

RIVISTA DI VITICOLTURA E DI ENOLOGIA

Trimestrale Scientifico a cura dell'Istituto
Sperimentale per la Viticoltura e
dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia

Direzione scientifica

A. Calò
M. Ubigli

Comitato scientifico

A. Amati
M. Bertuccioli
R. Bessis
M. Borgo
A. Carbonneau
M. Castino
A. Costacurta
V. Cotea
C. Delfini
M. Feuillat
M. Fregoni
A. Gandini
A. Garcia De Lujan
F. Iacono
C. Intrieri
C. Lorenzoni
F. Mattivi
C.P. Meredith
C. Miconi
E. Refatti
K. Schaller
A. Scienza
G. Versini
C. Zambonelli

Direzione Editoriale

G. Cappelleri

Direzione e Amministrazione
Via XXVIII Aprile, 26
31015 CONEGLIANO (TV)
Redazione: F. Giacomazzi
Tel. 0438.456711 - Fax 0438.64779

Misura dell'azoto prontamente assimilabile dal lievito nei mosti d'uva ed esempi di applicazione

Measurement of promptly assimilable nitrogen by yeast in grape juices and application examples

G. Nicolini¹, G. Versini¹, L. Corradin², R. Larcher¹, C. Beretta³, A. Olivari³, E. Eccli⁴

¹Dip. Laboratorio Analisi e Ricerca, Istituto Agrario, v. Mach, 1, 38010 S. Michele all'Adige (TN) - Italia

²Univ. degli Studi di Padova, Fac. di Farmacia, CTF, v. Marzolo 5, 35131 Padova - Italia

³Univ. degli Studi di Milano, Fac. di Agraria, DISTAM, v. Celoria 20, 20133 Milano - Italia

⁴Corso di Studi Superiori in Viticoltura e Enologia, v. Mach, 1, 38010 S. Michele all'Adige (TN) - Italia (ricevuto il 15.01.04, accettato il 20.02.04)

Riassunto

Il metodo internazionale di misura dell'azoto amminico libero dopo reazione con ninidrina proposto dall'American Society of Brewing Chemists è stato modificato per adattarlo ai mosti d'uva. Dopo le modifiche, anche l'ammonio arriva ad essere totalmente misurato, permettendo una più accurata stima dell'azoto prontamente assimilabile dai lieviti (PAN) sia rispetto al metodo originario che a quello del formolo. Di quest'ultimo, il metodo modificato è inoltre più salubre. Testato nel range di concentrazione tipico dei mosti d'uva italiani e su diverse varietà, il metodo fornisce risultati ben correlati con quelli ricavati dai contenuti di ammonio e dei singoli aminoacidi.

Il metodo è stato applicato a uve Mueller-Thurgau di uno stesso appezzamento nel corso della maturazione. L'azoto assimilabile tende leggermente a diminuire con questa, e la sua variabilità all'interno del vigneto è risultata maggiore di quella degli zuccheri e dell'acidità totale. La misura del PAN realizzata con un qualche giorno di anticipo rispetto alla raccolta effettiva, consente sia di programmare eventuali interventi enologici sia di valutare lo stato di nutrizione azotata dei vigneti. In condizioni di laboratorio mimanti la vinificazione in rosso, le vinacce apportano un ulteriore 20 % ca. di PAN rispetto a quello misurabile sul mosto ottenuto per pigiatura e pressatura.

Summary

The international method of the American Society of Brewing Chemists for the measurement of free amino nitrogen in wort by reaction with ninhydrin was modified to improve its performances in grape juice, mostly in respect to ammonium. The modified method allows to estimate the promptly assimilable nitrogen (PAN) by yeasts better than the original method and the formol method. Besides, it is more healthy for analysts than the latter. Accuracy was checked in real juices by comparison with the values of assimilable nitrogen derived from

the analysis of ammonium and each amino acid. Samples in the typical range for the Italian grape juices and from different varieties were used for it. The method was applied to analyse PAN during the ripening of Mueller-Thurgau grapes of a vineyard. PAN decreases slightly with ripening, and its variability inside the vineyard is higher than that of total acidity and reducing sugars. PAN can be measured few days before harvest, so that specific winemaking practices can be eventually planned, and the nutritional status of the vineyard is checked at the same time. Skin contact - carried out under laboratory conditions miming maceration for red wine production in absence of yeasts - gives 20 % of extra PAN.

Parole chiave: azoto assimilabile, uva, mosto, macerazione, maturazione.

Key words: assimilable nitrogen, grape, juice, maceration, ripening.

Introduzione

Il significato della conoscenza del contenuto di azoto prontamente assimilabile (PAN) dai lieviti nei mosti d'uva sta principalmente nel ruolo che le fonti di nutrizione azotata esercitano sul processo fermentativo. Sono ben note, infatti, non solo le relazioni che intercorrono con la produzione di biomassa di lievito e la velocità ed il completamento della fermentazione [Bisson, 1991; Boulton et al. 1995; Ribéreau-Gayon et al., 2003], ma anche quelle con la quantità e la tipologia dei composti volatili prodotti dal lievito stesso. A tale riguardo, la bibliografia è ormai piuttosto consistente [Äyräpää, 1971; Vos e Gray 1979; Ough e Bell, 1980; Houtman e Du Plessis, 1981; Ough e Lee, 1981; Monk 1982; Tromp 1984; Margheri et al., 1984; Rapp e Versini, 1991; Seeber et al., 1991; Henschke e Jiranek 1991; Versini et al., 1992; Nicolini et al., 1996; Bosso, 1996; Jiranek, 1999; Nicolini et al., 2000, 2002].

La conoscenza del contenuto di PAN nelle uve può fornire anche una indicazione circa lo stato nutrizionale del vigneto [van Leeuwen et al., 2000]. In tal caso va però tenuto in conto che - quale che sia la modalità analitica seguita per la determinazione - la misura dell'azoto assimilabile non include, se non marginalmente, la prolina; inoltre, va ricordato che il peso della prolina nel profilo aminoacidico è legato alla varietà ed all'epoca di maturazione [Kliewer, 1970; Cantagrel et al., 1982; Millery et al., 1986; Nicolini et al., 1995, 2001a; Huang e Ough, 1991; Spayd e Andersen-Bagge, 1996]. Naturalmente, rispetto a necessità più specificatamente agronomiche, esistono anche modalità di quantificazione dello stato nutrizionale azotato del vigneto più mirate e consolidate nella loro applicazione, quali ad esempio la misurazione dell'azoto totale della lamina fogliare o del picciolo [Porro et al., 1996; van Leeuwen et al., 2000], e anche stime approssimate ma più "veloci" nella loro applicabilità alle indagini in pieno campo [Porro et al., 2001a, 2001b].

Differenti approcci chimico-analitici possono essere utilizzati per arrivare ad una stima [Ough e Amerine, 1988] dell'azoto assimilabile come somma dell'azo-

to alfa-aminico libero e dell'ammonio. Tra questi, quelli che sfruttano le reazioni con:

il formolo [Becchetti, 1988] come modifica del metodo ufficiale utilizzato per le conserve vegetali [Fédération Internationale des Producteurs de Jus de Fruits, 1965, 1987], oppure

la ninidrina [Hebbard et al., 1993], oppure

l'acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico [Satake et al., 1960, in Ough, 1988; Lie, 1972a,b, in Ough, 1988; Crowell et al., 1985; Ough et Amerine, 1988], oppure l'o-ftaldialdeide/N-acetil-L-cisteina (OPA/NAC), [Dukes e Butzke, 1998].

Con ben diversi costi e con dotazioni analitiche per lo più fuori dalla portata dei più comuni laboratori di cantina, la quantità di azoto assimilabile può essere ricavata anche dalla misura dei singoli aminoacidi e dell'ammonio, considerando - ai fini di un'eventuale comparazione con i metodi sopra citati - un solo N per aminoacido ed escludendo dal computo prolina ed idrossiprolina. Si possono citare a riguardo, ed a puro titolo di esempio, le applicazioni in Cromatografia Liquida (HPLC) con detector a fluorescenza [Sanders e Ough, 1985] e la Cromatografia ionica con la ninidrina come agente colorante [Margheri et al., 1982; Nicolini et al., 2001a].

Recentemente [Nicolini et al., 1997; Nicolini e Corradin, 1998], per la misura dell'azoto prontamente assimilabile è stata adattata al settore enologico la metodica internazionale per l'azoto amminico libero proposta dall'American Society of Brewing Chemists (ASBC) [1992]. Il metodo americano è stato ritenuto un buon punto di partenza, in particolare perché evita l'uso del formolo, minimizzando così i problemi di tossicità per l'analista ed i costi in dotazioni di laboratorio, ad es. cappe. La metodica adattata è stata poi applicata alla quantificazione del contenuto in azoto assimilabile nei mosti di diverse regioni italiane, verificando anche l'esistenza di un "effetto varietà" ed "annata" [Nicolini et al., 2004].

In questa sede si intende riportare in dettaglio la metodica analitica, nonché studi sull'evoluzione dell'azoto assimilabile durante la maturazione di uve Mueller-Thurgau e sulle cessioni dalle vinacce nel corso della fermentazione.

Materiali

Sono stati realizzati due piani sperimentali denominati rispettivamente "maturazione" e "macerazione".

Nel primo, in un vigneto di Mueller-Thurgau non clonale ed abbastanza disomogeneo per condizioni geo-pedologiche, si è valutata l'evoluzione dell'azoto prontamente assimilabile (PAN) in relazione all'epoca di raccolta (30 agosto; 6, 15, 20 e 27 settembre). Si è operato sulla base di 12 campioni, ciascuno di 70 grappoli corrispondenti a ca. 12 kg, per ciascun momento di campionamento. I mosti sono stati ottenuti per pigiadiraspatura e doppio ciclo di pressatura (3.5

bar; Spiedel Press, Germany), quindi immediatamente solfitati (50 mg/L) ed analizzati per i parametri di routine. Un'aliquota è stata centrifugata (4500 RPM x 10 min) ed il surnatante congelato (-28°C) fino al momento dell'analisi.

Sono stati invece trattati secondo il piano sperimentale "macerazione" 24 lotti di uve delle varietà Cabernet sauvignon (n = 4), Merlot (n = 5), Schiava (n = 5), Teroldego (n = 5), Marzemino (n = 3) e Lagrein (n = 2). Da ciascuno di essi sono stati ottenuti campioni con la seguente procedura: 300 acini interi sono stati divisi in 3 frazioni, pesate, da 100 bacche. Le frazioni sono state denominate rispettivamente: "totale", "mosto" e "macerato". La frazione "totale" è stata macinata con un frullatore da cucina e 100 mL di frullato sono stati aggiunti di 1 mL di una soluzione (soluz. A) di 2g/100 mL di N_3Na e 2g di metabisolfito di potassio. La frazione "mosto" è stata pigiata manualmente, poi pressata meccanicamente (2.5 bar; pressa mod. Para Press, Paul Arauner G.m.b.H., Kitzingen/Main, Germany); si è quindi misurato il volume del mosto ottenuto e si è aggiunto 1 mL/100 mL di soluz. A. La frazione "macerato" è stata pigiata e pressata come per la frazione "mosto", quindi il pannello di pressatura è stato manualmente sgretolato e riaggiunto alla frazione di mosto. Si è misurato il volume ed è stata effettuata l'aggiunta della soluz. A. Inoltre, si è aggiunta una soluzione di enzima pectolitico (in dose analoga a quella di utilizzo industriale, 1 g/hL). Giornalmente la frazione "macerato" è stata gentilmente mescolata e capovolta. Al 2°, 4°, 6° e 8° giorno dall'ammostatura è stato aggiunto alcool etilico a 96 % vol. Tali aggiunte e movimentazioni sono state effettuate al fine di mimare, per quanto possibile, il processo di vinificazione in rosso sia in termini di rimontaggi che per quanto riguarda lo sviluppo di alcool e l'attività enzimatica a carico delle pectine propria dei lieviti o aggiunta. Nel calcolo dei valori di PAN si è poi tenuto conto delle diverse diluizioni effettuate. La misurazione del PAN è stata effettuata per tutti i campioni alla fine dell'esperimento, dopo 12 giorni dall'ammostatura.

Metodi

La misura dell'azoto prontamente assimilabile (PAN) è stata realizzata secondo la seguente metodica, riportata in dettaglio con commenti e precisazioni utili per una sua facilitata applicazione. Lo schema generale della metodica è riportato in Fig. 1.

Reagenti:

a) *Tampone acetato 4N pH 5.50 (quantità per 1 L)*

- Sodio acetato triidrato: 544 g (in alternativa sodio acetato anidro: 328 g)
- Acido acetico glaciale: c.a 100 mL
- Acqua deionizzata

Preparare un matraccio da 1 L con 500 mL di acqua deionizzata, pesa-

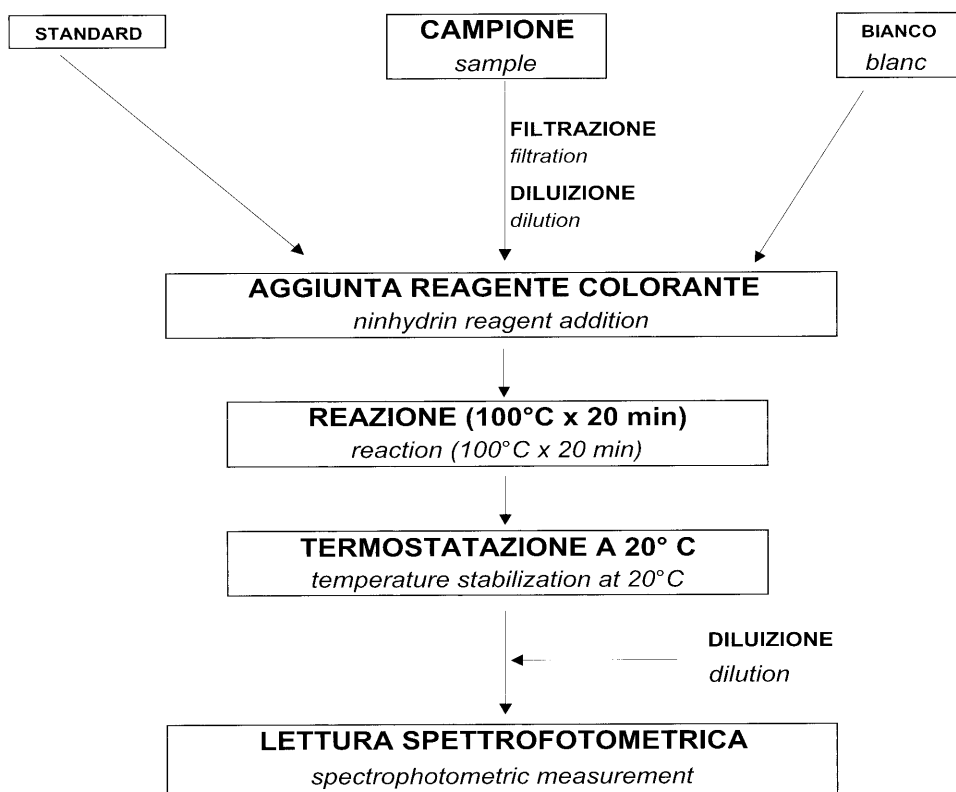


Fig. 1: Schema della metodica analitica
 Fig. 1: Scheme of the method.

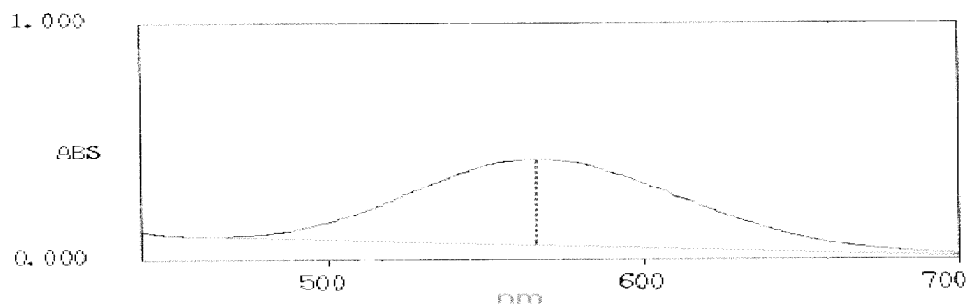


Fig. 2: Esempio di calcolo della assorbanza "corretta" (linea tratteggiata).
 Fig. 2: Example of computation of the absorbance (dashed line).

re su bilancia tecnica il sodio acetato trasferendolo nel matraccio gradualmente e favorendone la dissoluzione con un agitatore magnetico. Aggiungere 100 mL di acido acetico glaciale, prelevati con un cilindro graduato. A completa dissoluzione, eventualmente favorita con l'immersione in un bagno ad ultrasuoni, termostatare la soluzione a 20 °C e successivamente, misurando con un pHmetro, aggiungere acido acetico glaciale fino a pH 5.50. Portare infine ad 1 L con acqua deionizzata. Data l'elevata viscosità, allo scopo di eliminare impurità solide eventualmente presenti, filtrare il tampone sotto vuoto con membrane da 0.8 µm, cambiandole indicativamente ogni 300 mL di filtrato. Controllare in modo accurato il pH, in quanto influenza velocità di reazione ed intensità della colorazione. Non conservare a bassa temperatura.

b) Reagente colorante (quantità per 100 mL)

- Tampone acetato 4N, pH 5.50: 100 mL
- Ninidrina: 1 g (nocivo-irritante; R: 22-36/37/38)
- Fruttosio: 0.3 g

Al fine di impedire l'ossidazione della ninidrina e per garantire la sua completa solubilizzazione è consigliato l'uso di una bottiglietta scura (100 mL di capienza) sia per la preparazione che per lo stoccaggio. Si trasferisce il fruttosio nella bottiglietta, dopo di che si aggiungono nell'ordine la ninidrina, il tampone acetato (100 mL misurati con un cilindro graduato) ed un'ancoretta. Si favorisce la dissoluzione mediante un agitatore magnetico, lasciando gorgogliare dell'azoto nella bottiglietta tramite un tubicino, al fine di creare un ambiente riducente così da impedire l'ossidazione della ninidrina. È imperativa la copertura della bottiglietta con una pellicola d'alluminio. Si consiglia di preparare settimanalmente il reagente colorante che NON va conservato in frigorifero.

c) Soluzione di diluizione (quantità per 1 L)

- Acqua deionizzata: 600 mL.
- Alcool etilico 96%: 400 mL.
- Potassio iodato: 2g.

Prelevare con un cilindro graduato l'acqua deionizzata, aggiungere potassio iodato e a completa dissoluzione miscelare con alcool etilico 96 %. Introdurre in un recipiente al quale si possa applicare un dispensatore automatico da 10 mL.

d) Standard madre di treonina (quantità per 100 mL)

Pesare su bilancia analitica 170.1 mg di treonina; dopo completa dissoluzione portare a 100 mL con acqua deionizzata. La concentrazione espressa come azoto assimilabile è pari a 200 mg/L. Lo standard può essere conservato in congelatore.

e) Standard diluito di treonina

Diluire 1:150 lo standard madre con acqua deionizzata e conservare in frigorifero, preparandolo ogni 2-3 giorni.

Materiali

Spettrofotometro doppio-raggio, bagno ad acqua a 100°C, agitatore magnetico ed ancorette, bilancia analitica, bilancia tecnica, pH-metro, attrezzatura per filtrazione sottovuoto, dosatore automatico da 10 mL, provette con capacità minima di 16 mL con tappo a vite, vetreria comune di laboratorio, bottigliette scure da 100 mL e da 1 L, pellicola di alluminio, eventuale bagno ad ultrasuoni.

Preparazione del campione

Illimpidire il campione mediante filtrazione su carta o centrifugazione, diluire con acqua deionizzata fino ad ottenere nel campione in analisi una concentrazione di azoto assimilabile fra 0.5 e 1.5 mg/L di N (indicativamente da 100 a 300 diluizioni).

Procedimento

Prelevare 4 mL di campione diluito, depositarlo in una provetta di capacità minima di 16 mL dotata di tappo ed aggiungere 2 mL di reagente colorante. Il bianco è ottenuto sostituendo al campione diluito lo stesso volume di acqua deionizzata. Lo standard di riferimento è costituito da 4 mL di standard diluito di treonina addizionato di 2 mL di reattivo colorante.

Inserire le provette nel bagno d'acqua in costante ebollizione, lasciare reagire per 20 min, quindi termostatare a temperatura ambiente (bagno termostato a 20 °C) per un tempo compreso tra i 5 ed i 20 min in funzione dell'organizzazione del lavoro. Aggiungere 10 mL di soluzione di diluizione, mescolare energicamente. Filtrare con filtri a siringa da 0.45 micron, introdurre in cuvette da 1 cm in plastica, registrare lo spettro di assorbimento contro il bianco da 700 a 440 nm, stampare infine lo spettro ottenuto con la massima espansione di scala. La registrazione spettrofotometrica va effettuata tra i 10 ed i 20 min dal momento dell'aggiunta della soluzione di diluizione idroalcolica. Il rispetto accurato dei tempi è fondamentale.

Calcolo

Determinazione dell'assorbanza corretta

Si ricava graficamente dallo spettro stampato del campione. Tracciare la perpendicolare all'asse delle lunghezze d'onda in corrispondenza del max. a 565 nm. Misurare la distanza fra il punto di massimo e l'intersezione con la tangente ai minimi dello spettro, approssimativamente presenti attorno a 470 e 700 nm (Fig. 2) e riportare la lunghezza misurata ad un fondo scala di 1 (assorbanza "corretta").

Computo dell'azoto prontamente assimilabile (PAN)

Infine riportare il valore dell'assorbanza "corretta" del campione a quello dell'assorbanza "corretta" dello standard diluito di treonina, moltiplicare per la concentrazione dello standard diluito di treonina in mg/L di N e per la diluizione del campione:

$PAN (mg/L) = (Abs. \text{ "corretta" camp.} / Abs. \text{ "corretta" Std diluito}) * conc. Std diluito * N^{\circ} \text{ diluizioni camp.}$

Normali ritmi di lavoro consentono, ad un singolo operatore, di effettuare giornalmente 30 - 40 analisi, suddivise in più serie per consentire il rispetto dei tempi di analisi previsti.

Esempio di calcolo

Diluizione dello Standard:	1:150
Diluizione del Campione:	1:200
Densità ottica impostata come fondo scala sulla stampante per lo Standard diluito:	0.350
Densità ottica impostata come fondo scala sulla stampante per il Campione:	0.300
Lunghezza segmento Standard diluito:	4.1 cm*
Lunghezza segmento Campione:	3.5 cm*
Lunghezza dell'asse Y dello spettro misurata sulla stampa:	6.0 cm

*determinate graficamente misurando la lunghezza del segmento perpendicolare all'asse delle lunghezze d'onda tra il punto di massimo del picco e l'intersezione con la tangente ai minimi dello spettro (si veda la figura riportata).

a) Calcolo dell'assorbanza "corretta", riportata ad un fondo scala di 1:

$(Lunghezza \text{ segmento in cm}) * (assorbanza \text{ impostata come fondo scala} / lunghezza \text{ in cm dell'asse Y dello spettro misurata dopo stampa})$

$(4.1) * (0.350 / 6.0) = 0.239 \rightarrow$ Assorbanza "corretta" dello standard diluito

$(3.5) * (0.300 / 6.0) = 0.175 \rightarrow$ Assorbanza "corretta" del campione

b) Calcolo della concentrazione in PAN (mg/L N) del campione:

$(Abs. \text{ corretta Camp.} / Abs. \text{ corretta Std. dil.}) * (conc. Std. Madre / n^{\circ} \text{ dil. standard}) * n^{\circ} \text{ dil. Camp}$

$(0.175 / 0.239) * (200 / 150) * 200 = 195 \text{ mg/L N}$

Elaborazioni statistiche e grafiche.

Sono state realizzate con le procedure del pacchetto software STATISTICA™ per Windows, v. 5.1, 1997 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Risultati e discussione

Come evidenziato anche da Ough e Amerine [1988], una determinazione che porti alla valutazione dell'azoto assimilabile dai lieviti attraverso la misura dell'azoto alfa-amminico libero e dell'ammonio è sostanzialmente una stima approssimata. Partendo da tale convincimento, si è scelto di verificare la metodica analitica proposta rispetto ad un metodo di riferimento validato che consentisse di quantificare singolarmente i composti azotati prontamente assimilabili dai lieviti [Nicolini et al., 2001a] e di operare per quanto possibile su matrici costituite da mosti reali.

Da numerose verifiche (ripetibilità, forza del tampone, risposta colorimetrica dei diversi aminoacidi e dell'ammonio alla ninidrina, effetto della concentrazione di ninidrina, confronto tra soluzioni di diluizione ...) [Corradin, 1996], era stato osservato che la metodica originaria di misura dell'azoto amminico libero proposta dall'ASBC per il settore birrario, quando applicata ai mosti d'uva, non consentiva una adeguata risposta colorimetrica dell'ammonio alla ninidrina in relazione allo standard di riferimento (glicina). Principalmente da qui discendeva la perdita di accuratezza nell'applicazione diretta del metodo ASBC.

I principali adattamenti della metodica originaria necessari per renderla funzionale all'analisi dei mosti, suggeriti da verifiche sperimentali e dal raffronto con le condizioni di metodi utilizzando la ninidrina [Moore e Stein, 1948, 1954], hanno riguardato: (a) le caratteristiche compositive della soluzione tamponata contenente il reagente colorante e della soluzione idroalcolica di diluizione; (b) la definizione dei tempi di reazione, stabilizzazione e misurazione spettrofotometrica; (c) la scelta della treonina come standard di riferimento; (d) la definizione dell'intervallo di concentrazione ottimale (0.5 - 1.5 mg N/L) cui ricondurre il campione con opportune diluizioni; (e) la modalità di computo dell'assorbanza per via grafica, al fine di eliminare significativi effetti matrice.

La ripetibilità dell'intero metodo, inclusa la preparazione dei reagenti ed espressa come RSD %, è del 2.1 %, misurata realizzando 25 determinazioni dello stesso mosto nell'arco di 5 mesi. Il metodo proposto è stato messo a confronto con il metodo ASBC originario e con quello del numero di formolo [Becchetti, 1988], previa moltiplicazione, in quest'ultimo caso, per il peso molecolare dell'azoto. Il confronto è stato eseguito sulla base di 55 mosti naturali di Chardonnay e Mueller-Thurgau, varietà scelte per coprire l'intero range di concentrazione dell'azoto assimilabile solitamente presente nei mosti d'uva oltre che per la diversa composizione del profilo aminoacidico e per il diverso rapporto prolina/arginina [Nicolini et al., 2001b]. I coefficienti angolari delle rette di regressione lineare dei 3 metodi e le intercette con l'asse Y indicano (Fig. 3) come il metodo modificato, caratterizzato da coefficiente angolare prossimo all'unità e limitato valore dell'intercetta, risulti più accurato e con un R^2 leggermente superiore. Sia il metodo del formolo che quello originario ASBC hanno infatti intercette con l'asse Y piuttosto elevate che, a concentrazione azotata nulla misurata per cromatografia ionica, indicherebbero la presenza di diverse decine di mg/L di azoto assimilabile costituito in realtà da interferenze di matri-

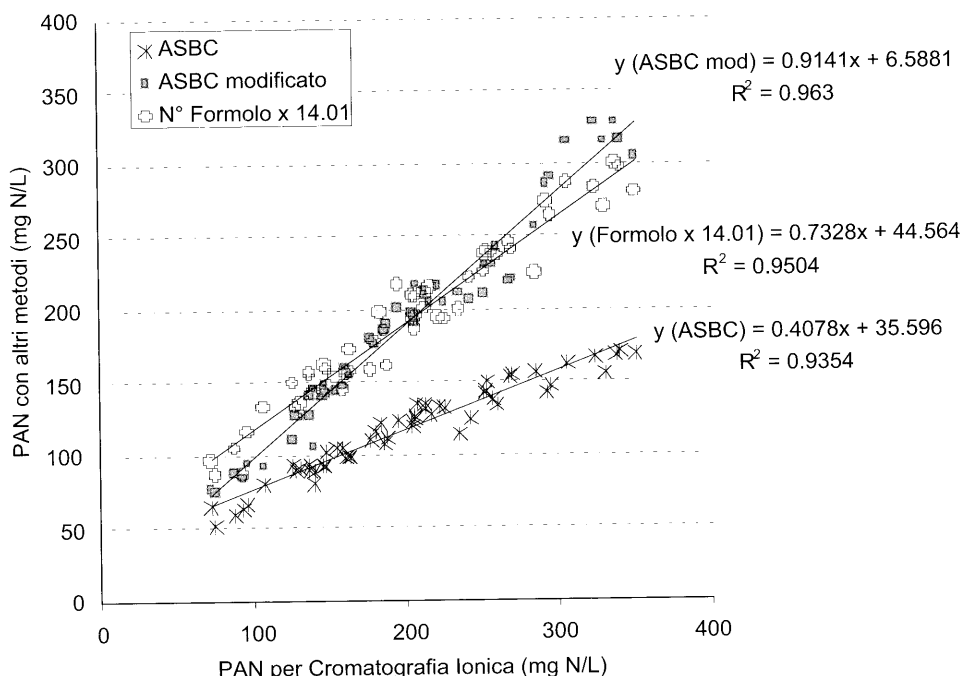


Fig. 3: Rette di regressione dei contenuti di PAN acquisiti con le diverse metodiche rispetto al metodo di riferimento in cromatografia ionica.

Fig. 3: Regression lines of the contents of promptly assimilable nitrogen (PAN) measured by the different methods (Y axis), in comparison with the reference method (Ionic Chromatography, X axis).

ce. Tale quantità di interferenze è dell'ordine dell'azoto assimilabile realmente presente nel 6 % dei ca. 600 campioni di mosti nazionali analizzati in una recente indagine e costituirebbe ca. la metà dei valori delle mediane di popolazione per varietà quali Merlot, Marzemino e Schiava coltivate in Trentino [Nicolini et al., 2004].

Si è anche osservato come le pendenze delle rette di regressione e le intercette risultino essere molto simili nei diversi mosti varietali (Tab. 1). Questo principalmente in conseguenza delle risposte colorimetriche alla ninidrina dei diversi aminoacidi e dell'ammonio - piuttosto simili e comunque bilanciate tra i diversi aminoacidi, indipendentemente dalla loro natura acida, basica o neutra - e rispetto alla treonina, aminoacido scelto come standard di riferimento. Infatti, soluzioni (2 mg/L di N) di glicina, aspartico, leucina, arginina, serina, glutammmina, glutammico ed alanina danno valori di assorbanza, espressi come percentuale rispetto quelli forniti da analoghe soluzioni di treonina, variabili tra il 92 % (aspartico) ed il 104 % (glutammina). Per l'ammonio, in analoghe condizioni, tale fattore di risposta è stato del 96 %.

Si è accertato inoltre che non è necessario procedere né a trattamenti deproteinizzanti dei mosti con acido solfosalicilico, né a trattamenti di riduzione del

Varietà / variety	N°	m	q	R ²
Cabernet s.	5	1.03	3.5	0.99
Chardonnay	47	0.93	7.9	0.92
Lagrein	6	0.97	2.5	0.99
Marzemino	7	0.98	-5.8	0.99
Merlot	8	0.94	-0.7	0.95
Mueller-Thurgau	19	1.01	-6.9	0.97
Nosiola	10	1.17	3.5	0.97
Teroldego	6	0.99	-2.0	0.96

Tab. 1: Parametri delle rette di regressione per varietà ($Y = mX + q$; Y: PAN, mg/L, col metodo proposto; X = PAN con il metodo di riferimento).

Tab. 1: Parameters of the regression lines per variety ($Y = mX + q$; Y: content of PAN with the modified method, mg/L; X = PAN with the reference method).

Data di campionamento Sampling date	PAN (mg/L)			PAN-NH ₃ (mg/L)			PAN-aa (mg/L)			Zuccheri Sugars (g/L)			Acidità totale Total acidity (g/L)		
	Media mean (n=12)	sign.	RSD %	Media mean (n=12)	sign.	RSD %	Media mean (n=12)	sign.	RSD %	Media mean (n=12)	sign.	RSD %	Media mean (n=12)	sign.	RSD %
30/08	75.8	a	17.6	34.8	a	23.9	41.0	b	13.9	132.0	d	2.9	10.5	a	4.1
06/09	68.3	ab	24.4	25.3	b	37.2	42.9	ab	17.6	147.6	c	4.7	8.94	b	5.0
15/09	72.4	ab	24.4	23.8	bc	38.4	48.7	a	19.0	150.8	bc	5.4	7.06	c	6.3
20/09	66.4	ab	30.9	21.6	bc	48.5	44.9	ab	23.4	156.8	b	7.4	7.20	c	4.0
27/09	60.9	b	30.9	16.6	c	46.3	44.2	ab	26.1	177.7	a	5.6	6.50	d	6.2

Tab. 2: Evoluzione della composizione di base, dell'azoto assimilabile (PAN) e delle sue forme di derivazione ammoniacale (PAN-NH₃) ed aminoacidica (PAN-aa) nel corso della maturazione di uve Mueller-Thurgau in uno stesso appezzamento.

Tab. 2: Changes of the basic composition, promptly assimilable nitrogen (PAN), and ammonium- and amino acid-derived PAN (PAN-NH₃ and PAN-aa, respectively) during ripening of Mueller-Thurgau grapes in a vineyard.

contenuto polifenolico ed antocianico, ad esempio con cartucce Sep-Pack C18, prima delle analisi.

Esperimento "maturazione"

L'evoluzione dell'azoto prontamente assimilabile (PAN), di quello sotto forma ammoniacale (PAN-NH₃; misurato per via enzimatica) e di quello sotto forma aminoacidica (PAN-aa; ottenuto per differenza) è riportata in Tab. 2, congiuntamente all'evoluzione degli zuccheri e dell'acidità totale. Si osserva la diminuzione dei valori medi di PAN, dovuta al marcato calo dell'azoto sotto forma ammoniacale ed evidentemente non compensato, se non marginalmente, dall'incremento di quello in forma aminoacidica non immagazzinato sotto forma di prolina. La variabilità in vigneto dei tenori delle diverse forme azotate (RSD%) è particolarmente elevata, e decisamente maggiore di quella riscontrata per i più comuni parametri analitici di controllo qualitativo delle uve, come osservato anche in altri lavori [Nicolini et al., 2004].

Esperimento "macerazione"

Alla luce dell'ampia variabilità (da 58 a 415 mg/L) riscontrata tra i tenori di PAN delle diverse uve, prima dell'elaborazione statistica i dati sono stati standardizzati per ciascuno dei 24 campioni d'uva, ponendo uguale a 100 il conte-

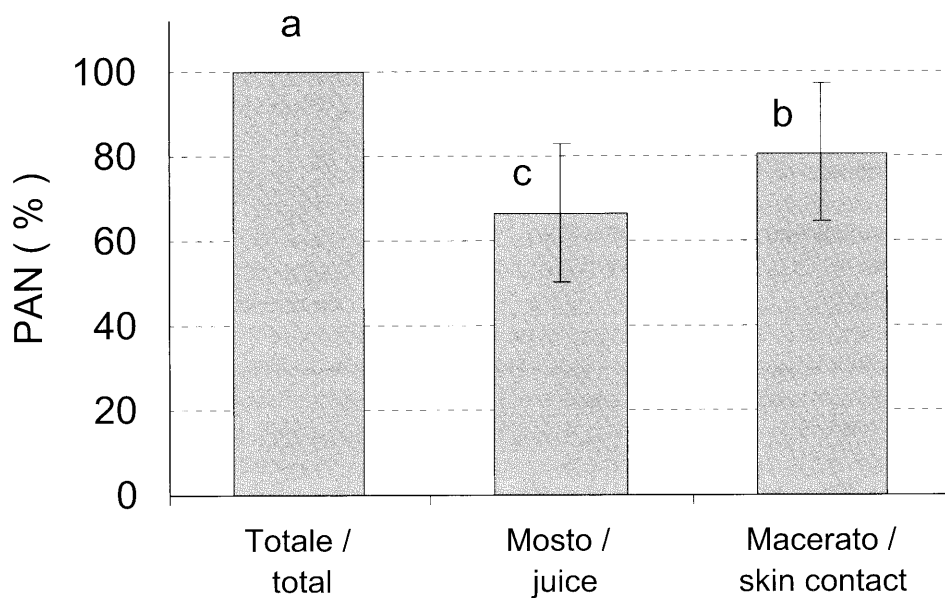


Fig. 4: Contenuto percentuale (media, n=24, \pm dev.st) di PAN nel mosto e dopo macerazione in mosto sterile alcolizzato, addizionato di pectolitici ed antifermentativi, rispetto al testimone (totale) ottenuto per macinatura.

Fig. 4: Percentage content (mean, n=24, \pm st.dev) of PAN in juices, and after 12-day skin contact with addition of anti-fermentive, alcohol, and pectic enzyme, in comparison with the PAN in the total fraction (ground grape).

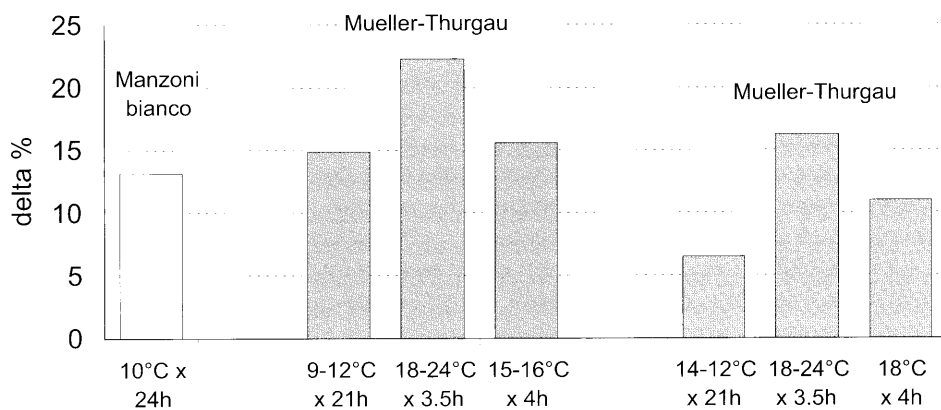


Fig. 5: Incrementi percentuali di PAN dovuti a macerazioni prefermentative rispetto a testimoni non macerati.

Fig. 5: Percentage of increase of the content of PAN due to skin contact prior fermentation compared to non macerated controls.

nuto di PAN della frazione "totale" ed esprimendo le frazioni "mosto" e "macerato" in percentuale rispetto ad esso. In Fig. 4 sono riportate le differenze riscontrate. La frazione "mosto" contiene mediamente solo il 67 % dell'azoto prontamente assimilabile presente nella frazione "totale". La "macerazione" mimante la vinificazione in rosso determina un incremento medio del 21% rispetto alla frazione "mosto". Considerando che sono stati misurati incrementi percentuali di PAN fino al 22 % ca. (Fig. 5) già dopo macerazioni prefermentative relativamente brevi (< 24 h) di uve bianche, si ritiene che la gran parte del PAN incrementabile con la macerazione si renda disponibile per i lieviti nei primi 2 giorni. Ciò può contribuire a supportare la fermentazione di molte uve rosse spesso poco dotate di PAN, poiché tale liberazione azotata avviene in un momento in cui il lievito è sicuramente ancora in grado di assimilare ammonio ed aminoacidi.

Conclusioni

Il metodo proposto per la misura dell'azoto prontamente assimilabile dai lieviti nei mosti risolve il problema di salubrità legato all'uso del formolo e rende non più necessario il lavorare sotto cappa. Inoltre, è risultato ben correlato, in tutto il range di concentrazione tipico dei mosti d'uva italiani e nelle diverse varietà, con i valori ricavabili dai contenuti di ammonio e dei singoli aminoacidi ottenuti con un metodo di riferimento validato quale quello per cromatografia ionica.

L'azoto assimilabile misurato su uve Mueller-Thurgau di uno stesso appezzamento nel corso della maturazione tende leggermente a diminuire con la stessa, e la sua variabilità all'interno del vigneto è maggiore di quella degli zuccheri e dell'acidità totale. Da ciò deriva la necessità di pianificare opportunamente i campionamenti. In considerazione della diminuzione non particolarmente rapida dell'azoto assimilabile in prossimità della raccolta e della numerosità possibile di analisi giornaliere, si evidenzia l'opportunità che la misura di tale parametro possa essere realizzata anche con qualche giorno di anticipo rispetto al momento effettivo di raccolta, consentendo sia di programmare interventi enologici adeguati, se necessari, sia di valutare lo stato di nutrizione azotata dei vigneti per futuri interventi.

Con uno specifico esperimento si è inoltre osservato come la cessione di azoto assimilabile dalle vinacce nel corso di una "simil-vinificazione in rosso" sia nell'ordine del 20 % di quello misurabile nel mosto, percentuale non disprezzabile ma non risolutiva in casi di significative carenze misurate sui mosti rispetto alle esigenze dei lieviti.

Bibliografia

1. A.S.B.C. TECHNICAL AND EDITORIAL COMMITTEES (1992). *Free amino nitrogen, international method, wort-12*. In: *Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists*, 8th revision.

sed edition, 1992.

2. ÄYRÄPÄÄ T. (1971). *Biosynthetic formation of higher alcohols by yeasts. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium.* J. Inst. Brew., (77, 3):266-275.
3. BECCHETTI R. (1988). *Metodi di analisi dei vini.* Gibertini Elettronica, III edizione pp. 162-163.
4. BISSON L.F. (1991). *Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes.* Int. Symp. on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, Washington, USA, 18-19 June 1991, J.M. Rantz ed., ASEV publ., pp. 78-89.
5. BOSSO A. (1996). *Influenza dell'aggiunta di dosi crescenti di azoto ammoniacale ai mosti sulla composizione in sostanze volatili di origine fermentativa e sulle caratteristiche olfattive di alcuni vini bianchi.* Riv. Vitic. Enol., (49, 3):3-28.
6. BOULTON R.B., SINGLETON V.L., BISSON L.F., KUNKEE R.E. (1995). *Principles and practices of winemaking.* Chapman & Hall, NY, USA, pp. 102-192
7. CANTAGREL R., SYMONDS P., CARLES J. (1982). *Composition en acides aminés du moûts en fonction du cépage et de la technologie et son influence sur la qualité du vin.* Sci. Aliment, (2):109-142.
8. CORRADIN L. (1996). *Ottimizzazione e confronto di metodi per la determinazione, in mosti d'uva, dell'azoto assimilabile in fermentazione.* Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, Univ. di Padova, a.a. 1995-1996.
9. CROWL E.A., OUGH C.S., BAKALINSKY A. (1985). *Determination of Alpha Amino Nitrogen in Must and Wines by TNBS Method.* Am. J. Enol. Vitic., (36,2): 175-177.
10. DUKES B.C., BUTZKE C.E. (1998). *Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay.* Am. J. Enol. Vitic., (49, 2):125-134.
11. FEDERATION INTERNATIONALE DES PRODUCTEURS DE JUS DE FRUITS (1965) - *Détermination de l'indice formol.* Analyses F.I.P.J.F. N 30, pp 1-2.
12. HEBBARD S., GOODMAN K., JIN H. (1993). *Chemical analysis of ammonium and amino acids in Chardonnay juices.* Austral. Grapegrower & Winemaker, May: pp.19-21.
13. HENSCHKE P.A., JIRANEK V. (1991). *Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must.* Proc. Int. Symp. on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, Washington, USA, 18-19 June 1991, J.M. Rantz ed., ASEV publ., pp.172-184.
14. HOUTMAN A.C., DU PLESSIS C.S. (1981). *The effect of juice clarity and several conditions promoting yeast growth on fermentation rate: the production of aroma compounds and wine quality.* S. Afr. J. Enol. Vitic., (2):71-81.
15. HUANG Z., OUGH C.S. (1991). *Amino acid profiles of commercial grape juices and wines.* Am. J. Enol. Vitic., (42, 3):261-267.
16. JIRANEK V. (1999). *Investigation of Yeast Nitrogen Metabolism Aimed at Improving Fermentation.* Proc. 12th International Oenological Symposium, 31st May -2nd June 1999, E. Lemperle ed., Le Westin Mont-Royal - Montréal, Canada, pp. 80-96.
17. KLIEWER W.M. (1970). *Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes.* J. Food Sci., (35):17-21.
18. MARGHERI G., GIANOTTI L., MATTAREI C., PELLEGRINI R. (1982). *Evoluzione degli aminoacidi liberi nel corso della elaborazione dei vini spumanti.* Vignevini, (9, 11):19-30.
19. MARGHERI G., VERSINI G., GIANOTTI L., PELLEGRINI R. (1984). *Fattori di qualità dei vini bianchi giovani: influenza dell'azoto assimilabile dei mosti e dei componenti aromatici dei vini.* Riv. Soc. Ital. Scienza dell'Alimentazione, (13, 5): 401-412.
20. MILLERY A., DUTEUTRE B., BOUDAILLE J.P., MAUJEAN A. (1986). *Differenciation des trois cépages champenois a partir de l'analyse des acides aminés libres des moûts des récoltes 1983 et 1984.* - Rev. Franc. Oenol., Cahier Scient., (103):32-50.
21. MONK P.R. (1982). *Effect of nitrogen and vitamin supplements on yeast growth and rate of fermentation of Rhine Riesling grape juice.* Food Technol. Austral., (34, 7): 328-332.
22. MOORE S., STEIN W. H. (1948). *Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of the amino acids.* J. Biol. Chem., (176): 367-388.
23. MOORE S., STEIN W. H. (1954). *A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds.* J. Biol. Chem., (211): 907-913.
24. NICOLINI G., VERSINI G., DALLA SERRA A., SEPPI A., AMADEI E., FALCETTI M. (1995). *Aspetti compositivi di mosti e vini Müller-Thurgau del Trentino.* Riv. Vitic. Enol., (48, 3): 47-61.
25. NICOLINI G., VERSINI G., DALLA SERRA A., SEPPI A., FALCETTI M. (1996). *Peculiarities in the*

- aroma compounds of Müller Thurgau wines from different grape production areas. In "Oenologie 95", Ve Symposium International d'oenologie, Bordeaux, 15-17 Juin 1995, A. Lonvaud-Funel ed., TEC & DOC, Paris, 1996, pp. 539-543.
26. NICOLINI G., VERSINI G., CORRADIN L., GRANDI C. (1997). *Un nuovo metodo valutativo dell'azoto assimilabile nei mosti e nei vini base Trento D.O.C.*. Convegno "Nuove conoscenze nella produzione di Talento Trento D.O.C." S. Michele a/A., 7 nov. 1997.
 27. NICOLINI G., CORRADIN L. (1998). *Il metodo IASMA per la determinazione in mosti d'uva dell'azoto prontamente assimilabile*. Workshop AEI Sez. Trentino, S. Michele all'Adige, 30 gennaio 1998.
 28. NICOLINI G., MOCCHIUTTI R., LARCHER R., MOSER S. (2000). *Lieviti ed aromi dei vini: comparazione tra ceppi commerciali di larga diffusione*. L'Enotecnico, (36, 3):75-85.
 29. NICOLINI G., LARCHER R., RAMPONI M. (2001a). *Free amino acids profile of juices of 12 grape varieties grown in Trentino (Italy)*. Itali. J. Food Sci., (13, 2):189-199.
 30. NICOLINI G., LARCHER R., RAMPONI M. (2001b). *Contenuto di ammonio e profilo aminoacidico di mosti varietali dell'annata 1999*. L'Enologo, (37, 3):79-87.
 31. NICOLINI G., VOLPINI A., MOSER S., CAVAZZA A. (2002). *Caratteristiche fermentative ed aromatiche dei ceppi di lievito La Claire™*. L'Enologo, (38, 10): 65-70.
 32. NICOLINI G., VERSINI G., LARCHER R. (2004). *Status of yeast assimilable nitrogen in Italian grape musts and effect of variety, ripening and vintage*. Vitis - Journal of Grapevine Research (in stampa).
 33. OUGH C.S., BELL A.A. (1980). *Effects of nitrogen fertilization of grapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation*. Am. J. Enol. Vitic., (31):122-123.
 34. OUGH C.S., LEE T.H. (1981). *Effects of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters*. Am. J. Enol. Vitic., (32):125-127.
 35. OUGH C.S. (1988). *Acids and amino acids in grapes and wines*. In: *Wine analysis*, Liskens H.F. & Jackson J.F. eds., Springer-Verlag, Berlin: pp. 92-146.
 36. OUGH C.S., AMERINE M.A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines, 2nd edition*. J. Wiley and Sons, New York, NY: 172-195.
 37. PORRO D., DALPIAZ A., STRINGARI G. (1996). *Valutazione dello stato nutrizionale mediante diagnostica fogliare*. L'Informatore Agrario, (21, 8): 107-115.
 38. PORRO D., CESCHINI A., DORIGATTI C., STEFANINI M. (2001a). *Use of SPAD meter in diagnosis of nutritional status in apple and grapevine*. Acta Horticulturæ, (564): 243-252.
 39. PORRO D., BERTAMINI M., DORIGATTI C., STEFANINI M., CESCHINI A. (2001b). *Lo SPAD nella diagnosi dello stato nutrizionale della vite*. L'Informatore Agrario, (57, 26): 49-55.
 40. RAPP A., VERSINI G. (1991). *Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines*. Int. Symp. on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, Washington, USA, 18-19 June 1991, J.M. Rantz ed., ASEV publ., pp. 156-164.
 41. RIBEREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A. (2003). *Il fabbisogno nutrizionale*. In: Trattato di enologia IK. Microbiologia del vino. Vinificazioni. Edagricole, Bologna, Italia. 2003, pp. 85-90.
 42. SANDERS E., OUGH C.S. (1985). *Determination of free amino acids in wine by HPLC*. Am. J. Enol. Vitic., 36:43-46.
 43. SEEBER R., SFERLAZZO G., LEARDI R., DALLA SERRA A., VERSINI G. (1991). *Multivariate data analysis in classification of musts and wines of the same variety according to vintage year*. J. Agric. Food Chem., (39, 10):1764-1769.
 44. SPAYD S.E., ANDERSEN-BAGGE J. (1996). *Free amino acid composition of grape juice from 12 Vitis vinifera cultivars in Washington*. Am J. Enol. Vitic., (47, 4):389-402.
 45. TROMP A. (1984). *The effect of yeast strain, grape solids, nitrogen and temperature on fermentation rate and wine quality*. S. Afr. J. Enol. Vitic., (5, 1):1-6.
 46. van LEEUWEN C., FRIANT PH., SOYER J.-P., MOLOT CH., CHONE X., DUBOURDIEU D. (2000). *L'intérêt du dosage de l'azote total et de l'azote assimilable dans le mout comme indicateur de la nutrition azotée de la vigne*. J. Int. Sci. Vigne Vin, (34, 2) : 75-82.
 47. VERSINI G., DALLA SERRA A., FALCETTI M., SFERLAZZO G. (1992). *Rôle du clone, du millésime ed de l'epoque de récolte sue le potentiel aromatique du raisin de Chardonnay*. Rev. des Oenologues, (65, 11):19-23.
 48. VOS P.J.A., GRAY R.S. (1979). *The origin and the control of hydrogen sulphide during fermentation of grape must*. Am. J. Enol. Vitic., (30, 3):187-197.