

37° MOSTRA NAZIONALE DEGLI SPUMANTI

GIORNATA DELL'ENOLOGO

Convegno

Le nuove frontiere della malolattica

3 settembre 2000
- Villa dei Cedri -
Valdobbiadene



ZIP *Dirigibile
Consulente* / *Perdennini / la ferment. malolattica*

**Gestione della fermentazione malolattica
nella vinificazione moderna**

Prof. Vincenzo Gerbi

Di.Va.P.R.A. Università di Torino

E' passato oltre un secolo da quando Müller-Thurgau (1891) formulò l'ipotesi che la disacidificazione che si poteva osservare nei vini in conservazione, fosse di natura microbiologica, provocata da schizomiceti, e da quando Koch (1900) ne diede la dimostrazione riproducendo il fenomeno mediante l'inoculo di un vino con i batteri da lui isolati da un altro che aveva appena subito la degradazione dell'acido malico.

Da allora il numero di studi dedicati alla fermentazione malolattica (FML) è diventato imponente, le conoscenze sul metabolismo batterico, sulle condizioni di sviluppo degli agenti e sui sistemi di controllo del fenomeno sono ormai un patrimonio acquisito, ma nonostante tutto essa costituisce ancora una delle fasi della vinificazione che preoccupa maggiormente l'enologo.

Importanza del fenomeno

La FML è importante per i vini per tre ordini principali di ragioni: la disacidificazione che produce, il contributo alla complessità del *flavour* dei vini, la stabilità biologica che induce.

Le prime due conseguenze possono essere oggetto di valutazioni di opportunità in quanto non tutti i vini possono ugualmente beneficiarne. Basti pensare ai vini bianchi di mosti ipoacidi o ai vini di uve aromatiche per i quali, nella maggior parte dei casi, si tende ad impedire il compimento della disacidificazione batterica.

La stabilità biologica costituisce invece un obiettivo irrinunciabile per qualsiasi vino e risulta indubbiamente più agevole raggiungerlo per i vini nei quali l'acido malico è stato trasformato. Diversamente è necessario far ricorso in modo più importante a mezzi fisici o chimici di stabilizzazione biologica.

Come è ben noto il contenuto in acido malico dei mosti diminuisce per fenomeni respiratori nel corso della maturazione dell'uva ed i mosti possono contenerne al momento della vinificazione da 2 a 10 g/l nelle zone a clima continentale, mentre presentano livelli < 2g/l nelle zone calde.

Ne consegue che l'importanza del fenomeno è assai più rilevante nelle prime rispetto alle seconde. Purtroppo l'acidità del mezzo in cui devono svilupparsi

costituisce la maggior limitazione all'azione dei batteri lattici, pertanto proprio laddove il fenomeno è più desiderabile si incontrano le maggiori difficoltà a realizzarlo.

Gli agenti ed il chimismo

L'adattamento di certi batteri lattici a resistere in ambienti notevolmente acidi come il vino, deriva quasi certamente dalla capacità di mantenere un adeguato pH all'interno della cellula. Tale adattamento consente di non disperdere energia sotto forma di ATP impegnata nel sistema di pompaggio di protoni fuori dalla cellula attraverso la membrana cellulare.

La FML, come ormai assodato da molte ricerche, prevede una decarbossilazione diretta dell'acido malico con produzione di acido lattico e CO₂. La maggior parte dei batteri lattici possiede l'enzima malolattico necessario a tale trasformazione, ma il fenomeno è condotto nei vini dalle specie più resistenti all'acidità. Nella maggioranza dei casi si tratta di forme cocciche, eterofermentative, (*Oenococcus oeni*, *Leuconostoc mesenteroides*), più raramente di forme bastoncellari (*Lactobacillus plantarum*).

La produzione di enzima malolattico è indotta dalla presenza stessa dell'acido malico. La presenza di zuccheri esosi o pentosi è in grado di favorire questa attività, ma è esclusa una loro preliminare metabolizzazione fermentativa per produrre ATP e quindi energia per le cellule batteriche, che in ogni caso sarebbe insufficiente.

L'aver chiarito il meccanismo in base al quale la FML è in grado di produrre l'energia necessaria alla crescita cellulare costituisce senza alcun dubbio il più importante progresso nella conoscenza del fenomeno (Henick-Kling, 1986) ed ha favorito enormemente lo sviluppo di nuovi metodi di controllo del fenomeno mediante l'uso di starter batterici e di nutrienti adatti.

La FML è di fatto una nuova via metabolica che permette la formazione di ATP, disponibile per la crescita, utilizzando la forza protonomotrice generata dalla fuoriscita dalla cellula degli idrogenioni liberati dalla decarbossilazione dell'acido malico in acido lattico.

Il sistema non necessita di fonti di carbonio diverse, anche se gli zuccheri presenti possono essere metabolizzati dai batteri. Gli agenti della FML sembrano preferire l'acido malico come fonte di energia durante la crescita in ambiente a basso pH e all'inizio della crescita cellulare. Quindi la crescita cellulare inizia, favorita dall'innalzamento del pH all'interno della cellula e dall'ATP formato, ma è anche favorita dalla crescita del pH esterno alla cellula che la degradazione dell'acido malico produce.

Le conseguenze della fermentazione malolattica

Occorre sottolineare che la diminuzione di acidità e l'aumento del pH derivanti dalla trasformazione dell'acido malico in lattico, non sono le uniche conseguenze importanti del fenomeno. Anche se sull'argomento gli studiosi sono ben lontani dall'aver completato le loro conoscenze, merita attenzione il capitolo dei composti volatili prodotti essenzialmente dal metabolismo secondario dei batteri a carico di componenti minori del vino quali l'acido citrico, i pentosi e le tracce di esosi.

E' stata imputata all'azione dei batteri malolattici la formazione di composti volatili responsabili delle sensazioni di "burrato", "caseario", "nocciolato", "dolce" e "fruttato".

Alcuni ceppi batterici, in opportune condizioni, producono poi polisaccaridi esocellulari in grado di influenzare positivamente le sensazioni tattili del vino in bocca, conferendogli note di morbidezza, pienezza e corposità.

Non in tutti i vini tali sensazioni sono rilevabili e documentabili statisticamente, ma ci sono casi come gli Chardonnay dove la nota matura e fruttata conseguente alla malolattica è evidente anche agli assaggiatori meno allenati.

Ma anche in quei vini in cui non è così facilmente percepibile, come i grandi vini rossi da invecchiamento, la fermentazione malolattica costituisce l'indispensabile premessa al una corretta maturazione del prodotto in botte ed a un successivo invecchiamento in bottiglia.

Il controllo della fermentazione malolattica

E' ampiamente dimostrato che i fattori che maggiormente condizionano la crescita dei batteri lattici nel vino sono il pH, la temperatura, l'anidride solforosa e l'etanolo. Evidentemente in un moderno processo di vinificazione orientato alla produzione di vini di qualità, nulla può essere lasciato al caso, tantomeno la FML in considerazione delle pesanti conseguenze qualitative che il fenomeno può avere sul vino.

La velocità di trasformazione dell'acido malico nel vino risulta influenzata dalla densità cellulare e, secondariamente, dalla specifica attività delle cellule. Per un corretto monitoraggio del fenomeno occorre tenere distinta la fase di crescita cellulare, da quella di attività specifica delle cellule.

Nella pratica risulta sempre assai più lunga e incerta la fase di crescita rispetto a quella di completamento della fermentazione. Purtroppo l'analisi chimica da sola, prendendo in considerazione la demolizione dell'acido malico e/o la formazione dell'acido lattico, non fornisce una informazione completa sulle possibilità di avvio e completamento del fenomeno, specie quando si verificano ritardi. I metodi microbiologici, in specie l'osservazione microscopica diretta dei preparati freschi, può fornire utili indicazioni integrative.

Fino a poco meno di venti anni fa la FML era affidata quasi esclusivamente alla microflora spontanea, quindi ad una induzione indiretta, agevolata da pratiche di controllo della temperatura e dalla riduzione delle dosi di SO₂. Nelle realtà più progredite si faceva già ricorso al taglio con partite di vino che avevano appena completato la disacidificazione batterica o con fondi di travaso o di chiarifica delle medesime partite.

Gli starter di batteri malolattici

Alcune fondamentali considerazioni portano i tecnici a consigliare senza riserve il ricorso a *starter* selezionati per realizzare un reale controllo della FML.

Una prima considerazione riguarda l'ecologia dei batteri lattici: la loro presenza nei vini deriva essenzialmente dal contatto con gli ambienti e le attrezzature della cantina, quali le superfici dei recipienti, le tubazioni, le tramogge, ed in minore misura dal vigneto attraverso il contatto con uve alterate, residui di mosto nei recipienti di raccolta dell'uva e con attrezzature di vendemmia.

L'igiene nelle cantine è decisamente aumentata sia per scelta dei produttori, timorosi di alterazioni e di formazione di gusti anomali, sia sulla spinta dell'adozione obbligatoria dei sistemi di autocontrollo igienico. Fatta eccezione per i recipienti di legno destinati alla maturazione del vino, è raro trovare recipienti di vinificazione a parete non liscia e perfettamente lavabile. Inoltre è aumentato il ricorso a sistemi di sanitizzazione oltre che di lavaggio delle attrezzature. Tutto questo ha fatto diminuire il rischio di inquinamento microbiologico, ma ha ridotto di conseguenza anche quella microflora spontanea che costituiva l'inoculo primario della FML. D'altro canto anche l'apporto batterico legato alle uve si è notevolmente ridotto, fortunatamente, perché lo stato sanitario delle uve è enormemente migliorato per effetto delle cure agronomiche e della lotta condotta con antiparassitari.

Il ricorso a *starter* selezionati soddisfa quindi in prima istanza alla necessità di garantire un adeguato apporto numerico di cellule microbiche. Notevoli sforzi sono stati fatti dalle ditte selezionatrici e produttrici di *starter* batterici per migliorarne le modalità di allestimento in modo da garantirne una rapida moltiplicazione una volta inoculati nel vino. In effetti il momento più delicato dell'uso di questi preparati coincide proprio con l'inoculo, perché venendo a contatto con un ambiente assai meno ospitale di quello in cui sono stati allevati, soprattutto per la maggiore acidità, vanno incontro ad una più o meno grave perdita di vitalità.

Per ridurre tale effetto negativo vengono normalmente consigliati dei protocolli di riattivazione che prevedono, in uno o più passaggi in vino diluito o disacidificato, l'adattamento progressivo delle cellule batteriche al nuovo ambiente. La messa in opera di tali protocolli comporta una certa perdita di tempo ed una notevole attenzione da parte dell'operatore, pena la perdita di efficacia del preparato e notevoli ritardi nel completamento della FML. Per tali ragioni la loro diffusione nelle cantine è stata finora inferiore a quanto fosse ipotizzabile sulla base della composizione dei vini italiani

Un importante progresso è rappresentato dall'introduzione sul mercato di preparati batterici ad elevata concentrazione cellulare e/o prodotti con cellule sottoposte a procedure di stress multipli (calore, pH basso ed etanolo), per indurre la produzione di proteine di adattamento che le rendono più resistenti. Con tali preparati è possibile realizzare un inoculo diretto del vino da disacidificare, affrancando il vinificatore dall'onerosa fase di premoltiplicazione.

Il continuo lavoro di selezione sta portando sul mercato anche ceppi selezionati, capaci di produrre effetti evidenti sulla componente volatile e quindi sul *flavour* del vino.

Il successo nell'impiego di *starter* batterici selezionati è comunque affidato, molto più che nel caso dei lieviti, alla scrupolosa osservanza delle modalità d'uso, pena la perdita della vitalità dei batteri inoculati. E' quindi necessaria una specifica formazione del personale addetto all'operazione.

Bibliografia essenziale

Gandini A. (1969). La fermentazione malo-lattica sotto l'aspetto microbiologico, chimico e tecnologico. *Vini d'Italia*, 11, 59-60, 125-134, 227-233.

Henick-Kling T. (1993). Malolactic fermentation. In Fleet G.H. *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Acc. Publ., Chur (CH), pp 289-326.

Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A. (1998). Handbook of Enology, vol.I The microbiology of wine and vinification, Dunod, Paris (F), pp 109-167.

Considerazioni pratiche sulla F.M.L.

Dr. Francesco Rusalen

USF Filtration & Separations S.p.A.

Le nuove frontiere della malolattica

USF UNIVERSITÀ
S. GIUSEPPE VESPALE

Considerazioni pratiche sulla
F.M.L

dr. Francesco Rusalen

FML si o FML no?

USF UNIVERSITÀ
S. GIUSEPPE VESPALE

..... nei vini bianchi
la scelta è legata a:

- livello di acidità desiderato
- profilo aromatico ricercato

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

FML si o FML no?



.....nei vini bianchi comporta:

- aumento della complessità aromatica dei vini
- diminuzione della freschezza e del fruttato

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

FML si o FML no?



- Quest'ultima affermazione è stata smentita da numerosi studi (Rosi, Henick-Kling, Catania 1998) che hanno dimostrato che certi ceppi di batteri lattici selezionati possono amplificare o conservare l'intensità fruttata dei vini.

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

FML si o FML no?



Nei vini rossi:

➤ evoluzione organolettica:

- diminuzione acidità
- aumento complessità
- riduzione delle note amare
- amplificazione delle caratteristiche apportate dal lievito nel corso della F.A.
 - migliore stabilità
 - richieste di mercato

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Come controllare la FML?



Per evitarla porre attenzione a:

- Composizione del Vino:
 - pH
 - Contenuto di SO₂ libera e totale
 - Contenuto in alcol
- Condizioni ambientali (°T)

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Come controllare la FML?



Per evitarla porre attenzione a:

- flora spontanea
- temperatura dei vini
- igiene della cantina
- impiego del Lisozima

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Come gestire la FML?



Controllo del substrato:

- gestione della SO_2
- gestione della flora spontanea
- composizione dei vini

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Come gestire la FML?



La FML non deve essere subita
ma è l'enologo che deve SCEGLIERE
come
REALIZZARLA

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Come gestire la FML?



Impiegare gli
"strumenti" adatti:

Batteri malolattici selezionati

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Quando inoculare i BMS?



Al termine della fermentazione alcolica,
perché:

- La temperatura è ancora favorevole
- Il vino contiene polisaccaridi e micronutrienti (amminoacidi e vitamine) liberati dai lieviti
- È possibile agire prima della solfitazione

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Quando inoculare i BMS?



Anche nel corso della fermentazione alcolica se:

- Il pH è basso (< 3.4)
- La F.A. procede senza intoppi (corretto inoculo e gestione)
- Se le condizioni igieniche sono adeguate

IN OGNI CASO DEVE ESSERE SEGUITA

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Vantaggi nell'impiego dei BMS



1. Sicurezza nella fermentazione
2. Miglioramento qualitativo
3. Scelta in f(x) del vino da ottenere
4. Minori problemi legati alla temperatura
5. **SICUREZZA ALIMENTARE**

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Sicurezza Alimentare



Ammine Biogene:

derivano dalla decarbossilazione microbica
degli amminoacidi;

quindi da Tirosina, Istidina, Triptofano,
Lisina derivano Tiramina, Istamina,
Tryptamina, Cadaverina.

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Perché ridurre il livello di Ammine Biogene?



1. Per la salute del consumatore
2. Per preservare l'immagine del vino
3. Nella CEE si stanno fissando dei limiti
4. Alcune catene distributive hanno già fissato dei limiti (10 mg/l)

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Ammine Biogene e Batteri



“La complessità della flora batterica indigena aumenta la possibilità di avere la presenza di almeno un ceppo produttore di ammine biogene” (Gerbaux 2000)

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Ammine Biogene e Batteri



Nelle fermentazioni condotte con il ceppo enolact dir *01 la formazione di istamina e sempre risultata limitata e comunque molto inferiore ai limiti proposti.

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

Ammine Biogene e Batteri



Le Ammine Biogene si formano anche dopo la conclusione della FML ed è stato dimostrato che l'impiego di Lisozima è efficace nel limitarne la produzione.

Villa dei Cedri
3 settembre 2000

**Impiego del Lisozima per il controllo della
fermentazione malolattica dei vini**

Prof. Riponi

Facoltà di Agraria – Università degli Studi di Bologna

Aureliano AMATI, Giuseppe ARFELLI, Claudio RIPONI, Massimo CASTELLARI

Istituto di Industrie Agrarie - Università di Bologna - Italia

Introduzione

Negli ultimi anni il problema della qualità è divenuto assai pressante nei processi di trasformazione delle materie prime ed in particolare nella elaborazione degli alimenti. Ciò è dipeso in buona parte dalla sempre maggiore attenzione che il consumatore pone nella scelta di ciò che acquista.

In questa logica la ricerca nel settore alimentare si è da tempo impegnata ad individuare tecnologie e prodotti in grado di garantire un'elevata sicurezza d'uso dell'alimento (healthy and safety foods).

Nel comparto enologico, in particolare, l'attenzione si è accentrata sull'anidride solforosa che, come noto, se da un lato presenta numerosi ed indiscutibili vantaggi tecnologici, dall'altro risulta essere caratterizzata da rilevanti problematiche igienico sanitarie.

La legislazione della CEE indica, relativamente al settore enologico, un limite di anidride solforosa presente nei vini al consumo di 160 mg/L per i rossi e di 210 mg/L per i bianchi, contemplando, tuttavia, numerose eccezioni che aumentano ulteriormente questi limiti.

Va inoltre precisato che l'impiego dell'anidride solforosa in campo alimentare è piuttosto frequente (bevande, frutta, vegetali, ecc.) e quindi la dose giornaliera accettabile (ADI) fissata per l'uomo da 0 a 0,7 mg/kg di peso corporeo può risultare facilmente superabile.

Assume quindi grossa rilevanza l'individuazione di additivi tossicologicamente accettabili e l'adozione di nuove tecnologie che permettono di evitare l'uso dell'SO₂ o quantomeno di ridurlo.

A tale scopo è stato sperimentato l'impiego del Lisozima in relazione al controllo dello sviluppo e della attività dei batteri lattici nel vino, al fine di impedire la fermentazione malolattica nei casi in cui risultasse indesiderata, nonché di evitare spunti lattici con correlato incremento dell'acidità volatile e relativo scadimento organolettico (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8).

Il Lisozima è una proteina scoperta da Fleming nel 1922, caratterizzata da un punto isoelettrico a pH 10.5-11.0, da un p.m. di circa 14500 Daltons e da un massimo di stabilità e di attività a pH inferiori a 7.0.

Essa è dotata di attività muramidasi e chitinolitica che provoca la disgregazione della struttura della parete batterica, predisponendo la cellula ad una lisi osmotica.

In base alla composizione percentuale della parete batterica in mucopolisaccaridi, si verifica una maggiore o minore sensibilità del batterio all'enzima: questa è elevata nei Gram positivi in genere e massima nel *Micrococcus lysodeikticus* (9) (10).

È stato descritto come il Lisozima si fissi anche su certi batteri resistenti, staccando alcune strutture che passano nel mezzo, senza tuttavia lisare la parete cellulare; sembra che

alcuni legami Lisozima-parete siano dovuti semplicemente a cariche elettrostatiche. Questa fissazione determina una caduta degli scambi respiratori, per cui l'accrescimento e la moltiplicazione batterica risultano danneggiati.

L'azione batteriostatica del Lisozima è molto più frequente di quella batteriolitica e può esercitarsi sia verso i Gram positivi che i negativi.

Il Lisozima è largamente diffuso in natura, sia nel regno animale (albume d'ovo, lacrime, saliva, latte umano), che in diversi vegetali e difende l'organismo umano da molte infezioni batteriche. In effetti il prodotto è ampiamente usato in campo farmacologico (11) come agente antibatterico, antivirale e antiflogistico, nonché come integratore umanizzante del latte vaccino.

Il Lisozima commerciale è presente sottoforma di cloridrato, avente un pH di circa 3.5 ed una stabilità a temperatura ambiente di almeno 5 anni.

Il procedimento di preparazione, iniziato già negli anni '50 ed attualmente utilizzato da almeno 6 produttori localizzati in Europa, Nord America ed estremo Oriente, prevede il contatto del bianco d'uovo di gallina con una resina a scambio ionico (autorizzata per l'impiego nel settore alimentare), che assorbe il Lisozima. Dopo un periodo di contatto di circa tre ore, si separa la resina dal bianco d'uovo e si procede ad un accurato lavaggio con acqua.

Si disassorbe il Lisozima mediante una soluzione acquosa di cloruro di sodio e l'eluato viene portato a pH 10.0 con una soluzione acquosa di idrossido di sodio.

Il Lisozima, che così viene precipitato, è poi isolato per filtrazione e risospeso in acqua. La sospensione è portata a pH 3.5 con soluzione acquosa di un acido alimentare e si completa la precipitazione con aggiunta di cloruro di sodio in acqua. La sospensione viene quindi filtrata ed il residuo raccolto viene essiccato.

Il bianco d'uovo privato dell'enzima è recuperato e utilizzato nell'industria alimentare. Le acque di lavaggio non contengono prodotti inquinanti e possono essere direttamente immesse negli impianti di depurazione urbani. Non vengono impiegate, né emesse nell'ambiente di lavoro o nell'atmosfera sostanze volatili estranee conseguenti al processo di produzione.

L'impiego enologico del Lisozima è stato sperimentato da Ribéreau-Gayon e coll. (12) che individuarono come dose efficace 16 mg/l, mentre una quantità maggiore, sempre secondo gli stessi Autori, accelererebbe la lisi, ma modificherebbe di poco il numero di cellule resistenti.

Amati e coll. (4) hanno dimostrato che il Lisozima è stabile a pH bassi ed in presenza dei normali componenti del vino; però già 13 mg/L di anidride solforosa libera a temperatura ambiente ne deprimono sensibilmente l'attività.

Manzano e coll. (13) hanno, infine verificato che l'attività batterica del Lisozima è variabile a seconda dei ceppi di *Leuconostoc oenos*; in genere detti batteri sono risultati maggiormente sensibili ai pH più elevati.

L'uso di enzimi come conservanti alimentari, basato sul loro effetto litico o batteriostatico sulla microflora di varie specie, è conosciuto da tempo soprattutto nei paesi asiatici.

Dal 1983 il Lisozima è autorizzato anche in Italia nella produzione di alcuni formaggi a pasta dura come trattamento preventivo del gonfiore tardivo conseguente alla fermentazione butirrica.

Il JEFCA (Comitato Congiunto degli Esperti sugli Additivi Alimentari FAO/WHO) nel 1992 ha approvato l'impiego del Lisozima nel settore alimentare classificandolo come alimento data la sua origine (uovo di gallina). Contemporaneamente è stata effettuata la sua valutazione tossicologica (14) ed è stata recepita la scheda tecnica per la sua identificazione e purezza (15). Anche la Commissione del Codex Alimentarius (Ginevra 1993) ha espresso parere favorevole all'uso del Lisozima per le preparazioni alimentari.

Descrizione delle prove

La valutazione dell'efficacia del Lisozima sul controllo dell'attività malolattica ha previsto, in una prima fase, delle prove di laboratorio su soluzioni modello e su mosti e vini di diversa origine ed, in un secondo tempo, delle applicazioni in cantina sia su scala pilota, che a livello industriale.

A) Prove di laboratorio

Sono state preparate soluzioni modello composte dagli acidi organici tipici dell'uva (acido tartarico 3,5 g/L, acido malico 2,5 g/L, acido citrico 0,5 g/L), da alcuni metalli (Fe 10 mg/L, Cu 1 mg/L rispettivamente sottoforma di cloruro e di solfato) e da etanolo (12% in volume). Su tali soluzioni, dopo aggiunta di Lisozima cloridrato cristallino (500 mg/L) della Solchem Italiana S.p.A., è stata valutata l'influenza sull'attività dell'enzima determinata da alcuni trattamenti fisici, dall'impiego di ausiliari tecnologici e dall'anidride solforosa. In particolare le soluzioni modello sono state sottoposte a centrifugazione (2.880 g), a filtrazione (0,45 µm) ed a refrigerazione (-5 °C per 120 ore). I coadiuvanti impiegati sono stati: gelatina in polvere (100 Bloom, N₂ totale 15,7%, N₂ dopo precipitazione 4 mg, finezza della polvere <16 Mesh); gelatina liquida; caseinato di potassio (N₂ totale 14,5%, N₂ dopo precipitazione 3 mg), sol di silice al 30% tipo A (pH 4,0, finezza della polvere 40 µ); sol di silice al 30% tipo B (pH 9,0, finezza della polvere 40 µ); bentonite (potere deproteinizzante 65 Codex, finezza della polvere 80 µ); carboni attivi (potere decolorante 146 indice di iodio); polivinilpolipirrolidone (finezza della polvere 80-120 Mesh); cellulosa (finezza della polvere 100-400 Mesh); farina fossile a granulazione fine e grossa; enzimi pectolitici del commercio (denominati A, B); ferrocianuro di potassio idrato (Carlo Erba RPE ACS 99%). I mosti ed i vini impiegati in questa fase presentavano caratteristiche compositive molto diverse in ragione soprattutto del pH, della gradazione alcolica, del contenuto polifenolico e della presenza di SO₂ (Tabella 1). In particolare si sono impiegati: un mosto bianco defecato a freddo impoverito in sostanze polifenoliche; un mosto rosso termomacerato sottoposto a defecazione a freddo e filtrazione con farina fossile; un vino bianco

iperossigenato elaborato in assenza di anidride solforosa; un vino bianco tradizionale con circa 80 mg/L di SO₂; un vino rosso termomacerato ed un vino liquoroso invecchiato in legno.

<u>DETERMINAZIONI</u>	M.B.	M.R.c.	V.B.	V.B.*	V.R.c.	V.I.f.
Alcool vol %	***	***	10,40	11,70	11,86	15,10
Estratto totale g/L	178,6	208,1	19,2	16,3	21,4	29,4
pH	3,11	3,04	3,21	3,10	3,59	2,98
Anidride solforosa totale	assente	assente	tracce	80	tracce	80
Polifenoli totali mg/L	90	403	93	202	1885	320
Catechine mg/L	3	14	3	7	115	15
Leucoantociani mg/L	7	158	10	37	2215	146

Tabella 1 – Composizione dei mosti e dei vini (M.B.: mosto bianco defecato; M.R.c.: mosto rosso da uve termomacerate; V.B.: vino bianco iperossigenato; V.B*.: vino bianco tradizionale; V.R.c.: vino rosso da uve termomacerate; V.I.f.: vino da uve appassite invecchiato in fusti)

Anche nel caso dei mosti e dei vini si è proceduto alla valutazione dell'influenza esercitata sull'attività del Lisozima da parte dei medesimi coadiuvanti impiegati per le soluzioni modello.

In tutte le prove le modalità di aggiunta degli ausiliari sono state predisposte in modo da poter essere paragonate a quelle che, di norma, vengono seguite nell'industria enologica. Ogni coadiuvante è stato perciò disciolto in un volume di acqua pari a dieci volte il proprio peso, aggiunto al liquido preventivamente addizionato di Lisozima (soluzione modello, mosto o vino) e quindi si è proceduto ad agitazione per 15 minuti.

L'attività del Lisozima è stata valutata dopo 24 ore dalle aggiunte dei coadiuvanti, su un campione mantenuto a temperatura ambiente (20 °C).

La bentonite idratata è stata sottoposta ad un periodo di agitazione di 15 ore in modo tale da permettere un completo ed efficace rigonfiamento della struttura montmorillonitica, mentre le tesi relative al ferrocianuro di potassio sono state aggiunte anche di 30 mg/L di gelatina e refrigerate per 7 giorni a 3 °C prima dell'indagine analitica.

Il metodo di determinazione dell'attività enzimatica è quello pubblicato dalla FAO in Compendium of Food Additive Specifications (Addendum 1) del febbraio 1992 (15).

L'attività residua del Lisozima è stata calcolata come percentuale dell'attività enzimatica nei medesimi liquidi in cui sono state eseguite le prove e non nei confronti dello standard. Tutti i dati derivano da medie di sei ripetizioni, per ovviare al fatto che il metodo analitico di valutazione dell'attività ha un coefficiente di variazione di circa l'8%.

I risultati ottenuti dalle prove relative alle soluzioni modello sottoposte a differenti trattamenti fisici (centrifugazione, filtrazione e refrigerazione) non dimostrano modificazioni a carico dell'attività del Lisozima.

Per quanto riguarda l'influenza dell'anidride solforosa libera (Fig. 1), è evidente come l'attività residua dell'enzima, determinata dopo 24 ore dall'aggiunta, diminuisce all'aumentare dell'antisettico presentando una soglia di sensibilità a 10 mg/L, in accordo con quanto rilevato da altri Autori (16).

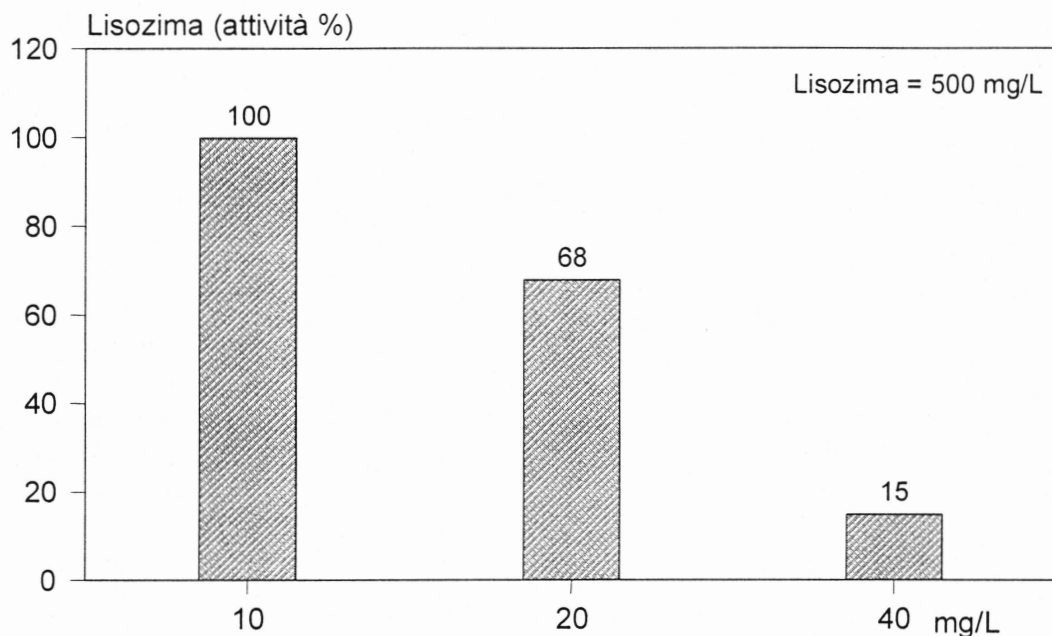


Fig 1 – Influenza dell'SO₂ sull'attività del Lisozima in una soluzione modello

Nella figura 2 viene evidenziata l'influenza della bentonite. Si può notare come questo coadiuvante, di notevole interesse enologico, abbatta l'attività del Lisozima in ragione della quantità usata, ma sempre in modo elevato per dosi anche relativamente basse se rapportate alle dosi in uso nel settore enologico. Ciò è da porre in relazione all'azione di questa argilla sulla proteina, come noto da tempo.

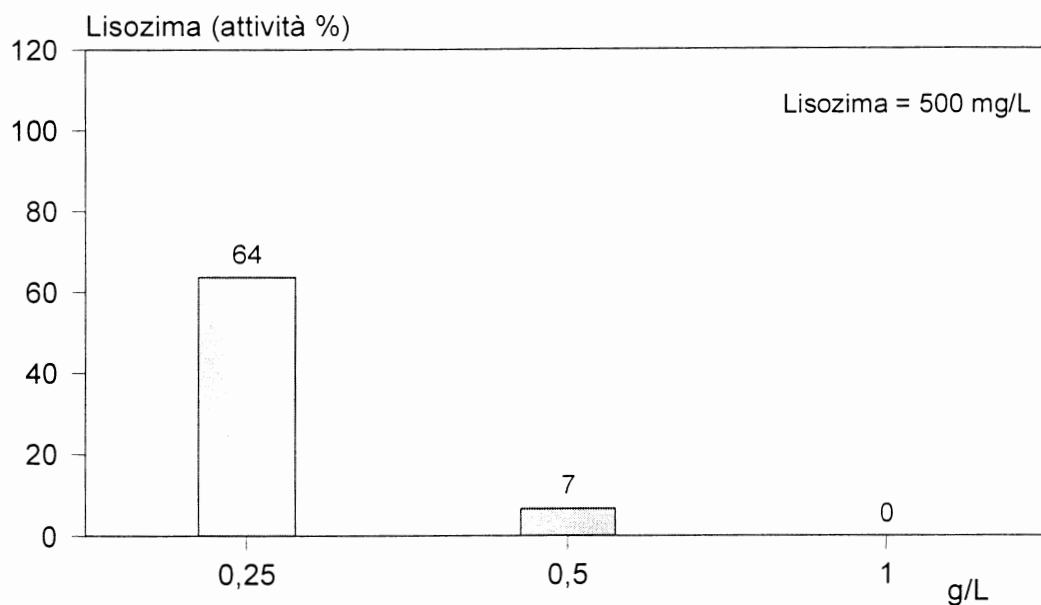


Fig 2 – Influenza della bentonite sull’attività del Lisozima in una soluzione modello

In figura 3 è mostrato l’effetto di alcuni coadiuvanti tecnologici. Per quanto riguarda il carbone attivo si nota un notevole abbattimento dell’attività dell’enzima in funzione sia della elevata quantità impiegata, sia della notevole superficie di adsorbimento dell’ausiliario tecnologico.

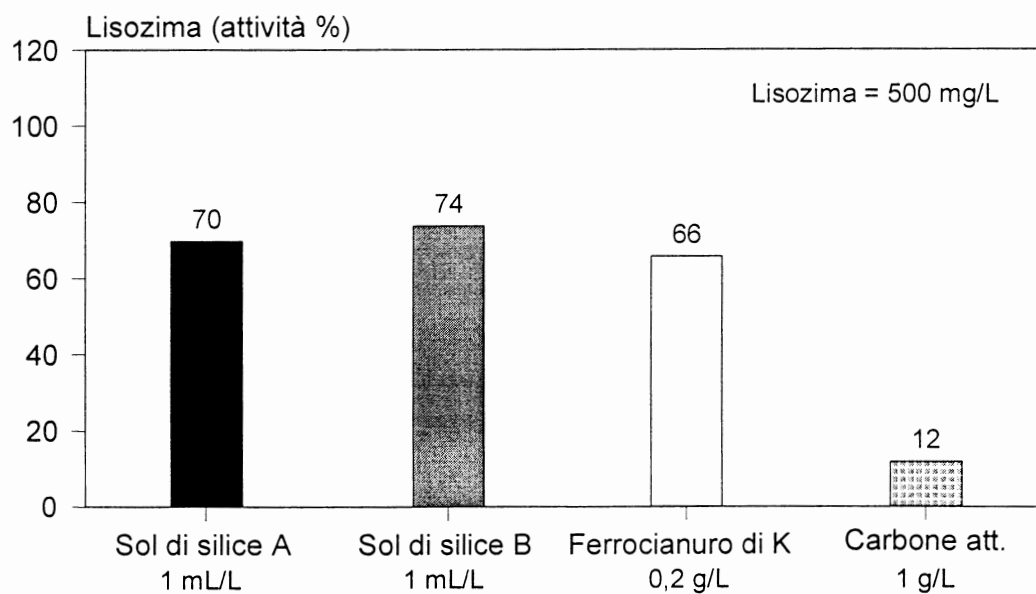


Fig. 3 – Influenza dei coadiuvanti tecnologici sull’attività del Lisozima in soluzione modello

Nella medesima figura si può osservare l'influenza del ferrocianuro di potassio, il quale induce un calo del 34% dell'attività in considerazione sia dell'elevato dosaggio, sia del probabile inglobamento dell'enzima nel flocculo formato con la gelatina utilizzata in fase di chiarifica.

Valutando l'influenza di due tipi diversi di sol di silice (acido e basico), si nota che la diminuzione di attività è di circa il 30% per entrambi i tipi.

La cellulosa e la farina fossile fine fanno diminuire l'attività del 20%, a differenza del polivinilpolipirrolidone e della farina fossile a granulometria grossa che non risultano influire sull'attività enzimatica in maniera significativa (Fig. 4).

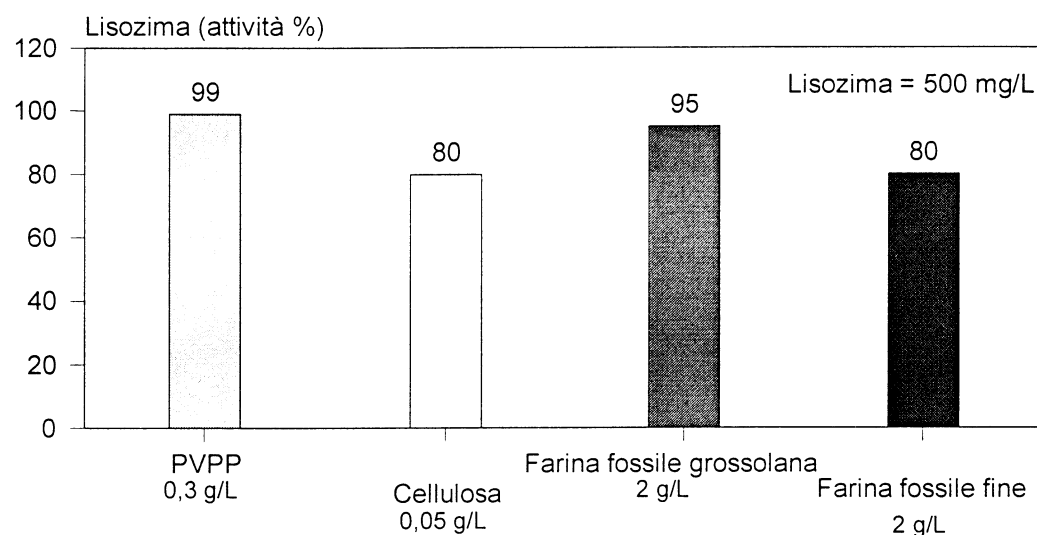


Fig 4 – Influenza dei coadiuvanti tecnologici sull'attività del Lisozima in soluzione modello

La diminuzione indotta dalla cellulosa e dalla farina fossile fine, è presumibilmente dovuta all'attrazione elettrostatica esercitata da questi ausiliari tecnologici e dalla relativamente elevata superficie adsorbente.

Nella figura 5 viene evidenziata l'influenza del caseinato di potassio che risulta causare una diminuzione di attività pari al 23%; tale fenomeno è prevedibile e provocato dalla formazione di coaguli del caseinato con il Lisozima alle condizioni di pH del mezzo.

Per quanto riguarda l'influenza sull'attività determinata dalle gelatine, la diminuzione causata dalla formulazione liquida del coadiuvante non è rilevante e non influenzata dalla SO₂ presente in forma libera alla dose di 0,5 mg/L.

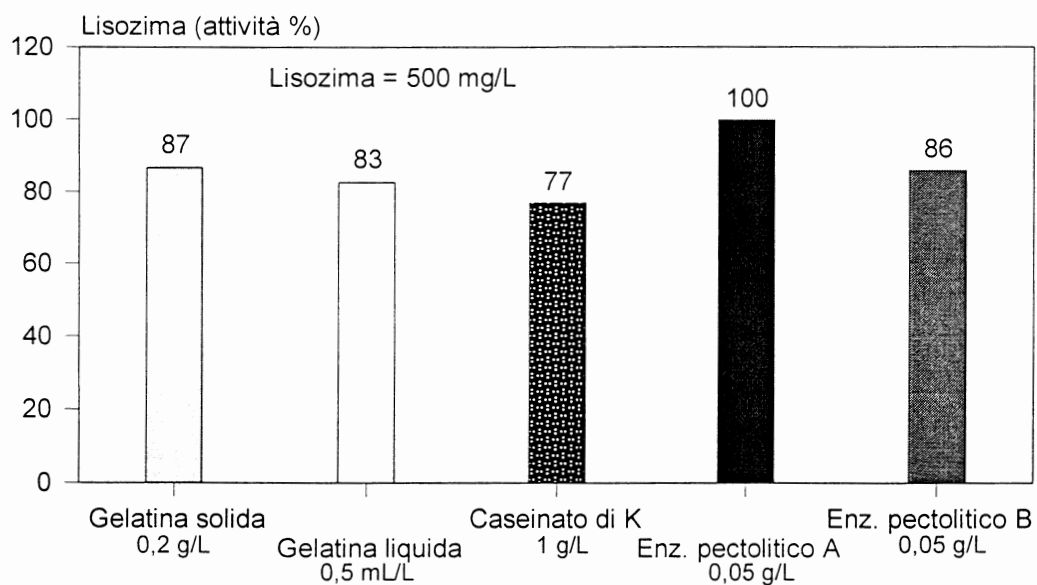


Fig.5 – Influenza dei coadiuvanti tecnologici sull'attività del Lisozima in soluzione modello

I due tipi di enzimi pectolitici presi in considerazione mostrano una differente influenza, causata dal fatto che il tipo B possiede anche attività proteolitica derivante da impurità residue del processo di produzione.

Nel caso delle prove condotte sui mosti e sui vini, va innanzitutto notato (Fig. 6) la differente attività del Lisozima nei confronti dello standard in ragione della matrice a cui viene addizionato. In soluzione modello l'attività rimane a valori elevati, mentre diminuisce quando viene aggiunto a mosti e a vini in relazione alla presenza, principalmente, delle sostanze polifenoliche. Il tenore alcolico ed il contenuto in SO₂ totale non sembrano infatti influire significativamente sull'enzima, come evidenziato dall'attività non molto dissimile fra mosto e vino bianco e fra vini bianchi a differente tenore in anidride solforosa totale.

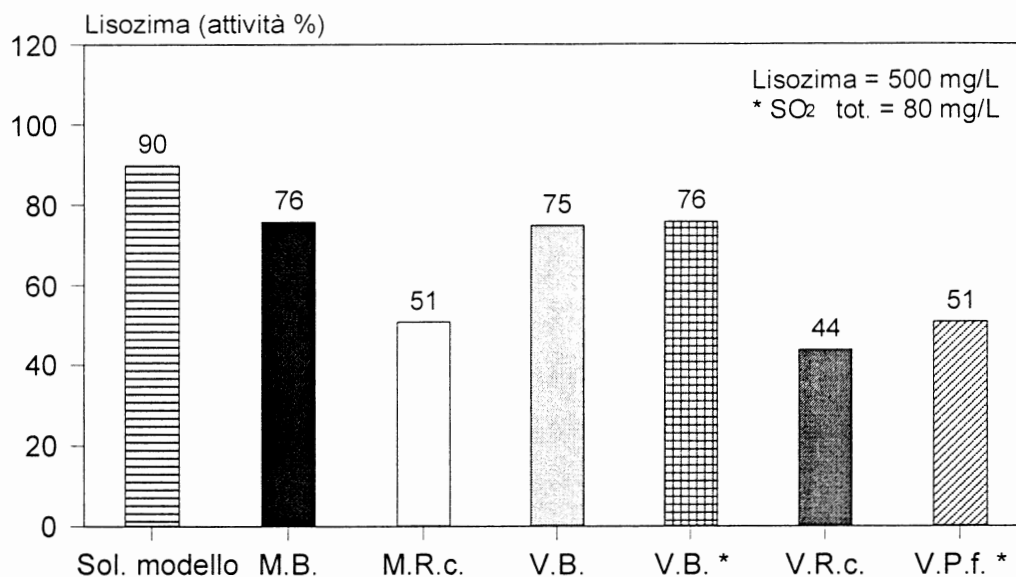


Fig 6 – Influenza della soluzione modello, dei mosti e dei vini sull’attività del Lisozima

Per quanto riguarda l’influenza dei coadiuvanti sull’attività del Lisozima, è da rilevare che elevati dosaggi di bentonite in mosti e vini tendono ad annullarne l’attività (Fig. 7), mentre a dosi più basse si evidenziano cali differenziati in ragione della matrice. Infatti le maggiori diminuzioni si hanno in mosti e vini ricchi di polifenoli; confrontando l’attività residua del Lisozima nel vino bianco privo di SO₂ con quella relativa al prodotto con 80 mg/L, si nota una differenza significativa non dovuta evidentemente alla presenza dell’antisetico, ma al differente contenuto polifenolico conseguente alla lisciviazione verificatasi nel corso della macerazione (VB=93 mg/L di PFT; VB*=202 mg/L di PFT). Per contro la differente attività residua fra mosto e vino corrispondente (M.B. e V.B.) non dipende dalla componente polifenolica che risulta analoga, ma probabilmente dalla maggiore presenza di sostanze in grado di coprecipitare con il Lisozima all’aggiunta di bentonite.

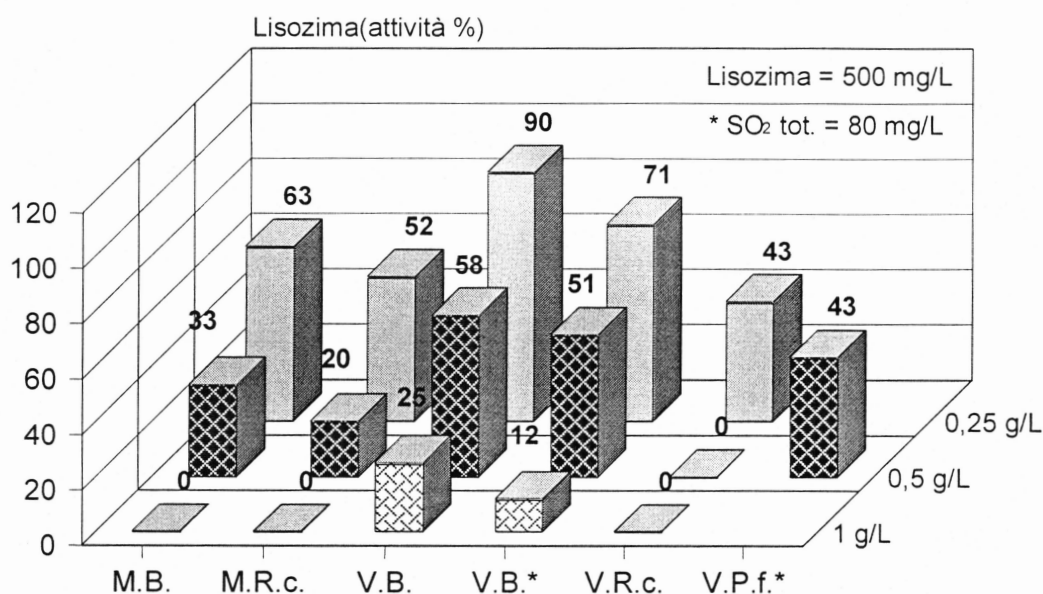


Fig 7 – Influenza della bentonite sull’attività del Lisozima nei mosti e nei vini

Anche l’aggiunzione di carbone attivo (Fig. 8) influisce negativamente sull’attività del Lisozima ma in modo differente a seconda della quantità aggiunta e della matrice liquida in cui viene a trovarsi. La diversa quantità di ausiliario tecnologico infatti non fa diminuire in maniera lineare l’attività del Lisozima ma, in presenza di quantità diverse, quella più bassa influisce a volte in modo non proporzionale rispetto a quella più elevata.

Dai valori rilevati appare impossibile correlare la diversa attività residua dell’enzima in substrati differenti per quanto riguarda contenuto polifenolico, anche in funzione del diverso dosaggio. In effetti in vini bianchi dosi basse di carbone non influenzano l’attività del Lisozima nel vino più ricco in polifenoli totali, mentre quantità elevate provocano nello stesso vino una maggiore diminuzione dell’attività.

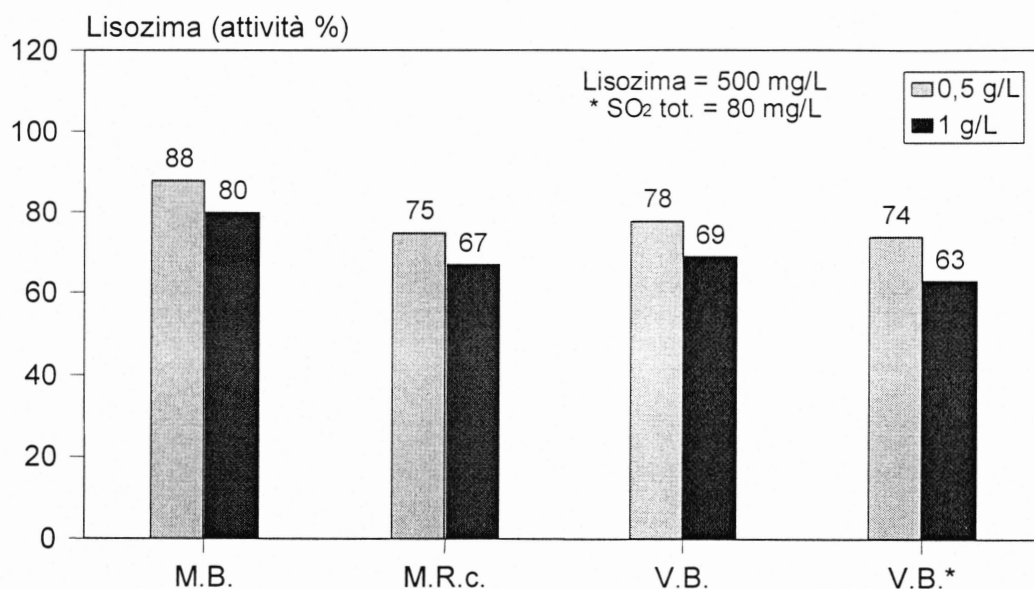


Fig 8 – Influenza del carbone attivo sull'attività del Lisozima nei mosti e nei vini

Per quanto riguarda la gelatina semolata e il caseinato di potassio (Fig. 9), a differenza di quanto rilevato in soluzione modello, i due coadiuvanti non provocano, anche agli alti dosaggi utilizzati, una diminuzione di attività né in mosto né in vino bianco. Ciò è da porre in relazione a una loro rapida precipitazione per copolimerizzazione con le sostanze presenti nelle due matrici senza coinvolgimento del Lisozima nella formazione del flocculo. Il sol di silice invece porta a una diminuzione dell'attività dell'enzima oltre che per azione diretta, anche per l'effetto del reticolo formatosi con altri composti colloidali.

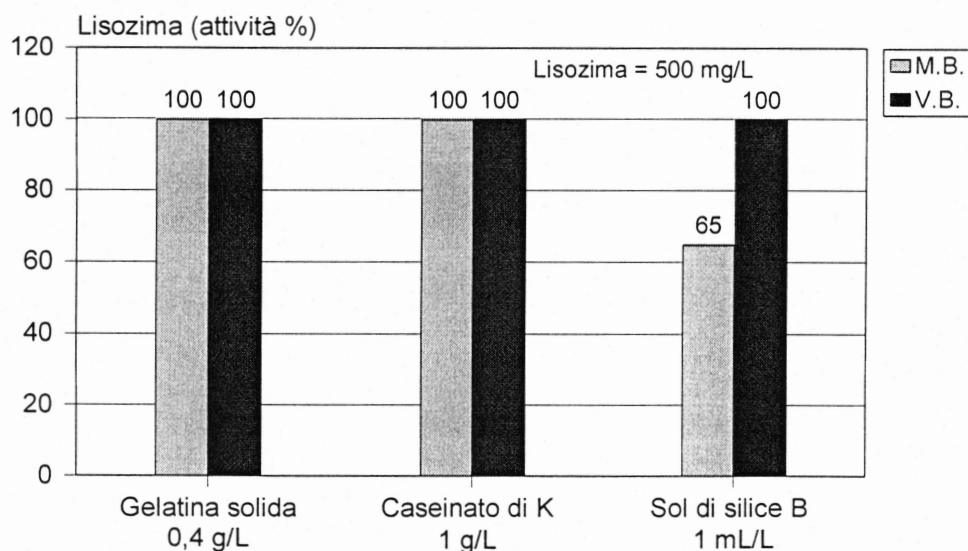


Fig 9 – Influenza dei coadiuvanti tecnologici sull'attività del Lisozima nei mosti e nei vini

Il ferrocianuro di potassio (Fig. 10) esplica un'azione sull'attività litica diversa proporzionale alla carica polifenolica; infatti, a maggior contenuto di sostanze polifenoliche corrisponde una maggiore diminuzione di attività del Lisozima dovuta alla formazione di coaguli ferro-ferrocianuro di potassio-gelatina e tannini-gelatina.

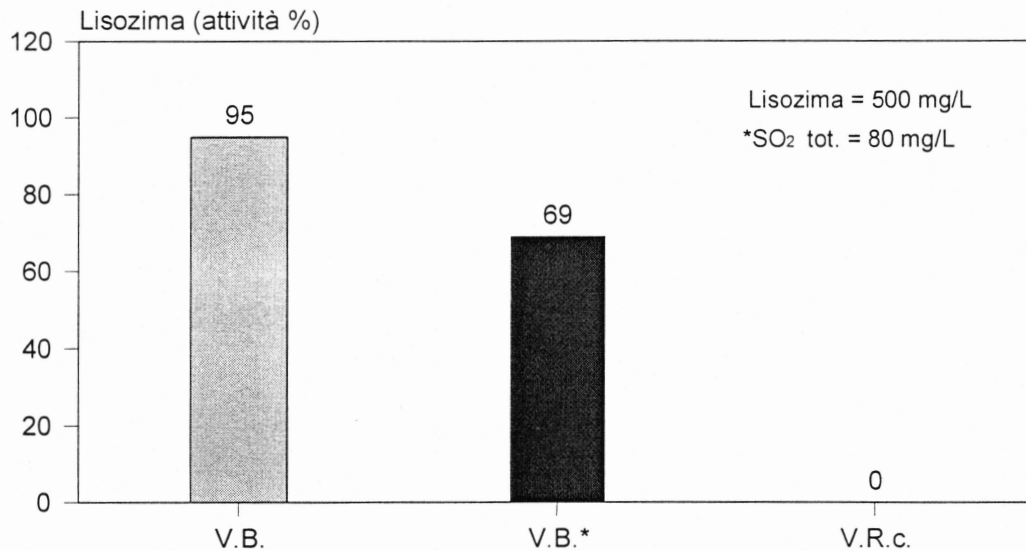


Fig 10 – Influenza del ferrocianuro di K (0,1 g/L) sull'attività del Lisozima nei vini

L'influenza degli enzimi pectolitici, con attività residua proteolitica (tipo B), impiegati a diversi dosaggi in mosti e vini, viene evidenziata in figura 11. Come già riscontrato in soluzione modello, l'attività del Lisozima diminuisce nei mosti ma non in maniera proporzionale al dosaggio di enzima pectolitico, mentre nel vino non si riscontra influenza alcuna.

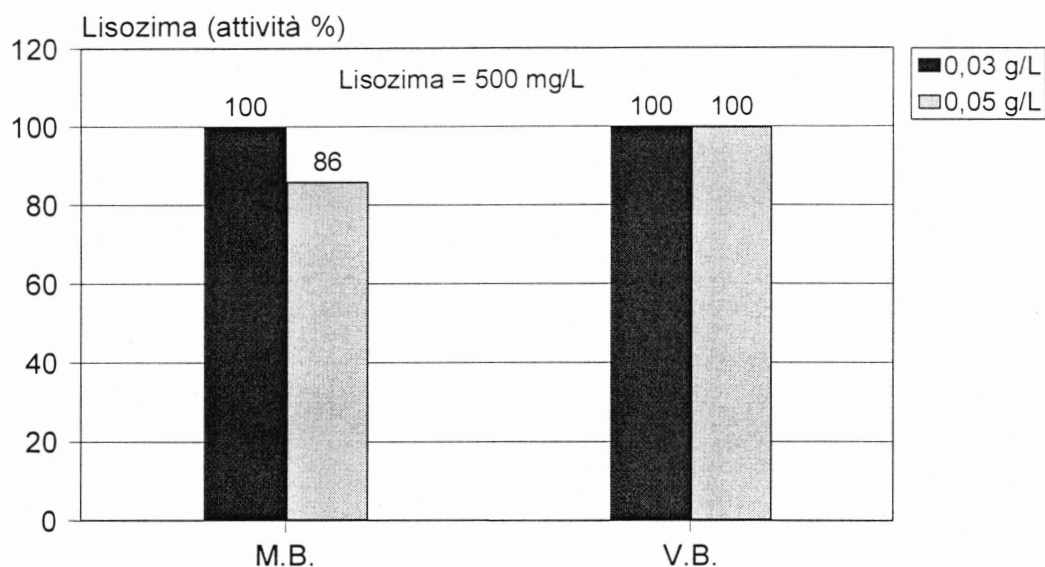


Fig 11 – Influenza dei diversi dosaggi di enzimi pectolitici sull’attività del Lisozima nei mosti e nei vini

B) Prove di cantina

In un primo tempo sono state effettuate prove su scala pilota presso la Cantina del Centro Tecnologico Sperimentale dell’E.S.A.V.E. (Faenza), utilizzando vini da uve cv Trebbiano romagnolo vinificate in bianco ed in totale assenza di anidride solforosa e di qualsiasi altro coadiuvante tecnologico. Per tutte le prove sono stati allestiti dei testimoni non addizionati di Lisozima o aggiunti di anidride solforosa alla dose di 80 mg/L.

Tutti i mosti sono stati fermentati con aggiunta di 5% di mosto lievito (Ceppo selezionato IMIA 659). La conservazione del vino è stata effettuata, previa filtrazione con membrana, in fusti di acciaio Inox ad una temperatura di 18 °C per dodici mesi.

In una prima serie di prove è stata aggiunta al vino una dose volutamente elevata di Lisozima (1000 mg/L) per verificare la sua reale capacità di inibire lo sviluppo dei batteri lattici in fase di conservazione. La prova, ripetuta per due annate successive, è stata effettuata aggiungendo il Lisozima ad un vino filtrato con membrana e seguendo l’evoluzione dell’acido lattico per un periodo di nove mesi (Fig. 12). I risultati ottenuti hanno dimostrato che il dosaggio adottato è in grado di inibire la fermentazione malolattica, che si è invece manifestata nel testimone non trattato.

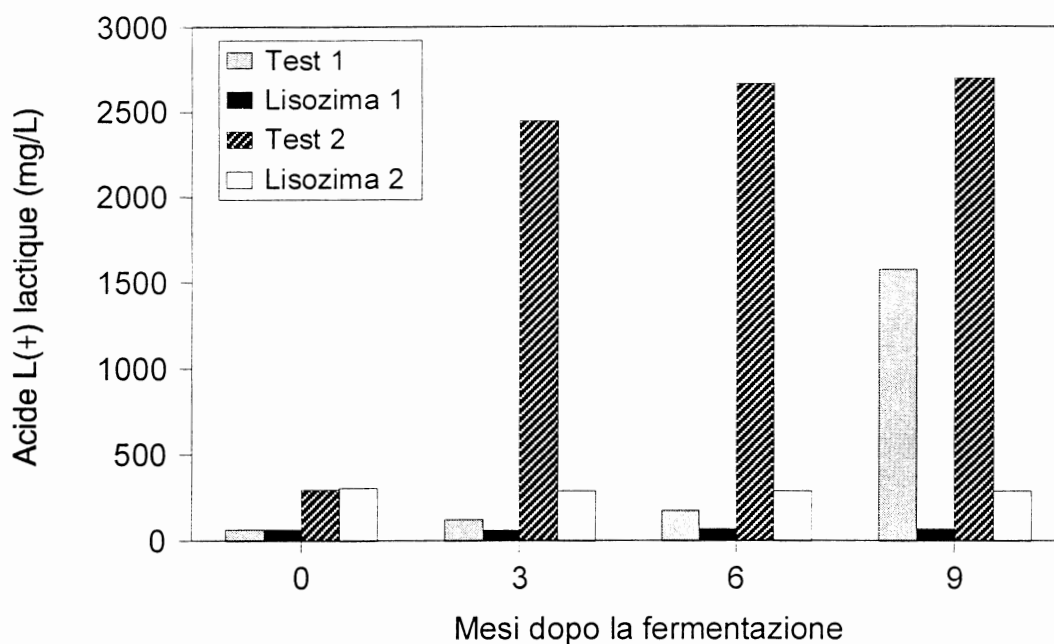


Fig 12 – Evoluzione dell’acido lattico nel corso di nove mesi

Vinificando in assenza di anidride solforosa, già nelle prime fasi della fermentazione alcolica si ha sviluppo di batteri lattici, con conseguente consumo di acido malico ancora prima che i lieviti abbiano esaurito lo zucchero presente. Questo fatto ha suggerito di verificare la possibilità di aggiungere il Lisozima già prima della fermentazione alcolica.

Poiché in tale momento i batteri lattici si dovrebbero trovare in fase di sviluppo e quindi più sensibili all’azione dell’enzima, si è approntata una serie di prove a due diversi dosaggi (500 e 250 mg/L) sensibilmente inferiori al caso precedente.

Il confronto è stato effettuato tra un vino addizionato di Lisozima al termine della fermentazione alcolica ed un mosto in cui l’aggiunta è avvenuta dopo defecazione, ma prima dell’inoculo con lieviti selezionati.

Come si può chiaramente vedere (Fig. 13), entrambi i prodotti addizionati di 500 mg/L di Lisozima sono risultati stabili anche dopo nove mesi.

Nel caso delle tesi trattate con 250 mg/L, soltanto l’aggiunta in prefermentazione è stata in grado di controllare lo sviluppo della malolattica; il trattamento con la medesima dose in conservazione ha solo ritardato lo sviluppo dei batteri senza inibirli completamente (produzione di acido lattico tra il sesto ed il nono mese).

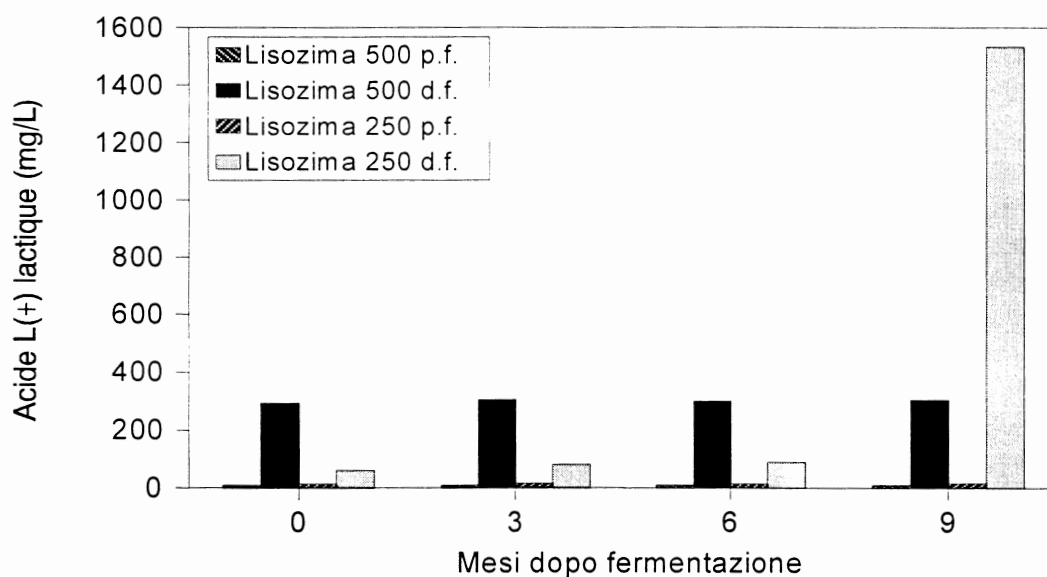


Fig 13 – Evoluzione dell’acido lattico in funzione di due dosaggi di Lisozima prima (p.f.) e dopo (d.f.) fermentazione

In seguito ai risultati emersi dalle prove condotte su scala pilota, sono state effettuate delle sperimentazioni a livello industriale coinvolgendo, per più annate successive, realtà enologiche notevolmente differenziate per tecnologia e per vini prodotti (17) (18).

Nella tabella 2 oltre ai valori minimi, medi e massimi di alcuni parametri compositivi dei mosti, si evidenzia come la carica batterica iniziale fosse assai varia non solo per numero, ma anche per specie. Questo ha permesso di condurre le prove in presenza di microbi con differente resistenza specifica nei confronti del Lisozima.

Lo schema delle prove ha previsto la diraspapigiatura e la successiva pressatura del pigiato ed il mosto così ottenuto è stato sottoposto a defecazione (statica o dinamica, in presenza o meno di ausiliari tecnologici) ed il prodotto limpido è stato suddiviso in quattro tesi, delle quali tre elaborate senza solforosa (rispettivamente con 0, 250 e 500 mg/L di Lisozima) ed una con 50 mg/L di SO₂.

DETERMINAZIONI	Min.	Max.	Medio
pH	3,06	3,43	3,26
Acido malico g/L	1,48	4,50	2,65
Zuccheri g/L	155	212	177
Batteri lattici UFC/mL	$\leq 10^4$	$1,6 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$

Tabella 2 – Composizione dei mosti

L'eventuale utilizzo di ausiliari tecnologici quali sol di silice, gelatina, bentonite, ecc. è stato limitato alla sola fase di illimpidimento.

L'aggiunta di Lisozima è avvenuta, previa sua dissoluzione in acqua fredda (alla concentrazione del 20%) per una durata di circa 30 minuti in lentissima agitazione, mediante rimontaggio di tutta la massa di mosto.

Il mosto è stato quindi addizionato di lieviti selezionati e l'andamento della fermentazione alcolica, dell'acido malico e dell'acido L(+) lattico sono stati seguiti periodicamente.

In tutte le prove la fermentazione (avvenuta a temperature diverse da azienda ad azienda, ma uguale fra le tesi a confronto in un singolo stabilimento) e la successiva conservazione è avvenuta in vasche di acciaio o di cemento vetrificato, con un'unica eccezione in cui tutta la prova (su uve cv Chardonnay) è stata condotta in botti di legno.

Ad eccezione di quest'ultima tesi, condotta in contenitori di 225 litri di capacità, le prove hanno avuto, per ogni tesi, una dimensione media di 25000 litri (100000 in totale per ogni azienda).

Dopo circa 5 giorni dal termine della fermentazione alcolica il vino è stato travasato e successivamente si è seguito periodicamente l'eventuale incremento dell'acido L(+) lattico e della carica in batteri lattici.

Dopo 200 giorni dall'inizio delle prove si è proceduto alla determinazione dell'acido acetico, dell'attività del Lisozima e ad una analisi organolettica dei vini.

Le tesi non addizionate di anidride solforosa e di Lisozima, hanno subito completamente la fermentazione malolattica fra i 7 e i 60 giorni dall'inizio della fermentazione alcolica, indipendentemente dalla carica e dal tipo di batteri lattici presenti. Al contrario la fermentazione malolattica si è manifestata dopo non meno di 90 e 110 giorni rispettivamente nelle tesi addizionate di 250 e 500 mg/L di enzima. Infine, alcune tesi addizionate di sola anidride solforosa hanno subito la fermentazione malolattica a partire da 7-10 giorni dall'avvio della fermentazione alcolica.

Possiamo rilevare come il dosaggio di 250 e 500 mg/L di Lisozima ha evitato l'insorgere della malolattica nella fase post fermentativa (70 giorni) considerata come momento più favorevole per l'attività batterica. Dopo 180 giorni di conservazione le tesi senza aggiunta di anidride solforosa e Lisozima non presentavano tracce di acido malico, mentre il 50% di quelle addizionate di 250 mg/L non avevano subito la fermentazione malolattica. L'aggiunta di 50 mg/L di anidride solforosa è stata insufficiente a bloccare l'attività dei batteri lattici.

Il comportamento non uniforme delle varie tesi ed in particolare di quelle addizionate di Lisozima, è da imputare sia alla diversa carica iniziale in batteri lattici, sia alla probabile presenza di ceppi differenti.

I batteri acetici non sono risultati sensibili al Lisozima anche se l'acidità volatile dei vini non è stata particolarmente rilevante (<0.5 g/L).

Tuttavia, poiché il Lisozima manifesta esclusivamente un'azione antibatterica, i vini corrispondenti presentavano un lieve sentore di ossidato rispetto a quelli elaborati con anidride solforosa.

Ciò ha permesso di ipotizzare un possibile utilizzo congiunto dei due additivi volto, da un lato, a mantenere inalterate le caratteristiche di freschezza del prodotto e, dall'altro, a contenere in livelli molto bassi la presenza di SO₂.

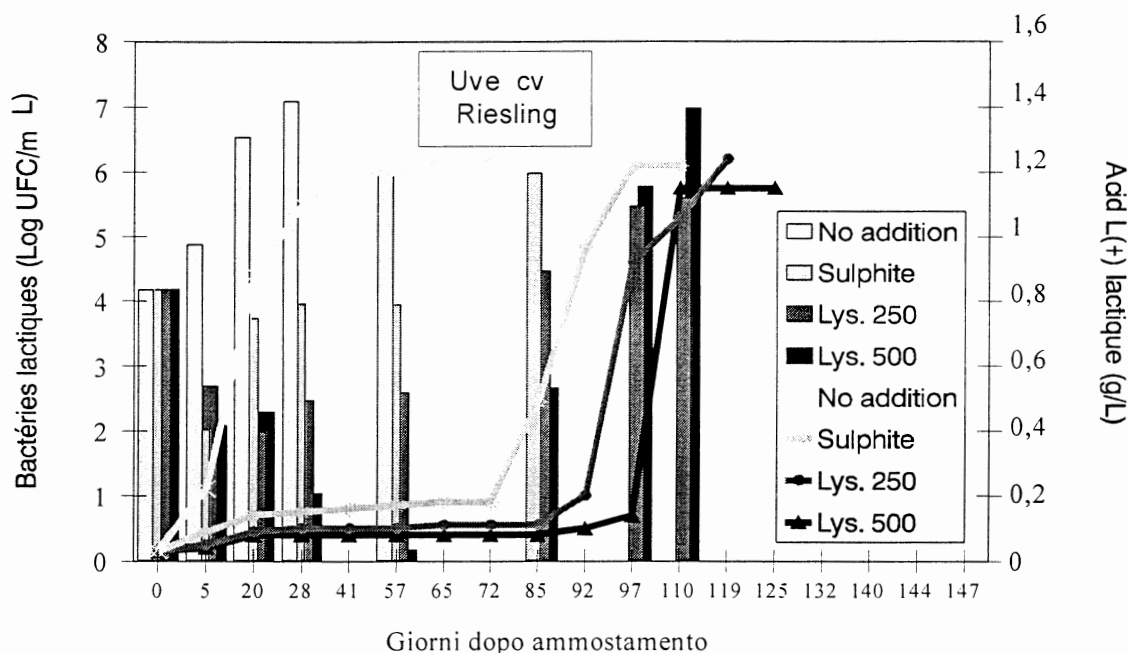


Fig 14 - Produzione di acido lattico in funzione della quantità di SO₂ e di Lisozima

In effetti le sperimentazioni effettuate su mosti da uve da uve cv Riesling (Fig. 14 e 15) vinificate in bianco, hanno evidenziato un sinergismo fra l'impiego del Lisozima e di bassi tenori di solforosa totale (30 mg/L). Identiche considerazioni sono state confermate anche da prove condotte su altri vitigni. Il testimone senza additivi ha subito la fermentazione malolattica nei primi 20 giorni dall'ammostamento, mentre le tesi con Lisozima e 30 mg/L di SO₂, sono risultate più stabili di quelle corrispondenti al solo Lisozima, come rilevato dalla più ritardata produzione di acido L(+) lattico. Parallelamente l'aspetto ossido-riduttivo dei vini elaborati con i due additivi è risultato, anche se di poco, superiore a quello delle tesi con solo Lisozima.

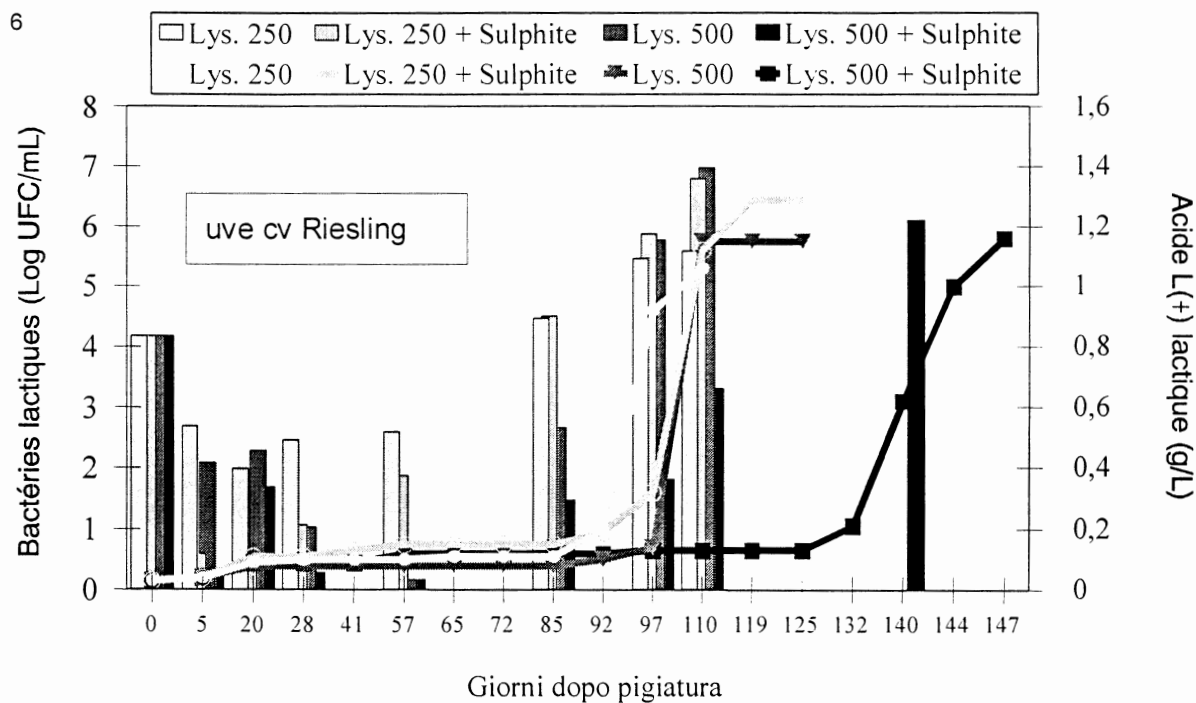


Fig 15 – Produzione di acido lattico in funzione dell'effetto sinergico tra l'SO₂ e il Lisozima (250 e 500 mg/L)

Conclusioni

Alla luce delle indagini condotte sia in laboratorio che in cantina, si può concludere che il Lisozima può permettere il controllo razionale della fermentazione malolattica.

Resta inteso che è necessario intervenire in maniera razionale nella scelta delle sequenze tecnologiche, tenendo presente l'azione dei diversi coadiuvanti, in particolare della bentonite e del carbone attivo che hanno evidenziato un'influenza negativa sull'attività dell'enzima. È da rilevare, inoltre, che le operazioni tecnologiche più comuni adottate in cantina, quali la centrifugazione, la filtrazione e la refrigerazione non provocano effetti sulla capacità di controllo del Lisozima nei confronti dei batteri malolattici. Tuttavia l'efficacia del Lisozima è da porre in relazione alla densità ed alla tipologia della popolazione microbica presente nel mezzo. È perciò consigliabile procedere a razionali operazioni di pulizia delle attrezzature e ad opportune filtrazioni dei vini in fase post fermentativa.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gandini A.; Gerbi V.; Varia A: 1984. La diffusione della fermentazione malolattica nei vini bianchi piemontesi. *Industria delle bevande* 13, 302-308
- 2) Kandler O. 1983. Carbohydrat metabolism in lactic acid bacteria. *Antone van Leewenhoek* 49, 209-22
- 3) Lafon-Laforcade S.; Ribéreau-Gayon P. 1984. Les alteration des vins par les bacteries acetiques. *Connaissance Vigne Vin.* 18, (1), 67-82
- 4) Amati A.; Pitotti A.; Boschelle O.; Manzano M.; Zironi R. 1988. L'inibizione della fermentazione malolattica. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino* 12, 71-79
- 5) Amati A.; Arfelli G.; Simoni M.; Gandini A.; Gerbi V.; Tortia C.; Zironi R: 1992. Inibizione della fermentazione malolattica: aspetti microbiologici e tecnologici. *Biologia oggi* VI (1-2) 95-114
- 6) Pitotti A.; Zironi R.; Dal Bon A.; Amati A. 1991. Possible application of Lysozyme in wine technology. *Med Fac. Landbouww, Rijksuniv Gent* 56 (4a), 1697-1699
- 7) Amati A.; Dell'Acqua E.; Zironi R.; Arfelli G. 1993. Lysozyme a new product to control malolactic fermentation in enology. *American Society of Enology and Viticulture 44th Annual Meeting, Sacramento (CA)* 25-28 giugno
- 8) Amati A.; Dell'Acqua E.; Ferrarini R.; Gerbi V.; Riponi C.; Zironi R.; Arfelli G. 1994. Lysozyme application to control malolactic fermentation: industrial trials. *American Society of Enology and Viticulture, 45th Annual Metteing, Anhaim (CA),* 30 giugno 2 luglio
- 9) Barbara L.; Pellegrini R. 1975. *Il Lisozima di Flaming.* Minerva medica Torino

- 10) Neviani E.; Carminati D.; Giraffa G.; Carini S. 1988. Sensibilità dei batteri lattici al Lisozima. Nota II: acquisizione di resistenza da parte di ceppi sensibili. Ind. latte 24, 27-34
- 11) Proctor V.A.; Cunningham F.E. 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a preservative and a pharmaceutical. Food Sc Nutr. 26, 4
- 12) Ribereau-Gayon J.; Peynaud E.; Ribereau-Gayon P.; Sudraud P 1975. Traité d'Oenologie: Sciences et Technique du vin. Tome II. Dunoud, Paris
- 13) Manzano M.; Dal Bo A.; Pitotti A. 1989. Effetti del lisozima su ceppi di *Leuconostoc oenos*: indagine preliminare. Ann. Microbiol. 39, 103-110
- 14) WHO Food Additives Series, 30 1993
- 15) F.A.O. Compendium of food additive specifications 1992. Addendum 1 F.A.O. Food and Nutrition Paper 52, 62, 4
- 16) Boschelle O.; Pitotti A. 1980 Utilizzo del lisozima come stabilizzante: verifica di affidabilità in mezzo acido. Ind. Alim. 27, 337-340
- 17) Amati A.; Chinnici F.; Piva A.; Arfelli G.; Riponi C. 1996. Influence of enological operations on Lysozyme activity in winemaking. Vitic. Enol. Sci. 51 (2), 59-62
- 18) Amati A.; Arfelli G.; Riponi C. 2000. Contrôle de la fermentation malolactique des vins: emploi du Lysozyme. XXV Congrès Mondial de la Vigne et du Vin. Parigi 19-23