



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Tossicologia**

Ciclo XXVI

**Studio della formazione di ammine biogene  
e di altri composti azotati negli alimenti**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

03/D1 Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Tossicologiche e Nutraceutico-Alimentari

Presentata da:	Dr.ssa Francesca Congiu
Coordinatore Dottorato	Prof. Gaetano Di Chiara
Tutor/Relatore	Dr. Carlo I.G. Tuberoso

Esame finale anno accademico 2012 - 2013



## INDICE

Indice	1
Introduzione	4
Gli aminoacidi e le ammine biogene	6
Caratteristiche degli aminoacidi	6
Aspetti nutrizionali degli aminoacidi	7
Caratteristiche delle ammine biogene	9
Aspetti tossicologici delle ammine biogene	13
Il quadro normativo	18
Amminoacidi e ammine biogene negli alimenti di origine vegetale	19
AA e AB nel vino	20
AA e AB nelle olive da mensa	22
I metodi di analisi	23
La validazione dei metodi	25
Prodotti tipici della Sardegna	27
Il vino e la Sardegna	27
Cannonau	28
Disciplinare di produzione del Cannonau DOC	28

Carignano	31
Disciplinare di produzione del Carignano DOC	32
Vermentino	34
Disciplinare di produzione del Vermentino DOC	35
Vernaccia	36
Disciplinare di produzione della Vernaccia DOC	38
Le olive da mensa	39
Tecnologia di produzione olive da mensa	40
Parte sperimentale	44
Sviluppo e validazione della metodica HPLC-FLD	44
Reagenti e standard	45
La derivatizzazione	45
Determinazione HPLC-FLD	49
Validazione del metodo	50
Tenore di AA e AB nei principali vini della Sardegna	55
Campioni	55
Risultati e discussione	56
Sperimentazioni enologiche	62
Prove fermentazione Cannonau	63
Risultati e discussione	64
Prove fermentazione Vermentino	70
Risultati e discussione	71

Prove fermentazione Moscato	76
Risultati e discussione	77
Le olive da mensa in Sardegna	81
Validazione del metodo	82
Campioni di olive	83
Preparazione dei campioni	84
Risultati e discussione	85
Conclusioni	92
Bibliografia	94

## INTRODUZIONE

Il progetto di questo lavoro di dottorato ha avuto come obiettivo la determinazione quali-quantitativa di ammine biogene (AB) e amminoacidi (AA), in particolare quelli essenziali, in differenti matrici alimentari tipiche della Sardegna (Italia). Lo studio è stato incentrato su vino e olive da mensa, probabile ottima fonte di ammine biogene a seguito dei processi di fermentazione implicati nella loro produzione.

La scelta di intraprendere tale linea di ricerca si basa sull'importanza di avere informazioni aggiornate per condurre una valutazione del reale rischio derivante dall'ingestione di AB. Tali molecole, infatti, hanno effetti diretti o indiretti sul sistema vascolare e nervoso umano e possono provocare anche reazioni avverse importanti nell'organismo. Pertanto, a tutela della sicurezza alimentare bisogna indagare la potenziale formazione di AB associata all'attività microbica e la complessiva esposizione dei consumatori alle diverse fonti di AB. Attualmente si è reso perciò necessario trovare metodi di individuazione simultanea ad alta sensibilità delle AB negli alimenti. Dal punto di vista legale, la situazione normativa è in via di sviluppo e le norme attualmente disponibili non sono sufficienti a tutelare i consumatori. Diversi enti governativi connessi all'Unione Europea sono stati coinvolti nella raccolta di dati, sia presenti in letteratura scientifica, sia derivanti da specifiche indagini sui più comuni prodotti alimentari consumati. Tali presupposti hanno lo scopo di monitorare il processo di produzione delle AB e il loro eventuale accumulo lungo la catena alimentare, potendo così migliorare le misure di controllo per la sicurezza degli alimenti (EFSA, 2011).

Un primo problema affrontato in questo lavoro di tesi, è stato pertanto quello di sviluppare e validare una metodica, al contempo semplice e di diffusa applicabilità, che permettesse di individuare contemporaneamente il maggior numero possibile di AB e AA in matrici alimentari. Una volta individuata la metodica ottimale, è stato affrontato uno studio su vini tipici della Sardegna, vista l'importanza del settore per l'economia locale e sul quale non risultava un approccio organico di studio. Sono stati analizzati vini DOC (Denominazione di Origine Controllata) ottenuti da uve Cannonau, Carignano, Vermentino e Vernaccia. In collaborazione con Agris (Agenzia della Regione Sardegna per la ricerca scientifica, la sperimentazione e l'innovazione tecnologica nei settori agricolo, agroindustriale e forestale) sono state sviluppate specifiche prove tecnologiche in modo da verificare come differenti tecniche di vinificazione potessero influire sulla produzione delle AB. Infine, è stata effettuata una sperimentazione sulle olive da mensa, un altro prodotto tipico della tradizione Mediterranea, ottenuto per fermentazione lattica e perciò probabile fonte di AB. Entrambe le matrici sono poi state analizzate durante le fasi di fermentazione, monitorando la presenza e l'andamento delle AB e AA, in particolare quelli essenziali.

# GLI AMMINOACIDI E LE AMMINE BIOGENE

## Caratteristiche degli amminoacidi

Gli amminoacidi sono molecole organiche di formula generica  $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$  aventi un gruppo funzionale amminico ( $-\text{NH}_2$ ) e uno carbossilico ( $-\text{COOH}$ ) legati allo stesso atomo di carbonio (carbonio  $\alpha$ ). Esistono anche altri amminoacidi che non presentano la classica struttura con i sostituenti in  $\alpha$  e l'acido  $\gamma$ -ammino butirrico (GABA) ne è un tipico esempio. In generale, gli  $\alpha$ -amminoacidi presentando un centro chirale sono tutti in configurazione L, ad eccezione della glicina che è achirale ( $\text{R} = \text{H}$ ). Gli amminoacidi ordinari sono 20 e vengono classificati in tre gruppi principali sulla base della polarità delle catene laterali (gruppi R) dei singoli amminoacidi:

1) amminoacidi con gruppi R non polari: sono nove e comprendono la glicina (Gly); l'alanina (Ala), la valina (Val), la leucina (Leu) e l'isoleucina (Ile) presentano catene laterali idrocarburiche alifatiche di diversa lunghezza, che vanno dal gruppo metilico dell'Ala ai gruppi butilici isomerici della Leu e dell'Ile; la metionina (Met), che ha una catena laterale contenente un etere tiolico e la prolina (Pro), unico amminoacido a presentare una struttura eterociclica con un gruppo pirrolidinico che le conferisce limitazioni conformazionali (rigido). Infine abbiamo AA che contengono gruppi laterali aromatici: la fenilalanina (Phe), con un'unità fenilica ed il triptofano (Trp) con un gruppo indolico.

2) amminoacidi con gruppi R polari non carichi: sono sei e comprendono la serina (Ser) e la treonina (Thr), che hanno gruppi R di dimensioni diverse con gruppi ossidrilici;

l'asparagina (Asn) e la glutammina (Gln), che hanno una catena laterale di diversa lunghezza con un gruppo ammidico terminale; la tirosina (Tyr) ha un gruppo fenolico e la cisteina (Cys) che ha un gruppo tiolico.

3) amminoacidi con i gruppi R polari e carichi: sono cinque e comprendono amminoacidi basici e acidi. Gli amminoacidi basici hanno cariche positive ad un pH fisiologico (6-7) e comprendono la lisina (Lys), che ha una catena laterale butilamminica, l'arginina (Arg), che ha un gruppo guanidinico, e l'istidina (His) che presenta un gruppo imidazolico. Infine, gli amminoacidi acido aspartico (Asp) e acido glutammico (Glu) sono carichi negativamente a valori di pH superiori a 4.

### **Aspetti nutrizionali degli amminoacidi**

Gli AA sono indispensabili per le trasformazioni endogene al fine di soddisfare la richiesta di sintesi proteica e altre vie metaboliche. All'interno dell'organismo, esiste un *turn-over* continuo tra gli amminoacidi che derivano dalla degradazione delle proteine, quelli che vengono utilizzati per la sintesi di nuove proteine, ma anche dalla sintesi di nuovi amminoacidi o dalla degradazione ed escrezione dei metaboliti. L'efficacia nutrizionale delle proteine dipende da: composizione amminoacidica, digeribilità e fisiologico utilizzo degli amminoacidi rilasciati. Gli amminoacidi devono essere forniti in adeguata quantità perché, anche se il nostro organismo riesce a sintetizzarne la maggior parte per costruire le proteine, non è capace di costruirne altri o comunque non in quantità sufficiente per l'ottimale crescita corporea. Questi AA vengono perciò definiti essenziali e devono essere introdotti con gli alimenti. In questa categoria

rientrano Leu, Ile, Thr, Trp, Val, Met e Phe (questi ultimi sono interconvertibili), mentre Arg e His risultano AA essenziali solo durante lo sviluppo (Amaya-Farfan, 2003). L'Arg, oltre ad essere un AA essenziale per i bambini in crescita (J. Amaya-Farfan *et al.*, 2003), possiede importanti qualità terapeutiche. La maggior parte delle azioni farmacologiche dell'Arg sono attribuite all'ossido nitrico (NO), molecola messaggero polivalente implicata in una grande varietà di processi biologici e in grado di agire su una vasta gamma di tessuti. Recenti scoperte suggeriscono anche che l'implementazione di Arg può migliorare l'aumento della produzione di NO (Xiao *et al.*, 2003) ed esplicitare una funzione protettiva contro attacchi di ROS, le specie reattive dell'ossigeno (Lass *et al.*, 2002).

Come visto precedentemente, la maggior parte degli AA importanti nella nutrizione esistono come L isomeri. Le proteine naturali sono realizzate esclusivamente da L-amminoacidi, ma durante la lavorazione alimentare i L-amminoacidi possono essere racemizzati a D isomeri (Masters *et al.*, 1979). I D-amminoacidi (DAA) possono anche essere sintetizzati da microrganismi (Friedman, 2012). La racemizzazione di residui L-amminoacidici a D- isomeri negli alimenti e di altre proteine dipende da pH, tempo e temperatura. La racemizzazione degli amminoacidi e formazione di legami D - peptide e il reticolato amminoacido come lantionine (LAN) e lisinoalanina (LAL) può compromettere la digeribilità e qualità nutrizionale (Friedman, 2010). Due percorsi sono disponibili per l'utilizzazione biologica di D-amminoacidi:

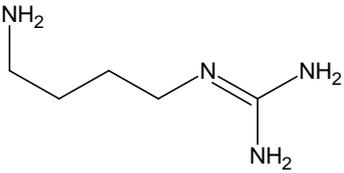
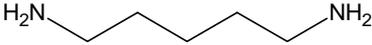
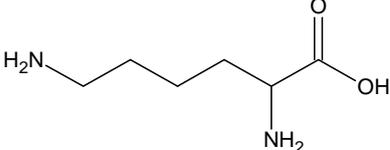
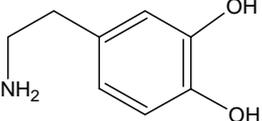
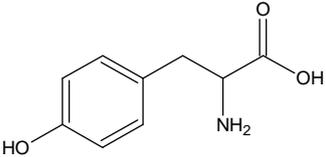
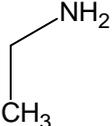
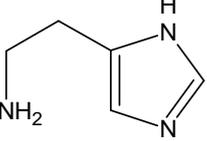
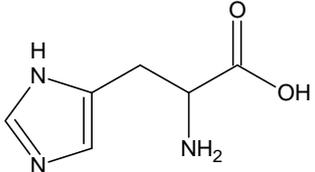
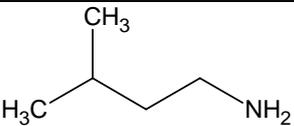
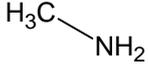
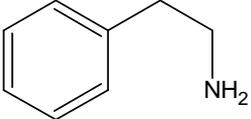
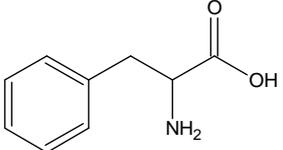
- racemasi o epimerasi possono convertire D-amminoacidi direttamente a L-isomeri o a miscele (DL);

- gli enzimi degradativi D-amminoacido ossidasi (DAAO) e D-aspartato ossidasi (DDO), possono catalizzare la deaminazione ossidativa del gruppo  $\alpha$ -amminico formando  $\alpha$ -chetoacidi, che possono poi essere specificamente riamminati alla forma L (Brückner e Fujii, 2010).

### **Caratteristiche delle ammine biogene**

Gli AA rappresentano anche i precursori delle AB, definite in tal modo in quanto dotate di una certa attività biologica. Le AB sono composti organici a basso peso molecolare e strutturalmente sono derivati organici dell'ammoniaca formati per sostituzione di uno, due o tutti e tre gli atomi di idrogeno con gruppi alchilici od arilici (**Tabella 1**). Tali composti sono sintetizzati in tutti gli organismi viventi a partire dai relativi precursori amminoacidici attraverso vie metaboliche che di solito comportano decarbossilazione (Kusano *et al.* 2008). L'enzima responsabile è una decarbossilasi che ha come cofattore il coenzima piridossal fosfato, principale trasportatore di gruppi amminici. La **Figura 1** descrive la biosintesi di PUT, SPM e ASP a partire dall'Arg, oltre alla produzione di AGM, citrullina (Cit) e ornitina (Orn).

Tabella 1. Caratteristiche delle principali ammine biogene

Simbolo	Nome	Struttura	AA precursore
AGM	Agmatina		Arginina 
CAD	Cadaverina		Lisina 
DA	Dopamina		Tirosina 
ETA	Etilamina		
HIA	Istamina		Istidina 
IPA	Isopentilamina		
MTA	Metilamina		
PEA	Feniletilamina		Fenilalanina 

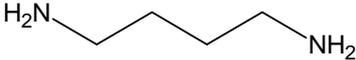
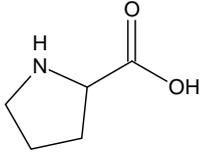
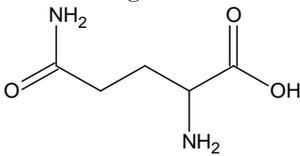
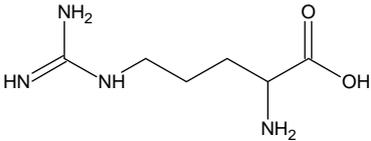
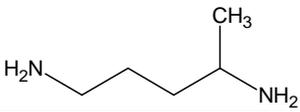
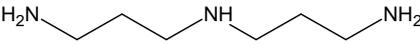
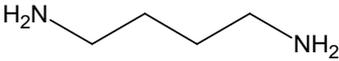
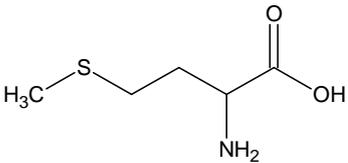
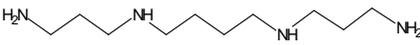
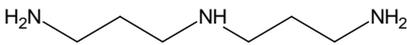
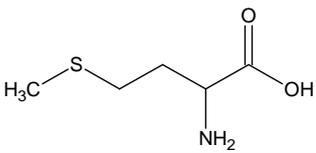
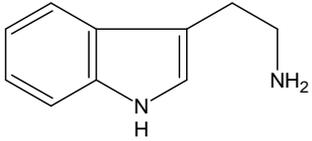
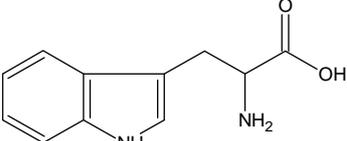
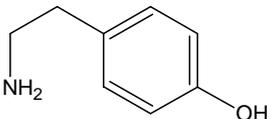
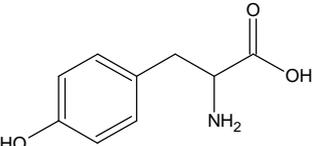
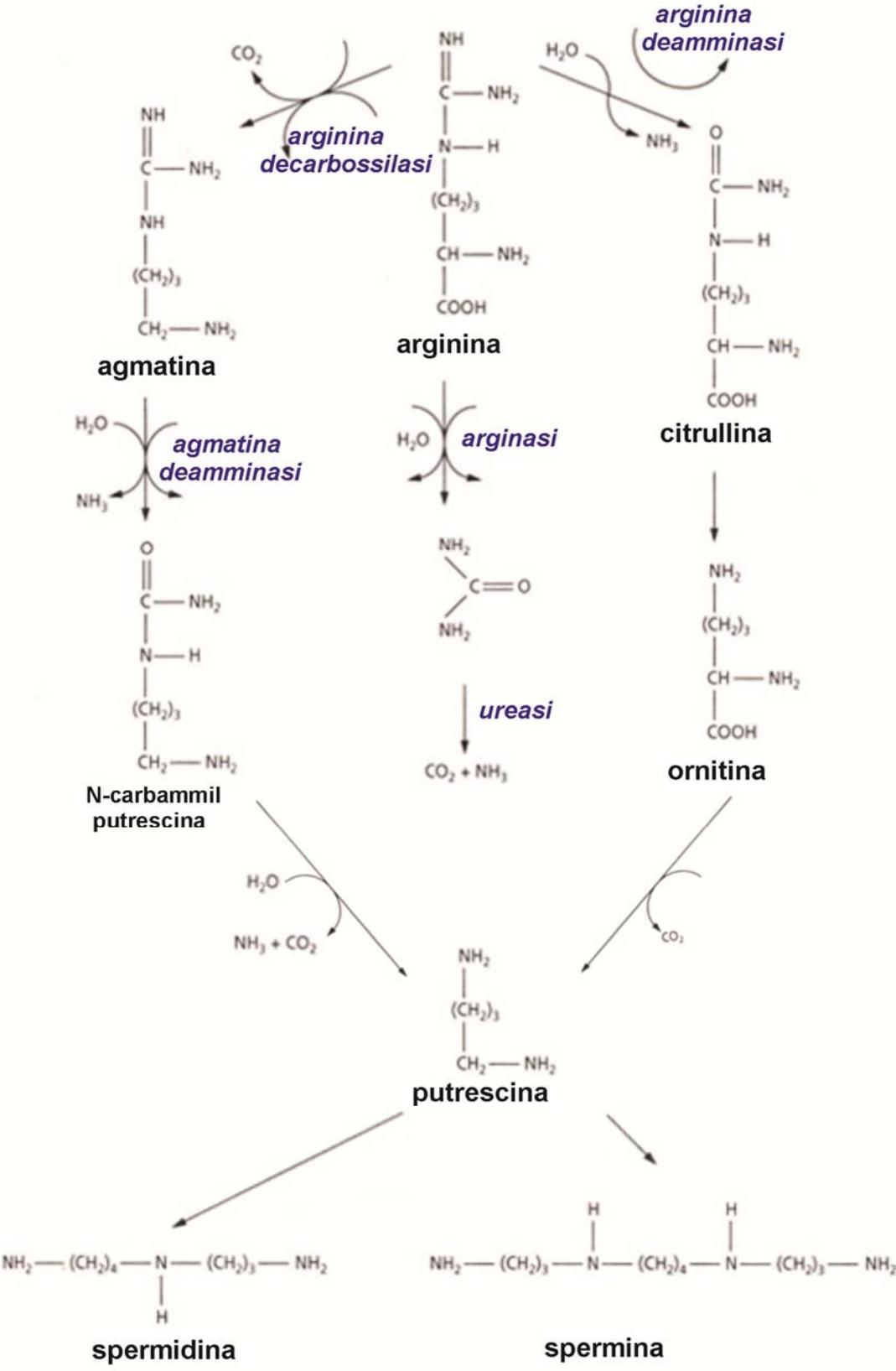
PUT	Putrescina	 <chem>NCCCCN</chem>	<p>Prolina</p>  <p>Arginina</p>  <p>Glutammina</p>  <p>Ornitina</p> 
SPD	Spermidina	 <chem>NCCCNCCN</chem>	<p>PUT</p>  <p>Metionina</p> 
SPM	Spermina	 <chem>NCCCNCCNCCN</chem>	<p>SPD</p>  <p>Metionina</p> 
TRA	Tryptamina	 <chem>NCCc1c[nH]c2ccccc12</chem>	<p>Triptofano</p>  <chem>NCC(c1c[nH]c2ccccc12)C(=O)O</chem>
TYA	Tiramina	 <chem>NCCc1ccc(O)cc1</chem>	<p>Tirosina</p>  <chem>NCC(c1ccc(O)cc1)C(=O)O</chem>

Figura 1. Biosintesi di putrescina, spermina e spermidina a partire dall'arginina



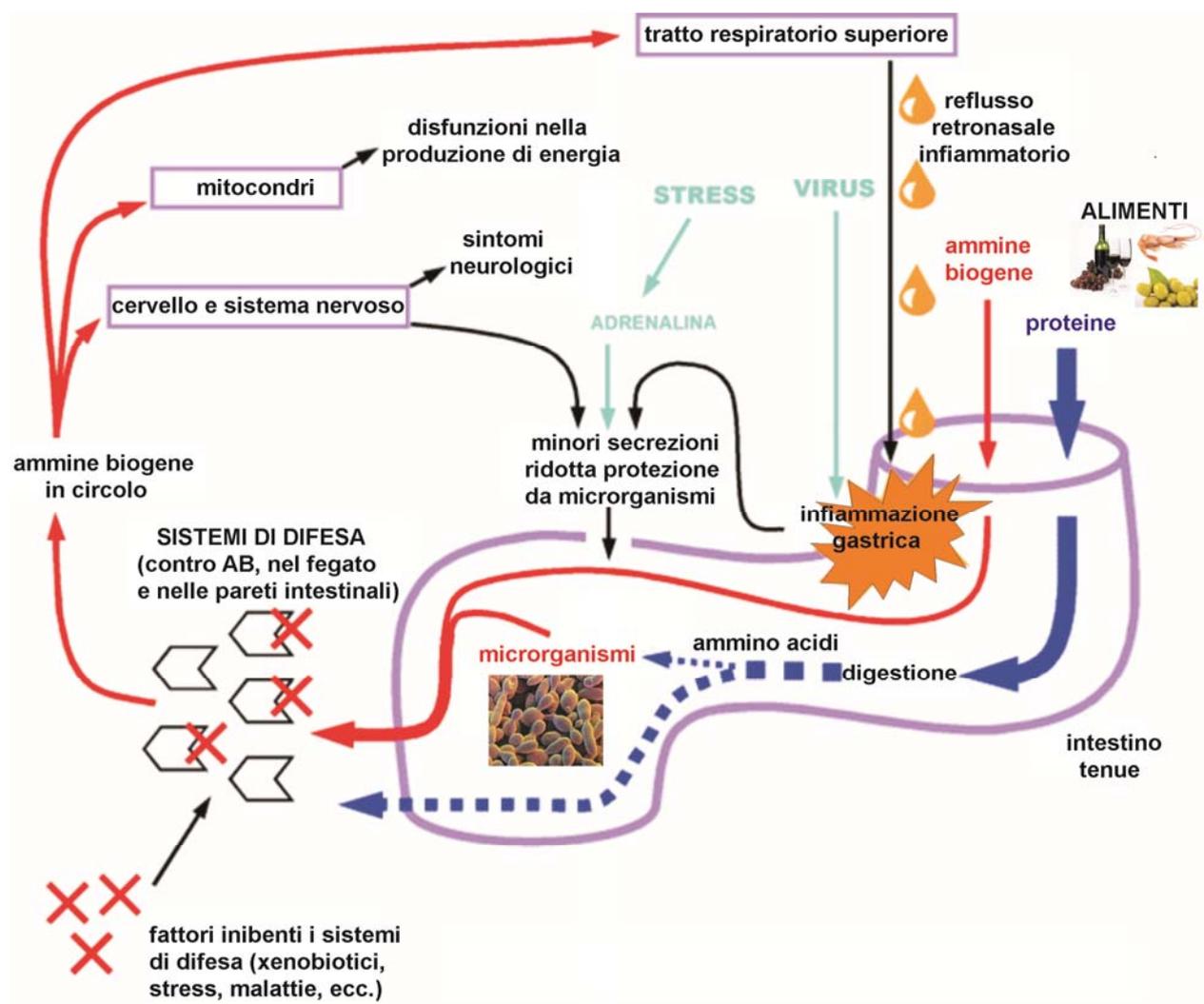
## Aspetti tossicologici delle ammine biogene

Le AB presenti in alimenti e bevande sono di particolare interesse tossicologico proprio perché possono avere, come già detto, effetti diretti o indiretti sul sistema vascolare e nervoso umano. Si ritrovano in alimenti ricchi di proteine e amminoacidi e solitamente il loro tenore è elevato in alimenti degradati o in putrefazione, ma possono essere individuate anche in alimenti che risultano perfetti ad un esame organolettico (Kelly, 2010). Numerosi studi hanno ritrovato la presenza di AB a concentrazioni più elevate in particolare in prodotti di carne o pesce e in alimenti fermentati di derivazione vegetale come il vino (Fernandes *et al.*, 2000; Ancín-Azpilicuet *et al.*, 2008).

Ad alte concentrazioni le AB possono indurre mal di testa, difficoltà respiratorie, palpitazioni, iper- o ipotensione, in particolare se accumulate con i differenti alimenti o se assunte da soggetti che risultano essere sensibili a tali sostanze o con specifiche patologie e/o sottoposti a terapie particolari che ne influenzano il normale metabolismo (Spano *et al.*, 2010). Un'eccessiva introduzione di AB con l'alimentazione può provocare anche sintomi con effetti simili alle reazioni allergiche, come diarrea, mal di testa, rinocongiuntiviti, asma, ipotensione, aritmia, orticaria, prurito, arrossamento, ecc. (Maintz e Novak, 2007). Inoltre la presenza di AB come, MTA, TRA, PEA, TYA, PUT, CAD, SPD può indurre un aumento della tossicità dell'HIA, potenziando i suoi effetti e causando così problemi alle persone maggiormente sensibili (Fernandes *et al.*, 2000). È anche nota la sindrome sgombroide, chiamata pure HFP (*Histamine Fish Poisoning*), intossicazione di origine alimentare causata dal consumo di prodotti ittici contaminati da batteri, che tuttavia non presentano alterazioni organolettiche. La sindrome è dovuta

alla tossicità dell'istamina per effetto del suo legame ai recettori cellulari di membrana negli apparati respiratorio, cardiocircolatorio, gastroenterico, e del sistema immunitario, i segni clinici provocati risultano più gravi in coloro i quali assumono farmaci che inibiscono gli enzimi detossificanti l'istamina nell'intestino (Hungerford J.M., 2010). La **Figura 2** riporta uno schema generale dell'esposizione dell'organismo alla contaminazione da AB.

**Figura 2.** Rappresentazione schematica dell'azione delle ammine biogene dopo ingestione



Un'altra reazione particolare è la cosiddetta “*cheese reaction*”, una sindrome provocata dall'eccessiva assunzione di TYA attraverso alcuni alimenti (come formaggi, carni lavorate, bevande alcoliche, ecc.) che hanno subito processi fermentativi o di decomposizione microbica. Gli studi hanno dimostrato che la concentrazione di tiramina è direttamente correlabile alla concentrazione di specifici batteri che producono proprio TYA (Ladero *et al.*, 2010, [b]).

Inoltre, è stato constatato che in alcuni pazienti trattati con MAO inibitori, l'eccessiva quantità di TYA non può essere metabolizzata e, comportandosi come simpaticomimetico per i recettori noradrenergici, provoca crisi ipertensive (Glória *et al.*, 2003). Tuttavia, nell'uomo sano per innalzare la pressione sanguigna di almeno 30 mmHg è necessaria una somministrazione orale media di 500 mg/kg di tiramina (Ladero *et al.*, 2010, [a]), mentre le donne sembrano più sensibili a questa AB e la quantità richiesta per ottenere lo stesso effetto è più bassa. Comunque, una concentrazione pari a 125 mg/kg di TYA è considerata tossica nelle persone normali tanto che è stato proposto un valore soglia di 100 mg/kg di tiramina (Ladero *et al.*, 2010, [a]).

Recenti studi hanno dimostrato che l'interazione tra etanolo e ammine sembra essere sinergica, infatti, l'etanolo è in grado di inibire alcuni enzimi intestinali come le monoammino ossidasi (MAO) coinvolte nella detossificazione delle AB (Glória *et al.*, 2003). Inoltre, l'alcool e acetaldeide sono stati descritti per aumentare gli effetti tossici di AB aumentando anche la permeabilità della parete intestinale di questi composti (Smit *et al.*, 2008). Questo effetto è di particolare importanza nelle bevande fermentate

contenenti alte concentrazioni di AB, o quando alimenti contenenti AB vengono consumati con bevande alcoliche di accompagnamento (Wöhrl *et al.*, 2004; Silla-Santos *et al.*, 1996).

Per quanto riguarda la tiramina, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha suggerito un valore soglia di 600 mg/persona/pasto, ma tale soglia deve essere 100 volte inferiore per soggetti sotto trattamento con i MAO inibitori classici (EFSA, 2011).

Altre AB come PUT e CAD (ottenute rispettivamente per decarbossilazione di Orn e Lys) una volta assunte possono reagire con i nitriti per formare nitrosammine cancerogene (Bover-Cid *et al.*, 1999). Attualmente, le funzioni delle poliammine non son ben chiare, ma si ipotizza siano implicate nella replicazione cellulare e nella genesi tumorale. In particolare la PUT (precursore delle poliammine quali SPM e SPD) è coinvolta nella regolazione della crescita cellulare, della divisione cellulare e nella promozione tumorale (EFSA, 2011; Karovicova *et al.*, 2005) ed è nota come il più efficace potenziatore della tossicità dell'HIA per l'uomo (Lehane *et al.*, 2000).

I fattori che contribuiscono a modulare il tipo ed il contenuto di AB negli alimenti sono numerosi e tra questi si possono annoverare le condizioni igieniche (Halász *et al.*, 1999 [b]), la carica batterica (inclusa l'aggiunta di colture starter) e fattori chimico-fisici come il pH della matrice (Bover-Cid *et al.*, 2001; Halász *et al.*, 1999 [a]). È generalmente accettato, infatti, che le vie di decarbossilazione siano attivate per aumentare la resistenza delle cellule a condizioni di sviluppo acide e mantenere l'omeostasi del pH cellulare (Wolken *et al.*, 2006). La formazione di AB richiede ovviamente la disponibilità di AA precursori che possono essere presenti nel prodotto alimentare in forma libera,

oppure possono essere liberati nella matrice a seguito di attività proteolitiche, svolte da enzimi endogeni o microbici, a carico di piccoli peptidi e proteine. Ulteriore fattore di produzione delle AB è la presenza nella cellula di permeasi, cioè di proteine di membrana che permettono l'assorbimento degli aminoacidi dalla matrice alimentare. Infine, deve essere considerata anche la temperatura che svolge un duplice effetto: un'azione diretta sullo sviluppo cellulare dei ceppi e una indiretta sull'attività degli enzimi proteolitici e decarbossilasici (Silla Santos, 1996). Questi enzimi presentano un intervallo di temperatura ottimale tra i 20 e i 35 °C, mentre temperature minori riducono notevolmente la loro attività (Ababouch *et al.*, 1991). La temperatura può influenzare molti aspetti correlati alla produzione delle AB e spesso può indurre un effetto antagonista alla loro produzione, influenzando le cinetiche di crescita dei microrganismi, la resa cellulare e l'attività enzimatica (Dapkevicius *et al.*, 2000). La temperatura, però, non presenta nessun effetto degradativo sulle ammine poiché esse sono termostabili, fatta eccezione per la SPM. Inoltre, anche gli enzimi decarbossilasici possono presentare resistenze ai trattamenti termici. Dunque negli alimenti trattati termicamente non sarà assicurata la distruzione delle AB. Per alimenti che necessitano la presenza di NaCl per la loro produzione, come le olive da mensa, anche tale fattore determina una variazione nella formazione di AB. A seconda del rapporto sale/acqua durante la fermentazione e lo stoccaggio, l'NaCl influenza la moltiplicazione dei microrganismi, i ceppi che prendono il sopravvento e la produzione di enzimi che alterano la struttura della drupa e che possono favorire la decarbossilazione degli AA (Lanza, 2013; Ababouch *et al.*, 1991). Anche la presenza di fonti carbonio, come il

glucosio, agendo sulle dinamiche della popolazione batterica (Sanchez *et al.*, 2001), può influenzare la produzione di AB. In particolare sono noti dati in letteratura che riportano come fattore di incremento della sintesi di HIA, il glucosio, e di contro fattori che la inibiscono come acidi organici e glicina (Maijala *et al.*, 1993). Un ulteriore punto critico per la formazione di AB sono le condizioni di conservazione del prodotto, in particolare la temperatura e la durata del periodo. È bene, quindi, tenere sotto controllo tutti i parametri ambientali nell'arco del periodo di conservazione, in modo tale da limitare, per quanto possibile, fenomeni non voluti e poco positivi. Il numero di microorganismi presenti nella materia prima rimane, comunque, uno dei fattori critici di maggior impatto. Per tale ragione, il controllo delle AB è legato principalmente alla prevenzione dello sviluppo dei microrganismi responsabili della loro formazione mediante diversi processi tecnologici (come il riscaldamento, la salagione, l'aggiunta di spezie ed altro), oppure attraverso l'uso di colture starter non produttrici AB (Bover-Cid *et al.*, 2000; Costantini *et al.*, 2011; Lonvaud-Funel, 2001; García-Ruiz *et al.*, 2011).

## **Il quadro normativo**

Nonostante l'attività tossica riconosciuta di alcune ammine e il loro elevato contenuto in alcuni prodotti fermentati, soprattutto formaggi e salumi, non sono ancora stati stabiliti per legge dei limiti legali. L'unico riferimento normativo attualmente in vigore per le ammine biogene è quello per l'istamina nei prodotti ittici. Il regolamento della Commissione Europea (EC) No 2073/2005 (e successive modifiche EC No 1441/2007 e EU No 365/2010) ha fissato i criteri di sicurezza alimentare per l'istamina

in due differenti prodotti della pesca (fresco e in salamoia) per le specie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphenidae*, *Pomatomidae* e *Scombreresosidae*. Nonostante i timori legati all'impatto sulla salute, non esistono comunque ancora limiti di legge per quanto riguarda il tenore massimo di ammine biogene nei vini. Neanche l'OIV (*Organization Internationale de la Vigne et du Vin*) ha fissato dei limiti massimi applicabili ai vini. Tuttavia, alcuni paesi Europei hanno fissato valori massimi ammissibili per l'istamina compresi tra 2 e 10 mg/L (Svizzera e Austria 10 mg/L, Francia 8 mg/L, Olanda 4 mg/L, Belgio 5-6 mg/L e Germania 2 mg/L).

Dai vari studi è emerso che possa essere più utile indicare il valore massimo del contenuto totale di AB negli alimenti, piuttosto che il valore di una singola ammina. Dal momento che in letteratura si trovano dei dati indicativi per i livelli di pericolosità per l'uomo, l'EFSA ha avviato un programma per la raccolta sistematica di dati sulla concentrazione di AB negli alimenti (EFSA, 2010).

### **Ammine biogene e amminoacidi negli alimenti di origine vegetale**

Le ammine biogene possono trovarsi in una notevole varietà di alimenti, anche di origine vegetale, in particolare in quelli ricchi di proteine, come frutta, noci, prodotti di soia e ovviamente tutte le verdure fermentate (crauti, cetriolini sott'aceto e olive da mensa), ma anche in bevande fermentate come il vino (Silla Santos, 1996; Dugo *et al.*, 2006; Karovičová *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2010). Dalla letteratura è emerso anche che in varie specie vegetali, le poliammine sono implicate nella regolazione dei fenomeni di sviluppo, come fioritura e fruttificazione, ma anche nelle risposte allo stress e agli stimoli

ambientali (Kusano *et al.*, 2008). Per tali motivi, il contenuto delle poliammine nei prodotti fermentati di origine vegetale ha una duplice origine: endogena, dovuta alle ammine normalmente contenute nel prodotto, ed esogena dovuta alle ammine formatesi a causa dei processi degradativi a carico di AA e altre ammine.

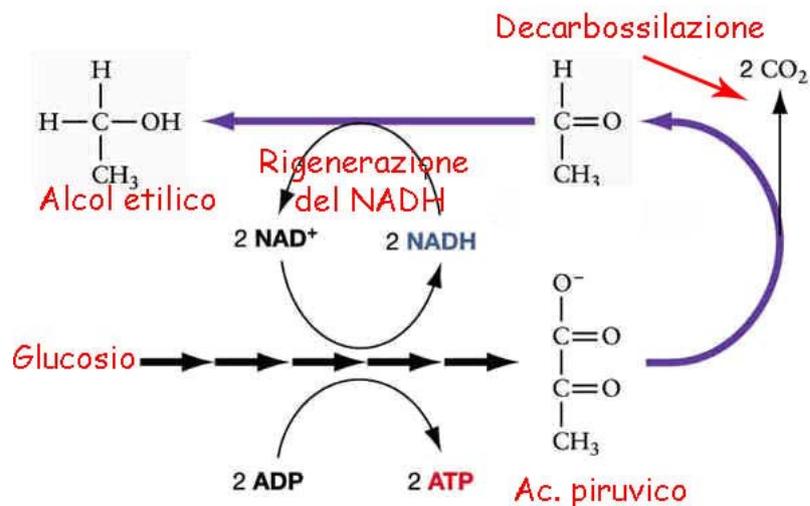
### *AA e AB nel vino*

Il vino è una bevanda utilizzata dall'uomo fin dall'antichità. Testimonianze storiche lo citano in Medio Oriente nel 6000 a.C, ma furono i Romani che lo diffusero in tutto il bacino del Mediterraneo dal 500 d.C., facendolo arrivare persino nei Balcani e nel nord Europa (Pretorius, 2000). Oggi il vino fa ormai parte della nostra cultura e delle nostre tavole, ma ha anche un peso considerevole nelle economie di molte nazioni produttrici. Il settore vinicolo comprende una grandissima varietà di vini e richiede una continua innovazione per far fronte sia alla concorrenza del mercato, sia per andare incontro alle esigenze e alla salute dei consumatori. Nonostante la grande diversità di vini presenti, i principi della loro produzione nel corso dei secoli sono cambiati molto poco e le operazioni di base della vinificazione sono:

- pigiatura dei grappoli ed estrazione del succo;
- fermentazione alcolica del succo ad opera dei lieviti;
- fermentazione malolattica opzionale ad opera dei batteri acido-lattici;
- immagazzinamento ed invecchiamento del vino nelle cantine;
- confezionamento e vendita del vino.

Il vino è fondamentalmente un prodotto di fermentazione alcolica del succo di uva ad opera di lieviti, i principali responsabili della biotrasformazione degli zuccheri (principalmente glucosio e fruttosio) presenti nei grappoli in etanolo, anidride carbonica e altri metaboliti (**Figura 3**). In realtà, il processo di vinificazione coinvolge vari microrganismi che danno un contributo sinergico alla semplice fermentazione alcolica, come lieviti, funghi filamentosi, batteri acido-lattici, altri gruppi di batteri e persino batteriofagi (Fleet, 1999).

**Figura 3.** La fermentazione alcolica



La vite (*Vitis vinifera*) contiene AB negli acini, ma è necessario sottolineare che le diverse pratiche agricole (convenzionale, biologica e biodinamica) e procedure di vinificazione possono influenzare notevolmente la quantità finale AB nei vini (Martínez-Pinilla *et al.*, 2013). Infatti, durante i processi di fermentazione da mosto a vino, i microrganismi sono in grado di produrle e la loro presenza nel vino può essere una

conseguenza del metabolismo dei lieviti durante la fermentazione primaria e dei batteri durante la fermentazione malo-lattica. Nel settore enologico la produzione di AB, in particolare di HIA, è legata soprattutto al metabolismo dei batteri lattici durante la fermentazione malo-lattica, processo che ha luogo nei vini rossi e talvolta, in quelli bianchi (Lonvaud-Funel, 2001). Durante questa fermentazione si ha la disacidificazione del vino attraverso la conversione dell'acido malico in acido lattico, ma possono verificarsi altri cambiamenti metabolici. I batteri lattici durante il loro sviluppo possono produrre AB ed in particolare l'*Oenococcus oeni* (batterio Gram+ appartenente alla famiglia delle *Leuconostocaceae*) ne può produrre diverse e in quantità rilevanti (Lonvaud-Funel, 2001; Guerrini *et al.*, 2002). Metodi efficienti nella ricerca di AB sono sia la quantificazione (Önal, 2007), che l'individuazione dei microrganismi produttori (Gardini *et al.*, 2005). Un modo per prevenire il problema è stato proposto da Landete *et al.* (2007) che in uno studio suggerisce di ridurre al minimo quei processi che aumentano il contenuto di AA nel mosto, come la macerazione delle bucce d'uva o il contatto con le fecce, inibendo i batteri lattici indigeni ed inoculando starter commerciali di *O. oeni*, non produttori di AB.

### ***AA e AB nelle olive da mensa***

La fermentazione per la produzione delle olive da mensa si basa su una microflora complessa che coinvolge batteri lattici (Hurtado *et al.*, 2012) e lieviti (Arroyo-López *et al.*, 2008). Negli ultimi anni, molti autori si sono concentrati sull'attività dei lieviti in quanto questi possono avere un forte impatto sulla qualità dei prodotti. Infatti, essi

possono svolgere un doppio ruolo durante la trasformazione delle olive da mensa, agendo allo stesso tempo da possibili artefici sia di effetti desiderabili che indesiderabili (Arroyo-López *et al.*, 2008), in particolare a causa della produzione di AB. I dati relativi alla composizione quali-quantitativa di AB e amminoacidi AA nelle olive da mensa pubblicati finora sono pochi e frammentari.

## I metodi di analisi

L'eterogeneità chimica degli amminoacidi e delle ammine biogene pone svariati problemi nella determinazione quali-quantitativa di queste molecole. Fermo restando che le tecniche cromatografiche, in particolare quelle che sfruttano la cromatografia liquida (LC), sono le più indicate per affrontare questa problematica, bisogna superare numerose difficoltà connesse sia alla separazione cromatografica, sia alla scelta del rivelatore più indicato. Per tali motivi sono stati proposti diversi metodi che consentono di analizzare simultaneamente AA e AB, tutti però possiedono un'importante caratteristica comune: l'uso di agenti derivatizzanti prima di procedere all'analisi HPLC (Innocente *et al.*, 2007). I reagenti di derivatizzazione permettono di rilevare tutte le ammine, utilizzando dei reattivi in grado di reagire con il gruppo amminico tipico della struttura chimica sia degli AA che delle AB. In generale, dalla letteratura è emerso che i derivatizzanti più frequentemente utilizzati, a tale scopo, sono:

- *o*-ftalaldeide (OPA) (Kutlán *et al.*, 2003),
- 9-Fluorenilmetilossicarbonil cloruro (Fmoc-Cl) (Bauza *et al.*, 2007; Molnár, 2011),
- dansil cloruro (DCI) (Mazzucco *et al.*, 2010; Pineda *et al.* 2012),

- dansil cloruro (Krause I. *et al.*, 1995),
- dietilettossimetilenemalonate (DEEMM) (Cejudo-Bastante *et al.*, 2010; Gómez-Alonso *et al.*, 2007),
- p-N,N,N-trimetilammonioanilil carbammato N-idrossisuccinimidil ioduro (TAHS) (Rebane *et al.*, 2012),
- 2,5-diossopirrolidin-1-il N-tri(pirrolidino)fosforanilideneammino carbammato (FOSF) (Rebane *et al.*, 2012).

Tra le tecniche di rilevazione più diffuse per la loro determinazione ritroviamo principalmente fluorescenza e UV- VIS, anche se viene spesso impiegata anche la massa (Önal, 2007). Tuttavia uno degli approcci preferiti risulta essere l'uso di un rivelatore a fluorescenza poiché offre maggiore sensibilità rispetto alla rilevazione UV-VIS ed è altamente specifico. Il dansil cloruro (DCI) è uno dei reagenti di derivatizzazione su cui ricade più spesso la scelta perché forma composti stabili con ammine primarie e secondarie (Jia S. *et al.*, 2011, Gros *et al.*, 1969; Lehtonen, 1996). Questo è importante perché alcuni reagenti di derivatizzazione elencati precedentemente determinano degli inconvenienti o presentano dei limiti nella metodica. Ad esempio reagenti come l'OPA, non reagiscono con la Pro (Molnár-Perl I. *et al.*, 2011) che rappresenta l'AA più abbondante nel vino e la cui determinazione risulta perciò importante. Anche la metodica del DEEMM presenta problemi per la determinazione della Pro in quanto il derivato DEEMM-Pro non è stabile e di conseguenza si ha un LOQ alto (Rebane *et al.*, 2012). Il FOSF invece non è ottimale per la rilevazione dell'Arg in quanto necessita di un'elevata concentrazione del suddetto AA per poter ottenere il prodotto FOSF-Arg.

Probabilmente ciò è correlato all'alta basicità della catena laterale dell'Arg, che ne limita il legame con questo derivatizzante (Rebane *et al.*, 2012).

## La validazione dei metodi

La messa a punto di un metodo analitico quali-quantitativo richiede che esso venga validato, ovvero che vengano determinati una serie di parametri che dimostrino l'affidabilità del metodo. A questo scopo, il metodo messo a punto per questo lavoro di tesi è stato validato in accordo con la "*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*" (ICH) che descrive la convalida di metodi analitici (ICH Topic Q2 (R1), 1995). Le linee guida riportano in dettaglio le procedure necessarie per ottenere una serie di parametri che descrivono l'affidabilità di un metodo analitico determinando:

- Linearità: capacità, entro un certo intervallo, di ottenere risultati che siano direttamente proporzionali alla concentrazione di un analita nel campione. La linearità si calcola costruendo una retta di taratura in un intervallo ben preciso di concentrazione. Tale retta di taratura permette di calcolare anche il coefficiente di correlazione ( $r$ ) e di determinazione ( $r^2$ ) e fornisce il valore di pendenza della curva ( $S$ ) da utilizzare per determinare l'LOD e l'LOQ;
- Limiti di rilevabilità (LOD, *limit of detection*), quantità minima di analita in un campione che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata come valore esatto. L'LOD viene calcolato secondo l'equazione  $LOD = 3,3\sigma/S$ , dove  $\sigma$  = deviazione standard del bianco e  $S$  = pendenza della curva di calibrazione;

- Limite di quantificazione (LOQ, *limit of quantification*), quantità minima di analita in un campione che può essere determinata quantitativamente con precisione. L'LOQ viene calcolato secondo l'equazione  $LOQ = 10\sigma/S$  dove  $\sigma$  = deviazione standard del bianco, e S= pendenza della curva di calibrazione;
- Precisione, esprime il grado di concordanza tra una serie di misurazioni ottenute dal campionamento multiplo di uno stesso campione omogeneo. La precisione può essere considerata a tre livelli:
  - ripetibilità (intra-day, stesse condizioni operative in un breve intervallo di tempo),
  - precisione intermedia (inter-day, variazioni di laboratori, giorni diversi, diversi analisti, diverse attrezzature),
  - riproducibilità, esprime la precisione tra i laboratori

Viene generalmente espressa come la varianza, deviazione standard o la deviazione standard relativa (RSD) di una serie di misurazioni. In questo lavoro di tesi, è stata determinata la deviazione standard relativa per l'area dei picchi come una misura di precisione.

- Accuratezza, esprime il grado di concordanza tra il valore che viene accolto come valore vero o valore di riferimento e il valore trovato. Per validare l'accuratezza del metodo è stata utilizzata la valutazione del recupero, misurato aggiungendo quantità note di standard ai campioni di matrice, in triplice copia a due livelli di concentrazione.

## PRODOTTI TIPICI DELLA SARDEGNA

La Sardegna, grazie alla sua posizione geografica nel centro del Mediterraneo, presenta condizioni climatiche ideali per la produzione di un notevole numero di prodotti alimentari di origine vegetale. Alcuni di questi prodotti richiedono processi di fermentazione per prolungare nel tempo la loro conservazione. Classico esempio sono il vino e le olive da mensa, due prodotti che permettono di consumare i frutti freschi di partenza, rispettivamente uva e olive, anche molto tempo dopo la loro raccolta.

### Il vino e la Sardegna

In Sardegna il vigneto è parte integrante del paesaggio e ha sempre avuto un ruolo importante nell'economia agricola sarda. La particolare conformazione territoriale della Sardegna consente una viticoltura moderatamente intensiva, caratterizzata da una produzione enologica di elevata qualità. I reperti archeologici rinvenuti hanno portato a ritenere che l'attività enologiche fosse già presente in epoca nuragica. È quasi certo che la *Vitis vinifera*, al pari dell'olivo, sia in Sardegna una pianta indigena, selvatica, e che i popoli sopraggiunti, in particolare i Romani e gli Spagnoli, non portarono tanto il ceppo, bensì l'arte dell'innesto, della coltivazione, e le tecniche di produzione e di conservazione del vino.

La Sardegna ad oggi vanta una DOCG (Denominazione di Origine Controllata e Garantita), ossia il Vermentino di Gallura, 17 DOC (Denominazione di Origine Controllata) e 15 IGT (Indicazione Geografica Tipica) (Sardegna Agricoltura - Regione

Autonoma Sardegna). Tra i vini più importanti della Sardegna si devono ricordare Cannonau, Carignano, Vermentino e Vernaccia, vini prodotti da vitigni rossi e bianchi che portano rispettivamente lo stesso nome.

### ***Cannonau***

Il Cannonau è il vitigno rosso più diffuso in Sardegna con una percentuale pari al 24%, ma arriva al 62% nella provincia di Nuoro e proprio per questa ragione il vino omonimo è il vino sardo più noto. La coltivazione di questo vitigno è diffusa in tutta l'isola, ma in particolare nelle zone più interne, soprattutto in Ogliastra. Il vino Cannonau presenta peculiari caratteristiche sensoriali che tuttavia variano da zona a zona: in generale ha una buona struttura con note olfattive e gustative che ricordano fiori o frutti rossi, freschi con sfumature quasi di confettura e speziate per le tipologie riserva o liquoroso. È bene ricordare che la DOC Cannonau di Sardegna comprende anche alcune sottocategorie: "Jerzu", "Capo Ferrato", "Oliena" o "Nepente di Oliena". La coltivazione del Cannonau nell'Isola è così importante che già nel 1972 vi è stato il riconoscimento della denominazione d'origine controllata del vino "Cannonau di Sardegna".

### *Disciplinare di produzione del Cannonau DOC*

I vini "Cannonau di Sardegna" sono regolamentati dal DPR 21.07.1972 G.U. 248 - 21.09.1972, successivamente modificato con DM 29.06.1982 G.U. 226 - 18.08.1982, DM 29.06.1992 G.U. 272 - 18.11.1992, DM 05.11.1992 G.U. 272 - 18.11.1992, DM 04.11.2011 G.U. 273 - 23.11.2011 e con il DM 30.11.2011 (Sardegna Agricoltura -

Regione Autonoma Sardegna). La denominazione di origine controllata “Cannonau di Sardegna” è riservata esclusivamente a quelle tipologie di vini che sono in grado di rispondere ai requisiti prescritti nel disciplinare di produzione e comprende le DOC “Cannonau di Sardegna” Rosso e Rosato, Rosso Riserva, Passito, Liquoroso e Classico (consentita per i vini delle province di Nuoro ed Ogliastra). Le modalità di lavorazione sono differenti e proprio per questo sono indispensabili per esprimere al meglio le caratteristiche sensoriali e la tipicità dei vini sopra indicati. Tali vini devono essere ottenuti per minimo l’85% da uve prodotte dai vigneti di Cannonau, il restante può derivare da altri vitigni di uve a bacca nera non aromatici, ma iscritti nel registro nazionale delle varietà di vite per uve da vino (D.M. 7 maggio 2004 e successivi aggiornamenti). Fa eccezione la tipologia “Classico” che deve avere invece un minimo del 90% di Cannonau. Per quanto riguarda le zone di produzione delle uve e le operazioni di invecchiamento ed imbottigliamento devono avvenire all’interno della regione Sardegna (per la specificazione “Classico”, le uve devono essere prodotte nei comuni delle province di Nuoro ed Ogliastra). L’imbottigliamento e il condizionamento deve aver luogo nelle stesse zone geografiche delimitate per salvaguardare la qualità, la reputazione, garantire l’origine della denominazione ed assicurare l’efficacia dei controlli. Nelle operazioni di vinificazione sono ammesse soltanto le pratiche enologiche appropriate per il mantenimento delle peculiari caratteristiche dei suddetti vini. All’atto dell’immissione al consumo del vino finito, il “Cannonau di Sardegna” Rosso deve risultare, secondo il disciplinare, di colore rosso rubino più o meno intenso, con un profumo fruttato maturo di piccoli frutti rossi e neri (ciliegia, mirto, prugna, mora),

sapore caratteristico sapido e leggermente tannico, con titolo alcolometrico volumico totale minimo di 12,50%, acidità totale minima pari a 4,5 g/L e estratto non riduttore minimo (estratto secco totale meno gli zuccheri presenti nel vino) di 22,0 g/L. Per quanto riguarda le altre tipologie di Cannonau è stato stabilito che: il “Cannonau di Sardegna” Rosato deve avere colore rosa brillante più o meno intenso, profumo floreale di rosa/viola e fruttato di ciliegia, il gusto è secco, caratteristico delle uve di provenienza, deve possedere parametri identici al precedente ad eccezione dell’estratto non riduttore minimo che deve essere pari a 18,0 g/L; il “Cannonau di Sardegna” Rosso Riserva deve avere colore rosso rubino, tendente al granato con l’invecchiamento, profumo floreale di rosa o petalo secco, fruttato da frutta matura (confettura e prugna secca), con un fondo speziato (chiodi di garofano e cannella-vaniglia) e vegetale da balsamico (mentolatoeucaliptolo), ha un sapore sapido, anch’esso caratteristico, molto caldo e morbido con retrogusto amarognolo, leggermente tannico, il suo titolo alcolometrico volumico totale minimo è pari a 13,00%, acidità totale minima sempre di 4,5 g/L e estratto non riduttore minimo di 24,0 g/L. Per quanto riguarda la tipologia “Cannonau di Sardegna” Classico deve possedere un tipico colore rosso rubino brillante che vira al granato con l’invecchiamento, profumo floreale di rosa o petalo secco, fruttato da frutta matura, con un fondo speziato e balsamico; il gusto è tipico, secco, sapido, molto caldo, con un retrogusto amarognolo, odore e sapore gradevole e caratteristico delle uve di provenienza, titolo alcolometrico volumico totale minimo di 13,50%, acidità totale minima e estratto non riduttore minimo pari alla tipologia precedente. Il “Cannonau di Sardegna” Passito deve essere di colore rosso rubino più o meno intenso, odore intenso

e etereo, sapore dolce e pieno, titolo alcolometrico volumico totale minimo di 15,00% di cui effettivo minimo 13,00%, zuccheri residui con minimo 50,0 g/L, acidità totale minima di 4,0 g/L, estratto non riduttore minimo di 26,0 g/L. Infine per il “Cannonau di Sardegna” Liquoroso le caratteristiche fissate sono: colore rosso tendente al granato con l’invecchiamento, odore intenso e etereo con un profumo di confettura matura, dal gusto caratteristico, etereo, sapido, dal secco al dolce, pieno e armonico, titolo alcolometrico volumico effettivo minimo 18,00% per il tipo “secco” e 16,00 % per il tipo “dolce”, zuccheri riduttori massimo 10,0 g/L per il tipo “secco” e minimo 50,0 g/L per il tipo “dolce”, acidità totale minima: 4,0 g/L, estratto non riduttore minimo 24,0 g/L (Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna).

### *Carignano*

Il vino DOC “Carignano del Sulcis” è uno dei grandi vini rossi della Sardegna e viene prodotto dalle uve del vitigno omonimo coltivato nella zona tradizionale del Sulcis situata nella parte sud-occidentale della Sardegna. La denominazione Carignano del Sulcis DOC è stata istituita nel 1977 e le uve devono essere prodotte nell'ambito del Sulcis comprendendo comuni in provincia di Carbonia-Iglesias e di Cagliari (Calasetta, Carbonia, Carloforte, Giba, Masainas, Narcao, Nuxis, Perdaxius, Piscinas, Portoscuso, San Giovanni Suergiu, Santadi, Sant'Anna Arresi, Sant'Antioco, Teulada, Tratalias, Villaperuccio). Con grande probabilità l’introduzione del Carignano in Sardegna avvenne ad opera dei Fenici o dei Cartaginesi, anche se risulta credibile la tesi secondo la quale il vitigno sarebbe stato importato dalla penisola iberica fin dai primi tempi della

dominazione spagnola dell'Isola. Quest'ultima ipotesi troverebbe riscontro anche nella stessa denominazione dialettale localmente in uso per l'uva Carignano: "Axina de Spagna" cioè "Uva di Spagna". In ogni caso la coltivazione del vitigno Carignano in Sardegna risale ad ogni modo ad epoche remote.

In generale dal punto di vista organolettico si può affermare che il vino Carignano del Sulcis si presenta di colore rosso rubino più o meno intenso, odore vinoso intenso, sapore asciutto, sapido ed armonico. In generale questa DOC risulta essere un rosso vellutato e straordinariamente equilibrato, ragion per cui riscontra un forte apprezzamento e viene incluso tra i grandi vini di elite. Nelle tipologie prodotte dopo un periodo di maturazione in botte, il vino affina le sue caratteristiche, assumendo il tipico colore rubino carico, profumi di prugne e ribes, il gusto caldo, intenso e persistente.

#### Disciplinare di produzione del Carignano DOC

Esistono differenti tipologie di Carignano: "Carignano del Sulcis" rosso, "Carignano del Sulcis" rosso riserva, "Carignano del Sulcis" rosso superiore, "Carignano del Sulcis" rosato, "Carignano del Sulcis" novello, "Carignano del Sulcis" passito. Secondo il disciplinare di produzione, il "Carignano del Sulcis" rosso, riserva, superiore, rosato, novello e passito devono essere ottenuti per almeno l'85% dalle uve Carignano (prodotte nell'ambito del Sulcis, mentre il restante 15% può essere costituito da uve provenienti da vitigni a bacca rossa non aromatici idonei e iscritti nel registro nazionale delle varietà di vite per uve da vino (D.M. 7 maggio 2004 e successivi aggiornamenti). Le uve destinate alla produzione del "Carignano del Sulcis" rosso devono assicurare un titolo alcolometrico volumico complessivo naturale minimo di 12% vol, mentre quelle

destinate alla produzione delle tipologie "rosso riserva" e "rosso superiore" devono assicurare un titolo alcolometrico volumico complessivo minimo di 12,5% vol. Le uve destinate alla produzione delle tipologie novello e rosato, devono assicurare ai vini un titolo alcolometrico volumico complessivo naturale minimo dell'11% vol. Anche per il Carignano, così come per il Cannonau e le altre DOC, l'imbottigliamento e il condizionamento deve aver luogo nelle stesse zone geografiche proprio per poter garantire qualità e origine della denominazione (Reg. CE n. 607/2009), nell'eventualità che invece l'imbottigliamento avvenga al di fuori dell'area di produzione delimitata, sono previste comunque delle autorizzazioni individuali a determinate condizioni (decreto legislativo n. 61/2010).

Per quanto riguarda la vinificazione della tipologia passito, la tradizione prevede che l'uva sia sottoposta ad un appassimento naturale in locali idonei o su pianta, sotto tettoie, e/o anche al sole fino al raggiungimento di un contenuto zuccherino non inferiore al 27%. La conservazione e l'invecchiamento devono avvenire in recipienti per almeno 6 mesi di cui almeno tre di affinamento obbligatorio in bottiglia. Terminato il periodo di invecchiamento, il prodotto deve avere un titolo alcolometrico volumico complessivo minimo del 16%.

Il Carignano del Sulcis rosso risulta essere di colore rosso rubino, con odore vinoso e sapore asciutto, sapido, e armonico. Il suo titolo alcolometrico volumico totale minimo è del 12%, acidità totale minima di 4,5 g/L ed estratto non riduttore minimo pari a 25 g/L. La tipologia "Carignano del Sulcis" riserva risulta di un rosso rubino più intenso con un titolo alcolometrico volumico totale minimo di 12,5 % ed estratto non riduttore

minimo di 26 g/L. Il colore del Carignano del Sulcis superiore è più tendente al granato e differisce per titolo alcolometrico volumico totale minimo di 13 %. Il Carignano del Sulcis rosato ha ovviamente una differente colorazione, di un rosato più o meno intenso e un titolo alcolometrico volumico totale minimo di 11,5%, con un estratto non riduttore minimo di 18 g/L. Il “Carignano del Sulcis” novello possiede sempre un colore rosso rubino e la profumazione risulta più vinosa e fruttata, sapore asciutto e sapido, il valore degli zuccheri riduttori residui non devono superare i 6 g/L, mentre l’estratto non riduttore minimo deve essere di 20 g/L. Infine tra le tipologie di “Carignano del Sulcis” ritroviamo il passito, il cui colore varia dal rosso all'ambrato, possiede un odore intenso e sapore dolce e vellutato, titolo alcolometrico volumico totale minimo è del 16%, con acidità totale minima sempre di 4,5 g/L, estratto non riduttore minimo di 28 g/L e l’ammontare degli zuccheri riduttori deve essere del minimo 5% (Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna).

### ***Vermentino***

Il Vermentino insieme al Cannonau rappresenta per eccellenza la produzione enologica Sarda ed è praticamente prodotto da tutte le aziende vitivinicole dell’Isola. Il vitigno Vermentino viene attualmente utilizzato per la DOCG “Vermentino di Gallura” e le DOC “Vermentino di Sardegna”, “Alghero Vermentino frizzante” e “Cagliari Vermentino”. Il vino DOC “Vermentino di Sardegna”, nelle diverse tipologie previste dal disciplinare di produzione, si presenta un ottimo vino bianco, non molto alcolico, brillante, di colore giallo paglierino leggero, generalmente con riflessi verdolini molto

tenui, liscio, morbido, fresco e di buona sapidità e dal profumo delicato. I vini denominati "Vermentino di Sardegna" sono regolamentati dal DPR 23.02.1988 G.U. 3 - 04.01.1989 e successive modifiche (DM 04.11.2011 G.U. 272 - 22.11.2011; DM 30.11.2011) (Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna).

#### Disciplinare di produzione del Vermentino DOC

La denominazione di origine controllata "Vermentino di Sardegna" è riservata ai vini che rispondono a precisi requisiti prescritti nel disciplinare di produzione, che devono essere rispettati per tutte e tre tipologie di vermentino: "Vermentino di Sardegna", "Vermentino di Sardegna" Frizzante, "Vermentino di Sardegna" Spumante. Devono essere ottenuti per minimo 85% da uve Vermentino prodotte in Sardegna e fino ad un massimo del 15% da uve provenienti da altri vitigni a bacca bianca (non aromatici) e, come visto per i precedenti vini, sempre iscritti nel registro nazionale delle varietà di vite per uve da vino approvato, con D.M. 7 maggio 2004 e successivi aggiornamenti. Anche per il Vermentino le operazioni di vinificazione e d'imbottigliamento devono essere effettuate all'interno della zona di produzione come per i vini già trattati. Nella vinificazione sono ammesse soltanto le pratiche atte a conferire ai vini le proprie peculiari caratteristiche e al momento dell'immissione al consumo, le diverse tipologie di Vermentino devono rispondere a determinate caratteristiche. Il "Vermentino di Sardegna" presenta un colore giallo paglierino, con leggeri riflessi verdolini, odore caratteristico, delicato e gradevole, sapore dal secco all'amabile, fruttato, fresco, sapido, con leggero retrogusto amarognolo. Il titolo alcolometrico volumico effettivo deve essere minimo del 10,5%, acidità totale minima

sempre di 4,5 g/L al pari degli altri vini e infine l'estratto non riduttore minimo pari a 14 g/L. Il "Vermentino di Sardegna" Frizzante differisce dal precedente per la spuma fine ed evanescente, odore fruttato e sapore che varia dal secco all'amabile, con peculiare carattere frizzante. Infine abbiamo il "Vermentino di Sardegna" Spumante avente spuma più intensa e persistente, il profumo delicato e un sapore che varia da brut nature (secco) a demi-sec (moderatamente dolce), fresco e caratteristico. Il suo titolo alcolometrico volumico totale minimo è dell'11%, mentre le restanti caratteristiche lo accomunano agli altri (Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna).

### *Vernaccia*

Dalla Vernaccia di Oristano, vitigno anch'esso probabilmente introdotto in Sardegna dai Fenici, si ricava l'omonimo vino DOC, dal colore giallo, dorato e ambrato, dal profumo delicato con sfumature di fiori di mandorlo e un sapore fino con retrogusto di mandorle amare e grado alcolico minimo di 15,5. Interessante è il metodo di produzione, la vendemmia viene effettuata a mano, di solito dalla seconda metà di settembre fino alla prima decade di ottobre. A seguito della spremitura e della fermentazione naturale, il vino viene trasferito in botti di media capacità, di castagno o di rovere, riempite al 75-80% del loro volume, in modo tale che per la presenza d'ossigeno, si formi sulla superficie del vino un velo costituito da lieviti denominato "flor". Questi lieviti si stratificano sulla superficie del vino formando pian piano un velo continuo che poi gradualmente ispessisce e le cellule dei lieviti assumono la caratteristica forma esagonale. In tal modo si realizza un film protettivo che separa il vino dall'aria,

caratteristica indispensabile per la qualità finale della Vernaccia. I lieviti operano anche da agenti moderatamente ossidativi e utilizzano per il loro metabolismo alcol etilico e acido acetico formando aldeide acetica, precursore dei profumi caratteristici di questo vino. Raggiunto un determinato spessore, il velo scende depositandosi poi sul fondo della botte, fungendo da filtro mobile, che rende il vino limpido e più chiaro. È interessante notare che nonostante i lieviti utilizzino l'alcol etilico per il loro metabolismo, il grado alcolico aumenta di 0,5-0,8 % vol all'anno: questo si verifica poiché le molecole dell'acqua sono più piccole di quella dell'alcol e quindi filtrano più facilmente dai pori delle botti (le annate più vecchie, anche di oltre 10 anni, hanno, infatti, gradi alcolici che possono superare i 20% vol). L'affinamento avviene in ambienti soggetti a forti sbalzi termici per almeno due anni, ad eccezione della "Vernaccia di Oristano" riserva per cui occorrono, quattro anni di invecchiamento. Oltre alla Vernaccia classica si producono anche Vernacce di tipo Liquoroso dolce e Liquoroso secco o dry, con un invecchiamento di due anni e un grado alcolico finale di 16,5 nel tipo dolce e di 18 nel tipo secco o dry. La "Vernaccia di Oristano", dopo il primo travaso, può essere usata per la preparazione del vino "Vernaccia di Oristano" liquoroso semplicemente aggiungendo alcol da vino o acquavite di vino. Il prodotto così trattato, viene trasferito in botti di castagno o di rovere per subire un invecchiamento minimo di due anni. Anche questi vini sono regolamentati da differenti decreti, come: DPR 11.08.1971 G.U. 247 - 30.09.1971, successivamente modificato con DM 30.03.2001 G.U. 102 - 04.05.2001, e con DM 30.11.2011 (Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna).

### Disciplinare di produzione della Vernaccia DOC

Il suo disciplinare di produzione stabilisce che la "Vernaccia di Oristano" deve rispondere a determinati requisiti. Deve essere, intanto, ottenuto esclusivamente dalle uve provenienti dal vitigno Vernaccia di Oristano, della medesima zona o dei territori comunali di Oristano, come Siamaggiore, Zeddiani, Baratili S. Pietro, Nurachi, Riola Sardo, Oristano (con le frazioni Nuraxinieddu, Massama, Donigala Fenugheddu, Sili), Santa Giusta, Palmas Arborea, Cabras (frazione Solanas), Simaxis (con la frazione S. Vero Congius), Solarussa, Ollastra, Zerfaliu, Tramatzu, Milis, S. Vero Milis, Narbolia. Per il medesimo scopo anche le operazioni di vinificazione, di conservazione e di invecchiamento devono essere effettuate all'interno delle suddette zone.

Le caratteristiche che la DOC "Vernaccia di Oristano" deve avere al momento dell'immissione al commercio sono: colore giallo dorato-ambrato, odore delicato con sfumature di fiori di mandorlo, sapore fine, sottile, caldo, con leggero retrogusto di mandorle amare, un'acidità totale minima pari a 3,5 g/L e un titolo alcolometrico volumico effettivo minimo di 15,00% vol, mentre l'estratto non riduttore minimo deve essere di 17 g/L. Per quanto riguarda invece la "Vernaccia di Oristano" superiore e la "Vernaccia di Oristano" riserva, esse differiscono dalla precedente principalmente per gli ultimi due parametri che in questo caso devono essere per entrambi rispettivamente di 15,50% vol e 18 g/L. La "Vernaccia di Oristano" liquoroso presenta invece un odore più intenso, complesso e alcolico, con un sapore che varia dal secco al dolce. Il suo titolo alcolometrico volumico effettivo minimo deve essere di 16,50 % vol, acidità totale

minima di 3,5 g/L e estratto non riduttore minimo pari a 18 g/L (Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna).

### **Le olive da mensa**

Il frutto dell'albero dell'olivo (*Olea europaea* L.) è una drupa carnosa la cui dimensione, forma, colore e contenuto di olio dipendono dal tipo di cultivar. La destinazione dei frutti è differente a seconda della loro attitudine a essere trasformati in olio e/o a essere consumati a tavola come olive da mensa. Le varietà di olivo, infatti, si possono distinguere, a seconda dell'utilizzo finale della drupa, in due grandi gruppi: varietà per olive da olio e varietà per olive da mensa (o da mensa). Le varietà da mensa sono caratterizzate dalla produzione di un frutto che, rispetto a quello delle varietà da olio, ha dimensioni maggiori, presenta un elevato rapporto polpa/nocciolo ed ha un contenuto in olio generalmente basso. Per fornire un prodotto di qualità elevata, le varietà da mensa richiedono ottime condizioni di coltura e cioè un terreno molto fertile, fresco per sua natura o irrigabile. Le olive da mensa sono prodotti fermentati ampiamente diffusi (Fernandez-Bolanos *et al.*, 1997) e la zona di produzione più importante è l'area Mediterranea, sebbene tale prodotto venga consumato su larga scala in tutto il mondo. Il loro consumo si sta ulteriormente espandendo, in particolar modo a causa della crescente popolarità della dieta mediterranea. La produzione mondiale di olive da mensa ha raggiunto circa 2,6 milioni di tonnellate nella stagione 2013/2014 (IOC, 2012). La UE, con circa il 30% della produzione mondiale, conferma la propria

posizione di leader produttivo e l'Italia si conferma il terzo produttore in ambito UE, dopo Spagna e Grecia.

Le olive da mensa sono uno dei principali prodotti agricoli che vengono consumati fermentati e in questo caso la fermentazione ha un effetto sia di conservazione, sia di migliorare gli attributi sensoriali del prodotto trasformato. La fermentazione lattica ad opera di batteri omo- ed etero-fermentanti, è quella più diffusa e viene applicata per l'ottenimento di prodotti di qualità, igienicamente sicuri, di elevato valore nutrizionale e dotati di caratteristiche sensoriali desiderate.

### *Tecnologia di produzione olive da mensa*

Per la produzione delle olive da mensa si procede con la raccolta dei frutti a diversi stadi di maturazione e successivamente lavorati per eliminare il caratteristico sapore amaro e renderle idonee alla consumazione. Le olive, infatti, appena raccolte non sono commestibili, per la presenza di glucosidi di natura polifenolica, che conferiscono alla polpa il caratteristico gusto amaro. Tutti i tessuti dell'olivo, soprattutto la polpa, sono ricchi di polifenoli, in particolare oleuropeina glucoside, responsabili del sapore amaro e aspro.

Diversi sono i modi per preparare le olive da mensa, ma i metodi più diffusi sono noti come sistema Spagnolo (o Sivigliano) e sistema Greco (o naturale). In questi processi spontanei si ricorre all'impiego di microrganismi starter e la buona qualità del prodotto finito deve essere garantita dallo stretto controllo del processo di fermentazione e perciò dell'ecosistema delle olive da mensa. Il processo di

fermentazione può essere influenzato da associazioni microbiche derivate da contaminazioni del frutto prima e durante la raccolta, dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione salina della salamoia, ma anche dalla disponibilità di nutrienti, ossigeno e di composti antimicrobici, per es. oleuropeina e acidi organici (Sánchez *et al.*,2001).

Il metodo Sivigliano è quello più diffuso per la produzione di olive con pigmentazione verde-giallo paglierino e consiste in un trattamento alcalino per rimuovere l'amarezza della drupa, seguito da un lavaggio con acqua per eliminare il residuo e dalla fermentazione in salamoia per migliorare le caratteristiche organolettiche della drupa. Il trattamento alcalino con NaOH (concentrazione variabile dall'1,5 al 3%) di norma viene interrotto quando la soda è penetrata per i 2/3 dello spessore della polpa, all'incirca nel giro di alcune ore. Con questo metodo la deamarizzazione è un processo chimico che determina la degradazione per idrolisi dell'oleuropeina ottenendo glucosio, acido elenolico e idrossitirosolo, tutti composti non amari, in tal modo si ottiene però non solo la deamarizzazione, ma anche l'eliminazione dell'effetto antimicrobico dell'oleuropeina. Allontanata la soluzione alcalina con una serie di lavaggi con acqua per 3 o 4 giorni, eliminando così i composti fenolici, ma anche i carboidrati essenziali per la crescita dei microrganismi, si prosegue con l'immersione delle olive nella salamoia (8-10%). La fermentazione spontanea si avvia non appena le olive sono nella salamoia. Nella prima fase di fermentazione, quando prevalgono batteri Gram(-) il pH della salamoia scende da valori alcalini fino a un pH di circa 6 per azione dei batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (2-3 giorni). Se la diminuzione del pH durante i primi giorni di fermentazione non è abbastanza veloce, si può avere un rapido

deterioramento delle olive a causa delle *Enterobacteriaceae* e di altri gruppi microbici che possono portare ammorbidimento e rottura della cuticola e altri difetti (Lanza, 2013). Durante la prima fase del processo di fermentazione, esistono frequenti casi in cui tali batteri Gram(-) possono prendere il sopravvento e, consumando gli zuccheri, rilasciano CO<sub>2</sub> che può accumularsi in sacche di gas sotto l'epidermide (sacche di gas ipocuticolare) oppure nella polpa (sacche di gas intramesocarpiche). Il pH elevato può contribuire allo sviluppo di *Clostridium* in grado di determinare fermentazione putrida, con caratteristico odore di decomposizione, o butirrica col tipico odore di burro rancido. Questa fermentazione maleodorante causata da anaerobi butirrici come *Clostridium butyricum* produce olive completamente spaccate (Lanza, 2013). Nei 10-15 giorni successivi, si sviluppano lieviti e batteri che utilizzando i carboidrati fermentescibili residui, determinano un abbassamento del pH a circa 4,5 per la produzione soprattutto di acido lattico. Nella terza fase che dura fino a due mesi, abbiamo l'esaurimento dei composti fermentescibili e un ulteriore abbassamento del pH a circa 3,8-4. Le olive così prodotte, presentano un colore verde tendente al giallo paglierino, un gusto decisamente acidulo e possono essere conservate in salamoia e immesse in commercio (Lanza e Corsetti, 2009).

Nel metodo Greco non vengono utilizzati trattamenti di tipo chimico per la deamarizzazione che avviene in modo naturale per semplice immersione dei frutti in salamoia (6-10%). Le olive vengono raccolte al completo stato di maturazione ed essendo il processo completamente naturale è più lungo (8-9 mesi) rispetto al precedente, in seguito al lento rilascio delle sostanze fermentescibili attraverso la

cuticola. Nella prima fase della fermentazione (3-4 giorni) si sviluppano batteri Gram(-) della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, i quali scompaiono entro 10-15 giorni per la diminuzione del pH dovuta allo sviluppo dei batteri lattici come *Lactobacillus plantarum*. Durante il processo fermentativo si sviluppano anche lieviti che raggiungono la massima densità in 10-25 giorni, insieme con i batteri lattici. Con questo sistema l'oleuropeina viene scissa dall'attività  $\beta$ -glucosidasi in glucosio e oleuropeina aglicone che viene poi successivamente scisso in di idrossitirosolo e acido elenolico. Le proprietà qualitative e organolettiche del prodotto finale dipendono dai diversi gruppi microbici coinvolti nella fermentazione dell'oliva, ma è generalmente accettato che siano i batteri lattici e i lieviti, i microrganismi più rilevanti che dominano il processo di produzione (Arroyo-López *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2012). I batteri lattici influenzano la fermentazione in vari modi, di cui il più importante è la produzione di acido lattico con conseguente diminuzione del pH che garantisce così la stabilità microbiologica durante la conservazione, anche a temperatura ambiente per lungo tempo, assicurando nella maggior parte dei casi un'ottima conservazione del prodotto.

## PARTE SPERIMENTALE

La prima fase del progetto è consistita nel mettere a punto e validare una metodica adatta a rilevare in modo simultaneo AA e AB in matrici alimentari mediante HPLC-FLD. Le matrici alimentari scelte sono state vino e olive da mensa, poiché durante le loro tecnologie di produzione subiscono processi fermentativi ad opera di differenti microrganismi che possono determinare la formazione di AB. Per quanto riguarda il vino, è stata inizialmente fatta una panoramica riguardante il tenore di AA e AB all'interno di quattro caratteristici vini DOC di Sardegna (Cannonau, Carignano, Vermentino e Vernaccia) e, successivamente, si è ampliata la sperimentazione investigando sull'andamento di produzione delle AB durante i processi fermentativi della vinificazione. Questa sperimentazione è stata effettuata in collaborazione con la Cantina Sperimentale dell'Agris su tre tipologie di vini caratteristici della Sardegna (Cannonau, Vermentino e Moscato) trattando i mosti con differenti ceppi di lieviti e batteri starter allo scopo di ricercare possibili differenze nell'attività microbica degli starter utilizzati.

### **Sviluppo e validazione della metodica HPLC-FLD**

La messa a punto del metodo di analisi delle AB e degli AA ha richiesto una serie di sperimentazioni che permettessero di trovare le condizioni ideali per analizzare simultaneamente il maggior numero di AA e AB. In dettaglio, è stata selezionata la procedura migliore di derivattizzazione e le condizioni di separazione cromatografica.

Infine il metodo è stato validato secondo le linee guida ICH (ICH Topic Q2 (R1), 1995).

### ***Reagenti e standard***

Tutti i prodotti chimici utilizzati erano di grado analitico. Acetone, acetonitrile, metanolo, acido acetico, acido cloridrico (37 % p/p) e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Gli standard di riferimento primario di AB e AA (purezza > 99,9 %) sono stati acquistati da Sigma - Aldrich, Merk e Carlo Erba (Milano, Italia). Le soluzioni standard di AB e AA (ca. 1000 mg/L) sono stati preparati per diluizione con una soluzione costituita da HCl 0,1 M/MeOH (1:1 v/v) e conservati a +4 ° C fino all'utilizzo. La soluzione dell'agente derivatizzante è stato preparata a 5000 mg/L sciogliendo 50 mg di dansil cloruro (DCl) in 10 mL di acetone, conservata anch'essa a +4 ° C fino al momento dell'uso. L'acqua ultrapura (18 M $\Omega$ ) è stata ottenuta con un sistema Milli-Q Vantaggio A10 (Millipore, Milano, Italia).

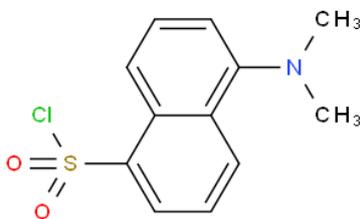
### ***La derivatizzazione***

Tra i vari derivatizzanti solitamente utilizzati in letteratura, si è deciso di testare l'OPA, l'FMOC, il DEEM e il DCl. Dalle prove sperimentali effettuate si è constatato che i primi tre agenti derivatizzanti presentano pro e contro nella determinazione dei composti amminoacidici. In particolare il processo di derivatizzazione con l'OPA è risultato essere una metodica con una tempistica di reazione relativamente lunga rispetto alle altre, inoltre questo reagente non è in grado di reagire con ammine

secondarie ed la stabilità dei prodotti di derivatizzazione non è stata ottimale. L'FMOC non ha dato problemi col processo di derivatizzazione, rapidi tempi di reazione e nessun problema nella derivatizzazione di ammine secondarie o cicliche, tuttavia si è verificata una totale perdita di sensibilità a basse concentrazioni. Infine è stato provato il DEEM tra le cui note negative si è verificata perdita di stabilità per alcune ammine secondarie, in particolare la Pro, AA presente in tutti i vini e a concentrazioni molto elevate. Il Dansil cloruro, invece, si è dimostrato un ottimo agente derivatizzante e pertanto è stato scelto per sviluppare la metodica di analisi.

Il Dansil cloruro (5-dimetilamminonaftalene-1-solfonil cloruro, DCl) è un composto solitamente utilizzato come agente derivatizzante grazie alle sue proprietà fluorescenti. La sua struttura chimica (**Figura 4**) permette il legame con i gruppi  $\alpha$ -aminici dando origine a derivati solfonamidici stabili e fluorescenti che permettono perciò la rivelazione dei DCl-derivati.

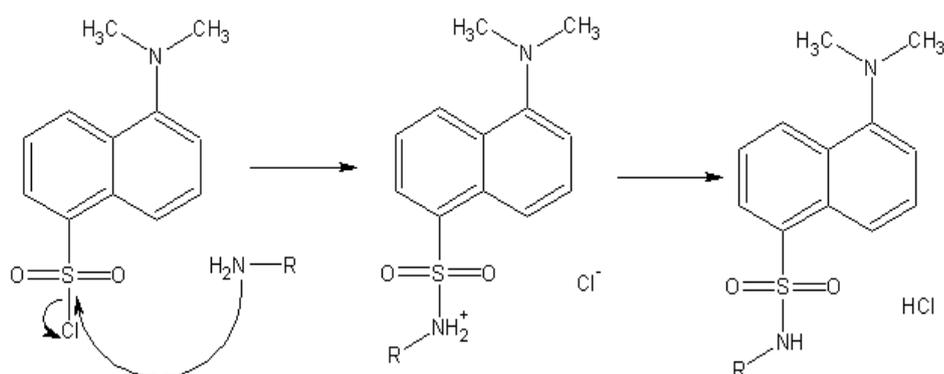
**Figura 4.** Formula di struttura del Dansil cloruro



La reazione che avviene tra il DCl e le ammine è una reazione di sostituzione nucleofila, in cui il nucleofilo (ammina) prende il posto del Cl<sup>-</sup>, presente nella molecola di DCl.

L'alogenuro legato al gruppo  $-SO_2$  rappresenta, infatti, un ottimo gruppo uscente<sup>1</sup> la cui sostituzione è anche favorita dall'effetto elettron-attrattore del gruppo solfonico che migliora ulteriormente la cinetica di reazione rendendo lo  $-S-$  parzialmente positivo ( $\delta^+$ ) e perciò facilmente attaccabile da un nucleofilo (Brown, 2006). Dalla reazione di sostituzione si forma un nuovo legame  $-S-N-$  che dà origine al derivato solfonamidico, in grado di assorbire all'UV-Vis e ad emettere fluorescenza. La **Figura 5** mostra il meccanismo della reazione di derivatizzazione in modo più dettagliato.

**Figura 5.** Reazione di derivatizzazione DCl - Ammine



[Hernández-Borges e Fanali, <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=rmorjDsHqnOxmOIIcCxBA&subNav=yfiqpHsHqnOxmOIIcCxBAG>]

Si nota chiaramente che l'attacco nucleofilo avviene ad opera del gruppo amminico, mediante il suo doppietto elettronico libero che attacca il gruppo solfonico, formando inizialmente un intermedio carico positivamente e successivamente si avrà la sostituzione del  $Cl^-$  legato al gruppo  $-SO_2$ . Il DCl si è rivelato essere un ottimo derivatizzante anche perché fornisce derivati molto stabili e combina la caratteristica

<sup>1</sup> I gruppi uscenti sono singoli atomi, o gruppi, più elettronegativi del carbonio: l'elettronegatività ne polarizza il legame con l'atomo di zolfo e conferisce a quest'ultimo un parziale carattere positivo (sito elettrofilo).

unica di essere sia fluorescente ( $\lambda_{\text{EX}}$  293 nm e  $\lambda_{\text{EM}}$  492 nm) che rilevabile nella UV-Vis ( $\text{Abs}_{\text{MAX}}$  356 nm), ma poiché la sensibilità riscontrata del fluorimetro è maggiore rispetto all'UV, si è scelto di utilizzare esclusivamente il detector fluorimetrico.

È importante dire che sono stati attuati degli accorgimenti per poter ottimizzare la derivatizzazione: ad es. la velocità di idrolisi dei dansil derivati è bassa e costante fino a pH 9,5 mentre sopra questo pH aumenta rapidamente. Operativamente, si è trovato un compromesso tra pH e temperatura per ottenere le migliori condizioni di dansilazione, tenendo in considerazione, oltre a questi parametri, anche il pKa del gruppo da dansilare. Prima di tutto si è optato per l'utilizzo di un ambiente di reazione basico, necessario soprattutto a sequestrare l'HCl formato durante la sostituzione nucleofila spostando di conseguenza la reazione verso i prodotti: in seguito a numerose prove si è scelto di utilizzare un tampone borato 0,2 M ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) avente pH 9,30. Le svariate modifiche volte a semplificare, velocizzare e rendere la metodica il più riproducibile possibile, hanno portato alla scelta di lavorare in provette Eppendorf® monouso da 1,5 mL con chiusura ermetica (polipropilene mod 0030 121.694, Eppendorf AG, Amburgo, Germania) ottimizzando la metodica su un volume finale di 1 mL. La generica miscela di reazione è costituita da:

- 400-500  $\mu\text{L}$  di tampone borato pH 9,30
- 50-100  $\mu\text{L}$  di campione (std o matrice)
- 10  $\mu\text{L}$  di standard interno (Norvalina, 100 ppm in HCl/MeOH)
- 50-100  $\mu\text{L}$  di DCl (5000 mg/L in acetone)
- 400  $\mu\text{L}$  di  $\text{CH}_3\text{CN}$

I volumi di campione e DCl condizionano il quantitativo di tampone poiché il volume finale deve essere sempre 1 mL. Avendo applicato la metodica a due matrici differenti, vino e olive, è stato necessario apportare delle modifiche e effettuare due validazioni. La miscela di reazione utilizzata per la determinazione delle ammine biogene nel vino è la seguente:

- 440  $\mu\text{L}$  di tampone borato
- 50  $\mu\text{L}$  di vino tal quale
- 10  $\mu\text{L}$  di Norvalina (S.I., 100 ppm in HCl/MeOH)
- 100  $\mu\text{L}$  di DCl (5000 mg/L in acetone)
- 400  $\mu\text{L}$  di  $\text{CH}_3\text{CN}$

La miscela viene poi fatta reagire per 30 min in un bagnetto ad ultrasuoni a 40 °C (Branson 2200, Milano) e le provette vengono successivamente centrifugate a 12000 rpm per 10 minuti con una centrifuga Eppendorf® MiniSpin (Eppendorf, Milano). Il surnatante viene poi prelevato e diluito 1:1 con MeOH, necessario per affilare i picchi cromatografici, in vial per l'analisi HPLC-FLD.

### ***Determinazione HPLC-FLD***

La determinazione HPLC delle AB e AA derivatizzati col DCl è stata eseguita con un sistema HPLC-FLD Varian ProStar (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) dotata di una pompa modulo 230, un modulo campionatore 410 (volume di iniezione 20  $\mu\text{L}$ ), e un rivelatore fluorimetrico Jasco 821-FP (Jasco Europa, Cremella, LC, Italia) con lunghezze d'onda fissate a 293 nm (Ex) e 492 nm (Em). La separazione è stata ottenuta

con una colonna Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 110A (150 x 4,60 mm, 3 μ, ChemTek Analitica, Anzola Emilia, Bologna, Italia) termostata a 25°C. La fase eluente utilizzata era costituita da: tampone acetato/CH<sub>3</sub>CN pH 4,0 (solvente A; 8,5 mL CH<sub>3</sub>COOH, 1,5 g CH<sub>3</sub>COONa, 200 mL CH<sub>3</sub>CN, acqua fino 1L) e acetonitrile (solvente B) come fase mobile al flusso costante di 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Il gradiente (v/v) è stato programmato inizialmente col 95 % del solvente A, diminuendo all'80 % in 18 minuti, a 50% in 42 minuti, 0% in 60 minuti e lasciato a 0 % fino a 64 min. Prima di ogni iniezione, il sistema è stato stabilizzato per 10 minuti con il rapporto A/B iniziale (95:5, v/v). I cromatogrammi sono stati acquisiti con un integratore HP Hewlett Packard 3396 serie II (Hewlett Packard, Cernusco sul Naviglio, Milano, Italia).

### *Validazione del metodo*

Il metodo è stato validato secondo le linee guida ICH (ICH Topic Q2 (R1), 1995), determinando linearità, limiti di rilevabilità (LOD), limiti di quantificazione (LOQ), precisione e accuratezza. La linearità è stata valutata mediante la preparazione di uno standard contenente tutte le ammine e lo SI. Tale standard è stato diluito in sei diverse concentrazioni, sottoposto poi alla procedura di derivatizzazione e all'analisi mediante HPLC-FLD. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante rette di taratura ottenute col metodo dei minimi quadrati utilizzando lo standard interno e correlando i rapporti delle aree dei picchi dell'analita/l'area del picco dello SI con la concentrazione. Le miscele sono state analizzate con il metodo descritto nella sezione precedente, calcolando per ciascun composto i parametri tecnici necessari per la validazione della

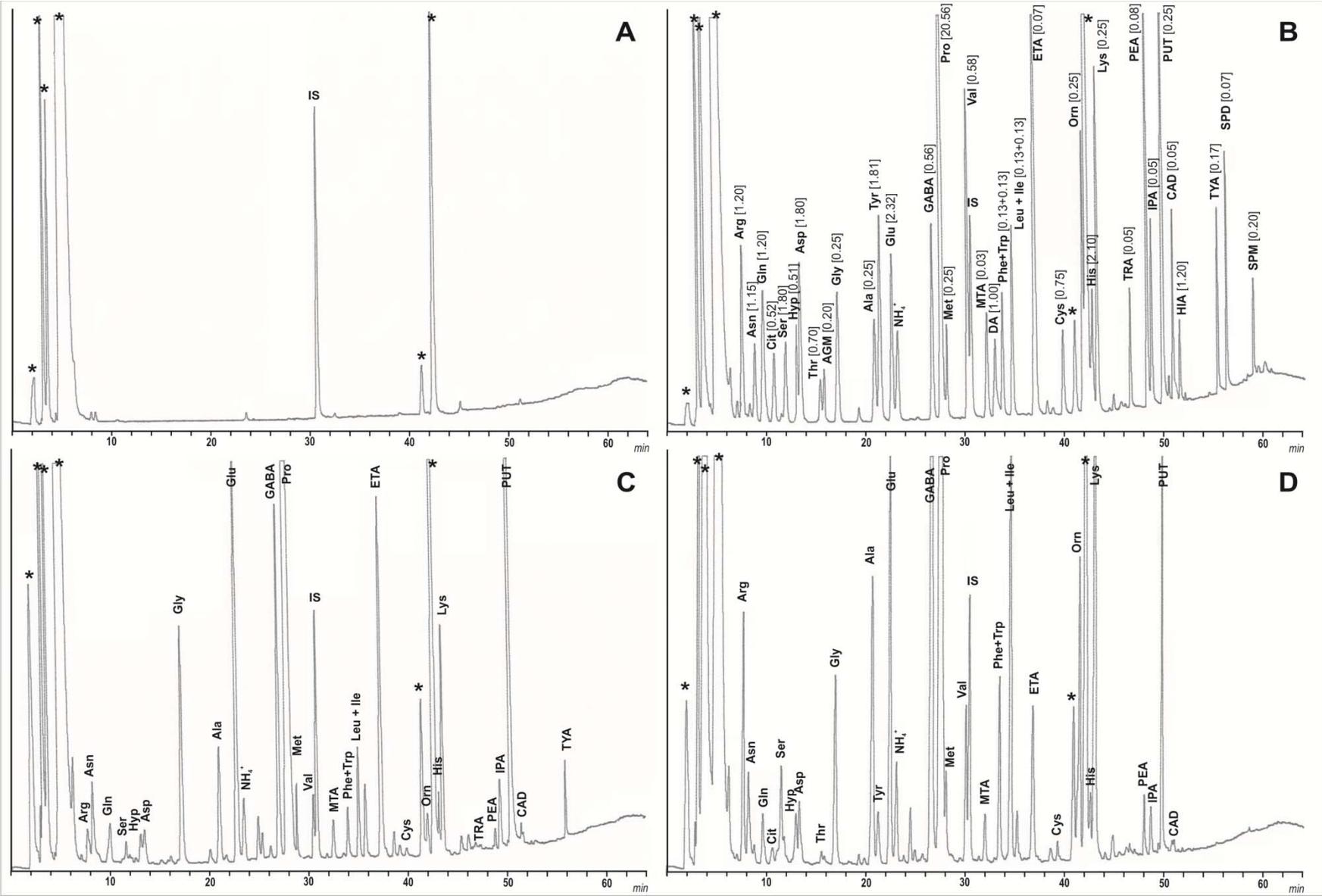
metodica: intervallo di concentrazioni, coefficiente di determinazione ( $r^2$ ), LOD e LOQ. Per valutare la precisione, sono stati determinati ripetibilità intra- ed inter-day eseguendo sei iniezioni della stessa miscela di standard nell'arco di un giorno e per tre giorni consecutivi. La deviazione standard relativa (RSD) dell'area del picco è stata utilizzata come una misura della precisione. Infine, è stato eseguito lo studio dei recuperi per poter valutare l'accuratezza del metodo analitico, misurando in triplicato le quantità note di standard nei campioni di vino a due diversi livelli di concentrazione (1 e 10 mg/L) e confrontandole con identici standard preparati in acqua. La **Tabella 2** riporta i dati ottenuti e si può osservare come globalmente la metodica messa a punto sia ottimale per analizzare un gran numero di AA e AB nei vini. Infatti, è possibile separare 36 molecole, di cui 22 AA, 13 AB, lo ione ammonio e la norvalina (SI). Purtroppo, due AA (Phe+Trp e Leu+Ile) coeluiscono e non è possibile dosarli. I valori di LOQ sono molto buoni, specialmente quelli di alcune AB che possono essere dosate fino a livelli di 0,01 mg/L per IPA e CAD. La **Figura 6** riporta i cromatogrammi HPLC-FLD esemplificativi del bianco (A), di una soluzione standard di AB e AA (B) e di due vini, il Vermentino (C) e il Cannonau (D). La verifica della natura dei picchi è stata effettuata mediante co-cromatografia, col metodo delle aggiunte. Si procede aggiungendo al campione lo standard della sostanza di cui si sospetta la presenza e confrontando il cromatogramma della matrice derivatizzata e quello della matrice addizionata della presunta sostanza entrambi precedentemente derivatizzati separatamente, e si controlla il picco in questione. Nel caso in cui il picco cromatografico incognito cresca otterremo la conferma della presenza di tale sostanza

nella matrice in esame. In tal modo con l'utilizzo di questa tecnica si è riusciti ad identificare gli AA e AB inizialmente incogniti.

**Tabella 2.** LC-FLD parametri di validazione della metodica per la determinazione di AA e AB nel vino

Composto		Sensibilità			Linearità		Ripetibilità (intra-day)	Precisione intermedia (inter-day)	Recupero ± SD (%)		
		LOD mg/L	LOQ mg/L	Intervallo di conc mg/L	r <sup>2</sup>	Equazione di calibrazione	Area picco (RSD, %)	Area picco (RSD, %)	1 mg/L	10 mg/L	
Arginina	Arg	7,7	0,18	0,55	0,61-12,23	0,9993	y = 0,3933x - 0,0348	1,16	1,02	98,44 ± 2,29	98,01 ± 2,29
Asparagina	Asn	9,0	0,23	0,69	0,74-14,83	0,9984	y = 0,2166x - 0,0093	0,84	1,14	98,21 ± 1,64	97,90 ± 2,63
Glutamina	Gln	10,0	0,07	0,21	0,27-5,35	0,9994	y = 0,1255x - 0,0175	1,14	0,99	97,37 ± 3,04	97,05 ± 3,37
Citrullina	Cit	10,9	0,04	0,11	0,11-2,23	0,9919	y = 0,4503x - 0,0532	0,79	1,12	96,57 ± 2,15	97,89 ± 2,65
Serina	Ser	12,0	0,16	0,49	0,51-10,20	0,9941	y = 0,34x + 0,0698	0,52	1,12	98,08 ± 2,88	97,67 ± 3,14
4-idrossiprolina	Hyp	12,4	0,08	0,24	0,26-5,26	0,9985	y = 0,4369x - 0,0261	2,46	1,34	97,86 ± 3,29	102,24 ± 1,84
Acido aspartico	Asp	13,3	0,15	0,46	0,50-10,06	0,9995	y = 0,1704x + 0,1005	1,11	2,76	98,27 ± 1,89	97,62 ± 1,42
Agmatine	AGM	15,8	0,05	0,16	0,18-3,64	0,9984	y = 1,6369x - 0,1827	1,05	2,33	97,40 ± 1,39	94,49 ± 3,16
Treonina	Thr	15,9	0,14	0,41	0,49-9,84	0,9993	y = 0,1806x - 0,0111	1,10	0,54	98,84 ± 2,28	97,01 ± 3,41
Glicina	Gly	17,2	0,04	0,11	0,14-2,95	0,9959	y = 1,4641x - 0,0371	1,67	1,34	97,93 ± 3,20	98,00 ± 2,00
Alanina	Ala	21,0	0,08	0,24	0,25-5,03	0,9989	y = 0,2942x - 0,0476	0,71	1,03	98,77 ± 1,93	97,63 ± 2,75
Tirosina	Tyr	21,6	0,08	0,23	0,25-5,02	0,9987	y = 0,2952x - 0,0029	1,17	1,36	97,78 ± 2,70	98,59 ± 2,33
Acido Glutamico	Glu	13,4	0,15	0,45	0,55-10,91	0,9997	y = 0,1094x + 0,0175	2,22	1,60	97,44 ± 2,15	97,51 ± 2,95
Acido γ-Amminobutirico	GABA	268	0,05	0,15	0,15-3,01	0,9964	y = 0,7252x - 0,0207	1,86	1,51	96,97 ± 1,72	97,89 ± 2,78
Prolina	Pro	27,8	0,07	0,21	5,03-100,60	0,9980	y = 1,0995x - 0,0713	3,66	2,62	98,11 ± 2,20	98,02 ± 1,59
Metionina	Met	28,3	0,05	0,14	0,16-3,12	0,9989	y = 0,891x - 0,081	1,96	1,78	95,47 ± 2,18	97,82 ± 1,56
Valina	Val	30,4	0,06	0,17	0,18-3,58	0,9984	y = 1,5158x - 0,0354	0,51	1,41	102,10 ± 1,98	101,96 ± 2,06
Metilamina	MTA	32,3	0,00	0,01	0,01-0,21	0,9931	y = 3,9625x - 0,0289	1,20	0,49	97,59 ± 2,11	102,47 ± 2,11
Dopamina	DA	33,2	0,06	0,18	0,36-7,20	0,9980	y = 1,4115x + 0,228	2,62	2,02	97,71 ± 1,29	96,34 ± 4,30
Fenilalanina	Phe	33,8	0,06	0,17	0,21-4,22	0,9987	y = 1,2097x - 0,0849	1,64	1,88	98,04 ± 2,58	97,75 ± 2,12
Leucina	Leu	35,0	0,03	0,10	0,11-2,24	0,9991	y = 1,7401x - 0,0283	1,28	2,79	97,49 ± 2,25	96,10 ± 1,67
Etilamina	ETA	37,2	0,01	0,04	0,06-1,11	0,9984	y = 5,0459x - 0,1335	0,57	0,96	98,82 ± 3,51	98,61 ± 1,78
Cisteina	Cys	39,8	0,06	0,18	0,21-4,23	0,9989	y = 0,3303x + 0,0771	2,86	2,71	97,63 ± 2,60	97,44 ± 2,12
Ornitina	Orn	42,2	0,04	0,13	0,26-5,24	0,9993	y = 1,9707x - 0,01	1,44	4,03	97,21 ± 2,09	98,09 ± 2,63
Istidina	His	43,5	0,15	0,46	0,50-9,99	0,9984	y = 0,1413x - 0,0413	2,70	3,04	95,38 ± 2,21	93,79 ± 3,51
Lisina	Lys	43,5	0,03	0,09	0,15-3,03	0,9985	y = 0,4385x - 0,0144	1,99	1,52	97,29 ± 1,87	96,48 ± 2,28
Triptamina	TRA	47,0	0,01	0,02	0,02-0,46	0,9986	y = 5,8214x - 0,0363	0,47	1,32	97,94 ± 2,28	98,63 ± 3,66
Feniletilamina	PEA	48,6	0,02	0,05	0,05-1,01	0,9987	y = 3,0694x - 0,1004	1,10	1,88	97,89 ± 1,97	98,66 ± 1,88
Isopentilamina	IPA	49,2	0,00	0,01	0,01-0,21	0,9987	y = 7,5805x - 0,0643	1,69	2,05	97,35 ± 1,35	97,83 ± 1,91
Putrescina	PUT	50,3	0,02	0,05	0,11-2,30	0,9949	y = 5,5167x - 0,0307	0,89	2,70	98,17 ± 3,56	97,68 ± 2,60
Cadaverina	CAD	51,3	0,00	0,01	0,01-0,21	0,9989	y = 7,8622x - 0,0388	2,67	1,41	97,90 ± 1,42	103,16 ± 3,76
Istamina	HIA	51,8	0,02	0,05	0,05-0,99	0,9986	y = 0,4859x - 0,0648	2,79	2,32	98,08 ± 1,78	101,57 ± 2,29
Tiramina	TYA	55,9	0,03	0,10	0,11-2,27	0,9985	y = 1,0466x - 0,0331	1,44	1,30	98,25 ± 2,18	96,97 ± 1,77
Spermidina	SPD	56,8	0,02	0,05	0,05-0,96	0,9989	y = 2,2977x - 0,0174	1,08	0,60	97,77 ± 1,54	97,80 ± 1,61
Spermina	SPM	59,2	0,02	0,05	0,05-1,08	0,9925	y = 0,409x - 0,0174	1,53	1,65	98,31 ± 2,91	97,68 ± 2,37

Figura 6. Cromatogrammi relativi a miscela contenente DCl e SI (A), mix standard (B), Vermentino (C) e Cannonau (D)



## Tenore di AA e AB nei principali vini della Sardegna

Sebbene diversi parametri chimico-fisici dei principali vini monovitigno della Sardegna possano essere trovati in banche dati scientifiche, i dati relativi alla composizione quantitativa di AB e AA pubblicati finora sono pochi e frammentari.

### *Campioni*

Sono stati analizzati 61 campioni di vini DOC (Denominazione di Origine Controllata) prodotti in Sardegna da diverse aziende enologiche che hanno fornito campioni commerciali di storia nota. Tutti i vini sono stati prodotti in purezza ed erano realizzati con il 100% delle uve omonime. La **Tabella 3** riporta il numero di campioni, le aziende produttrici e l'anno di produzione.

**Tabella 3.** Campioni vini

<i>N°</i>	<i>Azienda o Località</i>	<i>Tipologia</i>	<i>Anno</i>
1	Contini	Cannonau di Sardegna	2009
5	Argiolas	Cannonau di Sardegna	2010
3	Argiolas	Cannonau di Sardegna	2011
4	Argiolas	Cannonau di Sardegna	2012
1	Argiolas	Cannonau di Sardegna	2013
3	Contini	Cannonau di Sardegna	2012
2	Argiolas	Vermentino di Sardegna	2010
5	Argiolas	Vermentino di Sardegna	2011
3	Argiolas	Vermentino di Sardegna	2012
2	Argiolas	Vermentino di Sardegna	2013
4	Contini	Vermentino di Sardegna	2012

3	S. Anna Arresi	Carignano di Sardegna	2013
2	Santadi	Carignano di Sardegna	2013
6	Alghero (S.Antioco)	Carignano di Sardegna	2013
2	Calasetta	Carignano di Sardegna	2013
1	Giba (S.Giovanni Suergiu)	Carignano di Sardegna	2010
1	Giba (S.Giovanni Suergiu)	Carignano di Sardegna	2012
2	Giba (S.Giovanni Suergiu)	Carignano di Sardegna	2013
1	Tratalias	Carignano di Sardegna	2013
1	Contini	Vernacia di Oristano	2002
1	Contini	Vernacia di Oristano Riserva	1990
3	Contini	Vernacia di Oristano	2012
1	Contini	Vernaccia di Oristano	2000
1	Contini	Vernaccia di Oristano	2009
1	Contini	Vernaccia di Oristano	1997
1	Contini	Vernaccia di Oristano	2006
1	Contini	Vernaccia di Oristano	2010
1	Contini	Vernaccia di Oristano	2010

## Risultati e discussione

Le **Tabelle 4** e **5** riportano i composti identificati, elencati secondo l'ordine di eluizione, e le relative concentrazioni (mg/L) di AB e AA. Nei vini Cannonau, Carignano, Vermentino, e Vernaccia sono stati identificati 33 composti, tra AA e AB, e i dati analitici mostrano differenze significative, in particolare dal punto di vista quantitativo. Come si può notare le concentrazioni totali delle sostanze amminiche (AA + AB) determinate sono notevolmente elevate, in particolare il Vermentino è risultato il vino più ricco di sostanze azotate ( $2124,7 \pm 409,4$  mg/L) seguito da Cannonau, Vernaccia e Carignano con valori, rispettivamente di  $1940,9 \pm 338,2$  mg/L;  $1549,0$

$\pm 590,5$  mg/L;  $1380,6 \pm 412,6$  mg/L. Considerando solamente la frazione degli AA, si può notare che anch'essa è notevolmente elevata soprattutto se paragonata al contenuto di AB. Infatti, si hanno valori di AA che vanno da  $1549,7 \pm 589,3$  mg/L nel Carignano, sino a un massimo di  $2110,2 \pm 409,1$  mg/L nel Vermentino, mentre Vernaccia e Cannonau hanno invece valori intermedi. È interessante notare che è presente un AA che accomuna tutti i vini di tutte le tipologie analizzate e che rappresenta il composto più concentrato: la Pro. Essa si trova sempre a concentrazioni elevatissime, in particolare nel Cannonau dove raggiunge un tenore di  $1244,3 \pm 398,5$  mg/L. Nel Vermentino e nel Cannonau il secondo AA che si trova maggiormente concentrato è l'Arg, con valori di  $147,3 \pm 42,8$  mg/L e di  $82,4 \pm 53,5$  mg/L, rispettivamente. Nelle altre due tipologie di vino invece l'Arg non è così concentrata, anzi, presenta valori di  $20,6 \pm 32,5$  mg/L nella Vernaccia e di  $8,8 \pm 2,8$  mg/L nel Carignano. In questi altri due vini si è visto invece che l'AA più concentrato dopo la Pro è il Glu con valori di  $265,1 \pm 71,6$  mg/L nella Vernaccia e di  $261,2$  mg/L  $\pm 39,7$  nel Carignano. Si ricorda che il Glu è il precursore del GABA ad opera delle GAD (acido glutammico decarbossilasi), il quale presenta un effetto antipertensivo, probabilmente indotto dal suo potere inibitorio sul rilascio di noradrenalina (Hayakawa, *et al.*, 2002). In altri studi è emersa la capacità del GABA di indurre ipotensione in modelli animali (Hayakawa *et al.*, 2004), nonché nell'uomo, con effetti positivi in pazienti lievemente ipertesi (Inoue *et al.*, 2003). Visti gli interessanti effetti fisiologici anche le concentrazioni del GABA hanno destato curiosità, il Vermentino è il più ricco con valori di  $130,3 \pm 44,8$  mg/L, a seguire, con valori più bassi, abbiamo la Vernaccia ( $61,2 \pm 39,2$  mg/L), il Cannonau ( $43,1 \pm 8,9$  mg/L) e il

Carignano ( $42,6 \pm 15,0$  mg/L), si nota perciò che i vini con maggior valori di GABA possiedono valori dell' AA precursore inferiori, probabilmente a causa delle differenti attività decarbossilasiche dei microrganismi presenti durante la vinificazione nelle diverse tecnologie di produzione. Si è rivolta l'attenzione anche alla presenza di AA essenziali, presenti a concentrazioni, anche se non elevate, comunque interessanti. La tipologia di vino più ricca di tali composti è il Vermentino ( $118,5 \pm 8,3$  mg/L), a seguire il Carignano ( $68,3 \pm 28,2$  mg/L), il Cannonau e la Vernaccia con valori notevolmente vicini tra loro, rispettivamente di  $57,8 \pm 27,7$  mg/L e  $56,1 \pm 23,3$  mg/L. L'AA essenziale presente a maggior concentrazioni in tutti i vini è sempre la Leu. Anche in questo caso la concentrazione maggiore si è ritrovata nel Vermentino ( $59,1 \pm 22,5$  mg/L) e a seguito nel Cannonau ( $20,9 \pm 6,3$  mg/L), nella Vernaccia ( $21,1 \pm 10,2$  mg/L) e infine nel Carignano ( $17,2 \pm 10,1$  mg/L). In sintesi si è vista perciò l'elevata presenza di AA nel Vermentino e nel Cannonau, di contro si è notato che questi risultano essere i più poveri in AB, in modo speculare invece il vino più ricco di AB si è rivelato il Carignano. In generale, si può affermare che la quantità di AB totale non è elevata in nessuna delle tipologie di vino analizzate in questo progetto, risultando generalmente le singole AB a concentrazioni medie  $<10$  mg/L. Nello specifico notiamo da una parte il Carignano con un tenore in AB di  $47,4 \pm 13,7$  mg/L, e dall'altra, con il tenore minimo, il Vermentino ( $14,6 \pm 3,4$  mg/L), a seguito in ordine crescente troviamo la Vernaccia ( $24,3 \pm 13,2$  mg/L) e il Cannonau ( $41,0 \pm 13,6$  mg/L). Tra le AB presenti a tenori più elevati notiamo subito nel Carignano l'HIA con un valore medio di  $13,6 \pm 0,9$  mg/L, tale valore è abbastanza elevato rispetto ai limiti consigliati, tuttavia, è importante precisare che tale

ammina non è presente in modo costante in tutti i Carignani analizzati ma solo in 4: tre del 2013 con valori medi di  $13,3 \pm 0,4$  mg/L,  $14,4 \pm 0,9$  mg/L e  $13,8 \pm 1,0$  mg/L, un Carignano del 2010 ( $13,0 \pm 1,1$  mg/L); gli altri vini Carignano non presentano alcuna traccia di HIA. In ordine di concentrazione ritroviamo poi, la PUT con un valore medio di  $11,1$  mg/L  $\pm 7,9$ , che a differenza dell'HIA è presente in tutti i campioni di Carignano, nessuno escluso, con un range che va da un minimo di  $3,6$  mg/L ad un massimo di  $34,0$  mg/L. Tuttavia, la PUT raggiunge i valori massimi nel Cannonau con un tenore di  $20,5 \pm 1,0$  mg/L. È importante sottolineare anche la presenza della TYA, una tra le AB, insieme all'HIA, maggiormente conosciute e studiate per i suoi effetti, esclusivamente nel Carignano ( $3,40 \pm 4,53$  mg/L), nella Vernaccia ( $3,03 \pm 1,86$  mg/L) e nel Cannonau ( $9,06 \pm 2,86$  mg/L), è totalmente assente o presente in tracce nel Vermentino. Dai dati ottenuti, i vini Cannonau, Vermentino, Carignano e Vernaccia prodotti in Sardegna secondo i protocolli per la DOC mostrano bassi livelli di AB, in linea con valori normalmente riscontrati da altri Autori, e ciò indica corrette tecniche di vinificazione. Sicuramente allo scopo di ottimizzare il prodotto si potrebbero modificare alcuni dei parametri di vinificazione, come il ceppo di lievito, la temperatura e il tempo di macerazione. In tal modo si potrebbe migliorare ulteriormente la produzione di vino, permettendo di ottenere vini in generale più sicuri per il consumo.

**Tabella 4.** Concentrazione di AA e AB in Cannonau e Vermentino

Composto		t <sub>R</sub> (min)	Cannonau (n=17)				Vermentino (n=15)			
			min	max	media	± SD	min	max	media	± SD
Arginina	Arg	7,7	23,8	152,5	82,4	53,5	70,8	198,3	147,3	42,8
Asparagina	Asn	9,0	52,1	75,8	64,0	16,7	16,0	86,7	51,0	24,5
Glutamina	Gln	10,0	5,6	19,0	12,8	4,4	7,0	16,6	10,3	3,4
Citrullina	Cit	10,9	nd	26,5	18,1	5,3	nd	32,6	23,2	8,6
Serina	Ser	12,0	10,2	31,9	17,7	7,3	9,3	48,0	23,0	13,7
4-idrossiprolina	Hyp	12,4	6,1	7,8	6,8	0,7	11,7	18,5	13,8	2,8
Acido aspartico	Asp	13,3	10,9	80,9	37,9	25,2	25,6	65,5	40,7	14,0
Treonina	Thr	15,9	11,4	19,3	14,4	4,3	5,8	14,7	11,2	3,1
Agmatina	AGM	15,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glicina	Gly	17,2	34,9	45,3	39,4	3,4	17,8	35,2	24,2	7,0
Alanina	Ala	21,0	47,9	90,2	68,6	18,6	41,7	129,2	80,6	35,5
Tirosina	Tyr	21,6	nd	tr	tr	nd	nd	45,9	36,9	7,6
Acido Glutamico	Glu	13,4	44,1	111,8	68,7	28,1	64,4	126,9	82,2	25,0
Acido γ-Amminobutirico	GABA	26,8	29,8	52,5	43,1	8,9	70,6	191,9	130,3	44,8
Prolina	Pro	27,8	862,8	1872,2	1244,3	398,5	711,4	1391,5	1007,9	281,0
Metionina	Met	28,3	23,9	33,2	28,5	6,6	19,0	37,3	27,3	6,2
Valina	Val	30,4	11,4	18,2	14,8	2,9	12,9	24,9	17,7	5,1
Metilamina	MTA	32,3	0,2	1,7	0,9	0,6	1,1	2,2	1,5	0,4
Dopamina	DA	33,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fenilalanina*+Triptofano	Phe*+Trp	33,8	17,8	18,5	18,2	0,5	22,0	34,4	27,4	5,2
Leucina*+Isoleucina	Leu*+Ile	35,0	14,3	28,1	20,9	2,6	34,5	87,9	59,1	22,5
Etilamina	ETA	37,2	4,1	11,3	7,6	6,3	3,4	6,6	4,7	1,2
Cisteina	Cys	39,8	6,6	6,6	6,6	0,2	6,7	6,7	6,7	0,0
Ornitina	Orn	42,2	6,4	67,2	30,6	28,3	3,9	55,0	26,7	22,3
Istidina	His	43,5	17,7	75,2	30,6	22,0	7,6	15,0	11,2	3,1
Lisina	Lys	43,5	32,1	46,9	37,3	8,4	48,9	60,6	53,5	5,4
Triptamina	TRA	47,0	tr	0,1	0,1	tr	tr	0,1	0,1	tr
Feniletilamina	PEA	48,6	nd	1,2	1,2	tr	1,8	1,8	1,8	tr
Isopentilamina	IPA	49,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0
Putrescina	PUT	50,3	11,4	32,8	20,5	0,0	1,5	10,6	6,0	2,6
Cadaverina	CAD	51,3	1,0	2,4	2,1	0,6	1,1	2,5	2,1	0,5
Istamina	HIA	51,8	tr	8,1	6,6	1,5	nd	nd	nd	tr
Tiramina	TYA	55,9	5,1	11,5	9,1	2,9	nd	tr	tr	tr
Spermidina	SPD	56,8	nd	1,3	1,3	tr	nd	tr	tr	tr
Spermina	SPM	59,2	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	tr

\* amminoacidi utilizzati per la quantificazione (i dati di letteratura lo riportano come il più concentrato)

nd not detected (<LOD)

tr tracce (<LOQ)

**Tabella 5.** Concentrazione di AA e AB (mg/L) in Carignano e Vernaccia

Composto	t <sub>R</sub>	Carignano (n=18)				Vernaccia (n=11)				
		min	max	media	± SD	min	max	media	± SD	
Arginina	Arg	7.7	5,6	15,1	8,8	2,8	0,7	89,3	20,6	32,5
Asparagina	Asn	9.0	0,0	11,9	6,5	4,0	2,2	50,2	24,1	18,4
Glutamina	Gln	10.0	28,5	681,3	154,3	169,6	23,3	134,4	73,2	32,0
Citrullina	Cit	10.9	0,7	8,8	3,6	1,9	1,1	14,4	6,8	4,9
Serina	Ser	12.0	6,9	28,8	13,7	5,7	3,4	39,4	15,0	9,2
4-idrossiprolina	Hyp	12.4	0,9	10,1	6,7	2,5	2,9	34,8	17,3	8,5
Acido aspartico	Asp	13.3	8,8	144,1	74,7	35,4	25,9	207,6	102,6	46,5
Treonina	Thr	15.9	nd	nd	nd		0,8	13,3	7,0	3,7
Agmatina	AGM	15.8	1,6	6,6	3,7	1,4	5,1	24,9	16,2	5,6
Glicina	Gly	17.2	0,9	34,5	18,2	7,2	10,6	77,1	37,2	17,2
Alanina	Ala	21.0	13,4	48,8	28,3	10,3	nd	nd	nd	
Tirosina	Tyr	21.6	7,3	23,3	10,8	4,3	111,6	372,9	265,0	71,6
Acido Glutamico	Glu	13.4	151,0	325,9	261,2	39,7	29,1	1104,7	361,2	265,1
Acido γ-Amminobutirico	GABA	26.8	23,4	72,4	42,6	15,0	16,3	134,3	61,2	39,2
Prolina	Pro	27.8	202,4	951,0	569,9	203,9	200,5	1735,5	844,7	392,4
Metionina	Met	28.3	1,0	3,1	2,0	0,9	3,8	4,3	4,7	0,3
Valina	Val	30.4	2,8	20,2	7,6	4,9	4,4	19,5	11,9	4,2
Metilamina	MTA	32.3	0,2	0,8	0,5	0,2	nd	nd	nd	
Dopamina	DA	33.2	nd	nd	nd		nd	nd	nd	
Fenilalanina*+Triptofano	Phe*+Trp	33.8	7,4	31,7	16,2	6,7	2,8	21,6	11,2	4,8
Leucina*+Isoleucina	Leu*+Ile	35.0	7,6	42,5	17,2	10,1	2,0	40,1	21,1	10,2
Etilamina	ETA	37.2	1,1	4,2	2,3	0,7	0,7	5,0	2,3	1,2
Cisteina	Cys	39.8	0,2	6,2	1,2	1,6	1,4	1,6	1,5	0,1
Ornitina	Orn	42.2	0,4	0,6	0,5	0,1	0,9	7,3	3,7	1,8
Istidina	His	43.5	14,0	1290,3	74,7	222,1	nd	nd	nd	
Lisina	Lys	43.5	10,9	39,3	22,8	8,7	4,5	31,2	17,1	8,2
Triptamina	TRA	47.0	nd	nd	nd		0,3	0,4	0,4	0,1
Feniletilamina	PEA	48.6	0,2	3,3	1,7	0,8	0,2	2,5	0,8	0,7
Isopentilamina	IPA	49.2	0,0	0,4	0,2	0,1	0,1	1,1	0,5	0,2
Putrescina	PUT	50.3	3,6	34,0	11,1	7,9	0,5	37,8	13,9	10,7
Cadaverina	CAD	51.3	0,1	2,9	0,6	0,8	0,2	1,2	0,6	0,3
Istamina	HIA	51.8	12,2	15,0	13,6	0,9	2,1	16,6	12,2	4,9
Tiramina	TYA	55.9	0,4	16,2	3,4	4,5	0,6	6,9	3,0	1,9
Spermidina	SPD	56.8	0,2	2,6	1,6	1,0	nd	nd	nd	
Spermina	SPM	59.2	0,8	2,6	1,5	0,7	0,1	0,3	0,1	0,2

\* amminoacidi utilizzati per la quantificazione (i dati di letteratura lo riportano come il più concentrato)

nd not detected (<LOD)

tr tracce (<LOQ)

## Sperimentazioni enologiche

Dopo aver effettuato una panoramica del tenore di AA e AB dei vini Sardi, è stata impostata una sperimentazione allo scopo di investigare l'andamento di produzione delle ammine biogene durante i processi fermentativi della vinificazione. Tale idea è stata sviluppata proprio sulla base che l'attività dei microrganismi (lieviti e batteri) coinvolti nella produzione del vino, possa indurre ad un aumento della produzione di AB per azione decarbossilasica dei loro precursori. Inoltre, essendo in grado, con la metodica messa a punto, di determinare simultaneamente anche gli amminoacidi si è rivolto uno sguardo anche a quest'ultimi e all'eventuale presenza di amminoacidi essenziali nel prodotto finito, per poter valutare così al contempo sia il lato tossicologico sia quello benefico del consumo di vino. La sperimentazione è stata effettuata in collaborazione con la Cantina Sperimentale dell'Agris su tre tipologie di vini caratteristici della Sardegna: Cannonau, Vermentino e Moscato. Il campionamento è stato svolto nel corso del 2012-2013, prelevando i campioni a differenti intervalli durante il procedimento di fermentazione, partendo cioè dal prelievo delle uve precedente alla vendemmia fino all'ottenimento del vino finito, attraversando tutte le fasi intermedie, in modo tale da poter monitorare l'evoluzione delle AB e degli AA. Poiché si è ipotizzata una possibile differenza nella formazione di AB in funzione dei microrganismi coinvolti nelle fermentazioni, i mosti di uve Cannonau, Vermentino e Moscato sono stati trattati con differenti ceppi di lieviti starter. Per quanto riguarda il Cannonau, la sperimentazione è stata ulteriormente scissa anche nella fase della fermentazione malo-lattica, dove si sono testati due ceppi batterici differenti.

### *Prove fermentazione Cannonau*

I campioni di uva Cannonau provenivano da Illorai, località situata in Ogliastra, zona tipica di produzione di tali uve. Il vigneto si trova ad un'altitudine di 503 metri s.l.d.m., presenta un suolo sabbioso e le viti sono state allevate con un sistema a cordone speronato. Le uve raccolte sono state lavorate e vinificate da AGRIS presso la Cantina Sperimentale di Villasor (CA). I campioni di uve raccolti sono stati prelevati a 13, 10 e 1 giorno prima della vendemmia ( $t_{-13}$ ;  $t_{-10}$ ;  $t_{-1}$ ), il  $t_0$  rappresenta il campione massa e cioè la pigiatura delle uve, svoltasi il 02/10/2012. Lo stesso giorno il campione massa è stato suddiviso in due in modo tale da attuare in parallelo le due sperimentazioni.

La prima linea di ricerca "Lieviti commerciale - Batteri spontanei" (LcBsp) ha subito una fermentazione alcolica ad opera di lieviti commerciali (10 g/hL di *Saccharomyces cerevisiae bayanus*, con un potere alcoligeno superiore a 15 % vol, AM 37 OliverOgar, Montebello V.no VI), oltre agli starter sono stati aggiunti al campione massa: 5 g/hL solforosa, utilizzata per le azioni antisettiche e conservanti indispensabili per la salute, la stabilità e la qualità del vino; 10 g/hL Bioact, nematocida; 10 g/hL Tannino Tan Red OliverOgar, per preservare il vino dall'ossidazione. A distanza di una settimana il mosto è stato svinato e sono stati aggiunti altri 5 g/hL Tannino Tan Red (OliverOgar) per aumentare la stabilità cromatica e rinforzare la corposità e la durata dei vini nel tempo, successivamente il 27/11/2012 è stato inoculato con fecce. In seguito, la sperimentazione commerciale ha subito una fermentazione malo-lattica ad opera di batteri spontanei che si sviluppano naturalmente e al suo termine (20/12/2012) sono stati aggiunti 80 g/hL di acido tartarico e 3 g/hL di solforosa.

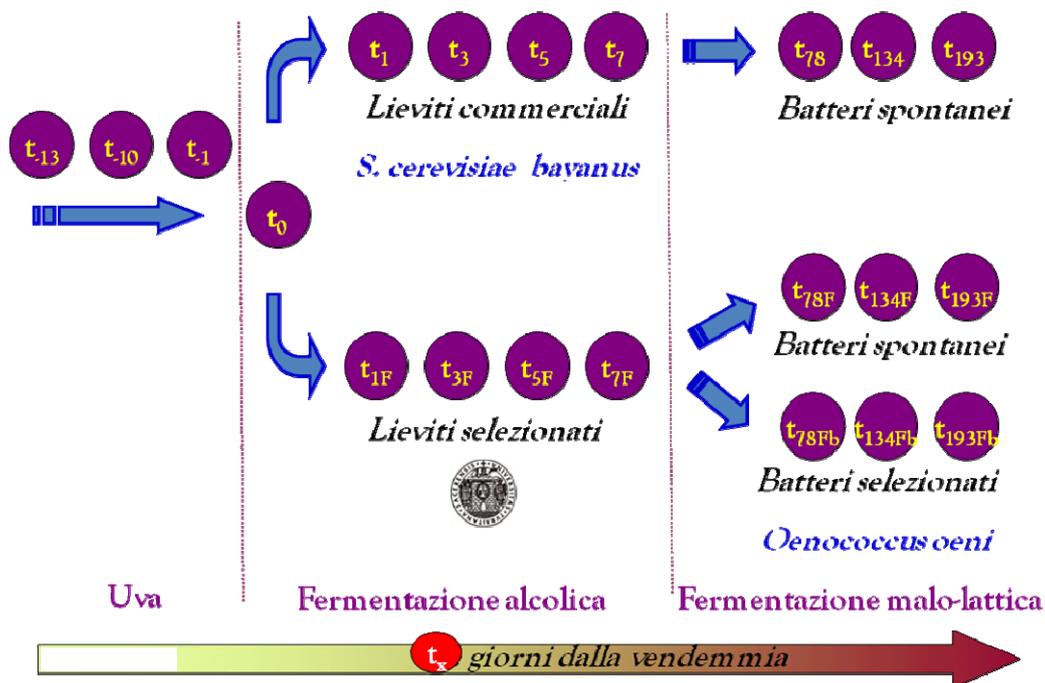
La seconda linea di ricerca "Lieviti selezionati - Batteri spontanei" (LsBsp) / "Lieviti selezionati - Batteri selezionati" (LsBse) è stata svolta utilizzando come starter lieviti *Saccharomyces cerevisia* selezionati freschi forniti dall'Università di Sassari. Anche in questo caso sono stati aggiunti al campione massa: 5 g/hL solforosa, 10 g/hL Bioact, 10 g/hL Tannino Tan Red (OliverOgar). A differenza dell'altra linea, qui, a distanza di 2 giorni sono stati aggiunti 10 g/hL Biogran 200. Successivamente il mosto è stato svinato e sono stati aggiunti altri 5 g/hL Tannino Tan Red (OliverOgar). A questo punto, la sperimentazione LsBsp è proseguita sviluppando la fermentazione malo-lattica (ML) ad opera della flora batterica spontanea, mentre la sperimentazione LsBse è avvenuta ad opera di batteri *O. oeni* selezionati (Malo Quick, OliverOgar). Il 12/12/2012, al termine della fermentazione malo-lattica, sono stati aggiunti 80 g/hL di acido tartarico e 3 g/hL di solforosa. La **Figura 7** riporta il numero e le tempistiche dei campioni prelevati che sono effettuati a intervalli regolari durante le differenti fasi di fermentazione sino a prodotto finito.

### ***Risultati e discussione***

Confrontando i dati ottenuti si è visto che i prodotti finiti delle tre linee di sperimentazione, e cioè i vini al termine della fermentazione, presentano differenze interessanti (**Tabella 6**). Per quanto riguarda la sperimentazione "Lieviti commerciali - Batteri spontanei" si nota subito la notevole diversità e superiorità delle concentrazioni dei composti rispetto alle altre linee di ricerca sviluppate sul Cannonau. Infatti, la concentrazione totale dei composti azotati dosati (TOT [-N-]) è pari a  $4415,5 \pm 309,0$

mg/L, con un tenore di AA di  $4348,1 \pm 321,6$  mg/L, di cui una percentuale è rappresentata dagli AA essenziali ( $270,2 \pm 10,8$  mg/L); anche il tenore di AB, è risultato essere più elevato rispetto agli altri due vini Cannonau prodotti, raggiungendo concentrazioni di  $67,3 \pm 4,7$  mg/L.

Figura 7. Schema della sperimentazione su uve Cannonau



Il caso che si pone all'altra estremità come concentrazioni amminiche dosate è la linea "Lieviti Spontanei - Batteri selezionati" che risultano avere dei valori notevolmente più bassi rispetto al precedente: TOT [-N-] =  $2695,8 \pm 133,9$  mg/L; [AA] =  $2657,5 \pm 142,7$  mg/L; [AA essenziali] =  $141,5 \pm 7,8$  mg/L e [AB] =  $38,3 \pm 1,9$  mg/L. Tra le due sperimentazioni si pone in via intermedia, considerando tutti i parametri osservati, la linea di fermentazione "Lieviti Spontanei - Batteri spontanei", dove il vino finito risulta avere valori di TOT [-N-] =  $3074,9 \pm 153,7$  mg/L; [AA] =  $3025,3 \pm 170,1$  mg/L; [AA

essenziali] =  $206,3 \pm 11,0$  mg/L e [AB] =  $49,6 \pm 3,3$  mg/L. In linea generale possiamo perciò dire che i lieviti commerciali che subiscono poi ML spontanea possiedono un'attività decarbossilasica notevolmente superiore agli altri stater utilizzati, così come anche l'azione proteolitica è probabilmente più elevata in queste condizioni, data la più elevata concentrazione totale di composti amminici. Dai dati ottenuti si possono però fare anche ulteriori considerazioni, come ad esempio il fatto che tra tutti i composti azotati rilevati la prolina è risultato essere quello a maggior concentrazione, variando rispettivamente nelle tre sperimentazioni, da valori di  $1972,3 \pm 78,9$  mg/L nel vino "Lieviti commerciali - Batteri spontanei", a  $1094,6 \pm 65,7$  mg/L in "Lieviti selezionati - Batteri spontanei" e  $1139,1 \pm 91,1$  mg/L in "Lieviti selezionati-Batteri selezionati". Un valore tanto elevato risulta essere interessante in particolare per la caratterizzazione del vino, non tanto per le proprietà intrinseche della Pro, poiché non esistono studi specifici su eventuali effetti tossici o benefici ad essa attribuibili. Particolarmente interessante è invece la presenza di AA come Arg e Leu, che si trovano entrambi a concentrazioni importanti: nei "Lieviti commerciali - Batteri spontanei", rispettivamente  $127,5 \pm 8,9$  mg/L e  $70,9 \pm 3,5$  mg/L, nella linea "Lieviti selezionati - Batteri spontanei", vi sono valori di  $99,1 \pm 6,4$  mg/L e di  $47,9 \pm 3,4$  mg/L, ed infine in "Lieviti selezionati - Batteri selezionati", sono state trovate concentrazioni di  $78,5 \pm 4,7$  mg/L per l'Arg e  $30,5 \pm 2,1$  mg/L per la Leu. Sono queste concentrazioni importanti, a maggior ragione considerando il ruolo di questi due AA essenziali descritto nel paragrafo "**Aspetti nutrizionali degli amminoacidi**".

Per quanto riguarda le AB, si può evidenziare che la loro concentrazione totale risulta essere non elevata ma, se paragonata ai valori limite dell'HIA consigliati nel vino e spesso utilizzati come indice generale del tenore di AB, risultano notevolmente superiori. D'altro canto è importante dire che non sono state rivelate, se non in tracce concentrazioni, di HIA e TYA, i maggiori responsabili finora indagati come scatenanti allergie o effetti negativi. L'AB maggiormente concentrata nelle sperimentazioni sul Cannonau è stata la PUT con valori di  $31,1 \pm 2,2$  mg/L in "Lievitati commerciale - Batteri spontanei", PUT a pari merito con ETA con valori medi di 18,6 mg/L in "Lievitati spontanei - Batteri spontanei", e infine nella linea "Lievitati spontanei - Batteri selezionati", ritroviamo valori di ETA pari a  $16,9 \pm 1,2$  mg/L e di PUT pari a  $10,4 \pm 0,4$ . La **Figura 8** riporta l'andamento durante l'evoluzione dall'uva al vino finito per alcuni composti azotati particolarmente rappresentativi nel Cannonau.

Tabella 6. Cannonau sperimentazione Agris. Concentrazioni AA e AB (mg/L)

Composto		Punti del campionamento						
		$t_R$ min	$t_0$	$t_{7c}$	$t_{7se}$	$t_{193csp}$	$t_{193sesp}$	$t_{193sese}$
Arginina	Arg	7,7	425,5±25,5	73,7±3,0	72,9±2,9	127,5±8,9	99,1±6,4	78,5±4,7
Asparagina	Asn	9,0	25,0±1,3	43,0±3,9	73,9±6,9	48,8±3,9	66,6±5,9	49,8±4,1
Glutamina	Gln	10,0	455,6±29,8	285,0±25,5	113,8±10,3	283,1±22,6	173,0±11,9	179,9±14,7
Citrullina	Cit	10,9	12,9±1,1	12,4±1,0	8,7±0,3	8,7±0,3	8,7±0,7	8,7±0,5
Serina	Ser	12,0	35,9±1,9	17,5±1,1	11,0±0,6	152,5±10,9	79,9±7,7	66,5±5,5
4-idrossiprolina	Hyp	12,4	21,5±1,0	22,8±2,0	23,2±1,9	nd	18,8±1,2	26,4±2,0
Acido aspartico	Asp	13,3	165,0±11,7	80,3±6,9	83,5±7,8	215,5±20,8	177,6±15,3	105,1±9,3
Treonina	Thr	15,9	49,6±3,7	18,4±1,5	17,3±1,3	33,6±2,8	27,6±1,8	22,2±1,9
Glicina	Gly	17,2	9,6±0,6	21,8±1,9	25,3±2,0	52,3±5,0	43,8±3,8	34,1±3,1
Alanina	Ala	21,0	42,8±3,1	43,7±3,9	41,3±3,7	74,3±7,1	67,8±5,6	40,1±2,7
Tirosina	Tyr	21,6	28,6±0,9	nd	nd	nd	nd	34,2±2,7
Acido Glutamico	Glu	13,4	338,6±17,3	158,1±14,8	164,9±11,3	446,2±40,9	365,5±30,3	211,0±20,0
Acido $\gamma$ -Ammiinobutirico	GABA	26,8	154,8±13,2	134,8±11,8	63,0±4,9	203,6±19,1	171,9±10,4	124,6±10,6
Prolina	Pro	27,8	170,1±6,89	765,9±30,6	684,6±27,4	1972,3±78,9	1094,6±65,7	1139,1±91,1
Metionina	Met	28,3	29,6±2,0	tr	tr	tr	tr	tr
Valina	Val	30,4	23,5±1,9	9,9±0,3	9,0±0,7	28,2±1,6	20,7±1,3	15,4±1,0
Metilamina	MTA	32,3	0,9±0,0	1,4±0,9	0,9±0,0	3,4±0,1	1,5±0,8	1,6±0,0
Dopamina	DA	33,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fenilalanina*+Triptofano	Phe*+Trp	33,8	19,0±1,0	18,1±1,4	17,7±1,2	20,0±1,3	18,9±1,1	18,4±1,3
Leucina*+Isoleucina	Leu*+Ile	35,0	29,4±1,8	15,2±0,9	10,8±0,4	70,9±3,5	47,9±3,4	30,5±2,1
Etilamina	ETA	37,2	3,8±0,2	16,4±1,0	14,6±0,6	22,1±1,3	18,6±1,7	16,9±1,2
Cisteina	Cys	39,8	132,7±12,1	136,2±11,2	136,6±12,0	190,4±10,3	166,7±14,4	162,4±15,3
Ornitina	Orn	42,2	15,8±1,3	48,5±2,6	29,1±2,1	23,6±1,9	32,6±3,0	19,6±1,5
Istidina	His	43,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lisina	Lys	43,5	8,9±0,4	10,1±0,8	10,1±0,6	35,1±2,8	38,7±2,9	21,1±1,7
Triptamina	TRA	47,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Feniletilamina	PEA	48,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isopentilamina	IPA	49,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Putrescina	PUT	50,3	4,5±0,2	8,1±0,2	7,6±0,3	31,1±2,2	18,6±1,1	10,4±0,4
Cadaverina	CAD	51,3	1,9±0,1	2,1±0,1	2,0±0,1	2,4±0,1	2,3±1,9	2,2±0,1
Istamina	HIA	51,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tiramina	TYA	55,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Spermidina	SPD	56,8	13,5±1,0	14,5±1,1	10,8±0,9	8,3±0,3	8,7±0,5	7,2±0,4
Spermina	SPM	59,2	2,0±0,1	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0

\* amminoacidi utilizzati per la quantificazione (i dati di letteratura lo riportano come il più concentrato)

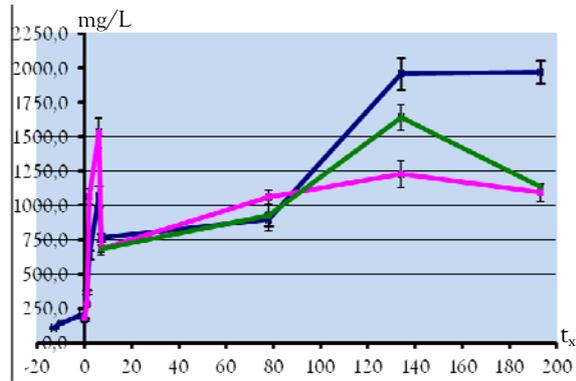
nd not detected (<LOD)

tr tracce (<LOQ)

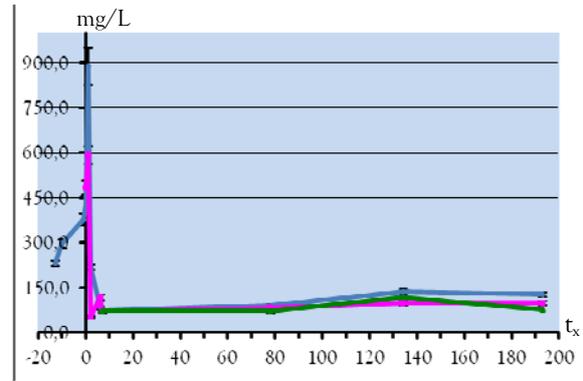
Figura 8. Evoluzione dei principali AA e AB durante la fermentazione del Cannonau

- LcBsp
- LsBse
- LsBse

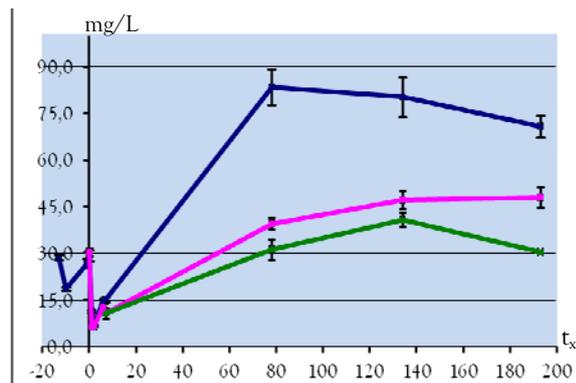
*Pro*



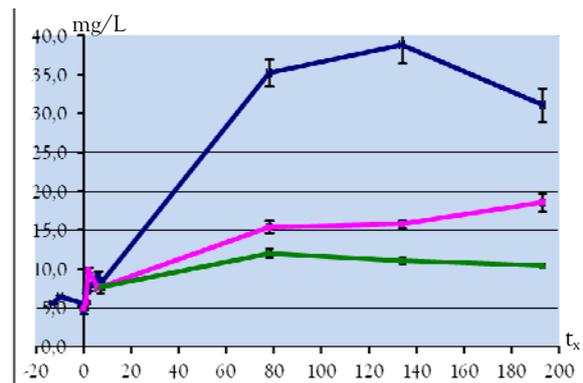
*Arg*



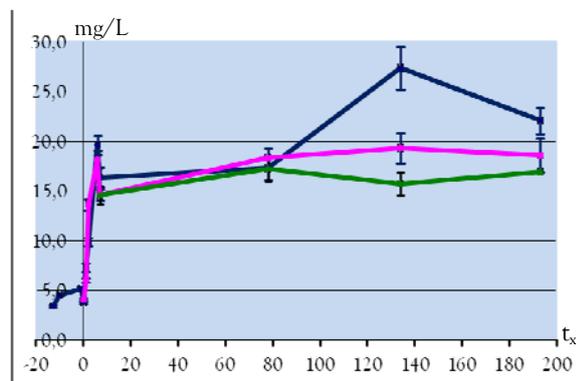
*Leu*



*PUT*



*ETA*



### *Prove fermentazione Vermentino*

I campioni di uva Vermentino sono stati ottenuti da un vigneto sito a Palmas Arborea (OR) a 4 metri s.l.d.m. su suolo sabbioso e le viti sono state allevate con un sistema a cordone speronato. I campioni di uve raccolti sono stati prelevati a 12 e 6 giorni prima della vendemmia ( $t_{-12}$ ;  $t_{-6}$ ), il campione massa preparato l'11/09/2012 presso la cantina di Villasor è stato suddiviso in due in modo tale da attuare in parallelo una sperimentazione utilizzando due lieviti starter differenti (la fermentazione malolattica non deve avvenire in questo vino).

La prima linea di ricerca "Lieviti commerciali" (Lc) ha subito una fermentazione alcolica ad opera di un tipo di lieviti commerciali (*S. cerevisiae* CNW OliverOgar). Al campione massa sono stati aggiunti 5 g/hL solforosa, 3 g/hL acido ascorbico e 1,5 g/hL Microzym 200 (enzimi pectolitici per uve bianche). Una volta spillato il mosto fiore sono stati aggiunti 20 g/hL del lievito commerciale e 10 g/hL di Thiazote<sup>2</sup> (Laffort). Successivamente sono stati aggiunti 15 g/hL di Golden Arom (OliverOgar) e 2 g/hL di solforosa. Il 14/11/2012 in seguito alla sfeccatura è stata aggiunto 1 g/hL di solforosa e infine il vino è stato sfecciato il 27/11/2012.

La seconda linea di ricerca "Lieviti Selezionati" (Ls) è stata svolta utilizzando come starter lieviti selezionati freschi *S. cerevisiae* forniti dall'Università di Sassari. Come il precedente anche in questo caso sono stati aggiunti al campione massa: 5 g/hL solforosa, 3 g/hL acido ascorbico e 1,5 g/hL Microzym 200. Una volta spillato il mosto

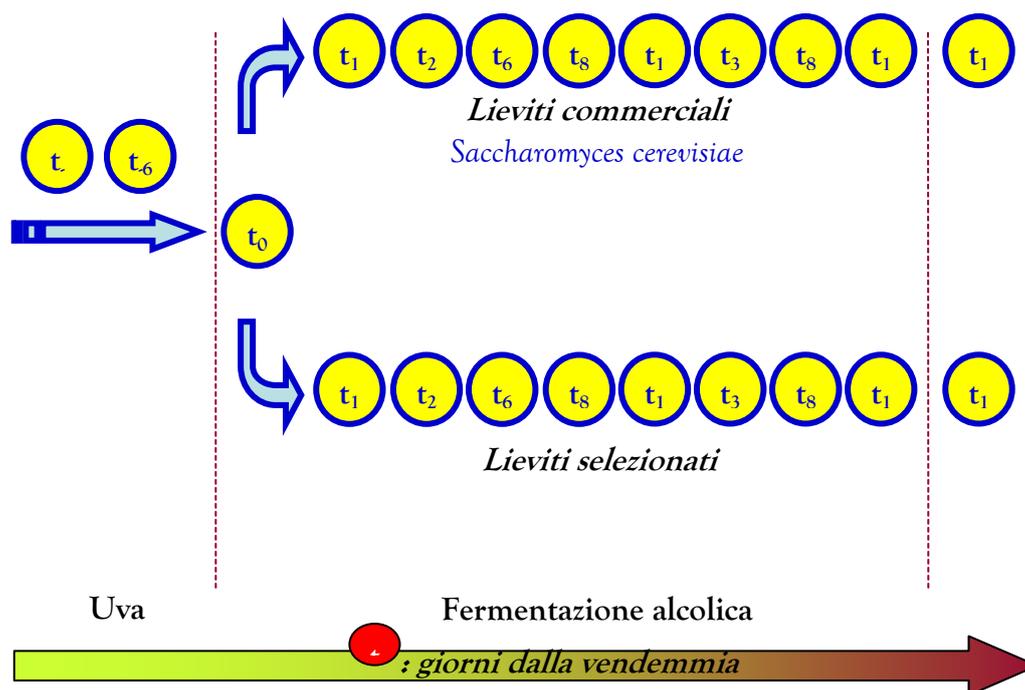
---

<sup>2</sup> Coadiuvante della fermentazione alcolica a base di sali d'ammonio e di tiamina, per dare un apporto di fattori di crescita al lievito, materiale azotato e tiamina, inoltre la tiamina limita il tasso di combinazione dell'anidride solforosa nel vino con un'azione decarbossillante degli acidi acetonicici. Questa azione si traduce nel vino finito con un aumento del tenore di SO<sub>2</sub> libera nei confronti del SO<sub>2</sub> totale, una diminuzione del tenore di acido piruvico e  $\alpha$ -chetoglutarico, un abbassamento dell'acidità volatile e un aumento del carattere aromatico

fiore sono stati aggiunti 20 g/hL di lievito fresco (Università di Sassari) e 10 g/hL thiazote, ed infine 15 g/hL Golden Arom (OliverOgar), seguiti da una aggiunta di 0,5 g/hL di solforosa il 19/09/2012 e un'altra il 26/09/2012. Il 28/09/2012 in seguito alla sfecciatura sono stati aggiunti 2 g/hL di solforosa e 15 g/hL di acido tartarico. Infine, sono stati aggiunti 2 g/hL di solforosa il 28/09/2012, il vino è stato sfecciato il 17/10/2012 e gli sono stati aggiunti 1,5 g/hL di solforosa.

I campioni sono stati prelevati a intervalli regolari durante le diverse fasi della fermentazione, come indicato nello schema riportato in **Figura 9**.

**Figura 9.** Schema della sperimentazione su uve Vermentino



### *Risultati e discussione*

Anche nelle sperimentazioni del Vermentino si sono riscontrate delle differenze, ma non così marcate come nel caso del Cannonau. Nel Vermentino abbiamo un

contenuto totale di sostanze azotate e di AA nella sperimentazione “Ls” (rispettivamente  $1599,7 \pm 70,9$  mg/L e  $1574,7 \pm 69,7$  mg/L) di poco superiore a quelle della linea “Lc” (rispettivamente  $1436,2 \pm 71,8$  mg/L e di AA di  $1412,7 \pm 66,9$  mg/L). Il tenore di AA essenziali è interessante perché mostra delle differenze più marcate: nella linea commerciale la loro concentrazione è di  $87,4 \pm 3,3$  mg/L, mentre nella linea selezionati il loro valore medio è di  $65,2 \pm 1,8$  mg/L. Ciò potrebbe essere legata ad una differente attività proteolitica degli enzimi prodotti dai due lieviti. È interessante osservare che il tenore di AB in entrambe le sperimentazioni è praticamente identico:  $23,6 \pm 1,4$  mg/L e  $25,0 \pm 1,9$  mg/L, rispettivamente nella sperimentazione Lc e Ls. Anche per questa sperimentazione possiamo dire che la concentrazione delle AB in totale se paragonata ai valori limite dell’HIA consigliati nel vino risulta essere superiore, tuttavia HIA e TYA non sono state rivelate se non in tracce. Anche nel Vermentino l’AA che è risultato essere in assoluto più concentrata è stata la Pro, con valori tuttavia notevolmente inferiori a quelli del Cannonau:  $303,0 \pm 12,1$  mg/L nella serie “Lc” e  $532,6 \pm 21,3$  mg/L nella serie “Ls”. L’Arg anche qui uno tra gli AA più concentrati, è stato ritrovato a concentrazioni che vanno da  $65,8 \pm 1,97$  mg/L nella serie “Lc” a  $69,3 \pm 3,5$  mg/L nella serie “Ls”. Per quanto riguarda gli AA essenziali anche qui si conferma la Leu come più concentrato ( $22,7 \pm 0,9$  mg/L nella linea “Lc” e  $15,1 \pm 1,1$  mg/L nella serie “Ls”). Infine per quanto riguarda le AB presenti a concentrazioni più elevate possiamo notare PUT, SPD e ETA che presentano concentrazioni più o meno simili tra di loro e tra le due serie:  $7,3 \pm 0,5$  mg/L,  $6,2 \pm 0,2$  mg/L,  $7,2 \pm 0,4$  mg/L per nella linea “Lc” e  $6,6 \pm 0,3$  mg/L;  $7,3 \pm 0,5$  mg/L;  $7,2 \pm 0,3$  mg/L nella serie “Ls”, rispettivamente per PUT, ETA e

SPD. In conclusione, osservando in dettaglio la variazione delle concentrazioni degli AA e AB possiamo affermare che sono presenti delle differenze nei diversi punti di analisi della sperimentazione, cioè durante il processo fermentativo del mosto, che tuttavia tendono a scomparire a fine fermentazione, ottenendo perciò due vini finiti molto simili tra loro per composti azotati (**Figura 10**).

Tabella 7. Vermentino sperimentazione Agris. Concentrazioni AA e AB (mg/L)

Composto		$t_R$		Punti del campionamento			
		min	$t_0$	$t_{8c}$	$t_{8se}$	$t_{179c}$	$t_{179se}$
Arginina	Arg	7,7	201,6±14,1	68,3±3,4	104,4±6,7	65,8±2,0	69,3±3,5
Asparagina	Asn	9,0	34,3±2,5	33,1±2,3	26,0±2,1	47,9±3,8	59,2±4,8
Glutamina	Gln	10,0	500,6±45,6	64,5±3,2	174,6±14,3	74,5±6,2	72,8±6,6
Citrullina	Cit	10,9	13,7±1,0	12,9±0,9	12,3±1,0	14,4±1,3	12,6±1,0
Serina	Ser	12,0	52,4±4,9	5,1±0,3	10,0±0,6	20,5±1,4	30,9±2,7
4-idrossiprolina	Hyp	12,4	24,8±2,0	23,1±2,0	22,2±2,0	23,2±1,9	28,3±2,1
Acido aspartico	Asp	13,3	1,9±0,0	1,9±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1	1,9±0,0
Treonina	Thr	15,9	66,9±5,8	11,7±1,1	15,7±1,2	16,2±1,0	11,7±0,6
Glicina	Gly	17,2	12,0±0,9	13,0±1,0	15,5±0,9	18,1±0,9	19,0±0,9
Alanina	Ala	21,0	128,2±10,7	25,7±1,9	77,1±6,5	27,6±2,2	46,8±3,7
Tirosina	Tyr	21,6	50,4±4,3	10,2±0,8	12,5±1,0	15,5±1,1	23,2±2,1
Acido Glutamico	Glu	13,4	378,8±35,2	82,7±7,8	136,0±10,6	137,3±12,3	85,3±7,9
Acido $\gamma$ -Amminobutirico	GABA	26,8	286,4±25,1	217,0±19,8	246,9±21,7	243,2±21,3	235,8±20,5
Prolina	Pro	27,8	387,7±11,7	248,9±12,4	234,2±14,1	303,0±12,1	532,6±21,3
Metionina	Met	28,3	31,9±3,0	27,7±2,2	27,7±2,3	27,7±2,0	27,7±1,7
Valina	Val	30,4	47,2±4,0	7,8±0,5	12,3±1,0	11,2±1,0	12,4±1,1
Metilamina	MTA	32,3	1,0±0,0	0,7	0,7±0,0	0,8±0,0	1,8±0,1
Dopamina	DA	33,2	nd	nd	nd	nd	nd
Fenilalanina*+Triptofano	Phe*+Trp	33,8	17,3±1,2	17,3±1,0	17,3±1,0	17,3±0,9	17,3±1,2
Leucina*+Isoleucina	Leu*+Ile	35,0	59,2±1,8	11,0±0,8	9,2±0,6	22,7±0,9	15,1±1,1
Etilamina	ETA	37,2	5,5±0,3	5,6±0,4	5,6±0,5	6,2±0,2	7,3±0,5
Cisteina	Cys	39,8	129,7±11,8	129,7±11,1	129,7±11,2	129,7±10,6	129,7±10,2
Ornitina	Orn	42,2	14,7±1,0	17,8±1,2	9,1±0,3	54,1±4,8	13,8±0,7
Istidina	His	43,5	56,7±5,0	47,7±4,0	47,7±3,6	47,7±3,9	47,7±2,7
Lisina	Lys	43,5	5,4±0,3	1,3±0,1	1,3±0,1	12,7±0,9	2,7±0,1
Triptamina	TRA	47,0	4,1±0,1	6,7±0,4	nd	nd	nd
Fenilettilamina	PEA	48,6	1,2±0,0	1,2±0,1	nd	nd	nd
Isopentilamina	IPA	49,2	0,7±0,0	0,7±0,0	nd	nd	nd
Putrescina	PUT	50,3	4,9±0,1	4,6±0,3	4,8±0,2	7,3±0,5	6,6±0,3
Cadaverina	CAD	51,3	2,2±0,1	2,0±0,0	2,0±0,1	2,0±0,1	2,1±0,1
Istamina	HIA	51,8	29,8±2,1	29,8±2,1	nd	nd	nd
Tiramina	TYA	55,9	7,4±0,3	7,4±0,6	nd	nd	nd
Spermidina	SPD	56,8	13,2±0,8	11,7±0,8	9,6±0,9	7,2±0,4	7,2±0,3
Spermina	SPM	59,2	2,7±0,2	2,4±0,1	1,6±0,1	0,7±0,0	0,7±0,0

\* amminoacidi utilizzati per la quantificazione (i dati di letteratura lo riportano come il più concentrato)

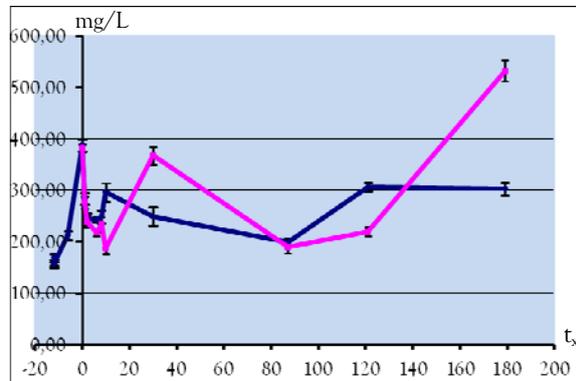
nd not detected (<LOD)

tr tracce (<LOQ)

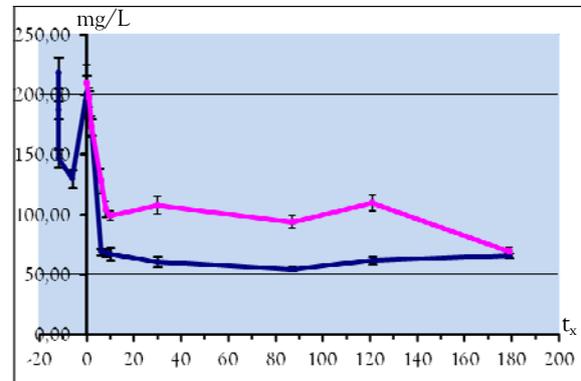
Figura 10. Evoluzione dei principali AA e AB durante la fermentazione del Vermentino

— Lc  
— Ls

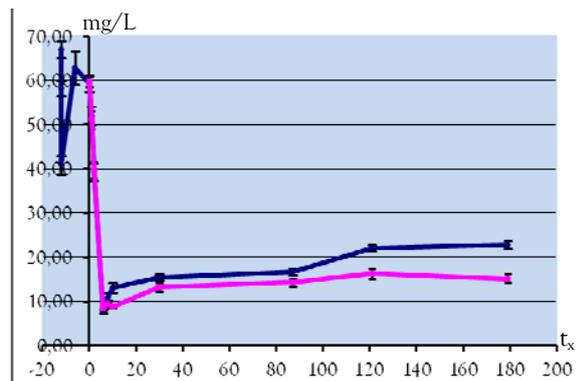
*Pro*



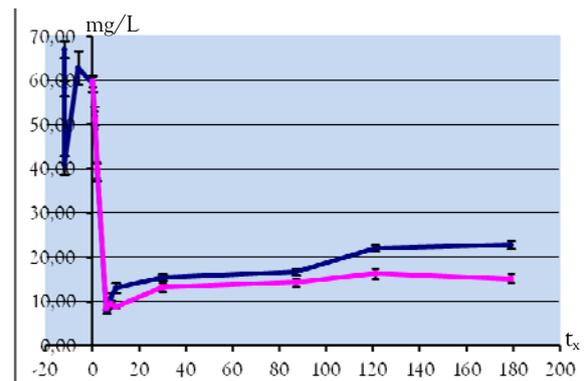
*Arg*



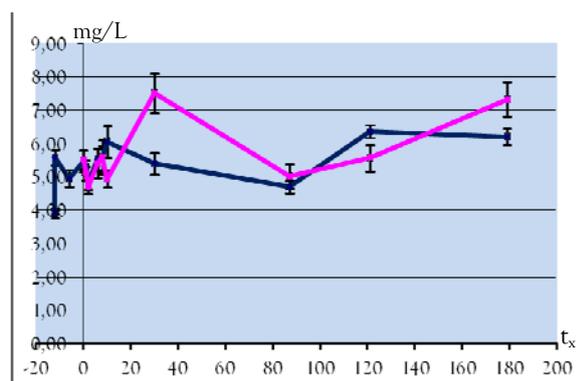
*Leu*



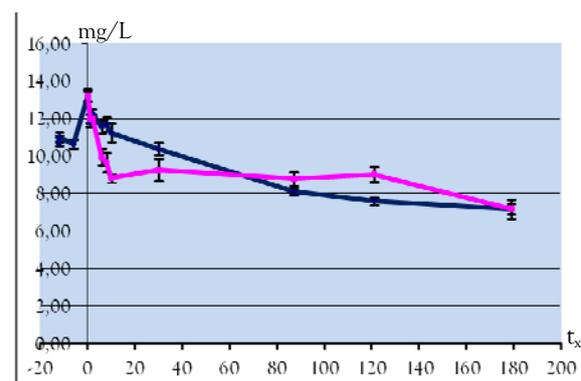
*PUT*



*ETA*



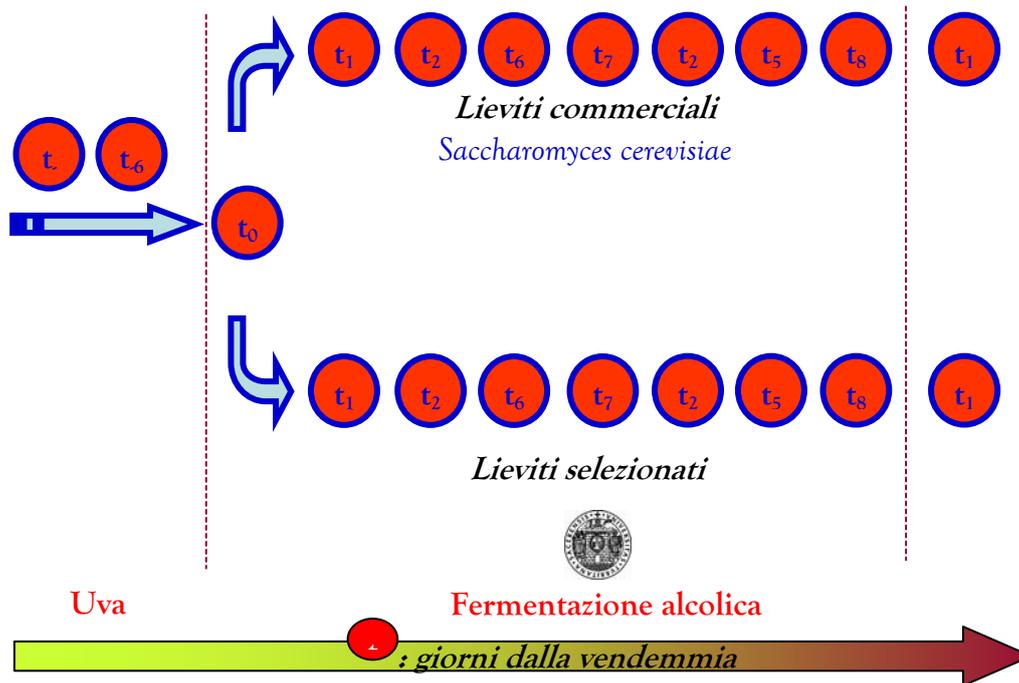
*SPD*



### *Prove fermentazione Moscato*

I campioni di uva Moscato sono stati ottenuti, come nel caso del Vermentino, da un vigneto sito a Palmas Arborea (OR) a 4 metri s.l.d.m. su suolo sabbioso e le viti sono state allevate con un sistema a cordone speronato. I campioni di uve sono stati prelevati 12 e 6 giorni prima della vendemmia ( $t_{12}$ ;  $t_6$ ) e il campione massa ( $t_0$ ) è stato vinificato presso la cantina sperimentale dell'AGRIS di Villasor. Come per la sperimentazione del Vermentino, anche quella del Moscato si è sviluppata in due linee, essendoci solo fermentazione alcolica. Nella sperimentazione "Lc" sono stati utilizzati lieviti commerciali (*S. cerevisiae* SI 404, OliverOgar), mentre nella sperimentazione "Ls" i lieviti selezionati freschi del ceppo *S. cerevisiae* erano forniti dall'Università di Sassari. Ad eccezione dei diversi lieviti starter, il metodo di vinificazione è risultato identico per entrambe le sperimentazioni, dove a parte i lieviti sono stati aggiunti 10 g/hL Thiazote (Laffort), 5 g/hL solforosa e 100 g/hL acido tartarico. Il mosto, dopo svinatura e aggiunta di 15 g/hL Biogran 200, è stato poi sfecciato circa 2 mesi dopo e in seguito sono stati aggiunti 2,5 g/hL solforosa e il vino è stato imbottigliato il 01/02/2013. I campioni prelevati a intervalli regolari durante le diverse fasi di fermentazione, sono riportati in modo schematizzato nella **Figura 11**.

Figura 11. Schema della sperimentazione su uve Moscato



### Risultati e Discussione

Le sperimentazioni del Moscato non differiscono per nessuno dei parametri presi in considerazione, i valori risultano pressoché identici. Si ha infatti per il Moscato ottenuto per fermentazione ad opera dei lieviti commerciali “Lc”: TOT [N-] =  $968,5 \pm 58,1$  mg/L; [AA]= $938,9 \pm 64,2$  mg/L; [AA essenziali] =  $49,1 \pm 1$ , mg/L 5 e [AB] =  $29,6 \pm 1,1$  mg/L, mentre per la sperimentazione effettuata “Ls”: TOT [N-] =  $972,1$  mg/L  $\pm 62,0$ ; [AA]=  $944,3 \pm 52,1$ ; [AA essenziali] =  $45,3 \pm 0,9$  e [AB] =  $27,7 \pm 0,7$ . Anche i valori dei composti amminici maggiormente caratterizzanti i Moscati prodotti con le due vinificazioni, sono simili: la Pro, sempre il composto azotato a più rappresentato, si trova a concentrazioni di  $311,0 \pm 15,5$  mg/L nella prima linea e di  $316,3 \pm 19,0$  mg/L nella seconda; a seguire l’Arg con valori di  $16,7 \pm 0,7$  mg/L e di  $17,1 \pm 0,7$  mg/L. La Leu presenta una concentrazione leggermente superiore nella linea “Lc” con un valore

di  $8,7 \pm 0,6$  mg/L, contro  $7,4 \pm 0,3$  mg/L della linea "Ls". Si può affermare che la concentrazione delle AB, anche in questo caso, se paragonata ai valori limite dell' HIA consigliati nel vino risulta essere fuori range. Tra le AB più concentrate abbiamo ETA con  $17,6 \pm 0,7$  mg/L e  $15,4 \pm 0,9$  mg/L, rispettivamente e poi SPD con una concentrazione media di  $7,2 \pm 0,4$  mg/L in entrambi i moscati e PUT con valori di  $2,7 \pm 0,1$  mg/L e  $2,6 \pm 0,1$  mg/L, D'altro canto è importante dire che non sono state rivelate tracce ne di HIA ne di TYA. A differenza però del Vermentino che presentava variazioni delle concentrazioni delle sostanze lungo il processo fermentativo del mosto ma che poi tendeva al raggiungimento dello stesso valore a fine fermentazione, nel caso del moscato non si è notata questa differenza (**Figura 12**). Ciò fa presumere che in questo caso gli starter utilizzati abbiano influenzato la formazione di AB in ugual modo, ottenendo perciò due vini finiti molto simili tra loro per composti azotati, ciò non toglie che altre tipologie di starter potrebbero determinare differenze, ragion per cui sarebbe interessante sviluppare e testare nuove sperimentazioni con ceppi microbici differenti.

Tabella 8. Moscato sperimentazione Agris. Concentrazioni AA e AB (mg/L)

Composto		t <sub>R</sub> (min)	Punti del campionamento				
			t <sub>0</sub>	t <sub>7c</sub>	t <sub>7se</sub>	t <sub>121c</sub>	t <sub>121se</sub>
Arginina	Arg	7,7	174,7±12,2	17,6±0,9	13,9±0,6	16,7±0,7	17,1±0,7
Asparagina	Asn	9,0	32,8±2,8	49,1±4,1	44,1±3,6	47,2±3,3	55,0±4,8
Glutamina	Gln	10,0	124,0±11,3	51,9±4,4	42,1±4,0	38,2±2,9	31,0±2,6
Citrullina	Cit	10,9	10,1±0,3	8,7±0,3	8,7±0,6	8,7±0,6	8,7±0,6
Serina	Ser	12,0	22,2±1,7	4,2±0,1	0,9±0,0	5,3±0,3	0,9±0,0
4-idrossiprolina	Hyp	12,4	21,8±1,6	24,6±2,1	22,8±1,8	22,1±2,0	24,3±2,1
Acido aspartico	Asp	13,3	1,9±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1
Treonina	Thr	15,9	32,6±3,0	11,7±1,0	11,7±0,6	11,7±0,9	11,7±0,9
Glicina	Gly	17,2	11,2±0,8	12,0±1,0	8,5±0,3	10,9±0,8	8,9±0,5
Alanina	Ala	21,0	26,2±2,1	5,0±0,2	3,9±0,1	5,6±0,3	4,9±0,2
Tirosina	Tyr	21,6	22,6±1,9	7,4±0,5	9,4±0,4	6,1±0,3	8,8±0,5
Acido Glutamico	Glu	13,4	66,6±6,1	25,1±2,1	36,1±3,0	33,0±2,8	16,4±1,0
Acido γ-Amminobutirico	GABA	26,8	327,4±30,2	6,1±0,3	3,4±0,1	12,5±0,9	12,7±1,0
Prolina	Pro	27,8	191,5±5,8	503,6±25,2	280,1±8,4	311,0±15,6	316,3±19,0
Metionina	Met	28,3	28,3±2,2	27,7±1,8	27,7±2,1	27,7±1,6	27,7±2,2
Valina	Val	30,4	23,4±1,7	5,8±0,3	6,1±0,3	6,7±0,3	6,5±0,4
Metilamina	MTA	32,3	1,2±0,1	0,4±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0	0,5±0,0
Dopamina	DA	33,2	nd	nd	nd	nd	nd
Fenilalanina*+Triptofano	Phe*+Trp	33,8	18,9±1,3	17,3±1,2	17,3±1,1	17,4±1,1	17,3±1,0
Leucina*+Isoleucina	Leu*+Ile	35,0	31,4±0,9	6,3±0,4	6,3±0,4	8,7±0,6	7,4±0,3
Etilamina	ETA	37,2	11,7±0,7	27,6±1,4	14,2±1,1	17,6±0,7	15,4±0,9
Cisteina	Cys	39,8	129,7±11,5	129,7±11,7	129,7±10,8	129,7±11,3	129,7±11,5
Ornitina	Orn	42,2	136,3±11,4	31,0±2,6	61,6±5,3	2,6±0,1	2,6±0,1
Istidina	His	43,5	47,7±4,1	47,7±3,7	nd	nd	nd
Lisina	Lys	43,5	8,6±0,3	4,9±0,3	2,8±0,2	5,7±0,3	4,0±0,2
Triptamina	TRA	47,0	nd	nd	nd	nd	nd
Feniletilamina	PEA	48,6	nd	nd	nd	nd	nd
Isopentilamina	IPA	49,2	nd	nd	nd	nd	nd
Putrescina	PUT	50,3	8,0±0,2	2,4±0,1	2,4±0,1	2,7±0,1	2,6±0,1
Cadaverina	CAD	51,3	2,1±0,1	2,2±0,1	2,0±0,1	1,9±0,1	2,0±0,1
Istamina	HIA	51,8	nd	nd	nd	nd	nd
Tiramina	TYA	55,9	nd	nd	nd	nd	nd
Spermidina	SPD	56,8	9,6±0,4	10,7±0,5	9,4±0,8	7,2±0,4	7,2±0,4
Spermina	SPM	59,2	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0

\* amminoacidi utilizzati per la quantificazione (i dati di letteratura lo riportano come il più concentrato)

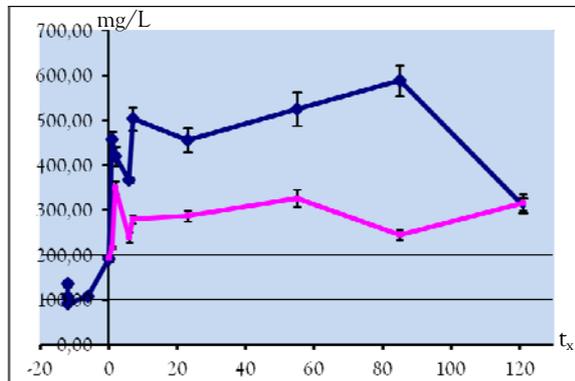
nd not detected (<LOD)

tr tracce (<LOQ)

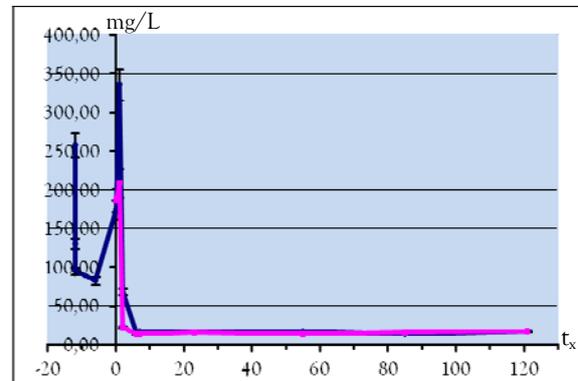
Figura 12. Evoluzione dei principali AA e AB durante la fermentazione del Moscato

— Lc  
— Ls

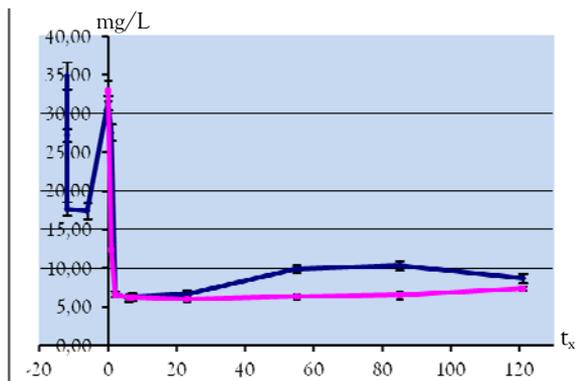
*Pro*



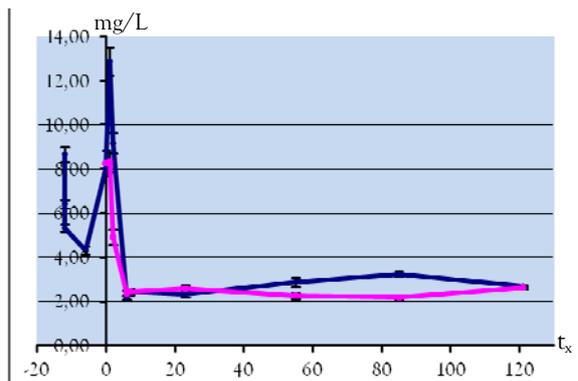
*Arg*



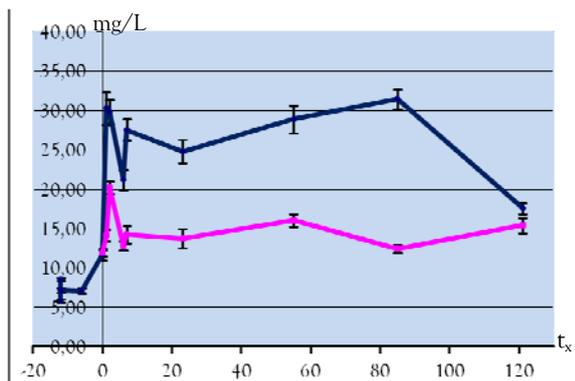
*Leu*



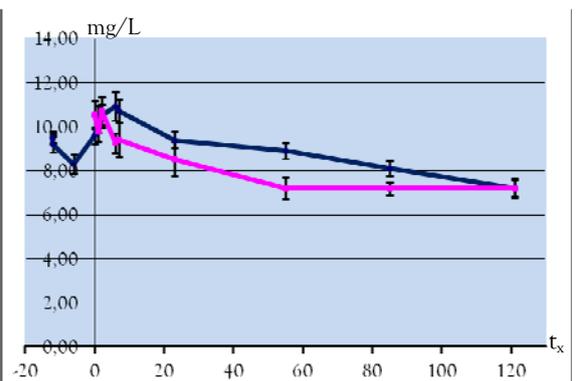
*PUT*



*ETA*



*SPD*



## Le olive da mensa in Sardegna

Tra i prodotti fermentati, le olive da mensa costituiscono un prodotto molto apprezzato in Sardegna. La produzione commerciale delle olive da mensa viene effettuata quasi esclusivamente con olive verdi delle varietà Manna, Nera di Gonnos e Pizz'e carroga, utilizzando come metodo di fermentazione il sistema Greco. Sia negli impianti industriali, sia in quelli artigianali, le concentrazioni di sale utilizzate variano dall'7 al 14%.

La deamarizzazione, perciò, come descritto nella parte introduttiva, risulta essere molto lenta e la fermentazione avviene, fondamentalmente, per azione di lieviti anaerobi e successivamente, quando il pH scende a valori intorno a 5, si instaura la fermentazione principale che è accompagnata da una certa attività di batteri lattici eterofermentanti. Durante il processo i valori di pH possono raggiungere valori maggiori, col pericolo di incorrere in rischi di tipo igienico-sanitario, favorendo lo sviluppo di lieviti filmogeni aerobi (in grado di cambiare il loro metabolismo durante lo sviluppo e, risalendo in superficie, formano un velo che impedisce il contatto del prodotto con l'O<sub>2</sub>, passando ad un metabolismo ossidativo), muffe e batteri. In particolare, i lieviti possono danneggiare irrimediabilmente il prodotto liberando enzimi poligalatturonasici che danneggiano l'integrità delle drupe, mentre le muffe e batteri possono costituire un rischio per la salute del consumatore. Di conseguenza è necessario mantenere stabile il pH a circa 4,5 durante il processo di fermentazione, facendo attenzione a curare perfettamente le colmature (cioè il ripristino dell'NaCl per mantenere costante la concentrazione della salamoia) e l'ermeticità (Piga *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda la poligalatturonasi, esso è un enzima appartenente alla classe delle glicosilasi, che catalizza la seguente reazione di idrolisi:



Questo enzima svolge solitamente un ruolo essenziale nel processo di maturazione della frutta. Durante la maturazione le protopectine vengono degradate ad acidi pectici, per azione della pectinesterasi. Successivamente gli acidi pectici, che sono polimeri dell'acido galatturonico, vengono idrolizzati e resi solubili ad opera della poligalatturonasi, con conseguente rammollimento della polpa.

### Validazione del metodo

Il metodo è stato validato, come per la matrice vino, in accordo con la *"International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use"* (ICH) (ICH Topic Q2 (R1), 1995) in maniera analoga a quanto fatto per il vino. Tuttavia, il fatto di dover procedere all'estrazione dei composti da una matrice solida ha richiesto una modifica legata alle prove di estrazione. Dopo aver effettuato diverse prove, si è deciso di utilizzare come solvente estrattore una soluzione di acido trifluoroacetico con una percentuale del 5% in acqua (TCA 5%, p/p). La linearità è stata valutata mediante la preparazione di una miscela di standard contenente 15 analiti e lo SI in sei diverse concentrazioni, sottoponendo la miscela alla procedura di derivatizzazione seguita dall'analisi mediante HPLC-Fluo. La **Figura 14** riporta i cromatogrammi HPLC-FLD esemplificativi del bianco (A), di una soluzione standard di AB e AA (B), delle olive fresche (C) e delle olive al  $t_{360}$  (D). La **Tabella 9**

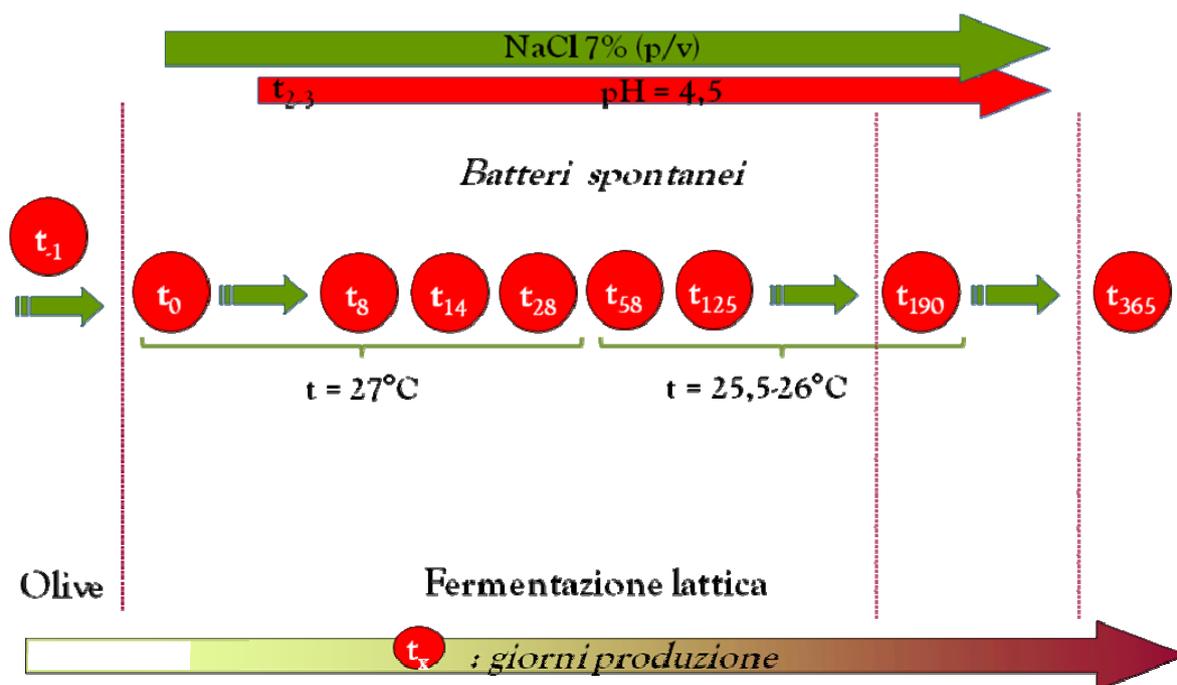
riporta l' intervallo di concentrazioni, il coefficiente di determinazione ( $r^2$ ), l'LOD e l'LOQ per ciascun composto.), la ripetibilità intra- ed inter -day, deviazione standard relativa (RSD) per l'area del picco e infine lo studio di recupero, nello stesso modo in cui tali parametri sono stati calcolati e argomentati per la matrice vino.

### **Campioni di olive**

I campioni di olive analizzati sono stati forniti dall'AGRIS (Agenzia per la ricerca in agricoltura) di Villasor (Cagliari) nell'annata 2012. Si è lavorato su una cultivar tipica sarda, la Nera di Gonnos seguendo la tradizionale fermentazione naturale. Il campionamento è stato effettuato durante le diverse fasi di fermentazione, dal  $t_1$  (giorno prima della raccolta, 5/11/2012) fino al  $t_{163}$  (giorno di fine preparazione prodotto 15/05/2013). Un'ultima analisi è stata effettuata a distanza di un anno ( $t_{365}$ ). La **Figura 13** riporta la tempistica della sperimentazione. Il processo di produzione svolto è stato il seguente: le olive, dopo la raccolta, sono state lavate prima dell'immissione in salamoia, la quale è stata preparata al 7% e periodicamente controllata, mantenendola costante con opportune integrazioni di sale. Il pH è stato regolarmente controllato a intervalli costanti di circa due - tre giorni per il primo periodo di fermentazione, sino a quando è risultato essere costante (pH ca. 4,5). Tale fase è avvenuta in modo naturale, senza aggiunta di alcun acidificante. Tutti i processi sono avvenuti in cella termostata a temperatura costante e controllata. Durante il primo mese di fermentazione la temperatura è stata mantenuta costante a circa 27 °C, e successivamente impostata a 25,5-26°C, fino alla completa deamarizzazione. Le olive sono state conservate a

temperatura controllata per circa tre mesi e successivamente sono state conservate a temperatura ambiente al buio.

Figura 13. Schema della prova per la fermentazione delle olive in salamoia



### Preparazione dei campioni

I campioni di olive raccolti sono stati preventivamente denocciolati e sminuzzati mediante un coltello mezzaluna, prima di subire la fase di estrazione. L'estrazione degli AA e delle AB è avvenuta in tubi da centrifuga da 15 mL (VWR International) mediante una soluzione di acido trifluoroacetico con una percentuale del 5% in acqua (TCA 5%, p/p). In dettaglio, è stato posto 1 g di polpa di oliva sminuzzata all'interno della Falcon, a cui è stato aggiunto lo SI (20  $\mu\text{L}$  di Norvalina a c.a. 1000 mg/L) e 3 mL di TCA 5%. Successivamente tale miscela di estrazione è stata omogeneizzata con Ultraturrax (IKA Italia, Milano) e posta poi in un bagnetto ad ultrasuoni per 20 min a  $40^\circ\text{C}$ . L'estratto è

stato poi posto in Eppendorf da 1,5 mL Lock Tubes™ e centrifugato a 12000 rpm per 10 min con una centrifuga Eppendorf® MiniSpin (Eppendorf, Milano, Italia). Sono stati recuperati 200 µL di supernatante e derivatizzati con la stessa metodica messa appunto per il vino

- 300 µL Tampone borato pH=9,30
- 200 µL Campione (estratto olive o std)
- 100 µL DCI (5000 mg/L in acetone)
- 400 µL CH<sub>3</sub>CN

Il derivatizzato è stato poi diluito, come da procedura standard, con MeOH (1:1, v/v) per analisi HPLC-FLD.

## **Risultati e discussione**

La validazione del metodo per il dosaggio degli AA e delle AB nelle olive è risultato molto affidabile e con parametri simili a quelli del vino. Solo alcuni valori dei recuperi sono risultati inferiori al 90%, ma del tutto accettabili (**Tabella 9**). Le sostanziali differenze nel contenuto di AA e AB evidenziate tra i diversi punti della fermentazione permettono di avanzare alcune considerazioni relative all'influenza esercitata dal particolare ambiente di fermentazione durante la tecnologia di produzione delle olive da mensa. Successivamente sono state eseguite anche le analisi sulle olive a distanza di un anno dalla loro preparazione e tale sperimentazione ha evidenziato dati interessanti. È importante sottolineare che il prodotto dopo i 253 giorni di fermentazione, è stato conservato al buio ma a temperatura ambiente con oscillazioni

comprese tra i 15 °C e i 26,5 °C. Ciò è stato fatto per mettersi nelle condizioni rappresentative delle normali modalità di conservazione domestica, in tal modo si verificano fluttuazioni legate all'ambiente (temperatura) e alle modalità (ermeticità e sciolmatura). Dai dati ottenuti è emerso che durante il processo di produzione si verifica un aumento di formazione sia dei composti azotati in generale, passando da valori di  $97,8 \pm 3,5$  mg/kg nell'oliva verde, che si mantengono costanti sino al  $t_{253}$  ( $96,13 \pm 3,5$  mg/kg), fino a valori di  $127,50 \pm 10,74$  mg/kg al  $t_{360}$ , a dimostrazione di un' aumentata attività proteolitica, solo durante la conservazione. La concentrazione di AA ha avuto anch'essa un'importante variazione da un valore iniziale di  $96,1 \pm 3,5$  mg/kg, a  $127,5 \pm 10,7$  mg/kg' fino ad arrivare alla concentrazione massima al  $t_{360}$  ( $277,3 \pm 10,8$  mg/kg), tra essi ritroviamo anche un' importante percentuale di AA essenziali, anch'essi in aumento durante le fasi di fermentazione che si mantengono poi più o meno stabili nel tempo ( $22,4 \pm 0,7$  mg/kg;  $42,0 \pm 4,0$  mg/kg;  $39,4 \pm 0,4$  mg/kg ). È interessante sottolineare anche l'aumento della concentrazione di AA essenziali, che hanno raggiunto valori di  $39,4 \pm 0,3$  mg/kg al  $t_{365}$ , particolarmente presente è stata la Leu che ha raggiunto un valore finale di  $10,60 \pm 0,9$  mg/kg al  $t_{253}$ , arrivando però a valori notevolmente più elevati dopo un anno ( $45,9 \pm 4,0$  mg/kg) (**Figura 15**).

Il tenore invece delle AB è completamente assente nelle olive verdi che durante il processo fermentativo risultano tendenzialmente costanti, sono state riscontrate solo bassissime quantità di AB che sono andate poi via via incrementando raggiungendo valori di  $9,4 \pm 0,1$  mg/kg al  $t_{360}$ . Per quanto riguarda il contenuto di HIA e di TYA, ritenute le ammine biogene di maggior interesse, esso è risultato nullo e perciò ben

lontano dalle concentrazioni considerate potenzialmente pericolose per la salute dei consumatori.

Tale fatto induce a considerare il prodotto esaminato sicuro dal punto di vista sanitario, considerazione rafforzata anche dal fatto che la concentrazione complessiva di AB al  $t_{253}$  e cioè al momento del confezionamento era praticamente nulla. La produzione di AB nel corso dell'intera filiera è notevolmente limitata, lo stesso non si può dire delle analisi effettuate al  $t_{365}$  che hanno mostrato che durante la conservazione in condizioni "domestiche", la loro concentrazione è incrementata rimanendo tuttavia su bassi valori (**Tabella 10**).

Nel dettaglio si possono notare, tra gli andamenti di formazione delle AB, l'incremento dei livelli di PUT che passa dalla presenza in tracce nel prodotto finito a un valore di  $7,0 \pm 0,5$  mg/kg dopo un anno (**Figura 15**). In generale l'AA presente a maggior concentrazione alla fine del processo di produzione è stato l'Asp che al  $t_{365}$  ha raggiunto valori di  $58,0 \pm 4,8$  mg/kg, la sua concentrazione è incrementata notevolmente durante la conservazione del prodotto (**Figura 15**).

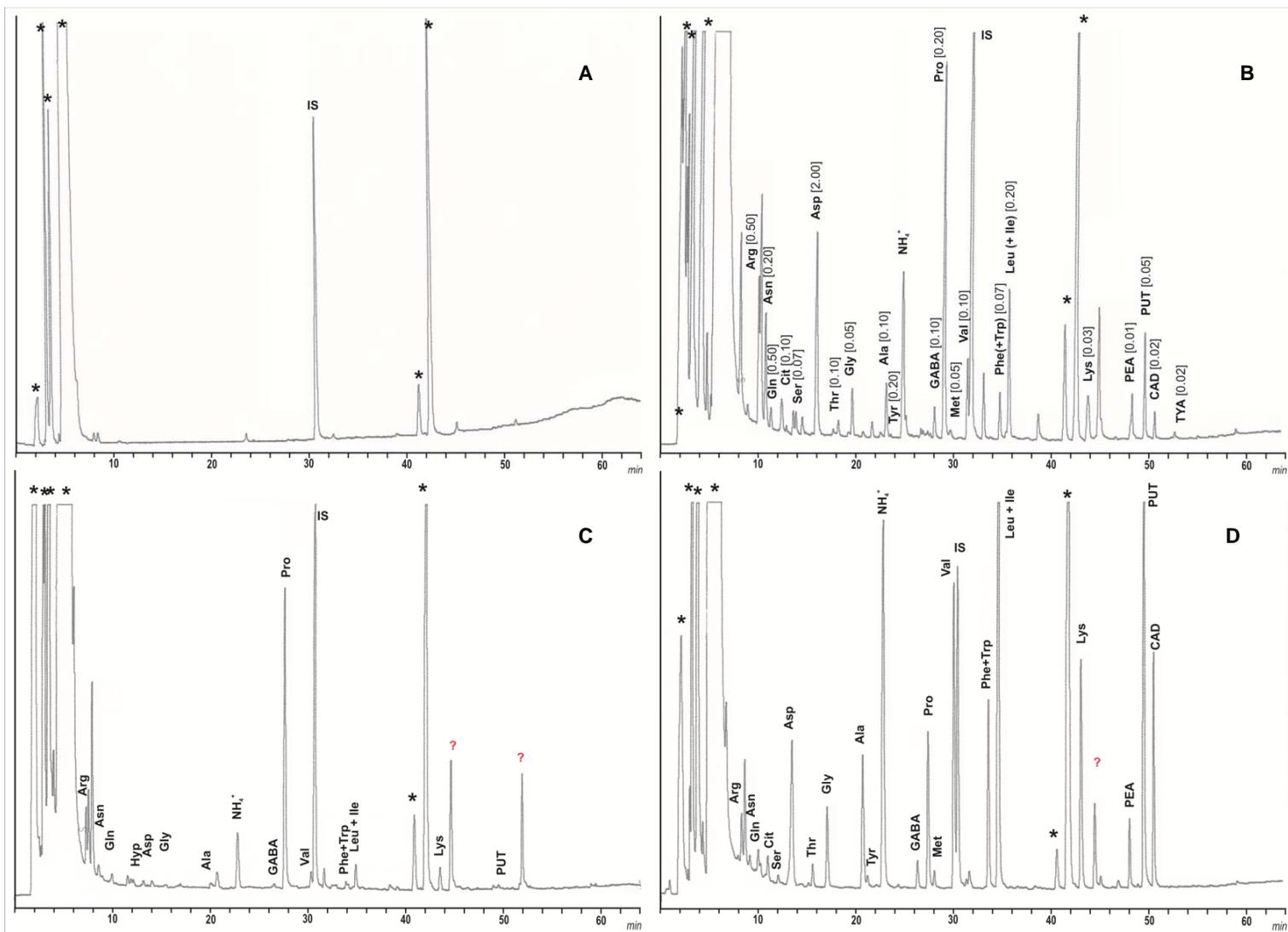
In conclusione si può affermare che l'aumento della concentrazione sia di composti azotati, sia di AA, che di AB potrebbe essere indice delle attività enzimatiche dei microrganismi presenti che promuovono, soprattutto durante il periodo di conservazione del prodotto, sia la proteolisi che la decarbossilazione con formazione di ammine, probabilmente favorita dalle variazioni di temperature e/o pH presenti all'interno della salamoia, in ogni caso il prodotto esaminato può essere tranquillamente considerato sicuro dal punto di vista igienico-sanitario.

**Tabella 9.** Parametri di validazione delle procedure analitiche per la determinazione di AA e AB nelle olive da mensa.

Composti	tr	Sensibilità			Linearità			Ripetibilità (intra-day)	Precisione intermedia (inter-day)	Recupero* ± SD (%)	
		min	LOD mg/kg	LOQ mg/kg	Range di concentrazione mg/kg	r <sup>2</sup>	Equazione di calibrazione	Area picco (RSD, %)	Area picco (RSD, %)	livello I	livello II
Arginina	Arg	7,7	0,05	0,15	0,15-2,91	0,9996	y = 0,6467x + 0,0528	1,89	2,45	97,1±3,2(6,9)	101,5±2,8(17,2)
Asparagina	Asn	9,0	0,06	0,19	0,20-4,05	0,9953	y = 0,5166x - 0,0185	1,33	3,30	96,6±4,0(3,7)	99,5±3,6(11,0)
Glutamina	Gln	10,0	0,08	0,25	0,25-4,97	0,9999	y = 0,3993x - 0,0519	0,96	3,61	105,8±2,9(6,7)	106,0±3,1(20,2)
Citrullina	Cit	10,9	0,05	0,15	0,15-3,11	0,9989	y = 0,6841x + 0,0077	1,64	2,96	100,1±4,0(2,0)	104,6±3,5(6,8)
Serina	Ser	12,0	0,06	0,17	0,22-4,43	0,9993	y = 0,5725 + 0,0050	2,74	3,48	97,9±3,6(1,0)	103,9±2,6(3,4)
Acido aspartico	Asp	13,3	0,11	0,33	0,45-9,10	0,9988	y = 0,3006x + 0,0811	2,01	3,75	103,7±1,7(20,1)	105,2±2,8(67,1)
Treonina	Thr	15,9	0,09	0,27	0,10-0,50	0,9992	y = 0,3679x + 0,0093	2,71	3,07	89,6±2,9(2,0)	91,2±3,7(6,7)
Glicina	Gly	17,2	0,02	0,05	0,05-1,03	0,9992	y = 1,8224x + 0,0072	1,35	2,92	94,5±3,0(0,7)	98,3±4,1(1,8)
Alanina	Ala	21,0	0,02	0,06	0,07-0,60	0,9997	y = 1,5617x + 0,0111	1,03	3,86	96,4±2,7(1,2)	102,4±3,6(4,0)
Tirosina	Tyr	21,6	0,10	0,31	0,30-5,92	0,9989	y = 0,3229x - 0,1341	2,71	3,20	86,4±3,9(3,3)	89,4±2,2(9,9)
Acido- γ-amminobutirico	GABA	26,8	0,04	0,14	0,15-3,07	0,9995	y = 0,7360x + 0,0072	3,04	2,39	97,9±2,8(1,0)	106,4±1,5(3,4)
Prolina	Pro	27,8	0,03	0,10	0,10-1,10	0,9998	y = 1,0486x + 0,0174	1,43	3,63	102,3±2,7(2,2)	105,7±3,5(7,3)
Metionina	Met	28,3	0,05	0,14	0,15-2,92	0,9991	y = 0,6907x - 0,0072	1,30	3,17	102,6±2,2(1,1)	104,5±1,5(3,5)
Valina	Val	30,4	0,02	0,05	0,09-1,88	0,9994	y = 2,0901x - 0,0204	1,65	2,45	107,0±3,3(1,0)	110,1±3,0(3,4)
Fenilalanina	Phe	33,8	0,02	0,06	0,10-2,04	0,9992	y = 1,5892x - 0,0091	2,78	2,94	103,2±2,7(1,0)	104,6±5,2(3,4)
Leucina	Leu	35,0	0,02	0,05	0,05-1,03	0,9998	y = 1,9215x - 0,0110	3,44	3,58	101,3±2,2(2,1)	103,0±1,8(6,9)
Lisina	Lys	43,5	0,01	0,03	0,05-1,09	0,9993	y = 3,5956x + 0,0148	2,16	3,46	95,7±2,9(0,7)	97,3±3,1(2,1)
Feniletilamina	PEA	48,6	0,01	0,03	0,05-1,09	0,9998	y = 3,2659x - 0,0014	2,67	2,01	89,8±3,4(0,1)	88,6±4,0(0,3)
Isopentilamina	IPA	49,2	0,00	0,01	0,0-0,20	0,9996	y = 9,3685x + 0,0047	1,54	3,77	95,9±2,6(0,1)	96,8±3,0(0,2)
Putrescina	PUT	50,3	0,00	0,01	0,05-1,16	0,9998	y = 8,0419x + 0,0263	2,62	3,19	85,3±3,9(0,7)	89,4±4,6(1,7)
Cadaverina	CAD	51,3	0,00	0,01	0,01-0,25	0,9998	y = 9,2008x + 0,0191	1,96	3,35	92,0±5,8(0,3)	93,2±3,7(1,0)
Istamina	HIA	51,8	0,10	0,29	0,35-5,45	0,9984	y = 0,3415x + 0,0006	1,87	2,61	89,0±3,6(0,3)	92,0±4,2(1,0)
Tiramina	TYA	55,9	0,01	0,04	0,05-0,17	0,9996	y = 2,6749x - 0,0260	2,22	3,28	85,3±3,9(0,8)	89,4±4,6(2,0)
Spermidina	SPD	56,8	0,01	0,03	0,05-1,13	0,9990	y = 3,1626x + 0,0009	1,13	2,80	88,5±4,7(0,1)	91,3±5,1(0,3)

\* tra parentesi il quantitative aggiunto (mg/kg)

Figura 14. Cromatogrammi relativi a miscela contenente DCl e SI (A), mix standard (B), olive fresche (C) e  $t_{360}$  (D)



**Tabella 10.** Concentrazioni di AA e AB (mg/kg) nelle olive a  $t_0$ ,  $t_8$ ,  $t_{253}$  e  $t_{360}$

Composti		$t_R$	Punti del campionamento							
			$t_0$	$t_8$	$t_{253}$	$t_{360}$				
		min	mg/kg	± SD	mg/kg	± SD	mg/kg	± SD	mg/kg	± SD
Arginina	Arg	7.7	2,0	0,1	0,7	0,0	8,8	0,8	4,6	0,4
Asparagina	Asn	9.0	39,3	3,3	37,0	2,6	24,4	1,1	3,9	0,1
Glutamina	Gln	10.0	27,5	2,3	23,8	1,3	26,9	1,7	42,3	3,9
Citrullina	Cit	10.9	nd		1,7	0,0	nd		2,9	0,1
Serina	Ser	12.0	nd		nd		1,9	0,0	1,7	0,0
Acido Aspartico	Asp	13.3	1,4	0,1	nd		3,9	0,7	58,0	4,8
Treonina	Thr	15.9	nd		0,6	0,8	0,5	0,0	2,0	0,1
Glicina	Gly	17.2	nd		nd		nd		5,1	0,3
Alanina	Ala	21.0	1,3	0,1	0,9	0,1	4,7	1,1	10,2	0,9
Tirosina	Tyr	21.6	nd		nd		nd		32,6	2,8
Acido- $\gamma$ -Amminobutirico	GABA	26.8	nd		0,8	0,4	4,9	1,7	3,8	0,3
Prolina	Pro	27.8	21,6	1,7	32,3	2,3	36,1	3,0	18,7	1,1
Metionina	Met	28.3	nd		nd	nd	nd		7,8	0,6
Valina	Val	30.4	nd		nd	nd	5,6	0,4	18,6	1,4
Fenilalanina*+Triptofano	Phe*+Trp	33.8	1,5	0,1	1,2	0,1	1,3	0,1	14,3	1,2
Leucina*+Isoleucine	Leu*+Ile	35.0	0,8	0,0	0,6	0,0	10,6	0,9	45,9	4,0
Lisina	Lys	43.5	nd		nd	nd	0,5	0,0	4,1	0,2
Feniletilamina	PEA	48.6	nd		nd	nd	nd		0,3	0,0
Isopentilamina	IPA	49.2	nd		nd	nd	nd		nd	
Putrescina	PUT	50.3	nd		nd	nd	tr		7,0	0,5
Cadaverina	CAD	51.3	nd		nd	nd	nd		2,4	0,1
Tiramina	TYA	55.9	nd		nd	nd	nd		nd	
Spermidine	SPD	56.8	nd		nd	nd	nd		nd	

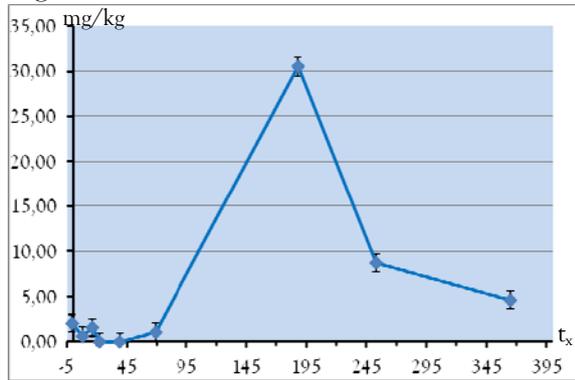
\* amminoacido utilizzato per quantificare i picchi

nd not detected (<LOD)

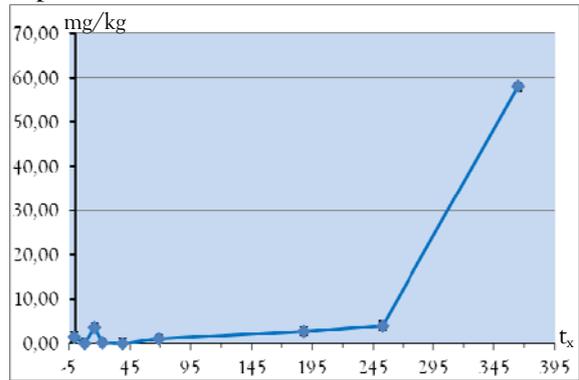
tr tracce (<LOQ)

Figura 15. Grafici delle principali AB e AA

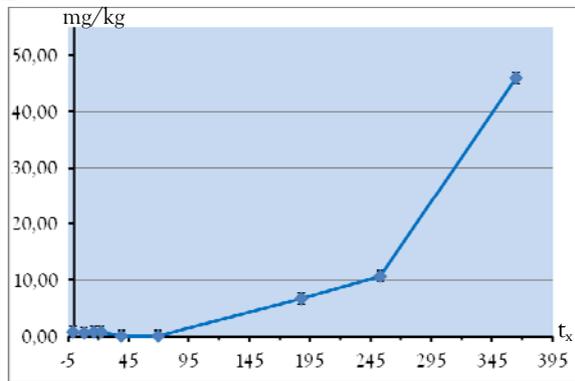
Arg



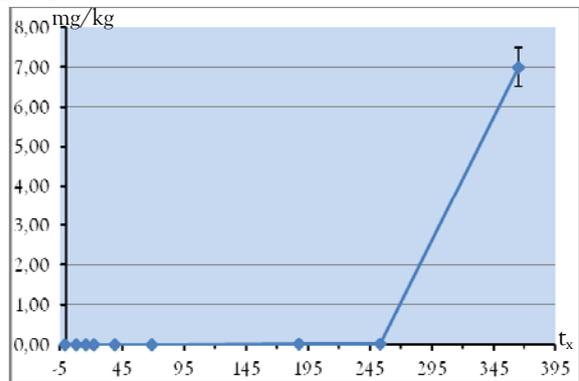
Asp



Leu



PUT



## CONCLUSIONI

Il lavoro del dottorato ha permesso di ottenere nuovi dati sul tenore di AA e AB in alcuni prodotti alimentari tipici della Sardegna e rappresentativi della dieta Mediterranea. Ciò è stato possibile grazie allo sviluppo di una metodica affidabile, precisa, intesa come ripetibilità e riproducibilità, ma anche accurata, sensibile e robusta, in grado di rilevare e quantificare in modo simultaneo la presenza di AB e AA. La derivatizzazione mediante DCl si è dimostrata selettiva, rapida e ha prodotto composti stabili che possono essere agevolmente rilevati con un'analisi HPLC accoppiato a detector a fluorescenza, come dimostrato dai valori dei parametri di validazione.

Lo studio delle principali quattro varietà di vini prodotti in Sardegna (Cannonau, Vermentino, Carignano e Vernaccia) ha evidenziato che esistono numerose differenze tra le tipologie dei vini, ma anche all'interno di ciascuna tipologia. Pertanto, le differenze sono riconducibili sia ai differenti vigneti di origine, ma anche alle diverse tecnologie di produzione applicate. In generale, si può affermare che la quantità di AB totale non è elevata in nessuna delle tipologie analizzate e HIA e TYA se presenti, lo sono solo in tracce. Il Carignano rappresenta il vino a maggior tenore di AB e di contro si pone il Vermentino con il tenore minimo tra i quattro. La situazione degli AA è esattamente l'opposto, poiché il Vermentino è risultato il vino più ricco mentre il Carignano il vino a più basso contenuto di tali sostanze. Interessante si è rivelata anche la presenza di AA essenziali e altri importanti AA come l'Arg a concentrazioni consistenti.

Per quanto riguarda la seconda parte, sono state attuate delle sperimentazioni in collaborazione con l'Agris, al fine di individuare eventuali differenze in vini sottoposti a fermentazioni con lieviti e batteri starter differenti (commerciali o selezionati dall'Università di Sassari). Dai dati ottenuti si è notata intanto la notevole differenza tra le tre tipologie di vino. In particolare il Cannonau presenta un notevole distacco rispetto ai due vini bianchi, in quanto è risultato un vino particolarmente ricco di composti azotati, probabilmente anche a causa della fermentazione malo-lattica che negli altri due vini non avviene. Il Vermentino e il Moscato risultano più simili tra loro, ma il Moscato è caratterizzato da tenori di composti amminici inferiori.

Nel dettaglio si possono notare alcune differenze tra le linee di vinificazione coi diversi lieviti e batteri starter. Nel caso del Cannonau è interessante notare che nella maggior parte dei casi sia la formazione di AB che il tenore di AA risulta essere maggiore nella sperimentazione con i lieviti commerciali e batteri spontanei. Tuttavia non esiste una particolare fase dove si evidenzia un aumento nell'andamento di formazione di tali composti ma tutte e tre le linee seguono lo stesso tipo di andamento, sviluppandosi in parallelo ma con valori di concentrazione diversi. Il Vermentino a differenza del Cannonau presenta alcune differenze a seconda dei lieviti utilizzati. I tenori sono in alcuni casi superiori nella linea commerciale (ad esempio per la Leu e PUT) e altre volte in quella spontanea (come nel caso della Pro). Anche nella sperimentazione del Vermentino gli andamenti di formazione vanno di pari passo l'uno con l'altro, portando però a risultati simili.

Interessante è stato anche il controllo dei dati del Moscato, nonostante si sia rivelato, tra i tre analizzati, il vino a inferiore concentrazione di composti azotati. Dallo studio dell'andamento temporale di formazione dei composti amminici sono emerse notevoli variazioni durante il processo fermentativo che poi tendono a ricongiungersi al punto finale, determinando la formazione di due vini finiti praticamente identici dal punto di vista di tenore in AA e AB.

Da tale studio si può dedurre che, la scelta dei lieviti starter ha una notevole influenza nella formazione di AB. Nonostante in Vermentino e Moscato non si siano riscontrate particolari differenze nel prodotto finito, non è detto che utilizzando altre tipologie di microrganismi non si possano ottenere vini con concentrazioni di AB ancora più basse.

Sarebbe perciò interessante ampliare la ricerca selezionando e testando i diversi ceppi microbici per poter ottenere dei prodotti a basso tenore di AB, e magari ad alti valori di AA essenziali o di AA come l'Arg, importanti per i loro effetti benefici, stando però sempre attenti a non intaccare le proprietà sensoriali del vino.

La terza parte di sperimentazioni sulle olive da mensa ottenuta seguendo la tradizionale fermentazione naturale, ha fornito dati interessanti. Il tenore globale di AA e AB è molto basso e le AB risultano completamente assenti nelle olive verdi. Nel processo fermentativo il loro tenore risulta tendenzialmente costante e solo a distanza di un anno è possibile individuare alcune AB, ma HIA e TYA, ritenute le ammine biogene di maggior interesse, risultano totalmente assenti. Alla luce dei dati ottenuti si può

affermare che le olive da mensa esaminate sono un prodotto totalmente sicuro dal punto di vista sanitario, anche consumate dopo un anno dalla produzione.

In conclusione, la sperimentazione effettuata ha permesso di verificare la generale salubrità delle produzioni visto il basso tenore di AB. Tuttavia, è necessario acquisire ulteriori dati tossicologici vista la presenza di molecole biologicamente attive come il GABA.

## BIBLIOGRAFIA

- Ababouch L., Afilal M.E., Rhafiri S., Busta F.F. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C). *Food Microbiology*. 1991, 8, 127-136.
- Amaya-Farfan J. Amino acids-properties and occurrence, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Caballero, B., Trugo, L. C., & Finglas, P. M. Oxford: Academic Press, Elsevier Science Ltd. 2003, 181-192.
- Ancín-Azpilicueta C., González-Marco A., Jiménez-Moreno N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, 48, 257-75.
- Arroyo-López, F.N. Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A., Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 128, 189-196.
- Bauza T., Kelly M.T., Blaise A. Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. *Food Chemistry*, 2007, 105, 405-413.
- Bover-Cid S., Holzapfel W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 53, 33-41.
- Bover-Cid S., Hugas M., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal of Food Protection*, 2000, 63, 237-243.
- Bover-Cid S., Hugas M., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 66, 185-189.
- Brown W.H., Foote C.S., Iverson B.L. *Chimica organica*. III edizione, Edises, Napoli 2006.
- Brückner H., Fujii N. Free and peptide-bound D-amino acids in chemistry and life sciences. *Chemistry and Biodiversity*, 2010, 7, 1333-1336.
- Cejudo-Bastante M.J., Sonni F., Chinnici F., Versari A., Perez-Coello M.S., Riponi C. Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT - Food Science and Technology*. 2010, 43, 1501-1507.
- Costantini A., Doria F., Vaudano E., Garcia-Moruno E. Chemical and molecular methods for the control of biogenic amine production by microorganisms. *Annals of Microbiology*. 2011, 61, 173-178.

- Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H., Wymenga, W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 57, 107-114.
- Dugo G., Vilasi F., La Torre G.L., Pellicano T.M. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chemistry*. 2006, 672-676.
- EFSA- European Food Safety Authority. (2010). <http://www.efsa.europa.eu/en/dataclosed/call/datex100607.htm>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 2011, 9, 2393.
- Fernandes J.O., Ferreira M.A. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*. 2000, 886, 183-195.
- Fernandez-Bolanos J., Heredia A., Vioque B., Castellano J.M., Guillen R. Changes in cell-wall-degrading enzyme activities in stored olives in relation to respiration and ethylene production. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1997, 204, 293-299.
- Fleet G.H. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 50, 101-117.
- Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chemistry and Biodiversity*, 2010, 7, 1491-1530.
- Friedman M., Levin, C. E. Nutritional and medicinal aspects of D-amino acids. *Amino Acids*. 2012, 42, 1553-1582.
- García-Ruiz A., González-Rompinelli E.M., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 148, 115-120.
- Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*. 2005, 16, 609-616.
- Glória M.B.A. Amines, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Caballero, B., Trugo, L. C., & Finglas, P. M. Oxford: Academic Press, Elsevier Science Ltd. 2003, 173-181.
- Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I., García-Romero E. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 608-613.
- Gros C., Labouesse B. Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins. *European Journal of Biochemistry*. 1969, 7, 463-470.

- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., Vincenzini, M., Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*. 2002, 44, 374-378.
- Hayakawa K., Kimura M., Kamata K. Mechanism underlying  $\gamma$ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*. 2002, 438, 107-113.
- Hayakawa K., Kimura M., Kasaha K., Matsumoto K., Sansawa H., Yamori Y. Effect of a  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition*. 2004, 92, 411-417.
- Halász A., Baráth Á., Holzapfel W.H. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *European Food Research and Technology*, 1999, 208, 434-438. [a]
- Halász A., Baráth Á., Holzapfel W. H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *European Food Research and Technology*. 1999, 208, 418-423.
- Hernández-Borges J., Fanali S. Analysis of biogenic amines in wine. <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=rmorjDsHqnOxmOIIecCxBA&subNav=yfiqpHsHqnOxmOIIecCxBAG>.
- Hungerford J.M. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*. 2010, 56, 231-243.
- Hurtado A., Reguant C., Bordons A., Rozès N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*. 2012, 31, 1-8.
- ICH Topic Q2 (R1) (1995) Validation of analytical procedures: Text and methodology. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf).
- Innocente N., Biasutti M., Padovese M., Moret S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*, 2007, 101, 1285-1289.
- Inoue K., Shirai T., Ochiai H., Kasao M., Hayakawa K., Kimura M., Sansawa H. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2003, 57, 490-495.
- IOC. (2012) On line reference included in World table olives figures: production. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>.
- Jia S., Kang Y.P., Park J.H., Lee J., Kwon S.W. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218, 9174-9182
- Karovičová J., Kohajdová Z. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, 59, 70-79.

- Kelly M.T., Blaise A., Larroque M. Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 7385-7392.
- Krause I., Bockhardt A., Neckermann H., Henle T., Klostermeyer H. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal Chromatographia A*. 1995, 715, 67-79.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, 2008, 228, 367-381.
- Kutlán D., Molnár-Perl I. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar. *Journal Chromatography A*. 2003, 987, 311-322.
- Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Alvarez M.A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 2010, 6, 145-156 [a].
- Ladero V., Martínez N., Cruz Martín M., Fernández M., Alvarez M. A. qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, 2010, 43, 289-295 [b].
- Landete J.M., Ferrer S., Pardo I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, 18, 1569-1574.
- Lanza B. Abnormal fermentations in table olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Frontiers in Microbiology*. 2013, 4, 91.
- Lanza B., Corsetti A. Olive da mensa, in L'ulivo e l'olio, AA.VV., Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, 2009, 636-655.
- Lass A., Suessenbacher A., Wölkart G., Mayer B. and Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Molecular Pharmacology*. 2002, 61, 1081-1088.
- Lehane L., Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 58, 1-37.
- Lehtonen P. Determination of amines and amino acids in wine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1996 47:127-133.
- Lonvaud-Funel A., Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 9-13.
- Maijala R., Eerola S., Hill P., Nurmi E. The influence of some starter cultures and GDL on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Agricultural Science in Finland*. 1993, 2, 403-412.
- Maintz L., Novak N. Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, 85, 1185-1196.

- Martínez-Pinilla O., Guadalupe Z., Hernández Z., Ayestarán B. Amino acids and biogenic amines in red varietal wines: The role of grape variety, malolactic fermentation and vintage. *European Food Research and Technology*. 2013, 237, 887-895.
- Masters P.M., Friedman M. Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27, 507-511.
- Mazzucco E., Gosetti F., Bobba M., Marengo E., Robotti E., Gennaro M.C. High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58, 127-134.
- Molnár-Perl I. Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents. *Journal Chromatographia B*. 2011, 879, 1241-1269.
- Önal A., A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, 103, 1475-1486.
- Piga A., Agabbio M., Giannettini J., Budroni M., Farris G. A. Interventi tecnologici per la valorizzazione delle olive da tavola della varietà «Manna». *Environnement et identité en mediterranees*. 2000.
- Pineda A., Carrasco J., Peña-Farfal C., Henríquez-Aedo K., Aranda M. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. *Food Control*. 2012, 23, 251-257.
- Pretorius I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 2000, 16, 675-729.
- Rebane R., Oldekop M.-L., Herodes K. Comparison of amino acid derivatization reagents for LC-ESI-MS analysis. Introducing a novel phosphazene-based derivatization reagent. *Journal Chromatographia B*. 2012, 904, 99-106.
- Sanchez A.H., Rejano L., Montano A., de Castro A. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 67, 115-122.
- Sardegna Agricoltura - Regione Autonoma Sardegna. DOC - Denominazione di Origine Controllata. <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&c=3684&s=67750&v=2>
- Shukla S., Park H.K., Kim J.K., Kim M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*. 2010, 48, 1191-1195.
- Silla Santos M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, 213-231.
- Smit A.Y., du Toit W.J. du Toit M, Biogenic amines in wine: Understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2008, 29, 109-127.

- Spano G., Russo P., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Alexandre H., Grandvalet C., Coton E., Coton M., Barnavon L., Bach B., Rattray F., Bunte A., Magni C., Ladero V., Alvarez M., Fernández M., Lopez P., De Palencia P.F., Corbi A., Trip H., Lolkema J.S. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010, 64, S95-S100.
- Wöhrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K., Jarisch, R. Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2004, 25, 5, 305-311.
- Wolken W. A. M., Lucas P. M., Lonvaud-Funel A., Lolkema J. S. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*. 2006, 188, 2198-2206.
- Xiao D.S., Jiang L., Che L.L., Lu L. Nitric oxide and iron metabolism in exercised rat with L-arginine supplementation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003, 252, 65-72.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Tossicologia dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2011/2013 ciclo XXVI, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013- Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".