denominata "*effetto Pasteur negativo*". In 7-8 ore, la coltura si adatta all'anaerobiosi e riprende la normale crescita e la produzione di etanolo. Dal momento in cui si verificano le condizioni aerobiche si attiva conseguentemente anche la fermentazione del glucosio con formazione di alcol etilico, anidride carbonica ed una considerevole quantità di acido acetico (Ciani e Ferrero, 1997). Quindi, la presenza di ossigeno stimola lo sviluppo di Dekkera e la sua produzione di etilfenoli.

Il metabolismo di *Brettanomyces* è influenzato da:

- *carbonio*: glucosio, etanolo, acidi cinnamici e composti carbonilici del legno dei recipienti;
- *ossigeno*: sono sufficienti quantità piccolissime, infatti lo sviluppo del lievito può essere favorito dalla presenza di 50-80 ppb di ossigeno, concentrazioni facilmente raggiunte durante il travaso dei vini o il mantenimento degli stessi nella botte (Rossini, 2003);
- *azoto assimilabile*: ammonio solfato, estratto di lievito;
- *temperature*: essendo questo lievito mesofilo, le temperature ottimali di crescita vanno dai 15 ai 45°C. Un abbassamento di 5-10°C della temperatura durante il periodo di affinamento può avere un effetto inibitorio sulla sua crescita;
- *resistenze*: il pH (< 3,5) e la concentrazione di SO₂ (30-35 mg/L) sono in grado di rallentarne lo sviluppo. L'impiego di antisettici per bloccarne la crescita ha dato esiti alterni, in relazione alla concentrazione e al tipo di antisettico.

Composti come il dietilcarbonato e il dimetilcarbonato hanno dimostrato un alto potere inibente nei confronti di *Brettanomyces*, tuttavia il primo è stato proibito perché può essere un precursore di carbammato d'etile e il secondo è guardato con sospetto perché dalla sua degradazione si origina metanolo. (Microbiologia del vino, 2005).

Il lievito *Brettanomyces* ha meno esigenze nutrizionali di *Saccharomyces cerevisiae*: solo alcune vitamine, gli ioni K^+ e Mg^{2+} e le fonti di azoto (ammonio solfato, estratto di lievito) risultano essenziali, ma un attivante di fermentazione a base di estratto di lievito è sufficiente per il suo sviluppo. La D-prolina rappresenta una buona fonte di azoto poiché è poco utilizzata dal *Saccharomyces* ed è presente nel vino ad alte concentrazioni.

Lo sviluppo è comunque lento e limitato a poche generazioni. Nei vini in affinamento *Brettanomyces/Dekkera* raggiunge il massimo della densità della popolazione dopo 5-7 mesi. È stato stimato che teoricamente una concentrazione di esosidi di 100 mg/L è in grado di causare un aumento della popolazione di *Brettanomyces* fino a 10^7 UFC/mL.

Naturalmente, il tempo di ottenimento di questo valore massimo e la conseguente fase di morte del lievito dipende dalla composizione chimica del vino (in particolare dal livello di SO_2), dalla disponibilità di zuccheri fermentescibili e dalla temperatura di stoccaggio (Microbiologia del vino, 2005).

1.6. Gli acidi fenolici e i loro derivati

I composti fenolici, a seconda della diversa struttura chimica, sono classificati in due grandi gruppi: flavonoidi e non flavonoidi. Tra i composti non flavonoidi sono compresi gli acidi fenolici e gli idrossistilbeni.

Le uve contengono acidi fenolici di due tipi: benzoici e cinnamici. La loro concentrazione varia da 100 a 200 mg/L nei vini rossi a 10-20 mg/L nei vini bianchi. Gli acidi cinnamici derivano dall'acido cinnamico, presentano una struttura chimica C6-C3 e sono principalmente: acido p-cumarico, caffeico, ferulico.

Nell'acino sono contenuti nel succo vacuolare delle cellule della polpa e della buccia, si trovano sotto forma esterificata con l'acido tartarico (Ribéreau-Gayon, 1965) sia come eterosidi con il glucosio.

Questi composti intervengono anche nella formazione degli antociani acilati attraverso l'esterificazione del glucosio eterosidico degli antociani monomeri da parte dell'acido caffeico e dell'acido p-cumarico.

Gli acidi fenolici formano soluzioni idroalcoliche incolori che tendono ad ossidarsi e quindi ad ingiallire (Ribéreau-Gayon, 1998).

Sotto il profilo sensoriale, gli acidi cinnamici, in soluzione, non presentano sapori né odori particolari, ma per azione dei lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* possono dare origine a fenoli volatili.

I fenoli volatili maggiormente presenti nei vini sono il 4-vinilfenolo, il 4-vinilguaiacolo, il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo.

I vini bianchi contengono quantità variabili di vinilfenoli, ma sono abitualmente privi di etilfenoli; al contrario, i vini rossi non contengono che deboli quantità di vinilfenoli e presentano tenori variabili in etilfenoli. La composizione in fenoli volatili dei vini rosati è intermedia tra quella dei vini rossi e quella dei vini bianchi (Chatonnet et al., 1992a; 1993a).

Vinil ed etilfenoli sono responsabili di alcune deviazioni olfattive dei vini: i più maleodoranti sono il 4-vinilfenolo (odore farmaceutico, vernice, elastoplast) e il 4-etilfenolo (odore di stalla, di sudore di cavallo). Il 4-vinilguaiacolo (garofano, pepato) e il 4-etilguaiacolo (affumicato, spezie) hanno odori meno sgradevoli.

1.6.1.1 vinil-fenoli nei vini bianchi

I vinil-fenoli dei vini bianchi provengono dalla decarbossilazione enzimatica svolta dai lieviti a carico di due acidi cinnamici presenti nel mosto, l'acido p-cumarico e l'acido ferulico, con formazione rispettivamente di 4 vinil-fenolo e 4-vinil guaiacolo.

La cinnamato decarbossilasi (CD) di *Saccharomyces cerevisiae* decarbossila solo gli isomeri trans della serie cinnamica; è un enzima endocellulare ed esercita la propria attività solamente durante la fermentazione alcolica.

Il debole tenore in vinilfenoli dei vini rossi dipende dall'inibizione della cinnamato decarbossilasi di *S. cerevisiae* ad opera di alcuni composti fenolici dell'uva (Chatonnet et al. 1989; Chatonnet et al., 1993a): in particolare, le procianidine oligomere possono condurre a un'inibizione totale dell'enzima (Ribéreau Gayon et al., 2007).

Il tenore di vinil-fenoli in un vino bianco dipende:

- dal contenuto del mosto in acidi fenolici precursori,
- dall'attività CD
- dal ceppo di lievito che assicura la fermentazione alcolica (ceppi Pof: phenolic off flavor). (Ribéreau Gayon et al., 2007).

I tenori in acidi idrossicinnamici dipendono a loro volta dal vitigno e dalle condizioni di maturazione: più le uve sono mature, maggiore è la quantità di precursori. Inoltre, anche le condizioni di estrazione del mosto influiscono sui tenori degli acidi fenolici.

Nel corso dell'affinamento si constata una diminuzione del tenore in vinil-fenoli e del loro impatto olfattivo, dovuto alla loro polimerizzazione e alla loro trasformazione in etossietilfenoli, composti poco odorosi (Ribéreau Gayon et al., 1998).

1.6.2 Gli etilfenoli nei vini rossi

Per lungo tempo, l'origine degli etilfenoli è stata attribuita esclusivamente al metabolismo dei batteri lattici (Dubois, 1983).

Però gli isolamenti di batteri acetici, lattici e di lieviti a partire da vini rossi "fenolici" hanno dimostrato che solo i lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* (o *Dekkera*) sono microrganismi capaci di formare numerosi milligrammi di etilfenoli per litro di vino, quantità in grado di far comparire un odore percepibile; la specie riscontrata nel vino è *Brettanomyces bruxellensis* (Chatonnet et al., 1992).

Lo studio dei meccanismi di biosintesi degli etilfenoli da *Brettanomyces* ha messo in evidenza l'azione sequenziale di due enzimi (Fig. 1.9):

- il primo è una *cinnamato decarbossilasi* che trasforma gli acidi cinnamici in vinilfenoli e ha una specificità differente da quella di *S. cerevisiae*;

- il secondo enzima è una *vinilfenol riduttasi* (VPR), di cui il *S. cerevisiae* è privo, proprietà da cui dipende sia l'incapacità di *S. cerevisiae* di produrre delle quantità importanti di fenoli volatili nei vini rossi, sia l'attitudine del *Brettanomyces* a decomporre gli acidi cinnamici in vinilfenoli e poi in etilfenoli. (Ribéreau Gayon et al., 2007).

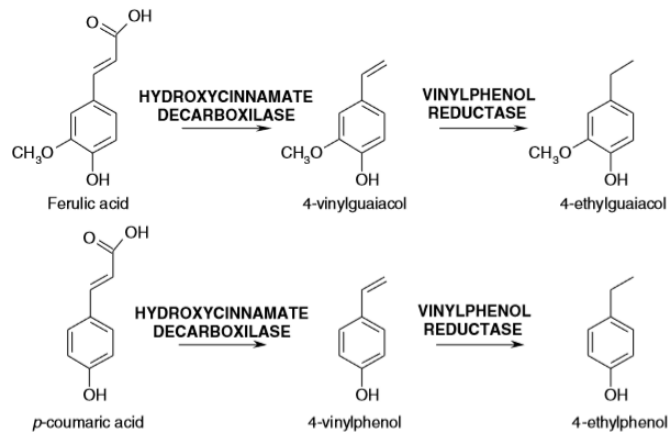


Figura 1.9: Formazione degli etilfenoli dai loro precursori idrossicinnamici.

I lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* sono dunque gli unici micro-organismi responsabili del difetto olfattivo “fenolico” di alcuni vini rossi.

Questi lieviti sono capaci di produrre del 4-etilfenolo e del 4-etilguaiacolo a partire dagli acidi idrossicinnamici dell'uva (p-cumarico e ferulico). Essi possono formare anche l'etil-4-siringolo a partire dall'acido sinapico del legno di quercia.

Questi micro-organismi possono anche moltiplicarsi in un vino rosso dopo la fermentazione alcolica e produrre importanti quantità di etilfenoli al di fuori del processo fermentativo.

Il *Brettanomyces*, infatti, può svilupparsi in anaerobiosi stretta nei vini detti secchi (che hanno terminato la fermentazione alcolica e malolattica) e produrre quantità importanti di etilfenoli degradando solamente piccole quantità di zuccheri residui (glucosio, fruttosio, arabinosio e trealosio). Questo fenomeno, molto diffuso nel corso dell'affinamento dei vini rossi, è passato per lungo tempo inosservato.

Le contaminazioni dei vini da parte di *Brettanomyces* sono sempre state giudicate nefaste per la qualità dei vini; secondo Ribéreau-Gayon et al. (1975), esse possono

dare luogo a un carattere butirrico, associato a un particolare difetto olfattivo definito “odore di topo”.

Curiosamente, la contaminazione da *Brettanomyces* non era mai stata collegata all’origine di un difetto olfattivo molto frequente, cioè “odore di stalla” dei vini fenolici, ma soltanto a quello estremamente più raro dell’“odore di topo”.

Nel corso dell’affinamento, la presenza di anidride solforosa è un fattore che governa i rischi di contaminazione da *Brettanomyces*, soprattutto durante il periodo estivo (Chatonnet et al. 1993).

Nella pratica, un tenore di SO₂ libero di 30 mg/L porta sempre alla scomparsa totale di popolazioni vitali per trenta giorni. Alcune osservazioni sembrerebbero indicare che questa situazione vale per vini giovani a pH normali (3,4 o 3,5), caso in cui i valori attorno al 2-2,5% di SO₂ libera si trovano allo stato molecolare attivo. Se il pH raggiunge 3,8, non vi è più dell’1% di SO₂ molecolare attiva ed è probabile che 30 mg/L di diossido di zolfo siano insufficienti per eliminare le popolazioni contaminanti (Ribéreau-Gayon, 2007).

Al massimo sviluppo dei lieviti, non corrisponde però il massimo di formazione degli etilfenoli, che viene raggiunto solo alcuni mesi dopo.

Sembra che le cellule di *Brettanomyces* siano in grado di utilizzare specifici substrati che in una prima fase ne possono favorire la crescita, e al loro esaurimento i lieviti rallentano la loro attività; in questo modo il grado di contaminazione tende a diminuire anche senza interventi mirati a contenerne lo sviluppo, fino ad arrivare alla morte e all’autolisi. Durante questa fase non si assiste a un forte incremento della concentrazione di etilfenoli, che invece tende ad aumentare durante la fase di riduzione dell’attività dei lieviti (Fig. 1.10).

Infatti, da studi effettuati presso la Cornell University, si è evidenziato che il lievito, dopo la morte e in seguito all’autolisi, rilascia nel vino i suoi componenti cellulari, tra cui gli enzimi di cui è dotato, i quali vengono così a contatto col substrato fenolico e determinano la formazione di etilfenoli.

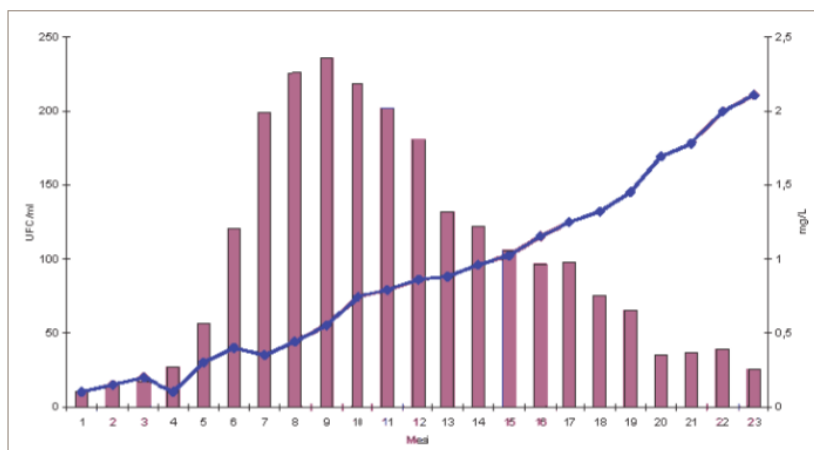


Figura 1.10: Andamento della popolazione di *Brettanomyces* e della concentrazione di etilfenoli.

1.7. *Brettanomyces*: da dove proviene?

I lieviti *Brettanomyces*/*Dekkera* contaminano mosti e vini, spesso rendendoli non più commercializzabili; tuttavia, alcuni produttori, ricercano il “Brett character” poiché esso gioca un ruolo favorevole nella complessità degli aromi e del bouquet, sia nella connotazione di note di invecchiamento in alcuni vini rossi giovani.

Brettanomyces e *Dekkera* possono essere isolati sulle uve sane e danneggiate, sulle attrezzature di cantina e in ambienti di vinificazione. La sua attività è stata segnalata in nazioni quali Francia, Italia, Germania, Sud Africa, Australia e Nuova Zelanda, dimostrando che non ha preferenze o restrizioni legate a particolari aree geografiche e/o climatiche. È opportuno puntualizzare quanto una scarsa igiene e una sanificazione poco accurata siano elementi favorevoli la proliferazione di tali microrganismi e ne aumentino la probabilità di diffusione nel mezzo.

La diffusione di *Brettanomyces*/*Dekkera* in cantina può essere attribuita all’uso di apparecchiature contaminate (pompe, tubature) e non sufficientemente sanificate. In particolare, essa sembra legata alla rugosità del materiale utilizzato per lo stoccaggio dei vini. Infatti, superfici con maggiore rugosità come cemento e legno risultano meno sanificabili e sono pertanto i vettori più frequenti della trasmissione del lievito, al contrario dell’acciaio.

Il legno è il principale diffusore di *Brettanomyces*: non può infatti essere trattato con interventi che garantiscano livelli sanitari tali da eliminare il lievito, poiché

provocherebbero un eccessivo impoverimento del materiale legnoso, andando a compromettere l'affinamento del vino.

Pertanto, la principale fonte di inquinamento è rappresentato dalle botti che hanno subito più utilizzi per diverse annate o che sono difficilmente sanificabili, anche se botti nuove possono ugualmente favorire lo sviluppo di *Brettanomyces* (Fugelsang, 1997). Questi, infatti, degradano il cellobiosio (Blondin et al., 1982), un intermedio derivante dal processo della tostatura delle botti e particolarmente presente nel vino stoccato in botti nuove. La tecnica del taglio dei vini con partite di incerta origine può rappresentare un'altra fonte di distribuzione del lievito.

In campagna, invece, la diffusione di *Brettanomyces/Dekkera* sulle uve sembra essere attribuita agli insetti, soprattutto *Drosophila melanogaster*.

Dalle uve, *Brettanomyces/Dekkera* contamina il mosto dove si sviluppa preferibilmente nelle fasi iniziali della fermentazione, poi a causa della competizione dei lieviti vinari si blocca, ma non muore.

La sanità delle uve è quindi il primo requisito per ridurre la presenza di questa specie, in quanto le contaminazioni possano provenire anche direttamente dall'uva (Taillandier, 2007; Loureiro, 2006).

Brettanomyces può inoltre produrre fermentazioni miste con *Saccaromyces* durante la fermentazione alcolica, ma non riesce mai a prendere il sopravvento.

È inoltre nota la sua capacità di causare arresti fermentativi dovuti alla sintesi di acidi grassi a catena corta (da C8 a C14) provenienti da esteri etilici, che provocano la morte del *Saccaromyces*, accumulandosi nel citoplasma o legandosi alla membrana plasmatica (Microbiologia del vino, 2005).

Una volta che il vino viene messo in barrique o in botte, *Brettanomyces* si localizza nelle pareti interne a livello di crepe o fessure, dove rimane attivo e protetto dai sanificanti, e aspetta il momento adatto per sviluppare e produrre il "Brett character". Inoltre, la sua presenza non è facilmente identificabile durante il processo di invecchiamento dei vini perché si sviluppa lentamente e non produce il caratteristico film superficiale o anidride carbonica. Di conseguenza, risulta essenziale un continuo monitoraggio delle popolazioni microbiche presenti nel vino in affinamento.

La concentrazione di etanolo non sembra influenzare la sua crescita, dato che è in grado di resistere a concentrazioni di etanolo comprese tra 4 e 11%.

1.8. Analisi sensoriale e “Brett Character”

L’alterazione del vino da parte di *Brettanomyces bruxellensis* rappresenta un grave problema che, nell’ultimo periodo, è stato preso in seria considerazione.

Tale alterazione, definita come “*Brett character*”, ha come risultato la produzione di un largo spettro di aromi. Questi odori sgradevoli vengono identificati con descrittori precisi, quali: stalla, sudore di cavallo, urina, medicinale, cuoio, aglio e odore di topo (De Blackburn, 2007; Romano et al., 2008). Essi sono attribuiti alla presenza di fenoli volatili, vinilfenoli ed etilfenoli, con una soglia di percezione media di circa 400 µg/L.

Per convenzione, si definisce *soglia di percezione* di un composto odoroso il tenore al di là del quale la sua presenza in una soluzione idroalcolica modello è individuabile all’olfatto dal 50% dei degustatori di una giuria di esperti.

La soglia di riconoscimento di un composto odoroso corrisponde alla sua soglia di percezione in un vino.

In particolare (Tab.1):

COMPOSTO	SOGLIA DI PERCEZIONE	DESCRITTORE
4-vinil-fenolo	770 µg/L	farmaceutico, chiodo di garofano
4-vinil-guaiacolo	440 µg/L	speziato
4-etil-fenolo	620 µg/L	sudore di cavallo
4-etil-guaiacolo	140µ g/L	speziato, affumicato

Tabella 1: Soglie di percezione e descrittori attribuiti ai principali fenoli volatili.

La percezione dei fenoli volatili costituisce un difetto soprattutto per degustatori esperti, abituati a riconoscere diverse caratteristiche olfattive, sia positive che negative come in questo caso.

Le caratteristiche qualitative dei vini vengono espresse mediante l'utilizzo di descrittori sensoriali, diversi al variare dello stimolo.

I descrittori sensoriali della qualità di un determinato prodotto possono e devono essere definiti e compresi univocamente all'interno del gruppo di assaggiatori, in modo da poter individuare i principali descrittori sensoriali.

L'analisi sensoriale può essere utilizzata come metodo per la ricerca organolettica dei composti responsabili del carattere Brett.

Quando si parla di bevande, quindi di vino, utilizziamo quattro dei cinque sensi per definirne le caratteristiche: vista, olfatto, gusto e tatto.

- **Analisi visiva**

L'occhio compie l'esame visivo e valuta la limpidezza, il colore, la consistenza e l'effervescenza di un vino.

La *limpidezza* descrive le quantità di particelle in sospensione di un vino che possono rendere il calice torbido, abbastanza limpido o limpido.

Il colore viene diviso in tre categorie a seconda del vino che ci troviamo ad analizzare:

1. Giallo: giallo verdolino, paglierino, dorato e ambrato
2. Rosa: tenue, cerasuolo, chiaretto
3. Rosso: porpora, rubino, granato, aranciato.

Il *colore* varia in funzione della varietà di vino presente nel bicchiere.

Segue poi la *consistenza* del vino, la quale si valuta osservando come le gocce di vino che si formano sugli archetti cadano velocemente sul bicchiere; tale parametro però è preso sempre meno in considerazione, poiché la consistenza può variare a seconda della pulizia/detersione dei bicchieri.

Si continua poi con l'analisi dell'*effervescenza*, se si degusta un vino frizzante, e si notano la grana, il numero e la persistenza delle bollicine; la grana può essere grossolana, mediamente fine e fine.

- **Analisi olfattiva**

Nei vini, tutti i sentori riconoscibili provengono dalle uve che sono state impiegate, dai metodi di vinificazione e da come il vino è maturato in botte o in acciaio. Il senso dell'olfatto permette di analizzare:

1. L'*intensità* dell'odore del vino, ovvero quanto "forte" esso sia;
2. La *complessità*, ovvero la quantità di sentori che si riesce a percepire annusando il calice; si definisce *poco complesso* quando manifesta una scarsa varietà di sfumature odorose, mentre si descrive come ampio un vino dotato di numerose sfumature diversificate tra i gruppi di profumi riconoscibili con successive inspirazioni;
3. Il *tipo di odore*, inizialmente classificato a partire da una lista dei descrittori olfattivi usati per i vini, risultato della sintesi di degustazioni, classificazione di odori e di testi dell'analisi sensoriale (Léglise, 1976; Peynud, 1980; Guignard, 1986; Neauport, 1997; Casamayor, 2002; Guyot, 2002).

Successivamente, si è effettuata una selezione dei descrittori, per eliminare i termini ambigui e ridondanti. I descrittori sono stati quindi raggruppati in sottofamiglie chiamate in modo da illustrare bene il loro contenuto. Infine, si sono determinate famiglie indipendenti dalle sottofamiglie. Tali grandi famiglie sono state scelte in modo da coprire la gamma olfattiva dei vini ed hanno nomi già utilizzati di frequente in degustazione. Esse rappresentano l'impressione olfattiva generale del vino, la nota dominante, e seguono un medesimo ragionamento come nell'industria dei profumi.

La sistematica della nuova classificazione, che le conferisce in particolare l'aspetto innovatore ed efficiente, è il fatto di raggruppare gli odori secondo la natura degli oggetti odorosi che li rappresentano. La mappa degli aromi (Fig.1.11) è strutturata secondo 3 cerchi concentrici: i tre livelli rappresentano tre diverse situazioni percettive, più generica quella verso il centro e più specifica quella esterna (Ubigli, 2009).

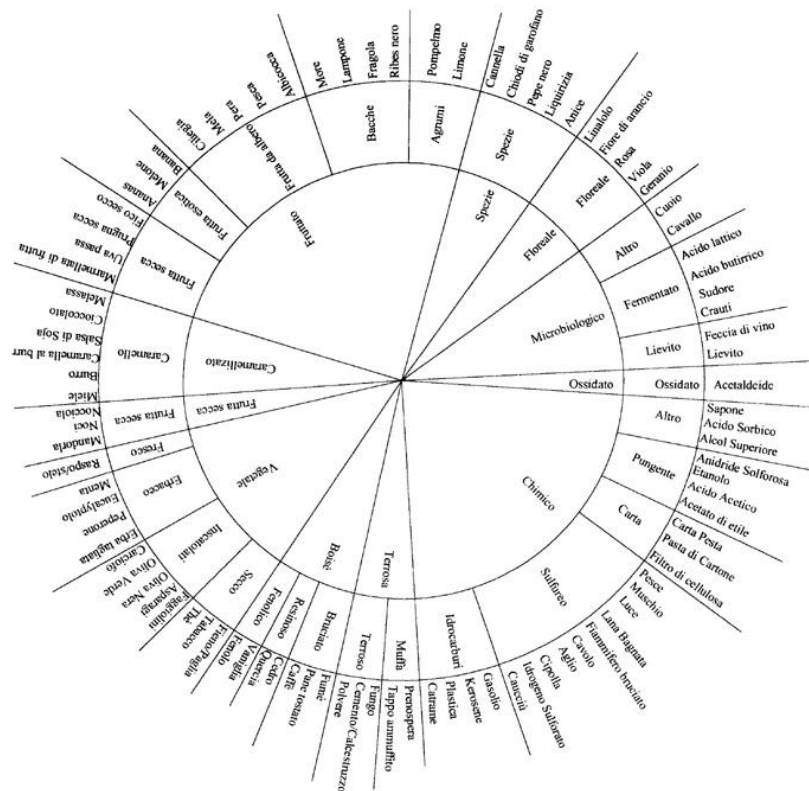


Figura 1.11: Ruota degli aromi nella versione della ASEV.

- Analisi gustativa

In ambiente enologico, con il termine “*gusto*” (*flavour*) si intende l’insieme delle percezioni che si avvertono nella cavità orale (sensazioni gustative, olfattive, tattili, sensibilità chimica comune), mentre con il termine “*sapore*” si fa riferimento esclusivamente agli stimoli di natura chimica dovuti alle sostanze dolci o amare, acide o salate, presenti in soluzione (Ubigli, 2009).

Le sensazioni principali si percepiscono in realtà su parti diverse della lingua, mentre altri caratteri come l’*alcolicità* o la *tannicità* interessano anche il palato. Oltre a ciò che percepiamo sulla lingua e sul palato, per via retro nasale l’analisi si completa con ulteriori sensazioni gusto-olfattive che consentono una miglior valutazione del vino, compresa la persistenza in bocca (la cosiddetta “lunghezza”) e lo stato evolutivo del prodotto.

I parametri gustativi cui fare riferimento possono essere:

- *contenuto zuccherino*: secco, abboccato, amabile, dolce;
- *tenore alcolico*: leggero, generoso, caldo, vigoroso, potente, liquoroso;
- *morbidezza*: ruvido, morbido, vellutato, grasso, oleoso;
- *acidità*: piatto, fresco, sapido, nervoso, spigoloso, crudo, verde;

- *tannicità*: tannico, astringente, ruvido, allappante, austero;
- *struttura*: magro, leggero, pieno, polposo, robusto;
- *persistenza*: corto, medio, lungo, molto lungo, lunghissimo;
- *stato evolutivo*: giovane, pronto, maturo, stanco, spento, passato.

1.8.1. Classificazione dei vini in funzione del “Brett Character”

All’analisi sensoriale i vini possono dividersi in 3 categorie in funzione del “Brett character”:

- *No Brett*: nel vino analizzato predominano i caratteri corrispondenti ai descrittori del fruttato, speziato, floreale, terroso e legnoso (Fig.1.12).

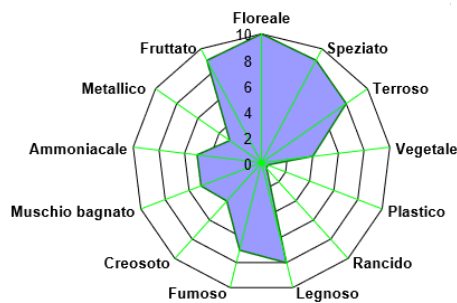


Figura 1.12. Descrittori del vino senza 4-etilfenolo.

- *Altamente Brett*: nel vino analizzato predominano caratteri associabili a descrittori negativi quali: rancido, fumoso, plastico, creosoto (catrame) (Fig.1.13).

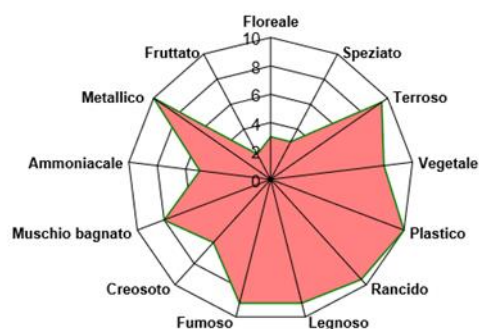


Figura 1.13: Descrittori del vino con 4-etilfenolo.

- *Mediamente Brett*: il vino in analisi presenta caratteristiche intermedie (Fig.1.14).

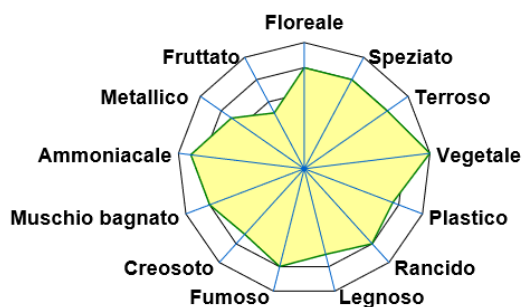


Figura 1.14: Descrittori di un vino mediamente caratterizzato da 4-etilfenolo.

A partire dai grafici sopra presentati, si può vedere come le caratteristiche del vino cambiano a seconda che sia presente o no il 4-etilfenolo, quindi come variano anche i descrittori.

Al fine di rilevare gli odori, e quindi i descrittori, degustatori addestrati facenti parte di un panel certificato eseguiranno test specifici.

Prevalentemente, vengono effettuati test discriminatori qualitativi, il cui scopo consiste nel rilevare la presenza o l'assenza di differenze sensoriali tra due vini seguendo alcune regole generali:

1. Il giudizio dev'essere indipendente, quindi non deve esserci comunicazione tra gli esperti.
2. I campioni in esame devono essere confrontabili, ovvero devono derivare dalla stessa varietà di vitigno. Non si possono quindi eseguire questi test se due vini sono, ad esempio, uno rosé e l'altro bianco.
3. Bisogna attenersi alle regole che vengono fissate per l'esecuzione dell'assaggio (possibilità di assaggiare una sola volta o un numero limitati di volte, ecc.).

I principali test utilizzati sono:

- *Test dell'appaiamento*: richiede che ciascun degustatore posto di fronte ad un certo numero di campioni presenti, abbinati il prodotto sconosciuto al rispettivo campione di riferimento, chiamato testimone;
- *Test del confronto a coppie (paired difference test)*: si basa su due soli campioni e prevede che il carattere sensoriale da considerare venga discriminato dai degustatori in uno dei due campioni rispetto all'altro, che funge da testimone;
- *Test triangolare*: i prodotti da confrontare sono 3 e si desidera sapere dal degustatore quale campione di vino sia diverso dagli altri due;
- *Test di preferenza*: si effettua a seguito del test triangolare e permette di effettuare il confronto tra il numero delle preferenze espresse per ciascun campione e di un valore tabellare individuato in funzione del numero degli assaggiatori coinvolti e del livello di probabilità di errore adottato.
- *Duo-Trio Test*: rappresenta una versione semplificata del test triangolare. Anziché disporre di tre bicchieri anonimi, se ne individua uno: ciò significa che è noto che il suo contenuto è diverso da uno ma uguale all'altro dei due. L'operatore deve decidere in quale dei due bicchieri è posto il vino diverso o uguale a quello del primo.

2. Scopo del Lavoro

L' "Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino" (OIV), è stata creata grazie all'Accordo del 3 aprile 2001, firmato da 35 Stati, e ha sostituito l'Ufficio Internazionale della Vigna e del Vino.

L'OIV è il punto di riferimento scientifico del mondo vitivinicolo ed è definita come "organismo intergovernativo di tipo scientifico e tecnico, di competenza riconosciuta nell'ambito della vigna, del vino, delle bevande a base di vino, delle uve da tavola, delle uve passa e degli altri prodotti della vigna".

Nell'ambito delle sue competenze, gli obiettivi dell'OIV sono:

- indicare ai propri membri provvedimenti che tengano conto delle esigenze dei produttori, dei consumatori e degli altri attori della filiera vitivinicola;
- assistere le altre organizzazioni internazionali che perseguono attività normative;
- operare per l'armonizzazione internazionale delle pratiche e delle norme esistenti e per la produzione di nuove norme internazionali, per migliorare le condizioni di elaborazione e commercializzazione dei prodotti vitivinicoli e contribuire alla considerazione degli interessi dei consumatori.

Al fine di raggiungere tali obiettivi, l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino svolge, tra l'altro, le seguenti mansioni:

- promuovere e orientare le ricerche e le sperimentazioni scientifiche e tecniche;
- elaborare e formulare raccomandazioni e sorvegliarne l'applicazione in collaborazione con i suoi membri nei seguenti settori: condizioni della produzione vinicola, pratiche enologiche, definizione e/o descrizione dei prodotti, etichettatura e condizioni di commercializzazione, metodi di analisi e di valutazione dei prodotti della viticoltura;
- presentare ai suoi membri tutte le proposte relative ai temi seguenti: garanzia dell'autenticità dei prodotti della viticoltura, in particolare nei confronti dei consumatori, segnatamente per quanto concerne le indicazioni di etichettatura, di protezione delle indicazioni geografiche, in particolare delle regioni vinicole e delle denominazioni di origine, che arrechino il toponimo corrispondente o meno, purché non violino gli accordi internazionali sul commercio e la proprietà intellettuale,

miglioramento dei criteri scientifici e tecnici per il riconoscimento e la protezione delle novità vegetali vitivinicole;

- contribuire ad armonizzare e ad adeguare le normative dei suoi membri o a facilitare il riconoscimento reciproco delle pratiche che rientrano nel campo delle sue competenze;
- partecipare alla tutela della salute dei consumatori e contribuire alla sicurezza sanitaria di uve e vini mediante le seguenti misure: rilevamento specializzato degli sviluppi scientifici al fine di valutare le caratteristiche specifiche dei prodotti della viticoltura, promozione e orientamento delle ricerche sulle caratteristiche nutrizionali e sanitarie corrispondenti, diffusione delle informazioni che risultano da tali ricerche ai rappresentanti delle professioni mediche e sanitarie.

Proprio per i sopraelencati scopi, l'OIV si occupa di fornire informazioni precise riguardo ai metodi di analisi da applicare nel campo enologico in modo che le indicazioni vengano rispettate dai 46 stati membri; metodi che, per essere applicati da tutti li stati membri devono seguire linee guida ben precise.

A tal proposito, l'OIV norma metodi di analisi che trovano applicazione nel settore e possono essere applicati in modo coordinato nei vari Paesi.

In questo lavoro di tesi è stato validato il metodo OIV-OENO 414-2011 presso "Sinergo SocCoop, Centro studi, ricerche e servizi" di Nizza Monferrato, per la rilevazione e quantificazione del lievito *Brettanomyces bruxellensis*.

Con il termine *validazione* si intende la conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi a una specifica utilizzazione o applicazione prevista, siano stati soddisfatti.

Il processo di validazione di un metodo interno, così come la verifica dell'applicabilità di un metodo normalizzato, ha l'obiettivo di dimostrare la validità per l'utilizzo di un metodo, mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo (caratteristiche tecniche, applicabilità, performance analitiche, ecc.) e si articola nelle seguenti fasi:

1. Richiesta di introduzione/modifica di un metodo di prova;
2. Studio di fattibilità (ha come presupposto la definizione dei requisiti che il metodo deve garantire per soddisfare la richiesta, quindi sensibilità,

specificità, precisione, esattezza, incertezza, ecc., e la definizione di tempi e costi di esecuzione);

3. Approvazione del protocollo di validazione (esso contiene tutte le informazioni riguardanti il processo di validazione e deve essere approvato dalla direzione del laboratorio);
4. Redazione del metodo (è la stesura della bozza del metodo di prova nel caso si intenda sperimentare un metodo interno, oppure una procedura di dettaglio del metodo normalizzato);
5. Sperimentazione del metodo (i metodi interni devono essere validati; un metodo normalizzato è considerato già valido ma deve essere sottoposto a una verifica per controllare che i parametri di validazione riportati siano garantiti dal laboratorio applicando quel metodo);
6. Stesura della dichiarazione di validazione (al termine della sperimentazione, nel caso si concluda positivamente, si procede alla valutazione di tutta la documentazione raccolta e si provvede a redigere la dichiarazione di validazione);
7. Addestramento del personale.

La validazione è una fase nella quale, a monte dell'applicazione del metodo, si prendono in considerazione tutti i requisiti che devono essere soddisfatti. Le caratteristiche del metodo devono essere definite in termini di parametri tecnici (campo di applicazione, campo di prova, accuratezza, limite di rilevabilità e di quantificazione, ecc.), ma anche di parametri economici.

La norma internazionale ISO 17025, che definisce quali siano «le prescrizioni generali che riguardano la competenza dei laboratori di taratura e di prova», precisa che i laboratori accreditati debbano, quando applicano un metodo analitico abituale, assicurarsi e assicurare sulla qualità dei risultati ottenuti.

Per raggiungere questo obiettivo, si susseguono una serie di fasi:

- La prima fase consiste nel definire le esigenze della clientela rispetto al parametro considerato, per determinare, di conseguenza, se il metodo utilizzato risponda bene a queste ultime;
- La seconda integra, per i metodi non standardizzati, modificati o sviluppati dal laboratorio, una convalida iniziale.

I dati acquisiti in queste due fasi sono utilizzati per la stima dell'incertezza di misura; valutati regolarmente, essi costituiscono un indicatore della qualità dei risultati ottenuti con il metodo scelto (Tabella n. 2.1) (OIV, 2005).

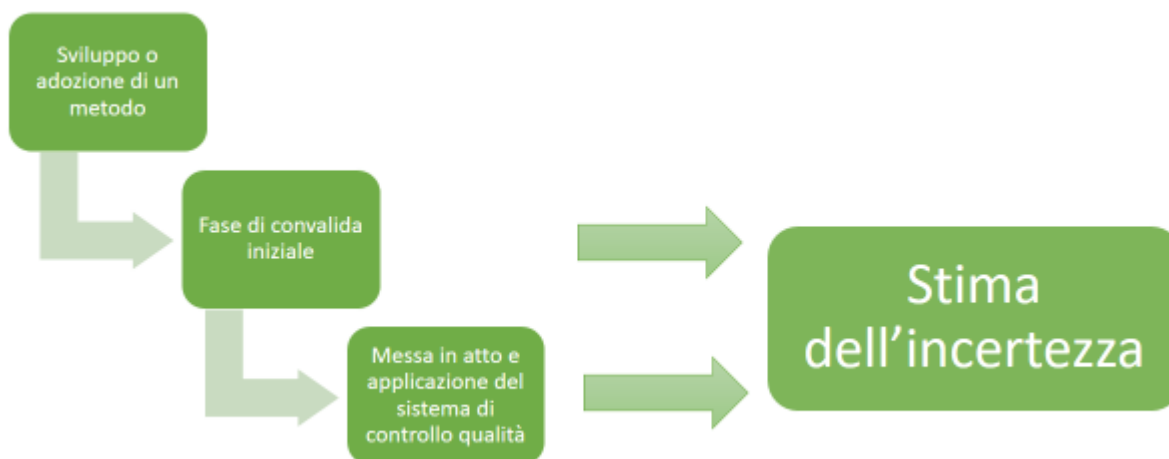


Tabella n. 2.1: Fasi di validazione

Una volta applicato il metodo, i laboratori devono utilizzare opportuni mezzi di controllo e di raccordo che permettano di monitorare la qualità dei risultati ottenuti. Infine, devono stimare l'incertezza dei risultati ottenuti (OIV, 2005).

L'applicazione della convalida prevede tre fasi, nelle quali figurano gli obiettivi e gli strumenti di convalida utilizzati per raggiungere gli obiettivi (Tabella n. 2.1).

<u>FASI</u>	<u>OBIETTIVI</u>	<u>STRUMENTI DI CONVALIDA</u>
Campi d'applicazione	<ul style="list-style-type: none"> - Definire le matrici analizzabili - Definire la gamma analizzabile 	Limite di rilevazione e quantificazione
Errore sistematico	<ul style="list-style-type: none"> - Risposta lineare sulla scala dei valori analizzabili - Specificità del metodo - Precisione del metodo 	Studio di linearità Studio di specificità Confronto con un metodo di riferimento Confronto con materiali di riferimento Confronto interlaboratorio
Errore aleatorio	<ul style="list-style-type: none"> - Precisione del metodo 	Studio di ripetibilità e riproducibilità

Tabella n. 2.1: Fasi necessarie per l'applicazione della convalida del metodo.

In base a queste considerazioni quindi l'attività di ricerca è stata rivolta a convalidare il metodo normalizzato OIV nell'ambito del laboratorio di Sinergo, al fine di ottenere la certificazione sull'analisi.

Nei risultati sarà discussa la valutazione dei seguenti punti:

- Linearità;
- Ripetibilità;
- Riproducibilità;
- Limite di rilevazione (LR);
- Limite di quantificazione (LQ)

applicata alla determinazione della presenza di *Dekkera* con metodo in RT-PCR.

Inoltre, durante l'esperienza di stage, è stata effettuata una prova di analisi sensoriale che aveva come obiettivo la determinazione della soglia di percezione del 4-etilfenolo nella diverse tipologie di vino bianco e rosso mediante l'utilizzo della *norma ISO 13301:2002* con conseguente organizzazione delle sedute di analisi sensoriale (preparazione delle soluzioni e dei test), gestione del Panel di 30 giudici addestrati ed elaborazione finale dei dati.

L'analisi sensoriale è definibile come l'insieme di tecniche e metodi che permettono, attraverso il corretto e attento utilizzo degli organi di senso, di misurare in modo oggettivo e ripetibile quanto viene percepito di un prodotto o di un servizio.

Il concetto di "soglia" è ampiamente diffuso nell'ambito dell'analisi sensoriale ed è spesso utilizzato anche nei campi riguardanti gli studi sensoriali su cibi e bevande.

I dati relativi alle soglie sensoriali di stimoli chimici vengono utilizzati negli studi sensoriali principalmente in due modi: come unità di misura della sensibilità dei valutatori o gruppi di valutatori a stimoli specifici, o come unità di misura della capacità, che una sostanza chimica, ha di provocare risposte sensoriali nei valutatori.

Nel primo caso il valore della soglia viene considerato come descrizione della performance di un valutatore, nel secondo caso come unità di misura di una proprietà della sostanza (ISO 13301).

Il termine “soglia”, introdotto dagli psicofisici del XIX secolo, viene quindi utilizzato per identificare una concentrazione oltre la quale gli stimoli prodotti dal 4-etilfenolo vengono percepiti e sotto la quale, invece, non vengono percepiti. (Grafico n. 2.1)

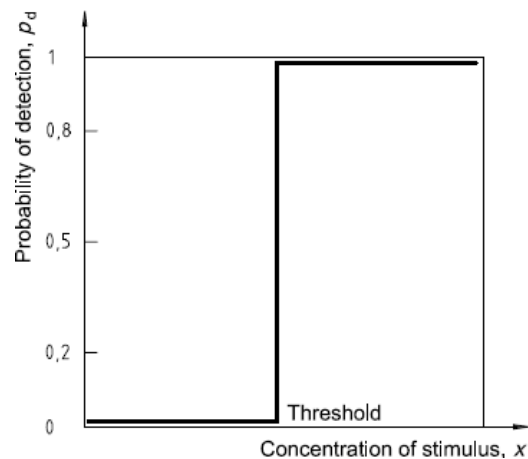


Grafico n. 2.1

Questa definizione esprime perfettamente quello che è il *concetto tradizionale* di soglia.

Tuttavia, ad oggi, si parla anche di *concetto probabilistico di soglia*.

Infatti, nella pratica il grafico della probabilità di rilevamento rispetto all'intensità dello stimolo è sempre un ogive (Grafico n. 2.2), ed è conveniente assumere, ai fini del calcolo, che la soglia fluttui così che una particolare concentrazione di stimoli la superi in alcune occasioni ma non altre.

La soglia può quindi essere ottenuta come una stima della mediana di questi valori momentanei, cioè come la concentrazione di stimolo per la quale la probabilità di rilevamento è 0,5.

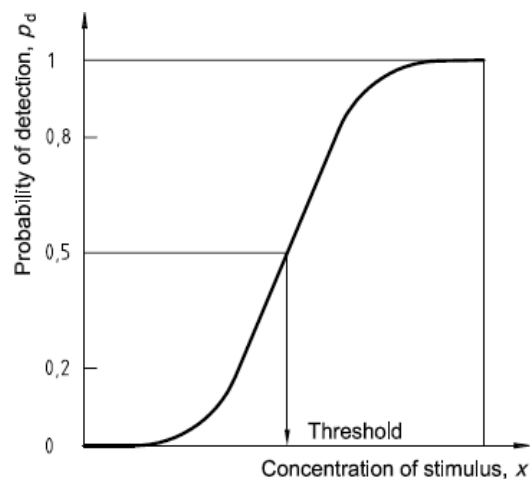


Grafico n. 2.2

La soglia può quindi essere ottenuta come stima della media di quei valori prodotti dai test.

La soglia così definita ha analogie con i livelli di effetto medi usati in branche della biologia, come per esempio la farmacologia e la tossicologia, le quali interessano l'effetto delle sostanze chimiche sugli organismi.

Questi tipi di test sono caratterizzati da molte variabili che potrebbero causare errori sperimentali. Questo può essere spiegato dalle differenze che intercorrono tra i diversi laboratori, i diversi individui più o meno allenati a valutare stimoli sensoriali e dalle differenze nelle procedure sperimentali. Chi andrà ad utilizzare queste norme e tecniche, quindi, deve essere consapevole che la determinazione delle soglie di rilevamento richiede molto più impegno di sperimentazione di quanto si possa immaginare.

In ogni caso, i risultati sperimentali dimostrano che, a mano a mano che si ripetono i test, le soglie individualmente osservate e le differenze tra individui analoghi tendono a diminuire. I test sulla soglia sono spesso un'attività poco praticata e i valutatori miglioreranno la loro sensibilità a mano a mano che riconosceranno lo stimolo (ISO 13301).

Questo tipo di prova, quindi, si può definire come "panel test" in quanto quest'ultimo è definito come un metodo di analisi sensoriale che si avvale di un gruppo di assaggiatori (panel) di almeno 8 persone in cui ogni assaggiatore esegue la prova di assaggio e, mediante l'utilizzo di un software, registra le risposte.

Successivamente le risposte sono raccolte dal coordinatore del test per elaborarne i dati; questa attività sarà più dettagliata nel capitolo dei risultati.

3. Materiali e Metodi

3.1 Real-Time PCR

La Reazione a Catena della Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) è un metodo di amplificazione in vitro degli acidi nucleici, sviluppato nel 1983 dal Dottor Kary Banks Mullis, vincitore del premio Nobel per la chimica nel 1993.

Ha molteplici utilizzi per un'ampia gamma di analisi, tra cui:

- Test di paternità,
- studi di evoluzione e filogenesi,
- identificazione di malattie ereditarie e virali,
- Clonaggio di un gene.

La PCR permette una sintesi esponenziale di un segmento di DNA a partire da un filamento di DNA definito stampo. Si utilizza un enzima, la DNA-polimerasi, che duplica un frammento di DNA compreso tra due sequenze di innesco (dette primer). Questa tecnica ha elevate riproducibilità, specificità e sensibilità oltre a essere molto rapida e poco costosa.

La miscela di amplificazione deve contenere:

- ✓ Sequenza target: consiste nel materiale genetico, contenente le regioni che si desiderano amplificare;
- ✓ DNA polimerasi termo-resistente e termo-stabile. Una possibile DNA polimerasi termoresistente è quella che viene chiamata "Taq pol", ossia una polimerasi isolata dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* capace di resistere a elevate temperature, quali quelle necessarie per denaturare il DNA;
- ✓ Due Primer: sono degli oligonucleotidi a singolo filamento complementari rispettivamente all'estremità 3' e 5' della sequenza target, chiamati perciò senso e antisenso. Costituiscono gli elementi di innesco per l'attività della DNA polimerasi;
- ✓ Soluzione tampone: una soluzione salina acquosa che mantiene stabile il pH;
- ✓ Deossiribonucleotiditri-fosfati (dNTPs): i singoli nucleotidi che costituiscono i componenti necessari per la sintesi del DNA.

Nella soluzione si trova anche cloruro di magnesio (*MgCl₂*) che svolge un ruolo di cofattore per la DNA polimerasi e influenza l'appaiamento del primer allo stampo.

Un parametro importante da valutare è la sua concentrazione perché influenza la specificità dell'appaiamento dei primer e l'attività dell'enzima (A. Scialpi, A. Mengoni, 2008).

La reazione prevede il susseguirsi di cicli di amplificazione, realizzati grazie all'alternanza di specifici cicli di temperature.

Le fasi che si distinguono durante ogni ciclo sono 3 (Fig. 3.1):

- Denaturazione,
- Appaiamento,
- Estensione.

Con la prima fase, la denaturazione, si raggiungono temperature di circa 95°C, temperature alle quali avviene la separazione della doppia elica del DNA stampo in due filamenti singoli (denaturazione termica). Ciò si produce poiché l'alta temperatura rende i legami idrogeno instabili, permettendone la rottura.

Nella seconda fase, l'appaiamento o *annealing*, la temperatura viene abbassata (raggiungendo temperature comprese tra i 55 e i 65°C): a queste temperature avviene il legame dei primer alle sequenze di DNA a singola elica a essi complementari, localizzati alle estremità del frammento di interesse.

La temperatura di appaiamento del primer è condizionata dal loro contenuto di basi (G) e (C) e dalla loro lunghezza. Se consideriamo primer di media lunghezza (circa 20 basi), per il calcolo della temperatura di melting T_m (temperatura alla quale si verifica il distacco del primer) si utilizza spesso la formula seguente:

$$T_m = 4 G + C + 2 A + T \text{ } ^\circ\text{C}$$

Dove G, C, A e T indicano il numero di nucleotidi contenenti le basi azotate corrispondenti. Nel caso in cui i due primer presentino delle T_m differenti, si utilizza in genere la T_m più bassa.

La temperatura di appaiamento T_a (temperatura alla quale si verifica l'appaiamento del primer) spesso viene stimata, sulla base di quella di melting, secondo la seguente relazione:

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Nell'ultima fase, quella di estensione, la temperatura viene leggermente alzata per massimizzare l'azione dell'enzima. In questa fase i primer vengono processati dalla

DNA polimerasi che incorpora i singoli deossiribonucleotidtrifosfati (dNTPs) complementari al DNA stampo.

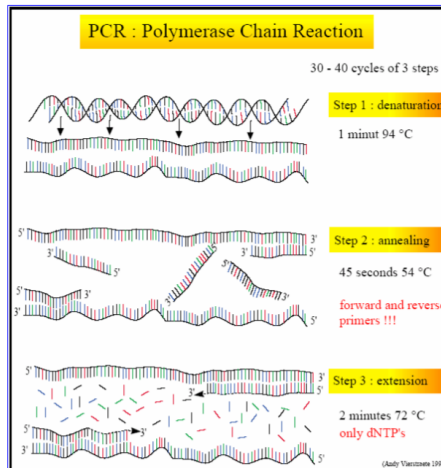


Figura 3.1: Fasi della PCR.

Il ciclo di amplificazione, costituito da queste tre fasi, viene ripetuto dalle 30 alle 40 volte per ottenere la massima amplificazione della sequenza target.

Negli ultimi cicli di amplificazione, la reazione rallenta a causa del consumo di reagenti e della riduzione dell'attività della polimerasi.

3.1.1. La Fluorescenza

La comprensione del fenomeno della fluorescenza è necessario per comprendere lo step successivo, ossia comprendere il principio della Real Time-PCR.

La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di emettere luce nel visibile, dopo essere state eccitate da radiazioni elettromagnetiche a specifiche lunghezze d'onda (Fig. 3.2).

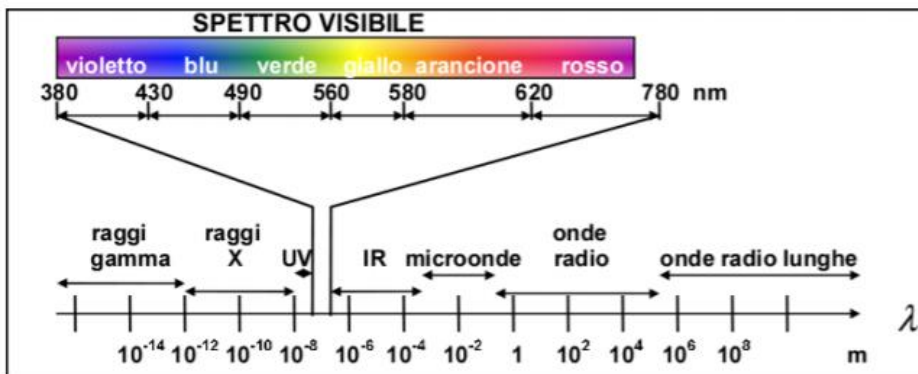


Figura 3.2: Spettro elettromagnetico

Le radiazioni elettromagnetiche consistono in un fenomeno ondulatorio caratterizzato da un trasferimento di energia. Due parametri importanti che le descrivono sono rappresentati dalla lunghezza d'onda (λ) e dalla frequenza (ν). All'inizio del Novecento, a seguito di studi sull'effetto fotoelettrico, emerse l'ipotesi che gli scambi energetici tra luce e materia si fondassero su un'energia quantizzata.

Max Plank, fisico tedesco, formalizzò questo concetto affermando che l'energia associata a una radiazione elettromagnetica è trasmessa sotto forma di fotoni, ossia in quanti di energia.

L'energia di un singolo fotone E è data dalla legge di Plank:

$$E = h\nu$$

dove ν rappresenta la frequenza e h è la costante di Plank (valore sperimentale della costante $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$). Risulta quindi che un raggio di luce si comporta come un flusso di particelle, la cui energia è proporzionale alla frequenza [D. Halliday *et al.* 1992].

Il fotone possiede sia le proprietà di una particella sia quelle di un'onda. Questa particolarità viene definita "dualismo onda-particella". Questo dualismo si verifica poiché i fotoni, o in generale le radiazioni elettromagnetiche, si comportano come onde durante il loro movimento nello spazio, ma nel momento in cui interagiscono con altre particelle elementari manifestano la loro natura quantistica. Dal punto di vista ondulatorio, il prodotto della frequenza e della lunghezza d'onda del fotone è pari alla velocità di propagazione dell'onda.

Considerando una situazione di radiazione nel vuoto vale la relazione:

$$\lambda\nu = c$$

dove c è la velocità della luce.

Da queste osservazioni si deduce che frequenza e lunghezza d'onda sono inversamente proporzionali e all'aumentare dell'una diminuisce l'altra. Il principio di fluorescenza si origina quando una radiazione incidente eccita gli atomi della molecola fluorescente; gli elettroni vengono promossi ad un orbitale più esterno caratterizzato da un livello energetico maggiore. Entro poche decine di nanosecondi l'elettrone eccitato ritorna al livello energetico di partenza, passando per stati eccitati a energia intermedia: questo processo è chiamato decadimento.

I passaggi per gli stati intermedi non determinano l'emissione di una radiazione, tranne l'ultimo, che genera luce a una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella della radiazione incidente e quindi dotata di energia minore. Questa luce viene chiamata fluorescenza. (Lakowicz et al 1999).

La fluorescenza è un fenomeno di emissione spontanea: se consideriamo una sorgente luminosa in uno stato eccitato con energia E_2 , essa può decadere spontaneamente verso lo stato fondamentale con energia E_1 . La differenza di energia tra i due stati viene rilasciata sotto forma di fotone. L'energia della radiazione emessa è sempre inferiore a quella assorbita; rispetto a quest'ultima avrà quindi una frequenza inferiore e una lunghezza d'onda superiore: questo fenomeno è chiamato *Stokes Shift*.

A differenza di altri fenomeni di luminescenza, la fluorescenza ha un decadimento istantaneo, vale a dire che l'emissione di radiazione termina nel momento in cui si smette di eccitare il campione.

Un parametro che si può valutare nel fenomeno di fluorescenza è la *resa quantica* che ci fornisce una stima dell'efficienza del processo di fluorescenza e viene definita come il rapporto tra il numero di fotoni emessi e il numero di quelli assorbiti e la massima resa quantica si ha per Φ pari a 1 (100%), ossia quando il numero di fotoni emessi e assorbiti risulta uguale.

3.1.2. RT-PCR: una metodica quantitativa

La tecnica di PCR convenzionale è una tecnica qualitativa; solo assumendo particolari accorgimenti si possono ottenere risultati semi-quantitativi. Infatti, non è possibile correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di DNA stampo presente inizialmente, perché nella fase finale l'efficienza della reazione può essere variabile.

Uno sviluppo della tecnica della PCR si è avuto con la real-time PCR. La real-time PCR, o qPCR (PCR quantitativa), consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR a ogni ciclo di amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare *un'analisi quantitativa* del DNA stampo iniziale.

Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da opportuni fluorofori, cioè coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di

DNA prodotte a ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori possono intercalarsi al DNA in maniera aspecifica, oppure fungere da marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze. Le informazioni che si ottengono con questa tecnica sono quindi maggiori rispetto a quelle di una classica PCR.

La real-time PCR è spesso utilizzata in combinazione con la reazione di retro-trascrizione (RT), per quantificare i livelli di espressione di specifici geni di interesse.

3.1.3. SYBR GREEN

I fluorofori usati in real-time PCR sono caratterizzati dal fatto che sviluppano fluorescenza solo quando vengono incorporati nei filamenti di DNA neosintetizzati. La fluorescenza emessa aumenta in rapporto al numero di siti di legame ai doppi filamenti di DNA prodotti.

La quantità di prodotto amplificato può quindi essere determinata a ogni ciclo di amplificazione, rilevando, al termine della fase di estensione, la radiazione emessa del fluoroforo. Uno dei fluorofori più utilizzati è il SYBR® Green, una molecola fluorescente che durante le reazioni di PCR si intercala nel doppio filamento del DNA. Come si nota dalla Fig. 3.3 il complesso DNA-SYBR® Green assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$ ed emette luce verde a una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$. Altri picchi di assorbimento, molto più deboli, si trovano nella regione dell'ultravioletto.

Il SYBR® Green si intercala nel DNA a doppio filamento, motivo per cui non è adatto per quantificare RNA a singolo filamento [Ian M. Mackay, 2007].

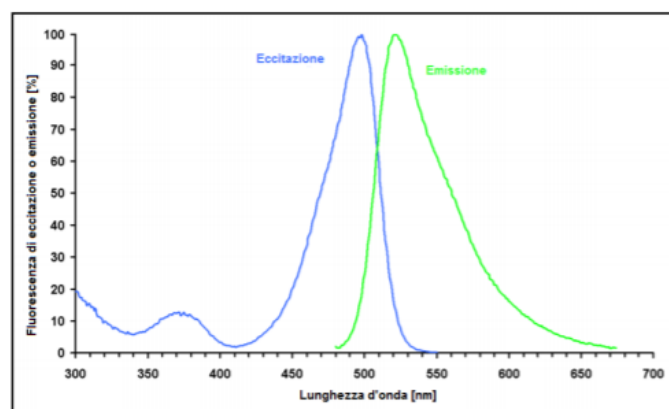


Figura 3.3: Spettro di eccitazione e di emissione del SYBR® Green.

Durante la fase di denaturazione il SYBR Green si trova libero nella miscela di reazione, successivamente nella fase di annealing esso si posiziona in modo aspecifico nel solco minore del DNA. Nella fase di elongazione il colorante si intercala nella molecola di DNA e, quando eccitato, emette fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte (fig.3.4).

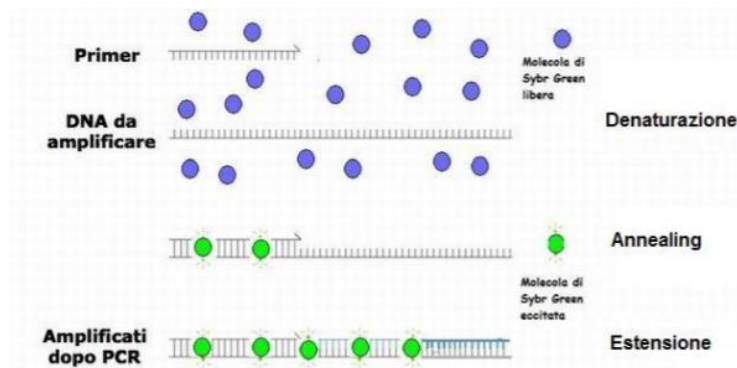


Figura 3.4 Comportamento del SYBR green nelle tre fasi di PCR.

Quindi, la real-time PCR o qPCR può essere usata per ottenere la quantificazione del DNA inizialmente presente nel campione. Questo può essere effettuato grazie all'aggiunta di composti la cui fluorescenza emessa ad ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di amplificato.

Test che sfruttano q-PCR sono stati specificamente progettati per la determinazione della famiglia *Brettanomyces* nel vino e successivamente sviluppati (Phister and Mills, 2003; Delaherche *et al.*, 2004).

3.2. Metodo OIV-OENO 414-2011

L'Assemblea generale dell'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino del 2011 ha deciso di adottare e includere, nella sezione della "Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dei vini e dei mosti", il metodo "Conteggio dei lieviti del genere *Brettanomyces bruxellensis* con qPCR – Metodo di tipo IV OIV-OENO 414-2011". Tale inclusione è avvenuta in seguito alla proposta del gruppo di esperti di Microbiologia e dei metodi di analisi dopo aver considerato i lavori degli esperti di Microbiologia.

3.2.1. Principio del Metodo

I microrganismi indicati nel presente metodo sono i lieviti del genere *Brettanomyces bruxellensis* che dispongono del gene bersaglio.

Il principio di questo metodo si basa sull'estrazione, direttamente da vino, del DNA del lievito target, seguita dalla sua amplificazione mediante qPCR.

Attualmente, soltanto due regioni, che si sono rilevate specifiche della specie, sono state utilizzate come bersaglio. Si tratta di un gene che codifica l'RNA 26S e del gene RAD4. Si tratta di una tecnica specifica per il *Brettanomyces bruxellensis*, ma che presenta il vantaggio di essere meno costosa.

La particolarità della qPCR risiede nella lettura della fluorescenza a ciascun ciclo di amplificazione. Questa aumenta in modo esponenziale a mano a mano che il DNA viene amplificato. Per questa applicazione sono state sviluppate numerose tecnologie di fluorescenza. In questo caso si tratterà di un fluoroforo SYBR® Green. Questo agente ha un'elevata fluorescenza intercalandosi in modo specifico tra i nucleotidi a livello del doppio filamento del DNA. In compenso, allo stato libero presenta solo una debole fluorescenza.

Inoltre, con questa metodica, si può generare una curva di fusione al termine dell'amplificazione per assicurare la specificità della reazione.

Al fine di validare le fasi di estrazioni e amplificazione del DNA, il metodo è stato integrato con uno standard interno, Lip4, *Yarrowia lipolytica*.

3.2.2. Campo di Applicazione

Il protocollo descrive un metodo per il conteggio dei lieviti del genere *Brettanomyces bruxellensis* nei vini in tino o imbottigliati, per mezzo della PCR quantitativa (qPCR) in tempo reale.

Finora non è stata validata l'analisi dei vini in corso di fermentazione alcolica e dei mosti.

3.2.3. Reattivi e Prodotti

Tutto il materiale di consumo in plastica deve essere precedentemente sterilizzato in autoclave e tutte le soluzioni devono essere preparate con acqua ultrapura e sterilizzate, per ulteriore sicurezza, in autoclave.

- Simplex Easy Wine kit (R- biopharm SEW 0100 - 100 det): Kit per estrazione DNA da lieviti e batteri nel vino, da conservare a temperatura ambiente.

Il Kit contiene:

- o Easy-Reagent
- o Wine solution
- o Washing solution

All'apertura del kit, è necessario aggiungere tutto il contenuto del flacone "wine solution" al flacone Easy Reagent e agitare il tutto. Il buffer preparato (EASY-REAGENT WINE) è stabile a temperatura ambiente per 4 mesi.

- Primer Brett 4 µM: a partire da soluzioni in stock di primer 100 µM, è stata preparata una miscela 4 µM Brett rad3 (GTTACACAATCCCCTCGATCAAC) e 4 µM Brett rad4 (TGCCAACTGCCGAATGTTCTC) e poi è stata portata a volume di 1 mL con acqua ultrapura. Tale soluzione si conserva per 1 anno a -20 °C.
- Primer YAL 4 µM: a partire da soluzioni stock di primer 100 µM, è stata preparata una miscela 4 µM YAL-F (ACGCATCTGATCCCTACCAAGG) e 4 µM YAL-R (CATCCTGTCGCTCTCCAGGTT). Anche questa ottenuta in 1 mL di acqua ultrapura.
- Standard interno Lip4 (*Yarrowia lipolytica*): viene messo in coltura il ceppo puro di *Yarrowia* in YPD (Yeast peptone dextrose) (Tab.3.1) liquido a 28° C fino a una DO₆₀₀

(densità ottica a 600 nm) di 1 che si otterrà dopo circa 48 ore dalla messa in coltura.

Dopo aver effettuato una stima della DO_{600} è necessario eseguire una diluizione a 1.0×10^6 UFC/mL in acqua fisiologica ($1DO = 1.0 \times 10^7$ UFC/mL).

10 g/L	Estratto di lievito
20 g/L	Peptone
20 g/L	Glucosio
20 g/L	Agar

Tabella 3.1: Costituzione del terreno YPD.

Prelevare 110 μ L dalla coltura a 1.0×10^6 UFC/mL in un micro tubo da 1,7 mL e aggiungere 110 μ L di glicerolo al 40% per ottenere una popolazione da 5.0×10^5 UFC/mL. Miscelare e conservare a -80°C . Realizzare un conteggio in parallelo per verificare la concentrazione della sospensione.

- Acqua bidistillata sterile
- Enzima liticasi
- Controllo positivo: il controllo positivo, una volta quantificato, deve presentare una carica quanto più prossima a $2,000 \pm 04$ UFC/2.5 μ L di DNA
- SsoAdvanced Universal SYBR Green (BIO-RAD 1725270): è pronto per l'uso per reazioni per PCR e real-time PCR. Esso contiene

3.2.4. Apparecchiatura Ed Accessori

- Workstation a raggi UV sterile. Deve essere accesa 15 minuti prima dell'analisi.
- Normale attrezzatura di laboratorio
- Micro-pipette per fase di estrazione
- Micro-pipette per fase di preparazione del master mix
- Puntali da 0.1 ml e da 1 ml con filtri
- Termomixer

- Centrifuga per micro-provette
- Vortex
- Micropipette con chiusura di sicurezza
- Micropipette da 0,2 ml con tappo "ottico" o strip da 8 pozzetti.
- Real-time PCR

3.2.5. Identificazione del campione

I campioni vengono prelevati sia direttamente dalle bottiglie da analizzare, sia con flaconi di prelievo precedentemente sterilizzati.

A seconda delle necessità del laboratorio, per la validazione di questo metodo, sono stati presi campioni di DNA estratti precedentemente con il metodo utilizzato dall'azienda, in modo da avere anche un ulteriore confronto di dati, ma sono stati anche utilizzati nuovi campioni di vino con estrazione effettuata al momento della prova.

3.2.6. Preparazione del campione

Il primo step da effettuare per verificare il metodo, è stata quella di l'estrazione del DNA dai nuovi campioni in modo da avere il campione pronto per poter essere processato in qPCR.

L' estrazione del DNA è avvenuta utiizzando il kit Simplex Easy Wine, la cui composizione è stata descritta nella sezione dei reagent, secondo i seguenti passaggi:

- Centrifugare tutti i reagenti a 9000 giri per circa 30 secondi.
- Miscelare il campione di vino e trasferirne 1 mL in un tubo da 1.5 ml. Quindi aggiungere 20 µl di standard interno a 5×10^5 UFC/ml.
- Centrifugare per 5 minuti a 6000 giri avendo cura di posizionare sempre i tubi in posizioni bilanciate e tutti con l'apertura verso l'interno della centrifuga (*Fig. 3.5*) in modo da rendere immediata l'identificazione del pellet rispetto al surnatante.

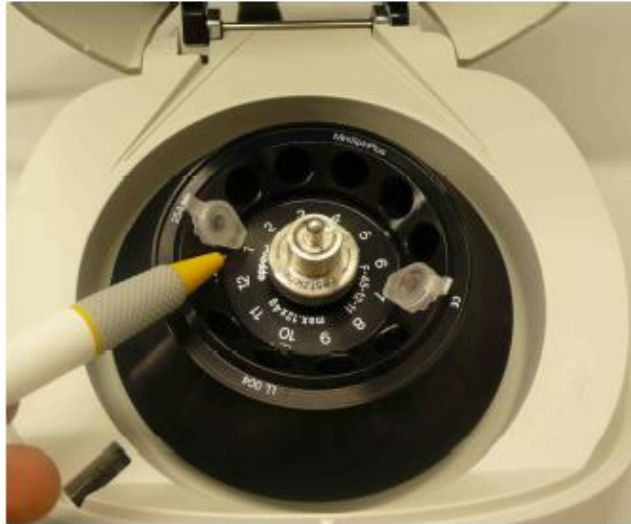


Figura 3.5: Metodo di posizionamento delle micropipette.

- Con una micropipetta asportare tutto il surnatante, aspirando dal lato opposto del pellet, in modo da non prelevare.
- Aggiungere 100 μ L di soluzione di lavaggio e risospendere, mediante vortex, il pellet.
- Centrifugare per 5 minuti a 6000 giri.
- Asportare tutto il surnatante. Se il pellet presenta ancora colorazione rossa, ripetere il lavaggio per una o due volte.
- Aggiungere 100 μ L di soluzione Easy Reagent Wine e risospendere, mediante vortex, il pellet.
- Aggiungere 3 μ L di Lyticase e agitare.
- Incubare in termomixer per 15 minuti a 37°C. In questa fase, disporre un coperchio pesante per evitare l'apertura dei tubi.
- Incubare in termomixer per 10 minuti a 95°C.
- Centrifugare per 5 minuti a 12000 giri.
- Trasferire il surnatante (contenente il DNA) in un nuovo tubo.

Una volta avvenuta l'estrazione, il DNA estratto deve essere conservato a:

- T° ambiente: se la corsa avviene subito dopo l'estrazione
- +4°C: se la corsa avviene in giornata
- -18°C: se la corsa avviene nei giorni successivi.

3.2.7. Procedimento per la qPCR

Per ogni campione di vino, prevedere 2 pozzetti in una piastra. da inserire successivamente nella PCR, con i primer Brett rad3/4 e 2 pozzetti di standard interno con i primer YAL.

Preparare inoltre un controllo positivo con il DNA di *Brettanomyces bruxellensis*. Per preparare il controllo positivo aggiungere 5 µL di soluzione madre del ceppo in un volume finale di reazione di 25 µL.

In base al numero dei campioni, il numero di pozzetti e la quantità di ogni componente della miscela varia:

$$n. \text{ pozzetti Brett} = n. \text{ pozzetti YAL} = 2 \times n. \text{ campioni} + 2$$

- Togliere le soluzioni dei primer Brett 4 µM e i primer YAL 4 µM dal congelatore e anche il reagente SYBR GREEN.
- Preparare una miscela Brett e una YAL secondo il numero di campioni (Tab.3.2)

Numero di campioni	1
Numero di pozzetti	4
Acqua a 18 MΩ	26,3 µL
SsoAdvanced SYBR GREEN	65.6 µL
Miscela primer 4 µM	13.1 µL

Tabella 3.2: Composizione delle miscele Brett e YAL.

- Deposare sul fondo di ogni pozzetto 20 µL di miscela

- Aggiungere 5 µL di soluzione di DNA omogeneizzata mediante agitatore automatico, o 5 µL di acqua per i controlli negativi
- Caricare la piastra nello strumento per effettuare la qPCR.

Il programma di amplificazione per la PCR è:

	Tempo (sec):	Temperatura (°C)
Fase d	180	95
Denaturazione		
Cicli con le temperature:	30	95
	10	64.6

La curva di fusione viene determinata a partire da 90 °C diminuendo di 0.5 °C ogni 10 secondi.

3.2.8. Costruzione Retta Standard

Requisito fondamentale per poter procedere con l'analisi, e per poter valutare i risultati ottenuti, è la costruzione della retta di taratura, ovvero una retta che ci permette di verificare lo stato di taratura, quindi di prestazione, dello strumento. Per prima cosa, è stata preparata una soluzione madre. Questa soluzione madre è stata ottenuta a partire da un ceppo puro di *Brettanomyces bruxellensis* fornitoci dal CRA-ENO di Asti, Centro di Ricerca per l'Enologia.

Mediante l'utilizzo di un'ansa è stata prelevata una piccola quantità del lievito e trasferita nella matrice di riferimento, il vino.

È stato deciso di utilizzare il vino anche per la costruzione della retta di taratura in quanto sarebbe stato più preciso e ottimale costruire una retta tenendo conto anche delle variabili intrinseche del vino, variabili che peraltro non sono presenti in acqua ultrapura.

Dopo 48 ore è stata misurata la DO della diluizione 1:10 della soluzione madre:

$$DO_{600} = 0,869$$

e sapendo che

$$DO_{600} = 1$$

significa avere una concentrazione di lievito pari a

$$1 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

allora una densità ottica di 0,87 equivale ad avere

$$8,69 \times 10^6 \text{ UFC/mL.}$$

A questo punto, per mezzo di una camera di Thoma si è effettuata la conta.
 È stata effettuata la conta di 5 quadrati piccoli per almeno 8 dei quadrati grandi per ognuna delle due camere presenti.

	1	2	3	4	5	TOT
I	4	3	6	4	3	20
II	7	4	7	3	5	26
III	1	7	6	5	4	23
IV	3	4	4	4	4	20
V	4	5	7	5	3	24
VI	4	3	6	3	5	21
VII	4	4	6	5	6	25
VII	5	7	3	4	3	22
TOT						181

Quindi, nella prima camera contata risultano esserci $1,81 \times 10^7$ UFC/ml.

	1	2	3	4	5	TOT
I	5	4	4	9	4	26
II	5	2	7	4	4	22
III	4	3	6	3	4	20
IV	6	6	6	3	3	24
V	7	2	4	3	2	18
VI	6	5	5	2	6	24
VII	3	3	5	5	6	22
VII	4	3	4	4	2	17
TOT						173

Nella seconda camera di conta risultano esserci $1,73 \times 10^7$ UFC/mL.

È stata quindi effettuata la media tra i due valori trovati:

$$X = \frac{(1,73 + 1,81)}{2} \times 10^7$$

$$X = 1,77 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

Quest'ultimo valore è il valore di partenza per la diluizione della soluzione madre che permetterà di ricavare le concentrazioni per le soluzioni che andranno a essere gli standard.

Sono state fatte diverse diluizioni (tab. 3.3) per raggiungere diverse concentrazioni comprese tra $3,5 \times 10^5$ e 3 UFC/mL.

La prima diluizione è stata 1:5, mentre le seguenti 1 : 10.

Dalla soluzione madre, $1,77 \times 10^7$ UFC/mL, è stata effettuata una diluizione 1:10 in modo da ottenere la concentrazione $1,77 \times 10^6$ UFC/ μ L composta da 1 ml di soluzione madre più 9 ml di ringer, in questo caso rappresentata dal vino.

Da qui, è stata effettuata una diluizione 1:5 per ottenere la prima concentrazione di riferimento per la retta standard **A** pari a $3,54 \times 10^5$ UFC/ μ L

La soluzione **B** $3,54 \times 10^4$ UFC/ μ L è stata ottenuta diluendo la A 1:10 e risulta formata da 1,5 mL di soluzione A più 13,5 mL di soluzione ringer.

La soluzione **C** $3,54 \times 10^3$ UFC/ μ L è stata ottenuta diluendo la B 1:10 e risulta formata da 1,5 mL di soluzione B più 13,5 mL di soluzione ringer.

La soluzione **D** $3,54 \times 10^2$ UFC/ μ L è stata ottenuta diluendo la C 1:10 e risulta formata da 1,5 mL di soluzione C più 13,5 mL di soluzione ringer.

La soluzione **E** $3,54 \times 10$ UFC/ μ L è stata ottenuta diluendo la D 1:10 e risulta formata da 1,5 mL di soluzione D più 13,5 mL di soluzione ringer.

La soluzione F invece è rappresentata da soluzione ringer senza la presenza del ceppo.

Soluzione	Concentrazione
A	$3,54 \times 10^5$ UFC/ μ L
B	$3,54 \times 10^4$ UFC/ μ L
C	$3,54 \times 10^3$ UFC/ μ L
D	$3,54 \times 10^2$ UFC/ μ L
E	$3,54 \times 10$ UFC/ μ L
F	0 UFC/ μ L

Tabella 3.3: Concentrazioni delle soluzioni standard.

3.3. *Analisi Sensoriale: metodo dell Test a scelta forzata*

Un bicchiere, perché sia adatto all'assaggio, deve avere determinate caratteristiche:

- Deve essere di vetro incolore, senza striature, venature o bolle di sorta nel vetro;
- La forma migliore è quella a calice affinché si possa prendere per il gambo senza toccare con la mano la parte del bicchiere contenente il vino.
- È importante anche che il recipiente abbia la forma di una mezza sfera, o di un tulipano in modo da evitare che agitando il vino questo esca fuori dal bicchiere e per ottenere che le parti odorose che si volatilizzano rimangano rinchiusi nella parte vuota del bicchiere.

Inoltre, il bicchiere per l'assaggio deve essere non troppo piccolo e di vetro sottilissimo per permettere al degustatore di giudicare la trasparenza, la chiarezza e il colore di un vino. Al contrario, un bicchiere di grandi dimensioni e sfaccettato non è adatto come quello descritto sopra poiché danno al vino un'immagine surreale.

Il bicchiere, come venne sottolineato nel XIX secolo, svolge un ruolo determinante e fondamentale nel processo di valutazione di un vino. Per questa ragione, L'Organizzazione Internazionale di Normalizzazione (ISO) ha proposto un apposito bicchiere e ne ha codificato le caratteristiche,

La caratteristica fondamentale di questo bicchiere detto tipo ISO (Fig.3.6), consiste nel fatto che esso può essere utilizzato per tutti i vini, bianchi, rossi o rosati, e per l'esame di tutte le componenti sensoriali: visiva, olfattiva e gustativa.

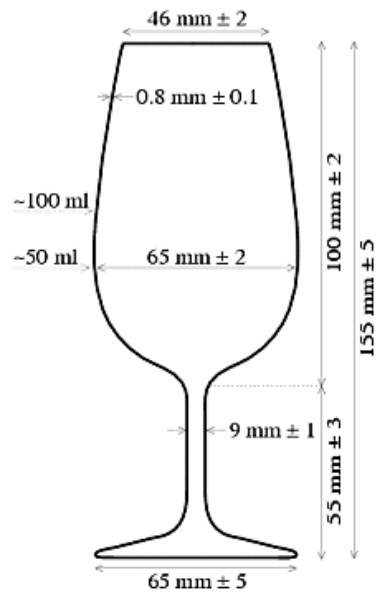


Figura 3.6: Bicchiere ISO

L'altezza totale è circa 15 cm e contiene attorno ai 200 ml di vino, anche se la quantità di liquido da versare sarà intorno ai 50-60 mL.

Oltre al bicchiere, anche la sala degustazione deve avere delle determinate caratteristiche.

Essa deve rappresentare un luogo di raccoglimento e di concentrazione.

La sala degustazione deve, quindi essere concepita in modo da permettere di eseguire le analisi sensoriali in condizioni note e controllate, così come sono descritte nella norma ISO 8589. L'accesso deve essere controllato e la pavimentazione facile da pulire, il soffitto e le cabine di degustazione devono essere di colore neutro e chiaro.

La sala deve essere dotata di aria condizionata, di regolazione igrometrica e di un sistema di ricircolo dell'aria. Si deve, quindi, poter controllare l'andamento della temperatura e, prima di ogni test o assaggio, bisogna verificare che questi criteri siano rispettati.

La temperatura dovrebbe aggirarsi intorno ai 20-22 °C e l'umidità relativa tra il 60 e l'85%.

L'illuminazione dovrà essere diffusa e uniforme, senza portare alla formazione di ombre e senza essere eccessiva (Ubigli, 2009).

Infine, oltre al bicchiere e alla sala degustazione, anche il panel, ovvero il gruppo di assaggio, deve essere formato da persone reclutate e precedentemente sottoposte a un percorso di formazione, addestramento e regolari verifiche.

Il panel è regolato dal leader del panel che ha il compito di selezionare e mantenere addestrati ed allenati i degustatori in base alle normative, soprattutto le normative ISO.

È quindi indispensabile che i panelisti abbiano una formazione teorica di base riguardante i concetti fondamentali inerenti alla degustazione. In seguito alla formazione teorica, è necessario eseguire numerosi test affinché gli assaggiatori riescano a:

- comprendere i problemi specifici posti dall'assaggio dei vini,
- rispondere in maniera adeguata ai questionari,
- essere in grado di descrivere le sensazioni e
- apprendere e riconoscere i diversi stimoli e le diverse sensazioni.

Il test effettuato in Sinergo è un test di tipo discriminatorio qualitativo a scelta obbligata.

Questo significa che per ogni domanda, il degustatore trovava davanti a sé tre campioni, due uguali e uno diverso, e doveva indicarne obbligatoriamente uno nella risposta.

Il risultato dato dalla risposta è un risultato binario:

- risposta esatta -> 1
- risposta errata -> 0

Nel test da noi effettuato, il campione diverso era quello che conteneva il 4-etilfenolo e che quindi presentava le caratteristiche del "Brett Character".

La domanda del test diceva "Esamina olfattivamente i campioni nell'ordine indicato, e segnala il campione diverso".

Il test è stato effettuato su diverse tipologie di vini, bianchi e rossi, che, presentando diverse caratteristiche olfattive rendevano più o meno difficile il riconoscimento del campione con il difetto.

I vini presi in analisi sono stati:

- vino rosso generico
- Barbera d'Asti

- Barbera Superiore
- Barolo
- Dolcetto
- Vino bianco generico
- Moscato
- Gavi
- Sauvignon.

Prima di inserire il 4-etilfenolo nei campioni, è stata effettuata l'analisi dei fenoli volatili in modo da valutare quanto composto mettere.

L'analisi dei fenoli volatili ha permesso di verificare la concentrazione iniziale di essi all'interno dei vini; questa è rappresentata nella tabella n. 3.4:

arietà di vino	[4-etilfenolo] _i
Barbera d'Asti	Assente
Dolcetto	Assente
Barolo	91 µg/L
Barbera Superiore	50 µg/L
Vino rosso generico	75 µg/L
Vini bianchi	Assente

Tabella 3.4: Concentrazioni iniziali del 4-etilfenolo nei vini.

Per ogni tipologia di vino sono state preparate sei triplete, ognuna contenente un solo campione con il difetto olfattivo in concentrazione crescente, tenendo anche conto della concentrazione iniziale di etilfenolo.

Le concentrazioni sono state aggiunte secondo un fattore 1,25.

La prima quantità aggiunta è pari a 281,6 µg/L; questa è stata moltiplicata per 1,25 ottenendo la seconda e così via (Tab. 3.5).

	[4-etilfenolo] ₁	[4-etilfenolo] ₂	[4-etilfenolo] ₃	[4-etilfenolo] ₄	[4-etilfenolo] ₅	[4-etilfenolo] ₆
Barbera AT	281,6	352	440	550	688	860
Dolcetto	281,6	352	440	550	688	860
Barolo	373	443	531	641	779	951
Barbera SUP	332	402	490	600	738	910
Vino rosso	357	427	515	625	763	935
Vini bianchi	104	130	163	203	255	319

Tabella 3.5: Concentrazioni di 4-etilfenolo aggiunte nelle varietà di vino.

Le concentrazioni variano in quanto a quelle inserite sono state sommate quelle iniziali.

Le varietà di vino erano suddivise in 5 postazioni, tutte costituite da due tipologie di vino differenti tranne la seconda postazione.

Le triplette erano così posizionate (Fig. 3.7, 3.8, 3.9):

POSTAZIONE 1							
0	1	0		0	0	1	
0	1	0		1	0	0	
1	0	0		0	0	1	
	1	0	0		0	0	1
	0	0	1		0	1	0
	0	1	0		1	0	0

Barbera d'Asti
 Vino Rosso Base

POSTAZIONE 2					
			0	1	0
1	0	0			
			0	0	1
0	1	0			
			1	0	0
1	0	0			

Barolo

Figura 3.7: Postazione delle triplette delle diverse varietà di vino.

POSTAZIONE 3								
0	1	0			0	0	1	
1	0	0			0	1	0	
0	1	0			1	0	0	
	1	0	0			0	0	1
	0	1	0			0	0	1
	1	0	0			0	1	0

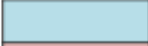

 Barbera Superiore
 Dolcetto

Figura 3.8: Postazione delle triplete delle diverse varietà di vino.

POSTAZIONE 4								
0	0	1			0	1	0	
1	0	0			0	1	0	
0	1	0			1	0	0	
	1	0	0			0	1	0
	0	1	0			0	0	1
	1	0	0			1	0	0

 Moscato
 Vino Bianco Base

POSTAZIONE 5								
0	1	0			1	0	0	
1	0	0			0	0	1	
0	1	0			0	0	1	
	0	0	1			0	1	0
	0	1	0			0	0	1
	1	0	0			1	0	0


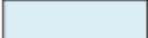
 Sauvignon
 Gavi

Figura 3.9: Postazione delle triplete delle diverse varietà di vino.

dove il valore "0" corrisponde al campione privo di difetto, quindi alla risposta errata, mentre il valore "1" corrisponde al campione contenente il 4-etilfenolo e, quindi la risposta corretta.

Le risposte di ogni singolo degustatore vengono registrate mediante un software e in seguito analizzate, come vedremo nei prossimi capitoli.

4. Risultati

4.1 Risultati Metodo OIV

I parametri che verranno discussi per quanto riguarda la validazione del metodo utilizzato per la quantificazione di *Brettanomyces* sono:

- la linearità,
- la ripetibilità,
- la riproducibilità,
- il limite di rilevazione e
- e il limite di quantificazione.

Nei parametri discussi e analizzati non si inserisce la specificità, ovvero la capacità di misurare solo il composto ricercato, in quanto il metodo è già specifico, sia per il composto da trovare, *Brettanomyces*, sia per la matrice da analizzare, il vino.

4.1.1 Linearità

La linearità di un metodo è la sua capacità, entro un certo intervallo, di fornire un valore d'informazione oppure risultati proporzionali alla quantità di analiti da dosare nel materiale di prova.

Lo studio di linearità permette di definire un campo di linearità e di convalidarlo. Questo studio risulta fattibile quando il laboratorio può disporre di materiali di riferimento stabili i cui valori accettati siano stati acquisiti con certezza; in teoria questi valori dovrebbero avere un'incertezza uguale a 0.

Potrà quindi trattarsi di materiali di riferimento interni, dosati con materiale tarato, di vini o di mosti la cui quantità sia data dalla media di almeno 3 ripetizioni del metodo di riferimento, di materiali di riferimento esterni o di materiali di riferimento esterni certificati.

Il protocollo di base suggerisce di operare con un numero n di materiali di riferimento che dovrà essere superiore a 3, nel caso in esame sono stati utilizzati 5 materiali di riferimento.

I materiali di riferimento sono stati misurati p volte, dove p dovrà essere superiore, anche in questo caso, a 3.

I risultati vengono poi rappresentati in una tavola come la seguente (Fig. 4.1):

Materiale x di riferimento	Valore accettato del materiale di riferimento	Valori misurati				
		Replica1	...	Replica j	...	Replica p
1	x_1	y_{11}	...	y_{1j}	...	y_{1p}
...
i	x_i	y_{i1}	...	y_{ij}	...	y_{ip}
...
n	x_n	y_{n1}	...	y_{nj}	...	y_{np}

Figura 4.1: Tabella di riferimento.

I risultati si possono presentare ed analizzare graficamente.

La rappresentazione scelta è una rappresentazione dei valori misurati in funzione dei valori accettati dei materiali di riferimento.

Utilizzando direttamente il software strumentale, a partire dai dati ottenuti viene costruita la retta di taratura e definito un modello di regressione lineare:

$$y = mx + b$$

Lo strumento fornisce direttamente i valori di pendenza (inclinazione della retta) ed intercetta (ordinata all'origine della retta) e il fattore di correlazione.

Nello studio effettuato in laboratorio, sono state create due diverse rette per lo studio di linearità:

- la prima teneva conto solo della concentrazione del lievito trovata
- la seconda vede riportare sul grafico valori che derivano dal rapporto tra la concentrazione del lievito e la concentrazione dello standard interno inserito durante la fase di estrazione.

La prima retta è stata ottenuta con i seguenti valori (Tab. 4.1), rilevati dopo aver eseguito la RT-PCR. I valori ottenuti derivano dalle soluzioni ottenute in seguito all'inoculo di *Brettanomyces* nel vino (Rif. Capitolo 3):

Materiale di riferimento	Valore accettato	Valori misurati	LOG[CT]
STD	CONC	CT	LOG
1	354000	19,80	5,5E+00
	354000	19,59	5,5E+00
	354000	20,17	5,5E+00
	354000	20,41	5,5E+00
2	35400	23,21	4,5E+00
	35400	23,26	4,5E+00
	35400	23,60	4,5E+00
	35400	23,48	4,5E+00
	35400	23,56	4,5E+00
	35400	23,57	4,5E+00
	35400	23,50	4,5E+00
	35400	23,49	4,5E+00
	35400	23,23	4,5E+00
	35400	23,78	4,5E+00
	35400	23,78	4,5E+00
3	3540	27,17	3,5E+00
	3540	27,62	3,5E+00
	3540	27,11	3,5E+00
	3540	26,38	3,5E+00
4	354	31,48	2,5E+00
	354	30,15	2,5E+00
	354	30,15	2,5E+00
	354	31,05	2,5E+00
	354	29,81	2,5E+00
	354	30,15	2,5E+00
	354	30,23	2,5E+00
	354	29,71	2,5E+00
	354	30,84	2,5E+00
	354	31,22	2,5E+00
5	35,4	33,77	1,5E+00
	35,4	34,94	1,5E+00
	35,4	33,17	1,5E+00
	35,4	33,48	1,5E+00
	35,4	32,70	1,5E+00
	35,4	34,66	1,5E+00
	35,4	34,07	1,5E+00
	35,4	32,32	1,5E+00
	35,4	32,30	1,5E+00
35,4	33,47	1,5E+00	

Tabella 4.1: Valori di riferimento per la retta standard (Fig. 4.2).

La retta trovata è riportata in Fig. 4.2:

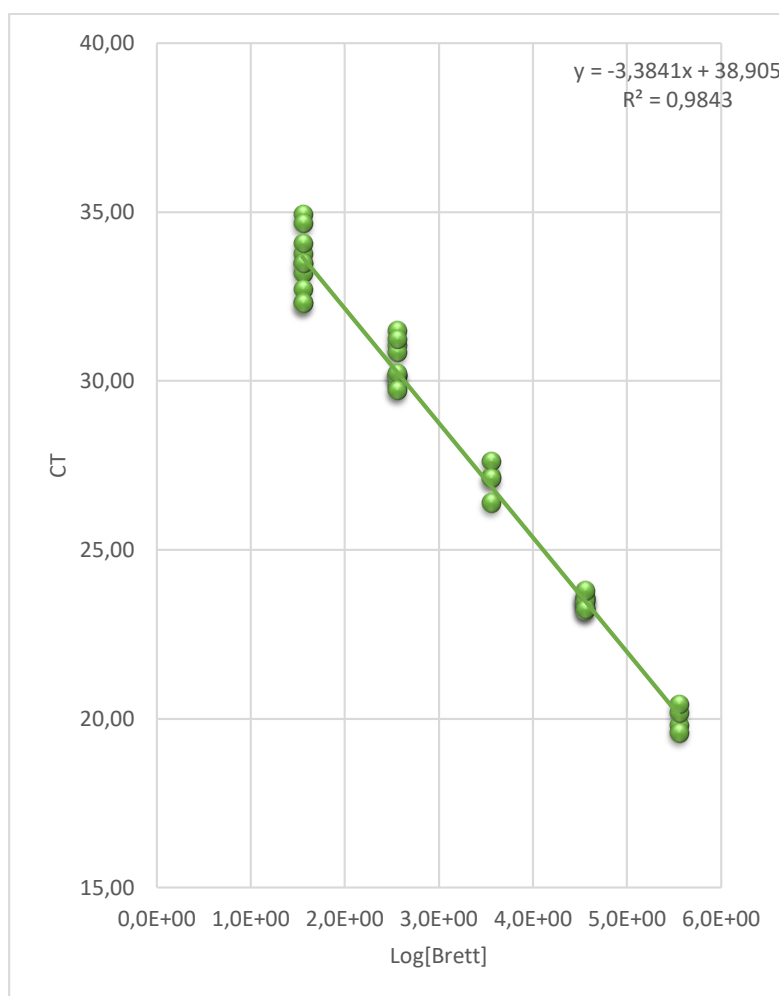


Figura 4.2: Retta standard.

Successivamente, è stata predisposta la costruzione della retta di taratura derivata dai rapporti tra il lievito e lo standard interno.

I risultati da cui si è partiti per la costruzione della retta sono riportati in Tab. 4.2.

Per questa retta, sono stati presi in considerazione i valori trovati sia dello standard interno ISTD sia del lievito; questo perché i valori dei rapporti sono meno dispersivi tenendo conto anche dell'estrazione del DNA.

CONC ISTD	CT BRETT	CT ISTD	LOG (CT BRETT/CT ISTD)	LOG (CONC BRET/CONC ISTD)
585500	19,80	25,95	-0,12	-2,2E-01
585500	19,59	25,90	-0,12	-2,2E-01
585500	23,07	29,05	-0,10	-2,2E-01
585500	21,51	28,01	-0,11	-2,2E-01
585500	23,21	26,30	-0,05	-1,2E+00
585500	23,26	26,24	-0,05	-1,2E+00
585500	23,57	26,79	-0,06	-1,2E+00
585500	23,50	26,86	-0,06	-1,2E+00
585500	27,17	27,05	0,00	-2,2E+00
585500	27,62	27,58	0,00	-2,2E+00
585500	27,11	27,03	0,00	-2,2E+00
585500	26,38	26,70	-0,01	-2,2E+00
585500	31,48	27,30	0,06	-3,2E+00
585500	30,15	26,58	0,05	-3,2E+00
585500	30,15	26,59	0,05	-3,2E+00
585500	31,05	28,11	0,04	-3,2E+00
585500	33,77	26,30	0,11	-4,2E+00
585500	34,94	26,80	0,12	-4,2E+00
585500	33,17	26,16	0,10	-4,2E+00
585500	36,48	28,41	0,11	-4,2E+00

Tabella 4.2: Valori di riferimento per la retta standard (Fig. 4.3)

La retta ottenuta da questi risultati è raffigurata in figura 4.3:

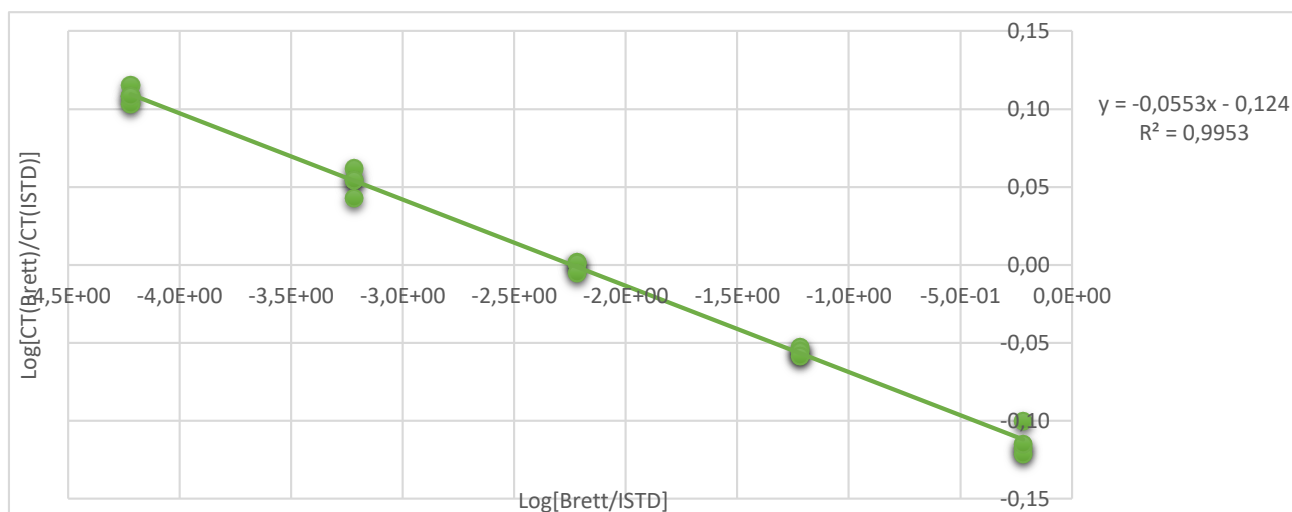


Figura 4.3: Retta standard dei rapporti Brett/ISTD.

Abbiamo considerato come retta di taratura di riferimento quest'ultima, in quanto, oltre ad avere i valori meno dispersi, tiene conto anche dell'estrazione del lievito e dello standard interno che risulterà essere sempre proporzionata.

In secondo luogo, anche il valore del coefficiente di correlazione R^2 che deve avere valori il più vicino possibile a 1, risulta essere più adeguato, infatti ha, nel secondo caso, un valore di 0,9953 rispetto a quello della prima retta che è 0,9843.

4.1.2 Ripetibilità e Riproducibilità

La ripetibilità è la concordanza tra i risultati di analisi indipendenti tra loro, ottenuti con il metodo considerato su uno stesso vino, nello stesso laboratorio, con lo stesso operatore che utilizza lo stesso materiale, in un breve intervallo di tempo. Queste condizioni sperimentali sono definite condizioni di ripetibilità.

Il valore di ripetibilità r è il valore al di sotto del quale si può stimare che si situi la differenza assoluta tra due risultati di un'analisi unica, ottenuti nelle condizioni di ripetibilità sopra definite, con un livello di attendibilità del 95%.

La deviazione standard di ripetibilità S_r è la deviazione standard dei risultati ottenuti nelle condizioni di ripetibilità. È un parametro della dispersione dei risultati, ottenuti in determinate condizioni.

Lo studio di ripetibilità si può applicare a priori e senza difficoltà a metodi quantitativi.

Il numero di materiali di prova potrà essere variabile in funzione del numero di ripetizioni.

La ripetibilità rimane un caso particolare di calcolo della fedeltà

$$S_v = \sqrt{\text{Var}(\bar{x}_j) + \frac{\text{Var}(\text{ripet})}{2}}$$

La parte

$$\text{Var}(\text{ripet})$$

è naturalmente uguale a 0 (una sola misura ad ogni replica), quindi il calcolo si riassume determinando

$$S_r = \sqrt{\text{Var}(x_{ij})}$$

che equivale a dire:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{p_i} (\bar{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N-n}}$$

La ripetibilità si calcola mediante la formula

$$R = 2\sqrt{2} * S_r$$

Per valutare le prestazioni di un metodo è necessario confrontare la sua ripetibilità con quella di un metodo di riferimento, ovvero la deviazione standard di ripetibilità del metodo in analisi (S_r) e la S_r del metodo di riferimento.

Il confronto è diretto; se il valore di ripetibilità è inferiore o uguale a quello del metodo di riferimento, il risultato è favorevole. Se il valore è più alto, bisognerà applicare un test di Fischer-Snedecor per sapere se il valore sia significativamente superiore.

Invece, la riproducibilità è la concordanza tra i risultati di analisi ottenuti con il metodo considerato su una stessa matrice, nello stesso laboratorio, con lo stesso operatore o operatori diversi che utilizzano curve di calibratura diverse in giorni diversi.

Gli studi di riproducibilità si possono attuare se esiste almeno un materiale di prova stabile nel tempo.

Il laboratorio sceglierà uno o più materiali di prova stabili. È consigliabile un numero di almeno 5 repliche per ogni materiale di prova essendo 10 il numero totale minimo di repliche.

Il calcolo della precisione si applica integralmente per il calcolo di riproducibilità, integrando, $Var(répet)$ se le misure sono state realizzate in doppio.

La riproducibilità si calcola secondo la formula

$$R = 2\sqrt{2} * S_R$$

dove S_R è la deviazione standard di riproducibilità.

Il valore R significa che nel 95% dei casi, la deviazione tra due valori acquisiti in condizioni di riproducibilità sarà inferiore o uguale a R .

Anche per R, si va a valutare la deviazione standard di riproducibilità (S_R) e mediante confronto diretto si va a verificare che sia inferiore o uguale a quella del metodo di riferimento.

La riproducibilità e la ripetibilità sono state valutate e analizzate sia per livelli bassi di popolazione microbica all'interno del vino, sia per concentrazioni maggiori.

Per quanto riguarda lo studio effettuato su vino con livelli di popolazione microbica basse, pari a $35,4 \cdot 10$ UFC/mL, i risultati ottenuti sono stati i seguenti:

[35,4 * 10 UFC/mL]										
	Prove					Media giornaliera Valore dopo apporto	scarti tipo giornaliero	Varianza giornaliera		
	1	2	3	4	5					
Giorno 1	2,460735	2,64563	2,788294	2,480605	2,604266	2,596	0,133343	0,0177803		
Giorno 2	2,558435	2,788294	2,480605	2,604266	2,558435	2,598	0,115286	0,0132909		
= Media delle medie =						2,597				
Scarto tipo di ripetibilità (S_r) =							0,12464182			
Ripetibilità =							0,353		UFC/mL	
Scarto tipo delle medie =							0,001485668			
Varianza delle medie (Var_{medie}) =							2,20721E-06			

$SR = [Var_{medie} + (1-1/p) \cdot S_r^2]^{1/2} =$	0,111492936	Riproducibilità =	0,315 UFC/mL
--	-------------	--------------------------	---------------------

Per quanto riguarda lo studio effettuato su vino con livelli di popolazione microbica alte, quindi $35,4 \cdot 10^3$ UFC/mL, i risultati ottenuti sono stati i seguenti:

[35,4 * 1000 UFC/mL]										
	Prove					Media giornaliera Valore dopo apporto	scarti tipo giornaliero	Varianza giornaliera		
	1	2	3	4	5					
Giorno 1	4,370887	4,334631	4,412429	4,461392	4,49678	4,415	0,065673	0,0043129		
Giorno 2	4,455292	4,50767	4,472835	4,531589	4,575464	4,509	0,047752	0,0022802		
= Media delle medie =						4,462				
Scarto tipo di ripetibilità (S_r) =							0,05741584			
Ripetibilità =							0,162		UFC/mL	
Scarto tipo delle medie =							0,066005726			
Varianza delle medie (Var_{medie}) =							0,004356756			

$SR = [Var_{medie} + (1-1/p) \cdot S_r^2]^{1/2} =$	0,08363025	Riproducibilità =	0,237 UFC/mL
--	------------	--------------------------	---------------------

Mediante confronto diretto, possiamo affermare che sia per quanto riguarda i valori S_r che per quelli di S_R , sono stati ottenuti valori inferiori a quelli del metodo di riferimento:

	S_r	S_R
35,4*10 UFC/mL	0,12	0,11
Metodo di Riferimento	0,26	0,29
35,4*10³ UFC/mL	0,05	0,08
Metodo di Riferimento	0,25	0,41

4.1.3 Limite di Rilevazione (LOD) e Limite di Quantificazione (LOQ)

Si definisce *limite di quantificazione* (LOQ) la concentrazione minima di analita che può essere determinata con un livello di precisione accettabile.

Rappresenta un livello a cui è possibile realizzare la quantificazione, ma il grado di incertezza associato a questa misura quantitativa è estremamente alto; in questi casi, la variabilità è tale che il valore di concentrazione riscontrato è paragonabile al valore calcolato dell'incertezza.

Il *limite di rilevazione* (LOD) è la quantità minima del composto da dosare che è possibile rilevare, ma non necessariamente quantificata in modo esatto.

Il limite di rilevazione è un parametro delle prove limite e convenzionalmente viene calcolato come 1/3 del limite di quantificazione.

In questo caso, si è effettuata la verifica di un limite di quantificazione predeterminato. Questo approccio permette di convalidare un valore di quantificazione ottenuto con approccio statistico o empiricamente.

Questo metodo permette di verificare che un limite di quantificazione dato a priori è accettabile. È applicabile quando il laboratorio ha la capacità di disporre di

almeno 10 materiali di prova che comportano quantità di analiti conosciuti, quantità che si situano al livello del limite di quantificazione stimata.

Per arrivare alla valutazione del limite di quantificazione, sono necessari alcuni calcoli:

- Calcolo della media delle n misurazioni:

$$\bar{x}_{LQ} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- Calcolo della deviazione standard di n misurazioni:

$$S_{LQ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_{LQ})^2}{n-1}}$$

I valori ottenuti devono rispettare le due condizioni seguenti

- Assicurarsi che la grandezza media misurata non si differisca dal limite di quantificazione predeterminato LQ; se

$$\frac{|LQ - \bar{x}_{LQ}|}{\frac{S_{LQ}}{\sqrt{n}}} < 10 ;$$

allora il limite di quantificazione LQ è giudicato valido.

- Assicurarsi che il limite di quantificazione sia diverso da 0.

Se $3_{sLQ} < LOQ$ allora il limite di quantificazione è diverso da 0.

Il valore 3 corrisponde ad un valore di oscillazione della deviazione standard tenendo conto del rischio α e del rischio β per assicurarsi che LOQ sia diverso da 0. Questo porta a verificare che il coefficiente di variazione per LOQ sia inferiore al 30%.

In molti metodi analitici, il valore 3 è sostituito da un valore pari a 5, rendendo così il coefficiente di variazione per LOQ pari a 20%.

Per questo metodo, il laboratorio Sinergo ha ritenuto fosse accettabile anche un valore del rischio α e β inferiore, in quanto, le normative considerano dannoso *Brettanomyces* a valori uguali o superiori a 10^4 UFC/mL.

Il limite di quantificazione predeterminato prevede una concentrazione di *Brettanomyces* pari a 35,4 UFC/ml.

I valori ottenuti sono rappresentati qui di seguito (Fig. 4.4):

	[BRETT] = 35,4 UFC/ml					Media	Scarto tipo
	1	2	3	4	5		
Giorno 1	44,632	28,400	37,704	45,840	57,284		
Giorno 2	26,567	36,545	27,749	57,813	36,609		
	Media delle medie = Mm=					39,914	11,379

RISCHIO ALFA E BETA 3%

Livello di LOQ predefinito=	35,4
------------------------------------	-------------

1° verifica $(ASS(LQ-MEDIA(LQ))/(Stipo/RADQ(N)) < 10$
 2° verifica $3*DEVSTD < LQ$

1,254623889	<10
34,13622986	<LOQ

LIMITE DI QUANTIFICAZIONE = LOQ =	35,400	UG/ml
LIMITE DI RILEVABILITA' = LOD =	11,800	UG/ml

Figura 4.4: Calcoli LOQ e LOD.

4.1.4 Melt curve

Un altro parametro per verificare la corretta corsa della RT-PCR è il controllo della temperatura di fusione T_m di *Brettanomyces bruxellensis* e dello standard interno *Yarrowia lypolitica*.

La T_m di *Brettanomyces bruxellensis* deve essere $82\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ mentre quella dello standard interno $84\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

Se e soltanto se la T_m è accettabile, l'andamento esponenziale dell'amplificazione è corretto.

Per il ceppo in analisi, la *melt curve* e il *melt peak* sono riportati in figura 4.5:

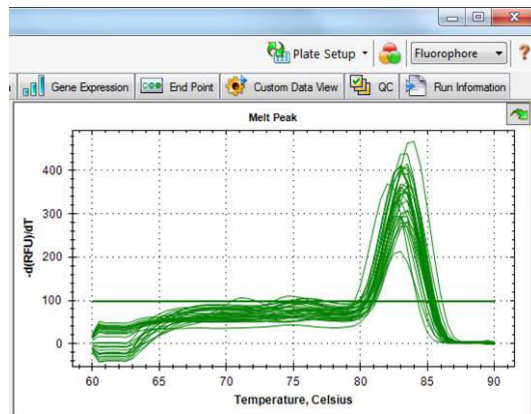


Figura 4.5: Melt curve e melt peak di *Brettanomyces*.

Per lo standard interno, la *melt curve* e il *melt peak* sono riportati in figura 4.6:

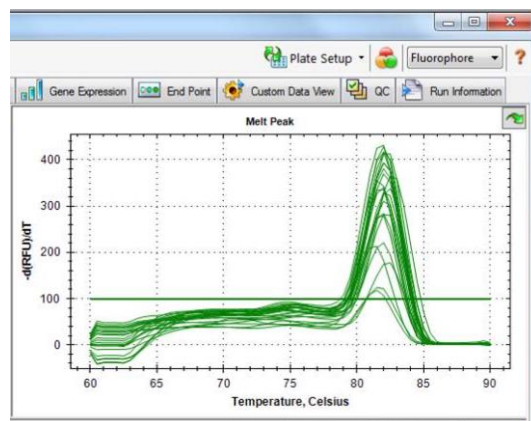


Figura 4.6: Melt curve e melt peak dello ISTD.

4.2 Determinazione della soglia di percezione del 4-etilfenolo

In un test di tipo discriminatorio, ovvero un test a triplice scelta forzata (3-AFC), tre alternative sono presentate contemporaneamente o sequenzialmente assieme allo stimolo di riferimento e il degustatore è forzato a scegliere quale alternativa differisce rispetto alle altre due.

Il risultato ottenuto è un risultato binario.

Il degustatore selezionerà il campione e verrà dato:

- punteggio uguale a 1 se la selezione è corretta
- punteggio uguale a 0 se la selezione non è corretta

Per ogni valutatore è stata determinata la media geometrica (BET) tra la massima concentrazione mancata e la successiva concentrazione più alta trovata.

Per ogni valore di BET è stato calcolato il corrispondente logaritmo in base 10.

In seguito, è stata effettuata la media dei valori dei logaritmi il cui valore ci ha permesso di fare l'antilogaritmo trovando il valore della soglia di percezione.

Questo percorso analitico è stato effettuato per diverse tipologie di vino, qui di seguito l'esempio riguardante un barbera d'Asti.

	VINO ROSSO							
	[4-etilfenolo] _i = 75							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	357	427	515	625	763	935	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 2	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 4	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 5	0	1	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 6	1	1	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 7	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 10	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 12	1	0	0	0	0	0	1045	3,02
Degustatore 13	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 14	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 16	0	0	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 17	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 18	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 20	1	1	0	1	0	1	845	2,93
Degustatore 21	1	1	1	0	1	1	691	2,84
Degustatore 22	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 24	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 25	0	1	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	319	2,50

$\sum \text{Log}_{10}$ 67,73

Media dei Log_{10} 2,60

Dev. Std di Log_{10} 0,151214954

$$y = 10^{2,60} \mathbf{398,11}$$

Nell'allegato sono contenuti i risultati completi delle prove per le altre tipologie di vino mentre di seguito sono riassunti i dati finali espressi in $\mu\text{g/L}$ ottenuti per ogni singola tipologia, raggruppati in due grafici (Grafico n. 4.1 e 4.2), uno per i vini rossi e uno per i bianchi.

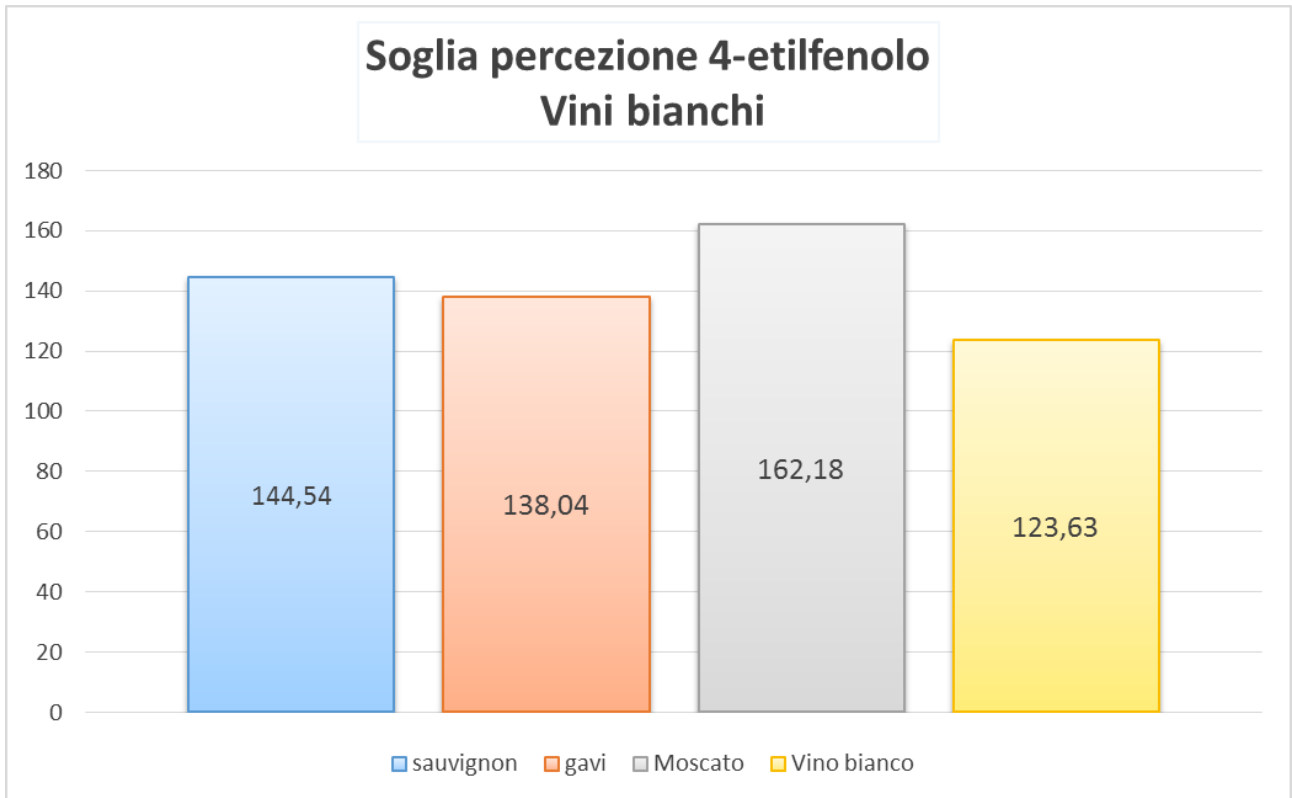


Grafico 4.1.: Soglia di percezione nei vini bianchi.

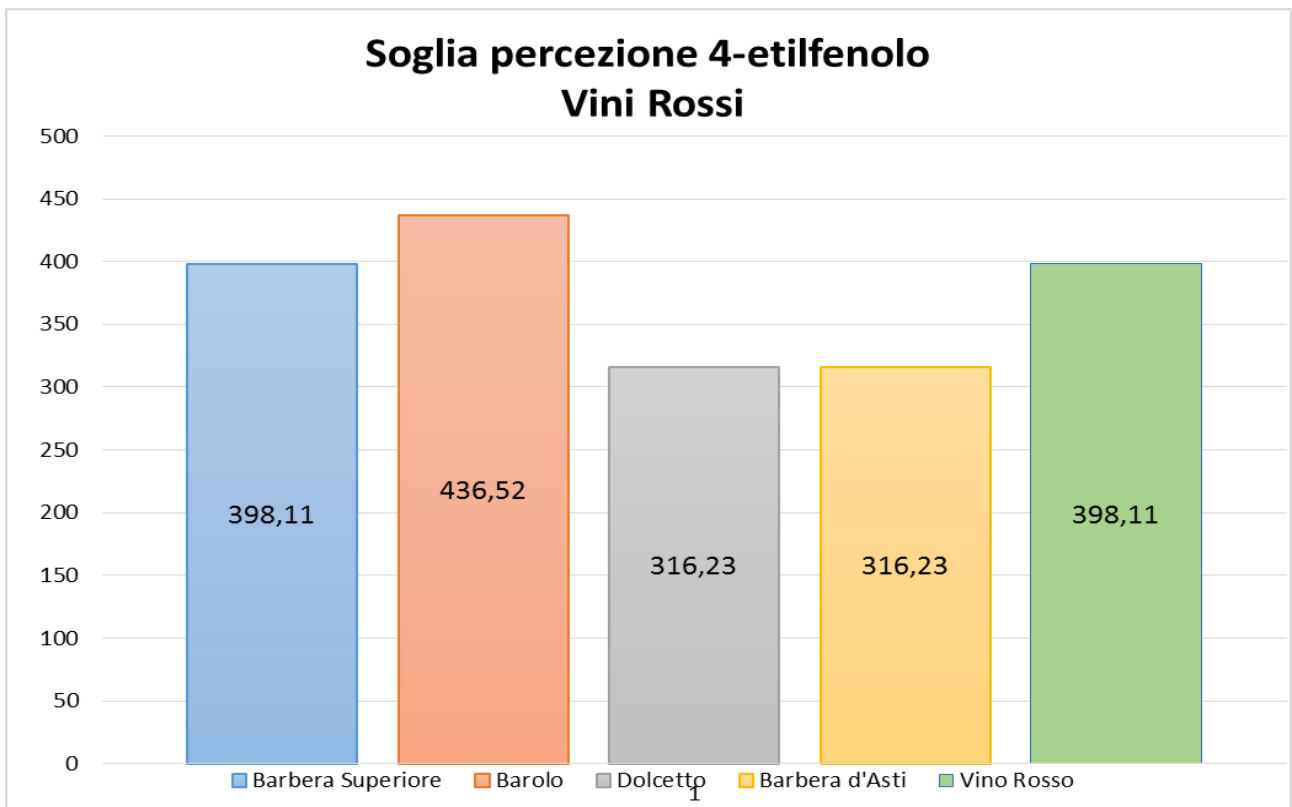


Grafico 4.2.: Soglia di percezione nei vini rossi.

5. Discussioni e Conclusioni

5.1. *Discussione Metodo OIV*

Il metodo di analisi per la quantificazione di *Brettanomyces bruxellensis* nel vino, precedentemente descritto, è stato validato con esito positivo ed è in corso la richiesta per ottenere la certificazione da parte dell'ente di accreditamento per il laboratorio.

Alla fine del processo di validazione, il metodo OIV-OENO 414-2011 risulta essere:

- *Lineare.*

La retta di taratura ottenuta risulta lineare nell'intervallo che va dall'LOQ con valore di circa 34 UFC/mL al valore di massima concentrazione di $35,4 \cdot 10^4$. Inoltre, il coefficiente di correlazione è molto vicino a 1 e superiore a 0,98.

- *Specifico.*

Il metodo risulta essere specifico a priori, senza necessità di test statistici, sia per il ceppo del lievito in analisi sia per la matrice.

- *Ripetibile.*

Il confronto diretto tra lo scarto di ripetibilità del metodo in analisi e quello del metodo di riferimento (OIV 414-2011) è positivo, ovvero quello di riferimento risulta più alto rispetto a quello del metodo in corso di validazione.

- *Riproducibile.*

Allo stesso modo, il confronto diretto avvenuto tra gli scarti di riproducibilità dei due metodi ci ha permesso di confermare la riproducibilità del metodo. Anche in questo caso, lo S_R del metodo in analisi risulta inferiore a quello del metodo di riferimento.

- *Conforme ai i livelli di LOQ e LOD previsti dalla metodica OIV di riferimento.*

LOQ è risultato inferiore al valore predefinito derivante dal metodo di riferimento e le due verifiche effettuate hanno rispettato i parametri.

- *Prestazione della corsa di amplificazione.*

A partire dalle *melt curve* e dai conseguenti *melt peak*, abbiamo potuto verificare che i prodotti di amplificazione siano quelli attesi.. È stata analizzata sia la T_m di *Brettanomyces* sia quella dello standard interno, *Yarrowia*. Entrambe le temperature di fusione hanno rispettato quelle attese per gli

ampliconi ottenuti e quindi confermare che l'amplificazione è avvenuta in modo corretto.

Alla fine del processo di validazione, il laboratorio è quindi in grado di utilizzare quotidianamente il metodo validato per determinare il livello di presenza di *Brettanomyces bruxellensis* nei vini, in relazione alle richieste dei propri clienti.

Attualmente, l'OIV non ha proposto nessun livello massimo per la concentrazione di *Brettanomyces* nei vini, ma di norma, un valore maggiore ma $10^2/10^3$ UFC/mL risulta essere dannoso per il vino.

Valori uguali o superiori a quello sopra citato sono infatti favorevoli alla produzione di 4-etilfenolo per opera del lievito che si accumula nel vino.

Il modo migliore per evitare la contaminazione da parte di *Brettanomyces* è operare in modo preventivo.

Come si può prevenire?

Un primo approccio di prevenzione consiste nella selezione di uve sane; questo potrebbe svolgere un ruolo nella diminuzione del rischio da parte di *Brettanomyces* la cui presenza è possibile sulle bucce di uve ammuffite (OIV, 2014).

Un secondo approccio prevede interventi da attuare direttamente in cantina: l'utilizzo di norme igieniche e di sanificazione adeguate, il controllo dei livelli di solfitazione e di temperatura. Elevate temperature e macerazione prefermentativa a caldo consentono infatti l'inattivazione del lievito (OIV, 2014).

Un terzo approccio è il controllo delle varie fasi di fermentazione:

- Fermentazione alcolica.

Durante la fermentazione alcolica, la diversità microbica diminuisce e la specie *Saccharomyces cerevisiae* diviene dominante. Tuttavia, *Brettanomyces*, a causa della resistenza all'etanolo e del ridotto fabbisogno di nutrienti che lo contraddistinguono, è in grado di svilupparsi non appena la fermentazione alcolica rallenta o si arresta. Si devono di conseguenza attuare le pratiche enologiche comunemente raccomandate per la gestione efficace della fermentazione, in particolare l'inoculo dei mosti facendo uso di lieviti selezionati conduce a una fermentazione alcolica più affidabile. Nel caso in cui la fermentazione si arresti, si raccomanda di attuare, al più presto, una procedura per la ripresa della stessa.

Gli zuccheri residui (principalmente glucosio e fruttosio) sono i substrati per la crescita dei *Brettanomyces*. Secondo una classificazione dei vini in base alla quantità zuccherina presente in essi, i vini sono di solito considerati secchi quando il livello di zuccheri è inferiore a 4 g/L. Invece, una concentrazione di 0,3 g/L di zuccheri residui è sufficiente a sviluppare una biomassa di *Brettanomyces* in grado di produrre fenoli volatili per più di 1000 µg/L. Al fine di evitare rischi nella fermentazione, i nutrienti utili per i lieviti (di cui potrebbe beneficiare anche *Brettanomyces*) vanno aggiunti esclusivamente se realmente necessari (OIV, 2014).

- Fase tra la fermentazione alcolica e quella malolattica.

Una volta completata la fermentazione alcolica, le condizioni favoriscono non solo i batteri lattici, ma anche i *Brettanomyces*, sebbene la loro proliferazione rimanga lenta. È importante monitorare la popolazione di *Brettanomyces* poiché l'ambiente è relativamente povero di microrganismi. I fattori che favoriscono la crescita dei *Brettanomyces* in questa fase sono: la macerazione finale a caldo (40-45 °C), la micro-ossigenazione, il rilascio di zuccheri nel caso di uve non pigiate. Il coinoculo dei lieviti selezionati e dei batteri lattici selezionati può tuttavia contribuire a ridurre la fase di latenza tra fermentazione alcolica e malolattica e, quindi, lo sviluppo dei *Brettanomyces* (OIV, 2014).

- Fermentazione Malolattica.

I parametri fisico-chimici (pH, temperatura, SO₂ totale) influenzano la progressione della fermentazione malolattica. Se questa viene ritardata, il rischio di produzione di fenoli volatili aumenta dato che *Brettanomyces* può trarre beneficio da questo lasso di tempo per moltiplicarsi. L'uso di colture starter di batteri malolattici è un buon modo per contrastare lo sviluppo di *Brettanomyces*. In alcuni studi hanno dimostrato che il coinoculo o l'inoculo sequenziale precoce impediscono la contaminazione da *Brettanomyces*, riducendo la fase di latenza tra la fermentazione alcolica e la fermentazione malolattica. Dopo la fermentazione malolattica, si consiglia di eliminare tutti i microrganismi mediante l'aggiunta di SO₂, che può essere utilizzata da sola o in combinazione con il dimetildicarbonato per ottenere un'azione sinergica (Renouf et al. 2008). Queste quantità devono essere aggiustate in base al pH del vino (OIV, 2014).

5.2. Valutazioni della soglia di percezione del 4-etilfenolo

Il panel è stato formato da persone reclutate e formate tra i membri del laboratorio o tra i degustatori professionisti esterni. I candidati volontari che intendevano entrare a far parte di questo panel sono stati sottoposti a una selezione e quelli che l'hanno superata, hanno formato il panel di giudici qualificati.

Le soglie di percezione della bibliografia (Boulton, 1996) sono

Vini bianchi (BIBLIOGRAFIA)
140 µ/l
Vini rossi (BIBLIOGRAFIA)
400 µ/l

Le analisi dei risultati hanno confermato quasi sempre le soglie di percezione che la bibliografia ci fornisce.

Le soglie di percezione trovate in seguito all'analisi delle risposte ricevute dal panel, invece, sono le seguenti:

- Sauvignon 144,54 µg/L
- Gavi 138,04 µg/L
- Moscato 162,18 µg/L
- Vino bianco generico 123,63 µg/L
- Barbera Superiore 398,11 µg/L
- Barbera d'Asti 316,23 µg/L
- Barolo 436,52 µg/L
- Dolcetto 316,23 µg/L
- Vino rosso generico 398,11 µg/L

Il valore più alto di soglia si riferisce al Barolo, un vino che, per le sue specifiche caratteristiche organolettiche, originali, rende più difficile la percezione del carattere Brett; mentre con il Barbera d'Asti e con il Dolcetto si registrano valori di percezione più bassi rispetto a quello medio della bibliografia; si tratta di vini che hanno caratteristiche organolettiche più semplici; questo permette di percepire con maggior facilità il sentore derivante da *Brettanomyces*.

Allo stesso modo, per i vini bianchi, il valore più alto è quello del moscato che, rispetto alle altre varietà vinicole, presenta delle caratteristiche olfattive più forti e particolari.

Analizzando l'andamento dei degustatori nei vini bianchi, la soglia di percezione risulta essere più elevata per alcuni degustatori, soprattutto legata al:

- Moscato e alla sua intensità aromatica, come si vede per il degustatore n. 3, 9 e 11 (Grafico n. 5.1);
- Sauvignon, di cui alcuni composti caratterizzanti, i tioli, presentano soglie olfattive inferiori e risultano come "disturbo sensoriale" per la percezione del difetto dovuto a *Brettanomyces*, ad esempio per il degustatore n. 12, 13, 14 (Grafico n. 5.1).

Per le altre varietà di vino, invece, si sono riscontrati meno problemi in quanto sono varietà meno complesse a livello olfattivo.

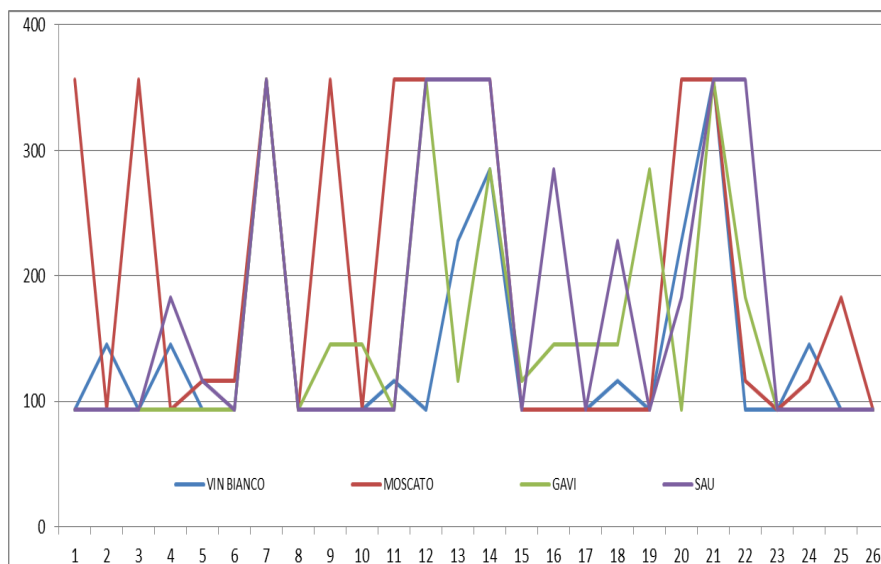


Grafico 5.1.: Grafico sull'andamento dei degustatori per i vini bianchi.

Analizzando l'andamento dei degustatori nei vini rossi, troviamo diversi scenari:

- Molti degustatori sono molto sensibili al 4-etilfenolo, come il 3, 8, 11, 13, 15, 3 26 (Grafico 5.2).

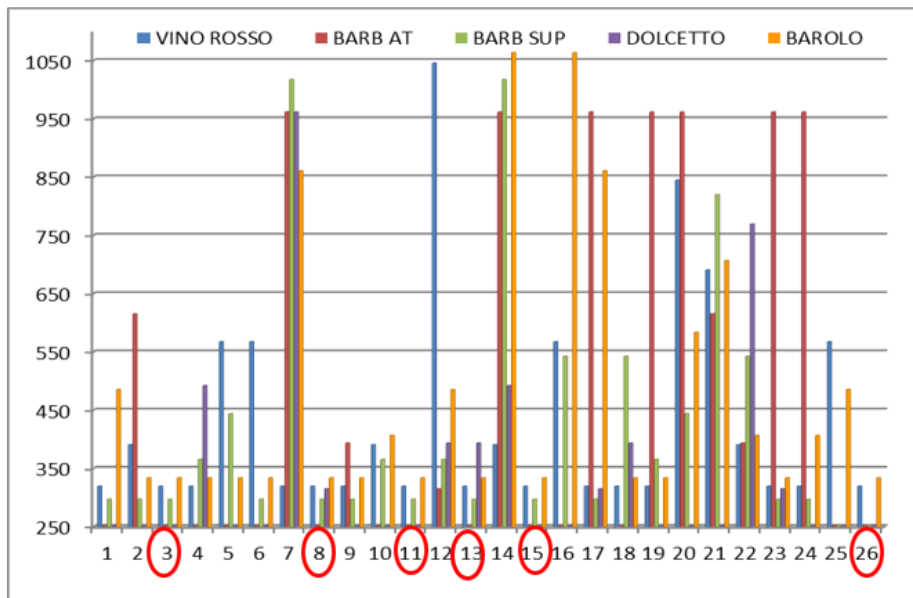


Grafico 5.2.: Degustatori sensibili al 4-etilfenolo.

- Alcuni degustatori presentano problemi nella percezione del 4-etilfenolo per tutte le varietà di vino, come il 7 e il 14 (Grafico 5.3).

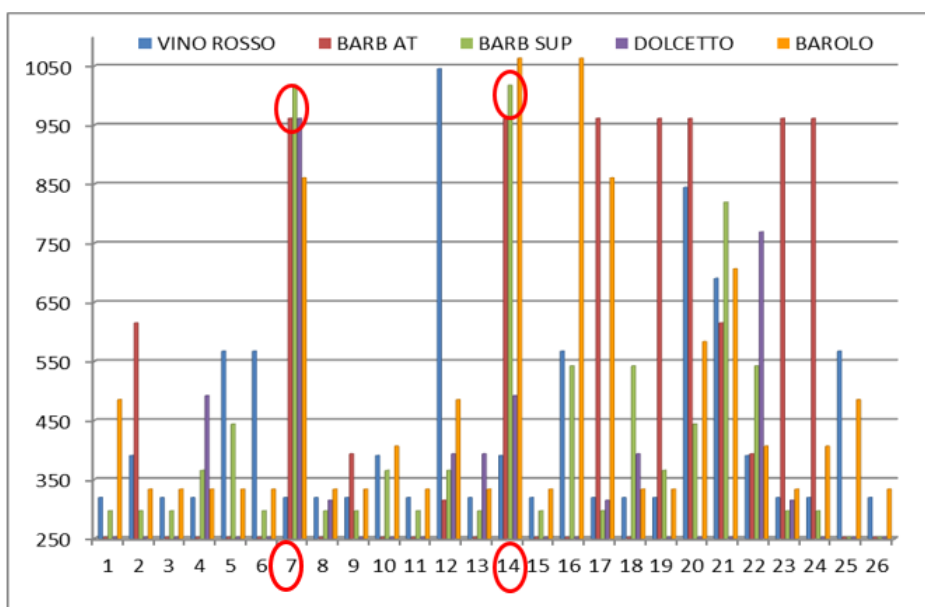


Grafico 5.3.: Degustatori poco sensibili al 4-etilfenolo.

- Alcuni mostrano difficoltà solo per alcune varietà, come per i degustatori 16, 23 e 24.

Il 16 ha riscontrato difficoltà per il barolo, per il 23 e il 24 le difficoltà sono state riscontrate nel barbera d’Asti (Grafico 5.4).

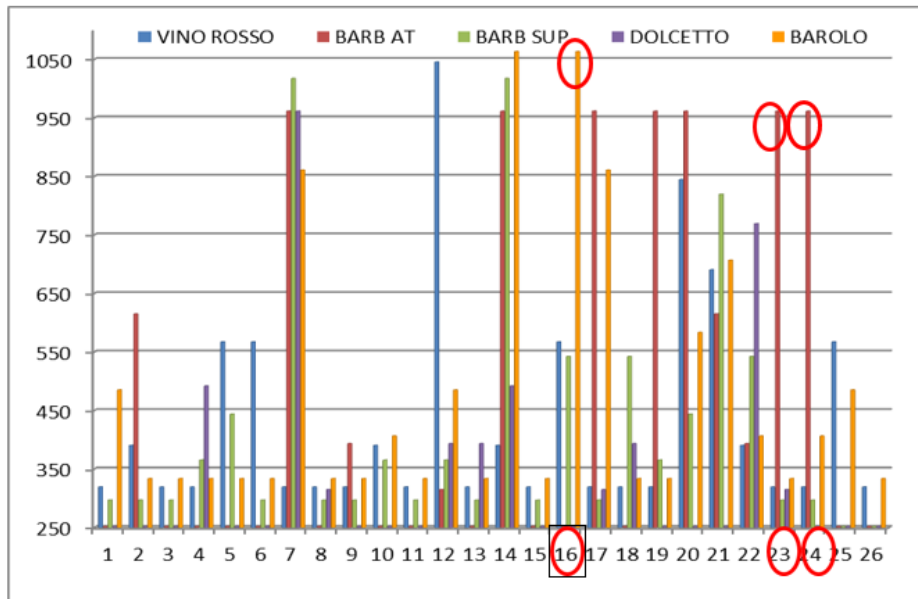


Grafico 5.4.: Andamento dei degustatori nei vini rossi.

6. Bibliografia

- *Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R. E., 1996, Principles and practices of winemaking, Chapman and Hall*
- *Casamayor P., Moisseeff M., 2002, Arômes du vin. Hachette,*
- *Centro Ricerche e Produzioni Vegetali (CRPV), 2004, Viticoltura ed Enologia biologica, Edagricole*
- *Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., 1992, Le caractère phénolè des vins rouges: caractèrisation origine et moyens de lutte, Revue Francaise d'enologie, 138, 21-24*
- *Chatonnet P., 1993, Fenoli volatili: influenze organolettiche e metodi di prevenzione, Vigne e Vini, anno III n. 2, 18-21*
- *Chatonnet P., 2002, La contaminazione dei vini da parte di Brettanomyces durante la vinificazione e l'affinamento, Sistemi di Lotta, OICCE Time. Anno III n. 2, 18-21*
- *Chatonnet P., Duboudieu D., Boidron J.N., 1995, The influence of Brettanomyces/Dekkera sp. Yeasts and lactic acid bacteri on the ethylphenol content of red wines, J. Enol, Viticultur, 46, 463-468*
- *Chatonnet P., 1989, Les composés aromatiques du bois de chêne cédés aux vins, influence des opérations de chauffe en tonnellerie. Conn. Vigne Vin, numéro spécial, 81-91.*
- *Chatonnet P., Boidron J.N., Dubourdieu D., 1993, Influence des conditions d'élevages et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide céétique et en ethyl-phenols, Journal International Science Vignet et Vin, 27, 4, 277-298*

- Chervin C., El-Kereamy A., Roustan J.P., Latchè A., Lamon J., Bouzayen M., 2004, *Plant Scienze*, Vol. 167, Issue 6, p. 1301-1305
- Ciani M., Ferraro L., 1997 – *Role of oxygen on acetic acid production by Brettanomyces/Dekkera in wine making*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 489-495
- Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G., 2003. *Molecular detection and identification of Brettanomyces/Dekkera bruxellensis Brettanomyces/Dekkera anomalous in spoiled wines*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1347-1355.
- De Blackburn C., *Food Spoilage Microorganisms*, Cambridge, 2007
- DeSalle R., Tattersall I., 2014, *Il tempo in una bottiglia – Storia naturale del vino*. Codice Edizioni – Torino
- Delaherche A., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2004, *Detection and quantification of Brettanomyces bruxellensis and 'ropy' Pediococcus damnosum strains in wine by real-time polymerase chain reaction*, *J. Appl. Microbiol.*, n. 97
- Dubois P., 1984, *quelques résultats récents concernant les constituants volatils des vins*, *l'Enotecnico* n. 20
- Dubois P., Brulè G., Ilic M., 1971, *Etude des phenols volatils de deux vins rouges*, *nn. Technol, Agric.*
- Deteyeux-Belleau C., Gagnè S., L'Hyvernay A., Donèche B., Geny L. (2007) – *J. Int. Sc. Vigne*, 41, p. 141
- Gho P., Ruffa G., 2014, *Il piacere del vino-come imparare a bere meglio*. Slow Food Editore S.r.l. –Bra (CN)

- Guignard J.-X., Noble A.C., 1986, *Proposition d'une terminologie pour une description analytique de l'arôme des vins*. *Science des aliments*, vol 42, pp. 657-662.
- Guyot C., 2002, *Cours d'analyse sensorielle et de dégustation des vins*. Ecole d'ingénieurs de Changins, Nyon
- Halliday D. Resnick R., Krane K. S., 1992, *Fisica 2*, 4^a Edizione, edito da Ambrosiana, Milano
- Henick-Kling T., 1992, *Wine Microbiology and Biotechnology*, G.H. Fleet Ed., Hartwood Academic Publishers, Chur, Suisse.
- Jourdes M., Quideau S., Saucier C., Glories Y., 2003, VII^e Symposium International d'oenologie, Lonvaud A., De Revel G., Dariet P., Tec et Doc, Lavoisier, Paris
- Kurtzman C.P., Fell J.W., 2000 – *The Yests: a taxonomic study*, Amsterdam, 4th edition, 114-118, 174-177
- Ibeas J.I., Lozano I., Perdignes F., Jimenez J., 1996. *Detection of Dekkera/Brettanomyces strains in sherry by a nested PCR method*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 998-1003
- Ito H., Motomura Y., Konno Y., Hatayama T. (1969) – *Tohoku J. Agric. Res.*, 20, p. 1.
- Lakowicz J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy" Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999, 3^a Edizione
- Léglise M. *Une initiation à la dégustation des grands vins. Défense et illustration des vins d'origine*, Lausanne, 1976.

- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M., 2003, Spoilage yeast in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol*, 86, 23-50
- Mackay I. M., 2007, *Real-Time PCR in Microbiology: from diagnosis to characterization*, Caister Academic Press
- Maicas S., Gonzalez-cabo P., Ferrer S., Pardo I., 1999, Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition, v. 21, Issue 4, pp. 349-353
- Néauport J. *La dégustation*. In: *Jules Chauvet ou le talent du vin*. Jean-Paul Rocher, 1997
- Norma ISO 13301, *Sensory analysis – Methodology – General guidance for measuring odour, flavour and taste detection thresholds by a three-alternative forced-choice procedure*
- OIV, Risoluzione Eno 10/2005, *Guida pratica per la convalida, il controllo qualità, e la stima dell'incertezza di un metodo alternativo di analisi enologica*
- OIV, 2014, *Codice di buone pratiche vitivinicole per evitare o limitare la contaminazione da Brettanomyces*
- Organizzazione internazionale della Vigna e del Vino, <http://www.oiv.int/it/lorganizzazione-internazionale-della-vigna-e-del-vino>
- Peynaud E., 1976, *Enologia e tecnica del vino*. Edizioni AEB – Brescia
- Peynaud E., 1980, *Le goût du vin*. Bordas
- Phister T.G., Millis D.A., 2003, *Real-Time PCR essay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine*, *Appl. Environmental Microbiol.*
- Pontallier P., Salagoity-Auguste M.-H., Ribéreau-Gayon P., 1982 - *Conn. Vigne Vin*, 16, p.45

- *Renouf V., Lonvaud-Funel A., 2007, Development of an enrichment medium to detect Dekkera/Brettanomyces bruxellensis, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries, Microbiol. Res., 161*
- *Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. and Lonvaud A., 2017, Trattato di enologia 1 – Microbiologia del vino e vinificazioni. Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media srl –Milano.*
- *Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdieu D., 2007, Trattato di enologia I - Chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti. Edagricole – Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE Editoria Specializzata – Bologna*
- *Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdieu D., 2007, Trattato di enologia II- Chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti. Edagricole – Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE Editoria Specializzata – Bologna.*
- *Romano A., Perello M. C., Lonvaud-Funel A., De Revel G., Aspetti sensoriali del “Brett character”, Rivista di viticoltura ed enologia, 2008*
- *Rossini R., 2003, Contaminazione da Brettanomyces: lo stato dell’art, Enologica Vason, Verona*
- *Scialpi A., Mengoni A., La PCR e le sue varianti: quaderno di laboratorio, Firenze, 2008, Firenze University Press*
- *Sicheri G., 2007, Tecnologie agrarie 2 – Industria enologica, lattiero-casearia, conserviera, olearia, molitoria. Ariberto S.r.l. – Milano*
- *Sommer P., Bunte A., 2007, Come condurre correttamente la fermentazione malolattica nel vino, n. 9/1, Rivista internet di viticoltura ed enologia*
- *Taillander P. 2007. Humidité et azote, des facteurs aggravants. La vigne. No. 189 Juillet-Aout, p.50.*

- Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F., 2008. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 237-243.
- Toflo R., Schirone M., Telera G.C., Manetta A.C., Corsetti A., Suzzi G., 2011, Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*, *J. Application Microbiol*
- Tofalo R., Schirone M., Perpetuini G., Corsetti A., Suzzi G., 2011, Metodo rapido per determinare il carattere "Brett" nei vini, 7^a Edizione Enoforum, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Teramo
- Vincenzini M, Romano P., Farris G.A., 2005, *Microbiologia del vino*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano
- Vivas N., 1997 – *Recherches sur la qualité du chêne français de Tonnellerie et sur les mecanismes d'oxidoreduction des vins rouges au cours de leur elevage en barriques*, Tesi di Dottorato, Université de Bordeaux II
- Ubigli M., 2009, *I profili del vino*, 3^a Edizione, Edagricole-New business Media

7. Allegati

	VINO ROSSO							
	[4-etilfenolo] _i = 75							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	357	427	515	625	763	935	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 2	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 4	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 5	0	1	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 6	1	1	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 7	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 10	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 12	1	0	0	0	0	0	1045	3,02
Degustatore 13	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 14	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 16	0	0	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 17	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 18	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 20	1	1	0	1	0	1	845	2,93
Degustatore 21	1	1	1	0	1	1	691	2,84
Degustatore 22	0	1	1	1	1	1	390	2,59
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 24	1	1	1	1	1	1	319	2,50
Degustatore 25	0	1	0	1	1	1	567	2,75
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	319	2,50

ΣLog_{10} 67,73

Media dei Log_{10} 2,60

Dev. Std di Log_{10} 0,151214954

$$y = 10^{2,60} \mathbf{398,11}$$

	DOLCETTO							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	281,6	352	440	550	688	860	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 2	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 4	1	1	0	1	1	1	492	2,69
Degustatore 5	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 6	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 7	0	0	0	1	0	0	962	2,98
Degustatore 8	0	1	1	1	1	1	315	2,50
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 10	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 12	1	0	1	1	1	1	394	2,59
Degustatore 13	1	0	1	1	1	1	394	2,59
Degustatore 14	0	1	0	1	1	1	492	2,69
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 16	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 17	0	1	1	1	1	1	315	2,50
Degustatore 18	1	0	1	1	1	1	394	2,59
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 20	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 21	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 22	0	1	1	1	0	1	769	2,89
Degustatore 23	0	1	1	1	1	1	315	2,50
Degustatore 24	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 25	1	1	1	1	1	1	252	2,40
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	252	2,40

$\sum \text{Log}_{10}$ 64,95

Media dei Log_{10} 2,50

Dev. Std di Log_{10} 0,159897016

$$y = 10^{2,50}$$

316,23 VALORE SOGLIA

	BAROLO							
	[4-ETILFENOLO] _i = 91						Best Estimate Threshold (BET)	
	DILUTION RATIO						Value	Log10 of value
	373	443	531	641	779	951		
Degustatore 1	0	0	1	1	1	1	485	2,69
Degustatore 2	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 4	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 5	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 6	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 7	0	1	1	0	0	1	861	2,93
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 10	0	1	1	1	1	1	406	2,61
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 12	1	0	1	1	1	1	485	2,69
Degustatore 13	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 14	0	1	1	0	1	0	1063	3,03
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 16	1	1	1	0	1	0	1063	3,03
Degustatore 17	0	1	1	1	0	1	861	2,93
Degustatore 18	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 20	0	1	0	1	1	1	583	2,77
Degustatore 21	1	0	0	0	1	1	707	2,85
Degustatore 22	0	1	1	1	1	1	406	2,61
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	334	2,52
Degustatore 24	0	1	1	1	1	1	406	2,61
Degustatore 25	0	0	1	1	1	1	485	2,69
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	334	2,52

$\sum \text{Log}_{10}$ 68,75

Media dei

Log_{10}

2,64

$$y = 10^{2,64}$$

436,52 VALORE SOGLIA

Dev. Std di

Log_{10}

0,171114997

Postazione 3	BARBERA D'ASTI SUPERIORE							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	332	402	490	600	738	910	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 2	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 4	0	1	1	1	1	1	365	2,56
Degustatore 5	1	0	1	1	1	1	444	2,65
Degustatore 6	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 7	0	1	0	0	1	0	1017	3,01
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 10	0	1	1	1	1	1	365	2,56
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 12	0	1	1	1	1	1	365	2,56
Degustatore 13	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 14	0	0	0	0	0	0	1017	3,01
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 16	1	0	0	1	1	1	542	2,73
Degustatore 17	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 18	0	1	0	1	1	1	542	2,73
Degustatore 19	0	1	1	1	1	1	365	2,56
Degustatore 20	1	0	1	1	1	1	444	2,65
Degustatore 21	1	0	1	0	0	1	819	2,91
Degustatore 22	0	0	0	1	1	1	542	2,73
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 24	1	1	1	1	1	1	297	2,47
Degustatore 25	0	1	0	1	1	1	542	2,73
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	297	2,47

$\sum \text{Log}_{10}$ 67,56

Media dei

Log_{10} 2,60

Dev. Std di

Log_{10} 0,17007127

$$y = 10^{2,60}$$

398,11 VALORE SOGLIA

	VINO BIANCO							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	104	130	163	204	255	319	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 2	0	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 4	1	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 5	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 6	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 7	0	0	0	1	0	0	357	2,55
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 10	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 11	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 12	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 13	0	1	1	0	1	1	228	2,36
Degustatore 14	0	1	1	1	0	1	285	2,46
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 16	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 17	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 18	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 20	1	0	0	0	1	1	228	2,36
Degustatore 21	0	0	1	1	0	0	357	2,55
Degustatore 22	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 24	1	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 25	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	93	1,97

$\sum \text{Log}_{10}$ 54,40

Media dei Log_{10} 2,09

Dev. Std di Log_{10} 0,19565081

$$y = 10^{2,09}$$

VALORE
123,63 SOGLIA

	MOSCATO							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	104	130	163	204	255	319	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 2	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 3	1	1	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 4	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 5	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 6	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 7	0	1	0	0	0	0	357	2,55
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 9	1	1	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 10	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 11	1	1	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 12	0	0	1	1	0	0	357	2,55
Degustatore 13	1	1	0	1	1	0	357	2,55
Degustatore 14	0	0	1	0	0	1	357	2,55
Degustatore 15	0	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 16	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 17	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 18	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 20	0	0	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 21	1	1	0	0	1	0	357	2,55
Degustatore 22	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 24	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 25	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	93	1,97

ΣLog_{10}

57,41

Media dei Log_{10}

2,21

$$y = 10^{2,21}$$

162,18 VALORE SOGLIA

Dev. Std di Log_{10}

0,279582691

	GAVI							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	104	130	163	204	255	319	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 2	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 4	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 5	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 6	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 7	1	1	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 9	1	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 10	1	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 12	1	0	1	1	0	0	357	2,55
Degustatore 13	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 14	1	0	0	1	0	1	285	2,46
Degustatore 15	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 16	0	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 17	1	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 18	0	0	1	1	1	1	146	2,16
Degustatore 19	1	1	1	1	0	1	285	2,46
Degustatore 20	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 21	0	0	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 22	1	0	0	1	1	1	182	2,26
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 24	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 25	1	1	0	1	1	1	182	2,26
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	93	1,97

$\sum \text{Log}_{10}$ 55,66

Media dei Log_{10} 2,14

Devi. Std di Log_{10} 0,210153469

$y = 10^{2,14}$ 138,04 Valore Soglia

	SAUVIGNON							
	DILUTION RATIO						Best Estimate Threshold (BET)	
	104	130	163	204	255	319	Value	Log10 of value
Degustatore 1	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 2	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 3	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 4	1	0	0	1	1	1	182	2,26
Degustatore 5	0	1	1	1	1	1	116	2,07
Degustatore 6	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 7	0	1	1	1	0	0	357	2,55
Degustatore 8	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 9	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 10	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 11	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 12	1	1	0	0	0	0	357	2,55
Degustatore 13	0	1	1	1	1	0	357	2,55
Degustatore 14	0	0	0	0	1	0	357	2,55
Degustatore 15	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 16	1	0	1	1	0	1	285	2,46
Degustatore 17	0	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 18	0	1	0	0	1	1	228	2,36
Degustatore 19	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 20	0	1	0	1	1	1	182	2,26
Degustatore 21	0	1	0	1	1	0	357	2,55
Degustatore 22	0	1	0	0	0	0	357	2,55
Degustatore 23	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 24	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 25	1	1	1	1	1	1	93	1,97
Degustatore 26	1	1	1	1	1	1	93	1,97

$\sum \text{Log}_{10}$ 56,24

Media dei Log_{10} 2,16

Dev. Std di Log_{10} 0,255199439

$y = 10^{2,16}$ **144,54** Valore Soglia

Ringraziamenti

“Trasforma le tue fatiche in un successo.”

Arrivare alla fine di questo percorso non sarebbe stato lo stesso se non avessi avuto con me delle persone come voi.

Un primo e indiscutibile grazie è per il Prof. Jean Daniel Coisson: senza di lui il mio impegno non sarebbe bastato per portare a termine la stesura della tesi. La sua disponibilità, la sua preparazione e la sua pazienza mi hanno regalato un po' di tranquillità in più per affrontare questo lavoro.

Ringrazio la *Sinergo Servizi* che mi ha permesso, durante il periodo del tirocinio, di apprendere, anche con la sola osservazione, e di iniziare a scoprire il mondo lavorativo in molte sue sfaccettature. Un grazie particolare è per Nadia, la mia tutor, che nonostante le mille cose da fare, ha trovato il tempo anche per me.

Un grazie speciale va a chi mi ha permesso di arrivare fino qui: alla mia Mamma e al mio Papà. I vostri sacrifici sono stati il mio punto di partenza per arrivare alla fine, provando a regalarvi un sorriso e un po' di soddisfazione. Grazie per avermi sostenuta, sopportata e spronata a dare il meglio di me. Grazie anche a te, Silvia: anche se dobbiamo ancora lavorarci un po', credo sia proprio la nostra diversità a rendere il nostro legame sempre “un po' più” forte.

Grazie a tutto il resto della mia famiglia che non ha mai smesso di credere in me: nonni, zii e cugini.

A far parte della mia famiglia, anche se non per legame di sangue, ci sono Michela e Patrizia: grazie per sostenermi e per essere sempre presenti durante i miei percorsi e i loro traguardi finali.

Daria, Stefania e Valentina, cosa dirvi? Il legame che abbiamo costruito va ben oltre degli stretti banchi di aule universitarie o “arrivo in ritardo, tenetemi il posto”! Ci siamo migliorate e completate; siete sempre nel mio cuore e so che affronteremo tutti i nostri prossimi traguardi insieme. Aver condiviso con voi questi anni è stata l'opportunità più bella e preziosa che l'università mi ha regalato.

Grazie ai miei amici di sempre, siete la mia seconda famiglia.

A Irene che con la sua puntualità e la sua ossessione per la programmazione, mi ha regalato piccole e felici pause fatte di caffè, shopping e gelati. Ti prometto che inizierò ad essere più puntuale ai nostri incontri e “nelle vie di comunicazione”: spero di aver imparato da te ad avere un po’ più di forza di volontà per vincere la mia “pigrizia”.

A Serena, l’amica con i progetti di vita più belli di sempre. Spero di avere gli occhi felici come quelli che hai tu quando ci parli dei tuoi progetti, della tua famiglia e delle mongolfiere.

A Chiara: da te spero di aver imparato ad essere più determinata e ad essere più diretta nelle cose che voglio e decisa nelle strade da prendere. Grazie per aver essere riuscita a starmi vicina nonostante i miei lati spigolosi.

Ad Alberto e Federica: grazie per avermi ascoltata, per avermi fatta sorridere ogni volta che vedevate i miei occhi diventare lucidi. Grazie per aver alleggerito le settimane e per avermi aiutata a trovare un punto di vista diverso da quello che sembrava essere l’unico. (State mica piangendo voi adesso?)

Grazie a Mattia, la *mia* persona: a te ho davvero aperto ogni sensazione, anche la più piccola, dall’inizio alla fine. Con te ho condiviso le fatiche, i successi, le svolte, le insicurezze e le certezze nel modo più sincero in assoluto. Grazie per aver avuto la capacità di starmi vicino senza mai voltarti anche solo per un attimo, per avermi stimolata ad andare verso cambiamenti positivi e costruttivi e grazie per aver continuato a tenermi per mano: questo mio traguardo è anche tuo.

Dopo l’ultimo esame, una cara Amica mi ha scritto questa frase:

“lo studio ha le radici amare, ma porta dolci frutti”

Ora è il momento di gustare i frutti e so che grazie a voi saranno ancora più dolci.

Vi ho sempre con me.