



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie

DOTTORATO DI RICERCA IN: VITICOLTURA, ENOLOGIA E MARKETING DELLE
IMPRESE VITIVINICOLE

CICLO XXI

STUDIO DELL'INFLUENZA DELLE DIFFERENTI CONDIZIONI DI STOCCAGGIO DELLE
VINACCE SUI COMPOSTI AROMATICI VARIETALI E DI FERMENTAZIONE

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Ponchia

Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio Ponchia

Co-Supervisore: Dott. Riccardo Flamini

Dottoranda: Annarita Panighel

INDICE

RIASSUNTO	5
ABSTRACT.....	5
SCOPO DELLA TESI.....	6
1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 La Grappa.....	8
1.1.1 Ciclo produttivo della grappa.....	8
1.1.2 Costituenti della grappa.....	11
1.1.3 La grappa di Prosecco.....	11
1.1.4 La grappa di Cabernet Sauvignon.....	12
1.2 La vinaccia.....	13
1.2.1 Tipologie di vinaccia.....	13
1.2.2 Composizione della vinaccia.....	14
1.3 Componenti aromatici varietali dell’uva e delle vinacce.....	17
1.3.1 Terpeni.....	17
1.3.2 Norisoprenoidi.....	21
1.3.3 Benzenoidi.....	24
1.4 Composti di fermentazione presenti nelle uve e vinacce.....	26
1.4.1 Alcoli superiori.....	26
1.4.2 Metanolo.....	27
1.4.3 Aldeidi e chetoni.....	27
1.4.4 Esteri.....	28
1.5 Ocratossina A (OTA).....	31
2. MATERIALI E METODI.....	33
2.1 Materiali e metodi-Composti varietali.....	34
2.1.1 Campionamento della vinaccia della vendemmia 2005.....	34

2.1.2	Campionamento della vinaccia della vendemmia 2006.....	35
2.1.3	Estrazione dei varietali.....	36
2.1.4	Analisi gascromatografiche	38
2.2	Materiali e metodi-composti di fermentazione.....	40
2.2.1	Campioni vendemmia 2007.....	40
2.2.2	Estrazione dei composti volatili di fermentazione.....	41
2.2.3	Analisi gascromatografica dei composti volatili di fermentazione	41
2.2.4	Estrazione degli acidi organici.....	42
2.2.5	Analisi cromatografica degli acidi organici.....	42
2.3	Materiali e metodi-composti carbonilici	43
2.3.1	Estrazione dei composti carbonilici	43
2.3.2	Preparazione delle soluzioni standard.....	44
2.3.3	Analisi gascromatografiche	45
2.4	Materiali e metodi-norisoprenoidi.....	46
2.4.1	Analisi cromatografiche.....	47
2.5	Materiali e metodi - Ocratossina A (OTA)	47
2.5.1	Campionamento della vinaccia della vendemmia 2006.....	47
2.5.2	Campionamento della vinaccia della vendemmia 2007.....	48
2.5.3	Preparazione del Campione.....	48
2.5.4	Analisi HPLC	48
2.5.5	Calcolo della Retta di Calibrazione	49
2.5.6	Metodo di Conferma dell'OTA	49
2.6	Materiali e metodi-uva e vinacce Incrocio Manzoni 6.0.13	50
2.6.1	Estrazione delle frazioni libere e legate dei varietali dalle uve.....	50
2.6.2	Fermentazione della vinaccia	51
2.6.3	Estrazione dei composti varietali dalle vinacce	51
2.7	Misura del grado alcolico dei distillati.....	52

3. RISULTATI E DISCUSSIONE (<i>I COMPOSTI VARIETALI</i>)	53
3.1 Studio dei profili degli aromi varietali liberi recuperabili con la distillazione: campioni vendemmia 2005	54
3.2 Studio dei profili degli aromi varietali liberi e precursori di aromi nelle vinacce dopo la distillazione: campioni vendemmia 2005	56
3.3 Studio dei profili degli aromi varietali liberi recuperabili con la distillazione: campioni vendemmia 2006	61
3.4 Studio dei profili degli aromi varietali liberi e precursori di aromi della vinaccia: campioni vendemmia 2006	64
3.5 I precursori di aromi nor-isoprenoidi nelle vinacce di Prosecco	70
3.6 Studio dei precursori di aromi nor-isoprenoidi nella vinaccia	71
4. RISULTATI E DISCUSSIONE (<i>I COMPOSTI DI FERMENTAZIONE</i>).....	75
4.1 Studio dei principali metaboliti di fermentazione nelle vinacce di uva Prosecco in relazione ai tempi ed alle modalità di conservazione: vendemmia 2006.....	76
4.1.1 Principali metaboliti volatili di fermentazione	77
4.1.2 Andamento dell'acido lattico, acido malico ed acido acetico durante lo stoccaggio delle vinacce Prosecco 2006 (180 giorni).....	82
4.1.3 Andamento dei principali esteri durante lo stoccaggio delle vinacce Prosecco 2006 (180 giorni)	86
4.2 Studio dei principali metaboliti di fermentazione nelle vinacce di uva Prosecco in relazione ai tempi ed alle modalità di conservazione: vendemmia 2007.....	88
4.2.1 Effetto della refrigerazione sui composti di fermentazione	89
4.2.2 Effetto dell'inoculo di lieviti selezionati sui composti di fermentazione.....	91
4.2.3 Effetto dell'inoculo di lieviti selezionati unito alla refrigerazione sui composti di fermentazione	94
4.2.4 Il contenuto di etanolo	96
4.3 Studio dei principali metaboliti di fermentazione nelle vinacce di uva Cabernet-Sauvignon in relazione ai tempi ed alle modalità di conservazione: vendemmia 2007	98
4.3.1 Principali metaboliti volatili di fermentazione	99
4.3.2 Principali esteri acetici ed etilici.....	101

4.4 Studio dei principali composti carbonilici recuperabili nelle vinacce con la distillazione: vendemmia 2005	104
4.4.1 L'analisi qualitativa delle PFBOA-ossime	104
4.4.2 L'analisi quantitativa delle PFBOA-ossime	108
4.4.3 Analisi dei composti carbonilici nelle vinacce	112
4.4.4 Effetto dell'acidificazione sui composti carbonilici nelle vinacce	113
5. RISULTATI E DISCUSSIONE (OCRATOSSINA A)	115
5.1 Indagine sulla presenza di OTA nelle vinacce destinate alla distillazione	116
5.1.1 Campionamento 2006	116
5.1.2 Campionamento 2007	119
6. APPENDICE	121
6. Studio delle vinacce di Incrocio Manzoni 6.0.13	122
7. ALLEGATI	127
8. CONCLUSIONI	137
9. BIBLIOGRAFIA	141

RIASSUNTO

La vinaccia è la materia prima utilizzata per la produzione della grappa. È costituita dalle parti solide dei grappoli d'uva: bucce, vinaccioli ed, eventualmente, raspi. La qualità e le caratteristiche della vinaccia determinano fundamentalmente la qualità e le caratteristiche della grappa. In questa tesi sono stati studiati gli effetti di diversi trattamenti a cui possono essere soggette le vinacce di Prosecco e Cabernet Sauvignon prima di essere stoccate per la fermentazione, sui composti volatili e varietali della vinaccia. I trattamenti indagati sono stati: l'acidificazione, la refrigerazione e l'aggiunta di lieviti selezionati. Sono stati successivamente studiati gli effetti di tali trattamenti sulla composizione chimica quando le vinacce vengono stoccate per tempi superiori ai tempi usuali di fermentazione. Infine, al fine di valutare l'effetto dell'acidificazione anche in relazione al rischio potenziale delle biomasse di fecce e vinacce, sono stati indagati i livelli di Ocratossina A nelle vinacce di diverse varietà d'uva coltivate in zone potenzialmente a rischio.

ABSTRACT

Grape marc is the raw material used in the production of grappa. Grape marc consists of the solid parts of the grape: skins, seeds and, sometimes, grape stalks. Quality and characteristics of the grape marc influence fundamentally the quality and characteristics of grappa. In this thesis the effects of different treatments undertaken on grapes of Prosecco and Cabernet Sauvignon before being stored and fermented, were studied. The following treatments have been investigated: acidification, refrigeration and addition of selected yeasts. Afterwards, the effects of these treatments on the chemical composition of the grape marc at storage times longer than the usual fermentation times, were studied. Finally, in order to evaluate the effect of acidification also in relation to the potential risk of biomasses of lees and grape marc, the concentration of Ochratoxin A has been investigated on the grape marc of different varieties of grapes cultivated in high risks areas.

SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di dottorato, si inserisce all'interno di un più vasto progetto denominato: "Progetto per il miglioramento della qualità delle grappe di Prosecco e di Cabernet Sauvignon. Studio degli effetti dei metodi di trasporto, conservazione, fermentazione e distillazione delle vinacce sulla composizione chimica di vinacce e distillati".

Dalle esperienze e dai dati acquisiti nelle prime fasi del progetto, il presente lavoro aveva come principale obiettivo lo studio degli effetti dei diversi trattamenti a cui possono essere soggette le vinacce di Prosecco e Cabernet Sauvignon prima di essere stoccate per la fermentazione, sulla loro composizione chimica. I trattamenti indagati sono quelli più comunemente impiegati nella produzione di grappe e distillati, quali l'acidificazione e l'inoculo di lieviti selezionati. È stato inoltre studiato l'effetto congiunto della refrigerazione e dell'inoculo di lieviti selezionati. In particolare, sono stati indagati al termine della fermentazione i profili qualitativi e quantitativi dei composti chimici volatili a) prodotti dai lieviti durante la fermentazione, b) varietali, c) composti glicosidati e precursori di aromi.

Sono stati successivamente studiati gli effetti di tali trattamenti sulla composizione chimica quando le vinacce vengono stoccate per tempi superiori a quelli di fermentazione (normalmente di 8-10 giorni), che su scala industriale possono variare da 1 a 4 mesi, fino ad arrivare anche a 6 mesi di stoccaggio.

Parallelamente, al fine di valutare l'effetto dell'acidificazione anche in relazione al rischio potenziale delle biomasse di fecce e vinacce - che possono stazionare in cantina o in distilleria anche per considerevoli periodi di tempo prima di venir distillate - legato allo sviluppo dei funghi ocratossigeni, sono stati indagati i livelli di ocratossina A nelle vinacce di diverse varietà d'uva coltivate in zone potenzialmente a rischio stoccate per 30 giorni.

Nell'ultima fase del lavoro, la ricerca è stata estesa alla varietà Incrocio Manzoni 6.0.13, con lo studio del profilo aromatico delle vinacce fermentate che sono impiegate per la produzione del distillato di uva.

1. INTRODUZIONE

1.1 La Grappa

La grappa è il distillato di vinaccia, tipico sia per la sua origine che per il processo di lavorazione. Essa si caratterizza e si differenzia dagli altri distillati per una tipicità che le deriva dall'evoluzione della materia prima, che induce la formazione di composti caratteristici con notevole influenza organolettica (Usseglio-Tomasset, 1973).

Fino a pochi decenni fa la grappa era considerata un distillato povero; il suo consumo era esteso quasi esclusivamente a diffusione regionale o, al più, nazionale. Nell'ultimo decennio questo prodotto ha rapidamente acquistato maggior spazio anche nel mercato internazionale. Attualmente la grappa è commercializzata nelle reti di distribuzione internazionale ed è entrata di diritto in competizione con i grandi distillati.

La grappa è regolamentata dalle leggi Europee. Il regolamento CEE n. 1576/89 del 29 Maggio 1989 pubblicato sulla G.U. L 160 del 12 giugno 1989 stabilisce le regole generali relative alla definizione, alla designazione ed alla presentazione delle bevande spiritose.

Il D.P.R. del 16 luglio 1997, n. 297 "Regolamento recante norme in materia di produzione e commercializzazione di acquaviti, grappa, brandy italiano e liquori" - capo IV, art. 9 - enuncia che "la denominazione *"grappa"* è riservata esclusivamente all'acquavite di vinaccia ottenuta da materie prime ricavate da uve prodotte e vinificate in Italia, distillate in impianti ubicati nel territorio nazionale, e rispondente alle prescrizioni contenute nel presente regolamento."

Esistono numerose varietà di grappa, e queste dipendono dal tipo e qualità dell'uva (uve rosse, uve bianche, monovitigno), dal processo di lavorazione (fermentazione e distillazione), dalla durata dell'invecchiamento (invecchiata, stravecchia, riserva).

1.1.1 Ciclo produttivo della grappa

Il ciclo di lavorazione della grappa comincia con il conferimento delle vinacce dalle cantine alla distilleria, dove le vinacce vengono stoccate per il periodo di tempo necessario alla fermentazione. Trascorso questo tempo le vinacce vengono distillate per ottenere il prodotto finale: la grappa.

La capacità produttiva degli impianti di distillazione determina il periodo di stoccaggio delle vinacce, così può succedere che anche le vinacce già fermentate vengano immagazzinate per mesi prima di poter essere distillate.

In aggiunta ai già noti effetti delle tecniche di distillazione sulle proprietà organolettiche della grappa, si è recentemente riscontrato che anche le tecniche di gestione della vinaccia nel periodo che intercorre tra la pressatura e la distillazione incidono sulle caratteristiche del prodotto finito.

I momenti critici che vanno ad incidere sulla qualità delle vinacce e quindi della grappa sono:

1) La vendemmia. La scelta del giusto periodo di esecuzione della raccolta dell'uva rimane uno degli aspetti più importanti, per esempio, una sovraturazione, può portare a sensibili perdite nel corredo aromatico dovute soprattutto alle possibili ossidazioni (De Rosa e Castagner, 1994). Un altro fattore di fondamentale importanza sono le temperature alle quali vengono eseguite le operazioni di vendemmia: se esse sono troppo elevate, possono provocare una perdita del potenziale aromatico. Nel caso di vendemmia a macchina si ha l'insorgere di svariate reazioni enzimatiche come ossidazione dei polifenoli, degradazione degli acidi grassi (con formazione di aldeidi dal gusto erbaceo) e dei carotenoidi (Fregoni, 2005), la cui presenza influenza sensibilmente le caratteristiche della futura grappa.

2) La modalità di vinificazione. L'uva può essere lavorata in cantina essenzialmente in due modi: o viene pressata ed immediatamente viene separata la parte solida da quella liquida (vinificazione in bianco dalla quale si ricava la vinaccia vergine, come per l'uva di Prosecco), oppure le due frazioni vengono mantenute assieme dopo la pigiatura almeno durante le prime fasi della fermentazione e vengono separate solo successivamente (vinificazione con macerazione delle bucce, come per l'uva di Cabernet Sauvignon).

In quest'ultimo caso la vinaccia arriva alla distilleria già fermentata e pronta per essere distillata. Altri parametri importanti per la qualità delle vinacce sono le pressioni utilizzate per la pressatura delle uve, la temperatura di macerazione delle bucce, i tempi che intercorrono tra la pigiatura dell'uva e la consegna delle vinacce alla distilleria.

3) Lo stoccaggio della vinaccia.

Corretti metodi di conservazione della vinaccia sono necessari poiché non tutta quella che viene consegnata in distilleria può essere immediatamente distillata.

I sistemi di stoccaggio tradizionali della vinaccia prevedono l'uso di:

- Sacchi sigillati di plastica della capacità di 40-50 Kg . Questo metodo è utilizzato soprattutto per piccole partite di pregio (solitamente per vinacce di ottima qualità, con una buona percentuale di umidità e solitamente già completamente fermentate).

- Contenitori in cemento . Trattasi di "vasche" interrate o sopraelevate chiuse su tre lati con il quarto lato aperto per consentire le operazioni di deposito della vinaccia da parte dei mezzi meccanici; i camion possono scaricare direttamente nella vasca la vinaccia che quindi viene sistemata mediante delle ruspe e pressata. Completato il riempimento, la vinaccia viene ricoperta con dei teli di nylon immobilizzati lungo i lati con lo spargimento di sabbia. Questo metodo è quello maggiormente utilizzato per grosse quantità di materia prima.

Un nuovo sistema di stoccaggio utilizzato soprattutto nelle grandi distillerie prevede l'uso del Grappasystem®. Questa macchina è costituita da un convogliatore all'interno del quale viene caricata la vinaccia e che autonomamente provvede all'insilamento in sacconi di plastica (lunghezza 50 m X 6 m diametro). Questo tipo di insilamento ha in vantaggio di compattare bene le vinacce e quindi ridurre le eventuali sacche d'aria, portando ad un miglioramento della composizione volatile della grappa. Inoltre permette lo sfruttamento di tutto lo spazio non coperto disponibile in distilleria per depositare le vinacce durante il periodo di maggior conferimento.

Una buona conservazione della vinaccia è quella che porta ad una minore perdita di alcol per ossidazione ed alle migliori caratteristiche organolettiche della grappa da essa ottenuta. Condizioni di conservazioni inappropriate portano ad una diminuzione del contenuto di etanolo dal 10 al 20% e ad un aumento del metanolo del 15% (Usseglio-Tomasset, 1971; Silva e Malcata, 1998)

Le regole generali per un buon stoccaggio delle vinacce, indipendentemente dal sistema utilizzato, sono la minimizzazione della quantità di ossigeno che può entrare in contatto con il prodotto ed il raggiungimento di un'acidità ottimale. Questi si ottengono normalmente attraverso il compattamento delle vinacce per eliminare sacche di aria (ossigeno) e particolari tecniche di acidificazione che permettono il raggiungimento di valori di pH prossimi a 3.

Un ambiente acido è stato identificato come un efficace fattore di inibizione nei confronti dei batteri; essi infatti vengono fortemente inattivati ad un valore di pH prossimo a 3, mentre si trovano nelle loro condizioni ottimali di sviluppo quando il pH raggiunge valori superiori a 4. Per quanto riguarda i lieviti è noto che essi fermentano più agevolmente a pH maggiori, tuttavia si è notato che una buona acidità ha azione selettiva

nei confronti dei blastomiceti presenti nella vinaccia, e contemporaneamente favorisce un decorso regolare della fermentazione con maggiore produzione di composti volatili, che contribuiscono a migliorare la qualità del prodotto (Versini e Inama, 1981; Versini, 1995).

Poiché i fenomeni che si verificano a carico della vinaccia prima della distillazione sono di cruciale importanza nel determinare la qualità della futura grappa, sono stati pertanto sviluppati processi di stoccaggio sempre più attenti a preservare ed a proteggere al meglio la vinaccia. Oltre all'acidificazione è invalso l'utilizzo di lieviti selezionati ed attivanti di lieviti per condurre al meglio le fermentazioni esaltando le caratteristiche varietali del prodotto di partenza.

1.1.2 Costituenti della grappa

La grappa è caratterizzata da un gran numero di composti volatili. Alcuni provengono dall'uva di partenza e sono quindi legati alla varietà dell'uva, come i terpenoli, norisoprenoidi e benzenoidi (Di Stefano, 1986; Versini *et al.*, 1994a; Flamini, 2005), altri come gli alcoli e gli esteri si formano durante la fermentazione della vinaccia (Versini, 1995), altri come gli acetali si formano durante la distillazione a causa delle alte temperature e dell'alta concentrazione di etanolo (Usseglio-Tomasset, 1970; Misselhorn, 1975).

Le prime due categorie di composti verranno trattati nei paragrafi 1.3 e 1.4.

1.1.3 La grappa di Prosecco

La notevole produzione di uva Prosecco nella provincia di Treviso comporta, inevitabilmente, una notevole produzione di vinaccia di questa varietà, fino ad arrivare ad esserne un prodotto rappresentativo. Nell'ultimo decennio si è poi arrivati alla completa valorizzazione delle grappe monovitigno, ed è in questo panorama che si inserisce la grappa di Prosecco (Boatto *et al.*, 2003).

La grappa di Prosecco è caratterizzata dai contenuti considerevoli di composti volatili varietali della classe dei terpenoli (linalolo, geraniolo, furan linalolo ossidi, nerolo e citronellolo) e da contenuti rilevanti di esteri salicilici, di farnesolo. di vitispirani (Flamini *et al.*, 2002a).

1.1.4 La grappa di Cabernet Sauvignon

Cabernet Sauvignon è una ben nota varietà di uva rossa, coltivata in diverse parti del mondo, Europa (Francia), California , Sud Africa, Cile, Australia. La grappa ottenuta da queste uve presenta il profilo di una grappa non aromatica caratterizzata da contenuti limitati di composti varietali (Di Stefano e Borsa, 2006; Ruberto *et al.*, 2008).

1.2 La vinaccia

La vinaccia è definita dalla legislazione italiana come il complesso delle parti solide che rimane dopo la pigiatura e la pressatura dell'uva, costituito da bucce, vinaccioli ed eventualmente dai raspi (Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998). La presenza o meno del raso dipende dalle tecniche di vinificazione adottate in cantina. Per lungo tempo, considerata sottoprodotto della vinificazione, la vinaccia rappresenta in realtà la materia prima necessaria alla produzione della grappa.

1.2.1 Tipologie di vinaccia

Le vinacce che pervengono in distilleria possono essere classificate a seconda del contenuto alcolico e del processo di vinificazione subito dalle uve, in 3 diverse tipologie: vinacce vergini, fermentate completamente e parzialmente fermentate.

Le **vinacce vergini o vinacce dolci** sono quelle provenienti dalla torchiatura diretta delle uve destinate alla vinificazione in bianco (le parti solide dell'uva vengono subito separate dal mosto dopo la pigiatura). Esse contengono soprattutto zuccheri e pochissimo alcool.

Le vinacce vergini sono impregnate di mosto e debbono fermentare nei sili prima di poter essere distillate (Usseglio-Tomasset, 1973). Per questo motivo una volta giunte in distilleria vengono subito insilate in contenitori chiusi in modo da evitare perdite alcoliche dovute ad un decorso fermentativo ad opera di lieviti selvaggi e fermentazioni batteriche responsabili di odori sgradevoli. Le vinacce vergini sono caratterizzate da un odore erbaceo, colore vivo e buona consistenza al tatto (De Rosa e Castagner, 1994).

Le **vinacce fermentate** sono quelle ottenute per torchiatura da vinificazione con macerazione (vinificazione in rosso) e pertanto hanno svolto la fermentazione alcolica assieme al mosto, pur conservando ancora qualche residuo di zucchero. Hanno ceduto al vino una notevole parte del patrimonio aromatico varietale, del colore e dei tannini. È opportuno distillarle in tempi molto brevi, limitando al minimo il periodo di insilamento. Le vinacce fermentate sono caratterizzate da sensazione olfattiva vinosa e da un colore scarico.

Le **vinacce parzialmente fermentate** presentano caratteristiche intermedie rispetto alle vinacce vergini ed alle totalmente fermentate.

1.2.2 Composizione della vinaccia

La composizione chimica della vinaccia subisce variazioni con l'andamento stagionale, la varietà del vitigno, il luogo di provenienza, l'epoca della vendemmia e le tecniche di vinificazione utilizzate (De Rosa e Castagner, 1994). I vinaccioli rappresentano in peso il 25 % della vinaccia e vengono spesso considerati componenti passivi della massa, sia nel processo fermentativo che in quello di distillazione (De Rosa e Castagner, 1994). Ciò è essenzialmente dovuto al fatto che possedendo una robusta epidermide ed una particolare forma a cuneo difficilmente si rompono durante le fasi di lavorazione. La buccia, o epicarpo, è formata da un epidermide di 6-10 strati di cellule appiattite che la rendono sia robusta che elastica; all'esterno vi aderisce una sostanza cerosa, la pruina, che costituisce il substrato ideale sia per i lieviti sia per tutti gli altri microrganismi che intervengono nel corso della fermentazione alcolica.

I contenuti medi delle sostanze che si trovano nella vinaccia sono riportati in tabella 1.1.

SOSTANZA	% IN PESO
<i>Acqua</i>	50-70%
<i>Cellulosa</i>	10-20%
<i>Zuccheri</i>	6-8%
<i>Grassi</i>	2-4%
<i>Acidi organici</i>	1-2%
<i>Tannini</i>	1-2%
<i>Sostanze minerali</i>	1-2%

Tabella 1.1 Composizione media della vinaccia (De Rosa e Castagner, 1994).

Acqua: come in tutti i tessuti vegetali è presente in grande quantità anche nelle vinacce. Il suo contenuto è legato allo stadio di maturità al momento della vendemmia e alle condizioni vegetative della pianta. Per valutarne ed esprimerne la quantità contenuta sono stati ideati due indici: contenuto percentuale in umidità della buccia e valore di umidità della vinaccia. Il primo indica la quantità di acqua presente nella buccia; il secondo, molto più importante e significativo, dipende esclusivamente dalla quantità di mosto o vino che viene lasciata nella massa delle vinacce stesse.

Cellulosa: questo polimero del β -glucosio è presente in percentuale del 10-20% nelle bucce. Le caratteristiche peculiari di questa sostanza sono l'insolubilità in acqua e la scarsa conducibilità termica.

Zuccheri: dal punto di vista chimico, gli zuccheri delle vinacce sono esattamente gli stessi di quelli presenti nell'acino, glucosio e fruttosio. Il rapporto glucosio/fruttosio è di circa 0.9:1 al momento della maturazione fisiologica. I lieviti nella loro demolizione attaccano preferibilmente il glucosio per cui, verso il termine della fermentazione alcolica, il 75% dello zucchero presente ancora nelle vinacce è costituito da fruttosio.

Acidi organici: I principali acidi organici presenti nella vinaccia sono: acido tartarico, acido malico, acido citrico e acido succinico.

L'acidità è dovuta principalmente all'acido tartarico, gli altri acidi sono salificati da potassio, calcio e magnesio. L'acidità delle vinacce comunque varia in funzione di vari aspetti, i più importanti sono: quantità di mosto che rimane inglobata nelle vinacce, varietà dell'uva e andamento stagionale (per esempio annate piovose o aride corrispondono ad una bassa acidità) (De Rosa e Castagner, 1994). Buoni valori di acidità determinano una fermentazione più regolare, questo sia grazie ad un'azione selettiva operata sui lieviti che interessano la fermentazione alcolica, sia per un'azione inibente sui batteri che demoliscono l'acido tartarico ed altri acidi organici come l'acido malico.

L'acido L(-)malico è presente naturalmente nelle uve ed è il substrato sia di lieviti che di batteri malolattici, quindi la sua concentrazione può variare durante la lavorazione dell'uva e delle vinaccia.

L'acido lattico si può formare da due fonti: come sottoprodotto della fermentazione dei lieviti o come prodotto principale della fermentazione malolattica (ML) dell'acido malico. La fermentazione dei lieviti produce un acido lattico racemo (una miscela di isomeri D ed L); i batteri malolattici producono esclusivamente l'acido L(+)lattico dall'acido L(-)malico. Gli acidi fino ad ora menzionati costituiscono l'acidità fissa delle vinacce.

L'acidità volatile è data dall'acido acetico.

L'acido acetico viene formato durante la fermentazione dei lieviti ed è il risultato di una reazione secondaria dell'ossidazione dell'acetaldeide. Esso viene anche formato dallo spoilage degli acetobacter in condizioni anaerobiche: i batteri ossidano l'etanolo ad acido acetico a concentrazioni che dipendono dall'esposizione all'aria e dal tempo di esposizione (Margalit, 2004).

Composti polifenolici: nelle vinacce sono contenute essenzialmente due classi di questi composti, ovvero le sostanze tanniche ed i pigmenti coloranti. I pigmenti coloranti dell'uva sono contenuti nelle bucce, ed assieme agli altri composti polifenolici conferiscono alle vinacce una buona protezione contro l'ossidazione durante lunghi periodi di conservazione. I tannini sono presenti nelle bucce in percentuali del 1-2 % e nei vinaccioli in percentuali del 5-6 %.

Sostanze pectiche: sono presenti sia nelle vinacce che nel mosto. Esse sono costituite da catene lineari di condensazione di acido galatturonico le cui funzioni acide possono essere in parte libere ed in parte esterificate con alcol metilico. Durante il periodo di stoccaggio ad opera di enzimi specifici, le pectinmetilesterasi, e durante la distillazione con le alte temperature, una frazione di alcol metilico si libera dalla macromolecola e passa al distillato; tale reazione è facilitata nelle vinacce dall'elevato valore di pH. La quantità di alcol metilico presente nelle vinacce fermentate è in stretta relazione con il vitigno di appartenenza e con il tipo di lavorazione dell'uva in cantina. Nelle uve bianche, che solitamente arrivano in cantina non fermentate, la formazione di metanolo è rapida quasi quanto la fermentazione alcolica. Nelle uve rosse sono necessari 30-40 giorni di insilamento per avere una liberazione del 70% di metanolo rispetto al totale che viene liberato quasi tutto a circa 120 giorni. Per un basso contenuto di metanolo, si dovrebbero avere vinacce umide con contenuti di etanolo da svolgere o svolti del 5% (v/v): queste hanno a fine fermentazione un contenuto di metanolo sempre al di sotto del limite legale stabilito nella grappa di 1g/100mL di alcol anidro (De Rosa e Castagner, 1994).

Sostanze aromatiche: Le bucce sono la sede naturale delle sostanze aromatiche varietali. Queste sostanze sono presenti in dosi maggiori nelle bucce che nel succo dell'acino: nella buccia del Cabernet Sauvignon sono contenuti il 38% dei composti volatili liberi ed il 64% di quelli glicosidati (Gomez *et al.*, 1994), la stessa percentuale si ha anche nelle varietà a bacca bianca (Wilson *et al.*, 1986). Le vinacce contengono quindi la grande maggioranza delle sostanze aromatiche, sia libere che glicosidate, e costituiscono una materia prima preziosa al fine di ottenere grappe ben dotate di aroma.

Composti di fermentazione: si formano nella vinaccia durante la fermentazione ad opera di microorganismi come lieviti e batteri. Una più dettagliata descrizione delle sostanze aromatiche e dei composti di fermentazione è trattata nei paragrafi 1.3 e 1.4.

1.3 Componenti aromatici varietali dell'uva e delle vinacce

1.3.1 Terpeni

I terpeni costituiscono una grande famiglia di composti (circa 4000), di cui suscettibili di essere odorosi sono i monoterpeni (composti a 10 atomi di carbonio) e i sesquiterpeni (composti a 15 atomi di carbonio), formati rispettivamente a partire da due e tre unità isopreniche. I monoterpeni esistono sottoforma di idrocarburi semplici (limonene, mircene, ecc.), di aldeidi (es. nerale, geraniale, ecc.), alcoli (es. linalolo, geraniolo, ecc.), acidi (es. acido geranico), esteri (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998).

La biosintesi dei composti terpenici parte dall'acetilCoA e arriva, attraverso l'isopentenil pirofosfato e il dimetilallil pirofosfato, al geranil pirofosfato o al neril pirofosfato (Manitto, 1980). In genere si ipotizza che i terpeni ciclici si formino a partire dal neril pirofosfato, mentre quelli aciclici dal geranil pirofosfato.

Nell'uva sono stati trovati soprattutto composti terpenici mono, di e triidrossilati (Williams *et al.*, 1980). I terpeni idrossilati si trovano nell'uva soprattutto sotto forma glicosidata (Di Stefano, 1992; Williams *et al.* 1982 a,b; Voirin *et al.* 1992).

I terpenoli (terpeni idrossilati) vengono divisi in tre categorie partendo dai tre alcoli monoidrossilati linalolo, geraniolo e citronellolo:

- **sottoclasse del linalolo**: linalolo, ossidi furanici del linalolo, ossidi piranici del linalolo, 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diolo (diolo1), 2,6-dimetil-7-octen-2,6-diolo (endiolo), 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diolo (diolo2), 2,6-dimetil-7-octen-1,6-diolo (8-OH-6,7-diidro linalolo), E e Z 2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diolo (8-OH linalolo), 2,6-dimetil-7-octen-2,3,6-diolo (triolo);

- **sottoclasse del geraniolo**: geraniolo, citronellolo, 3,7-dimetil-1,7-ottandiolo (idrossi-citronellolo), e-3,7-dimetil-2-octen-1,7-diolo (idrossi geraniolo), acido geranico;

- **sottoclasse del nerolo**: nerolo, α -terpineolo, 2-idrossi-1,8-cineolo, Z-3,7-dimetil-2-octen-1,7-diolo (idrossi nerolo), p-ment-1-ene-6,8-diolo, p-ment-1-ene-7,8-diolo.

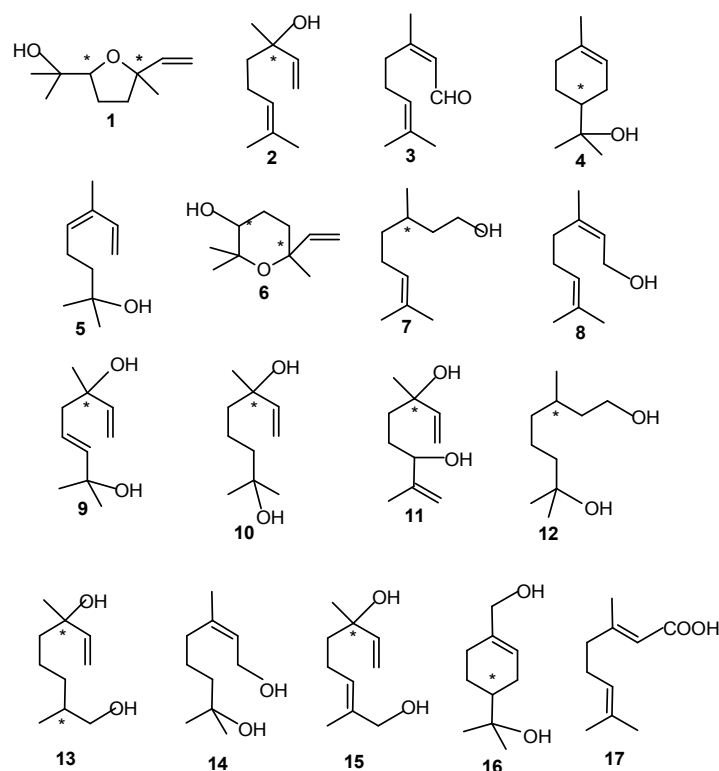


Figura 1.1 Principali terpenoli presenti nelle uve e nelle vinacce.

1. furan linalolo ossido (trans e cis); 2. linalolo; 3. nerale (Z) e geraniale (E); 4. α -terpineolo; 5. trans-ocimeno; 6. piran linalolo ossido (trans e cis); 7. citronello; 8. nerolo (Z) e geraniolo (E); 9. diendiolo I; 10. endiolo; 11. diendiolo II; 12. idrossi-citronello; 13. 8-idrossi diidrolinalolo; 14. 7-idrossinerolo (Z) e 7-idrossi geraniolo (E); 15. 8-idrossilinalolo (trans e cis); 16. 7-idrossi- α -terpineolo; 17. acido geranico.

Tutti questi composti si trovano nell'uva e nei diversi tessuti della pianta, oltre che in forma libera, anche sotto forma glicosidata (Williams *et al.* 1982, Günata *et al.* 1985a, Versini *et al.*, 1994a): β -D-glucopiranosidi, 6-O- α -L-ramnofuranosil- β -D-glucopiranosidi, 6-O- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranosidi e 6-O- β -L-apiofuranosil- β -D-glucopiranosidi, sebbene non si possano escludere altre strutture glucidiche. Nelle cellule della vite si ipotizza che il linalolo venga epossidato per via enzimatica, da questo intermedio non isolabile si ha per idrolisi la formazione degli ossidi furanici e piranici del linalolo e del triolo che verrebbero quasi integralmente glicosilati. La formazione dei due isomeri dell'8-idrossilinalolo, sarebbe invece ricondotta all'idrossilazione diretta del linalolo mediata da enzimi specifici (ω -idrossilasi). La formazione dell' α -terpineolo e dei mentendioli si dovrebbe ricondurre alla ciclizzazione enzimatica del nerolo o del linalolo. Il tenore dei terpeni liberi e glicosidati aumenta nel frutto con il grado di maturazione; con la sovraturazione quello dei liberi diminuisce fino ad essere insignificante nell'uva appassita, mentre quello dei glicosidi subisce ancora un incremento per poi diminuire anch'esso in fase di appassimento (Di Stefano *et al.*, 1995).

La buccia è più ricca in monoterpenoli liberi e legati rispetto al succo: il geraniolo e nerolo liberi sono più abbondanti nella buccia rispetto alla polpa e al succo, mentre il linalolo libero e il diendiolo I (forma ossidata dell'idrossi-trienolo) sono distribuiti uniformemente tra la buccia ed il succo. Il nerolo, geraniolo, citronellolo vengono chiamati monoterpenoli della buccia (Versini *et al.*, 1992) perché sono presenti in essa in concentrazione maggiore.

I terpenoli legati sono contenuti, invece, in quantità pressoché simile nelle differenti parti dell'acino. Trans e cis furanlinalolo ossido sono presenti principalmente come glicosidi sia nella buccia sia nel succo, mentre cis e trans piran linalolo ossido sono contenuti principalmente nel succo in forma libera (Wilson *et al.*, 1986). La presenza dei volatili legati glicosidicamente è 2-8 volte maggiore di quella dei corrispondenti aromi liberi (Günata *et al.* 1985a, 1985b). Questo, insieme alle basse soglie olfattive ed alle proprietà sensoriali degli agliconi, rende i composti glicosidati una fonte potenziale di volatili odorosi durante i processi di lavorazione del frutto (Maicas e Mateo, 2005). Alcuni agliconi sono già odorosi quando vengono rilasciati dai glicosidi. Questo è il caso di monoterpeni come geraniolo, nerolo e linalolo, che possiedono attributi floreali e basse soglie olfattive dell'ordine dei 100-400 ppb (Rapp e Mandery, 1986). I microorganismi sono in grado di sintetizzare i composti terpenici (Hock *et al.*, 1984) ma la formazione da *Saccharomyces cerevisiae* non è ancora stata osservata (Rapp e Mandery, 1986). Tre categorie di terpeni esistono nei tessuti delle piante: 1) i composti liberi dominati da linalolo, geraniolo e nerolo 2) le forme polioidrossilate dei monoterpeni libere e prive di odore 3) le forme glicosidate dei monoterpeni che non apportano nessun diretto contributo all'aroma dell'uva (Maicas e Mateo 2005).

Alcuni dei terpenoli legati possono venir liberati chimicamente (Skouromounis e Sefton, 2000), sia dall'attività glicosidasi naturale delle uve o da lieviti e batteri durante le fasi della vinificazione (Günata *et al.* 1985a, 1985b; Boido *et al.*, 2002). La velocità di idrolisi acida è strettamente dipendente dalla temperatura e dal pH del mezzo e dalla struttura dell'aglicone. Nel vino si è osservato che i glicosidi di alcoli terziari come linalolo, linalolo ossidi e α -terpineolo sono più facilmente idrolizzati di quelli di alcoli primari come il geraniolo ed il nerolo (Günata *et al.*, 1985b). Terpenoli non volatili e non odorosi aventi un livello di ossidazione maggiore del linalolo e con caratteristiche di idrofilicità, come l' α -terpineolo, l'endiolo, gli ocimenoli con basse soglie olfattive possono venir formati per trasformazioni chimiche durante la fermentazione (Williams *et al.*, 1980).

Mentre l'idrolisi enzimatica dei monoterpeni e della vanillina dai corrispondenti β -D-glucosidi ad opera di β -glucosidasi era già nota agli inizi del 1900, l'idrolisi enzimatica di precursori diglicosidici è stata riportata per la prima volta nel 1988 da Günata *et al.*

La reazione di idrolisi degli agliconi dai disaccaridi catalizzata da enzimi può essere sequenziale (in due steps) (figura 1.2) o in uno step solo ad opera di diglicosidasi.

In modo sequenziale nel primo step una delle seguenti esoglicosidasi: α -arabinofuranosidasi, α -ramnopiranosidasi, α -arabinopiranosidasi o β -apiofuranosidasi rompe il legame disaccaridico interno liberando i corrispondenti zuccheri ed i β -D-glucosidi. In un secondo step, una β -D-glucosidasi catalizza l'idrolisi del β -D-glucoside liberando il corrispondente aglicone ed il glucosio (Günata *et al.*, 1988).

Nella modalità ad un step, una diglicosidasi catalizza la rottura dell'aglicone dal corrispondente diglicoside (Günata *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1997; Sarry *et al.*, 2003).

Il meccanismo di idrolisi enzimatica dei glicosidi si presume avvenga in maniera simile della rottura catalizzata dagli acidi dei legami glicosidici, che implicano un intermedio carbocationico (Sinnot, 1990). Si pensa che gli amminoacidi istidina, acido glutammico ed aspartico siano coinvolti nell'idrolisi enzimatica.

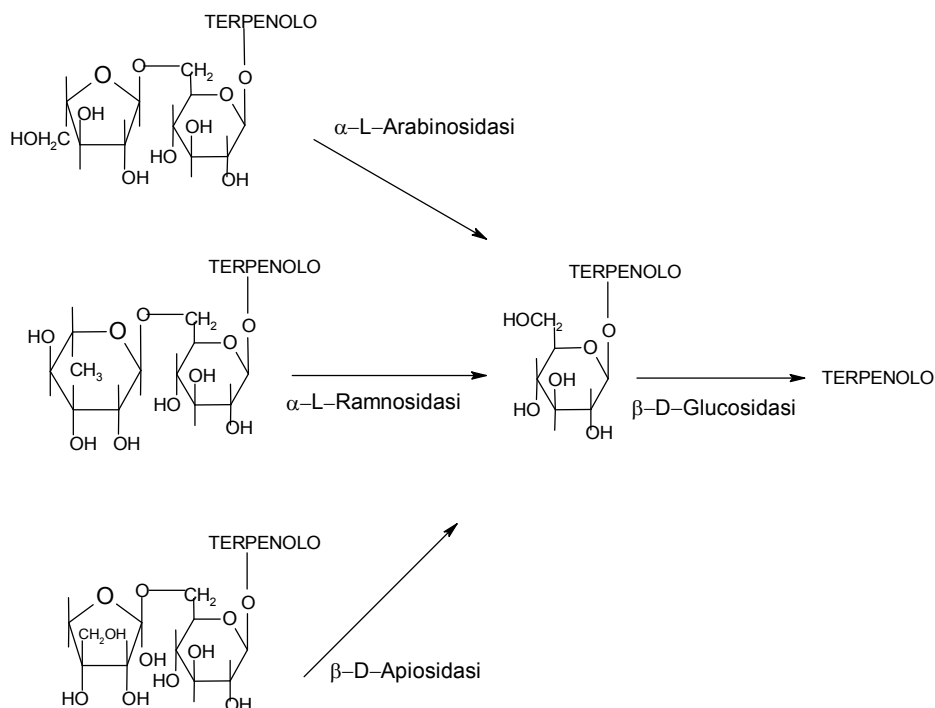


Figura 1.2 Schema di idrolisi enzimatica sequenziale di precursori aromatici disaccaridici (Maicas e Mateo, 2005).

1.3.2 Norisoprenoidi

I norisoprenoidi sono molecole a 13 atomi di carbonio derivati dalla degradazione dei carotenoidi e delle xantofille (Di Stefano, 1996; Wirth *et al.*, 2001). (figura 1.3)

I principali carotenoidi nelle uve mature sono il β -carotene e la luteina, che rappresentano l'85% del totale; composti minori, ma presenti a livelli rilevabili sono la neoxantina e la violaxantina (Razungles *et al.*, 1993; Baumes *et al.*, 2002). Essi sono presenti principalmente nelle bucce che costituiscono il principale materiale della vinaccia utilizzata per la produzione delle grappa.

È stato trovato che la proporzione di β -carotene nelle bucce è tre volte maggiore che nelle polpe (Guedes de Pinho *et al.*, 2001).

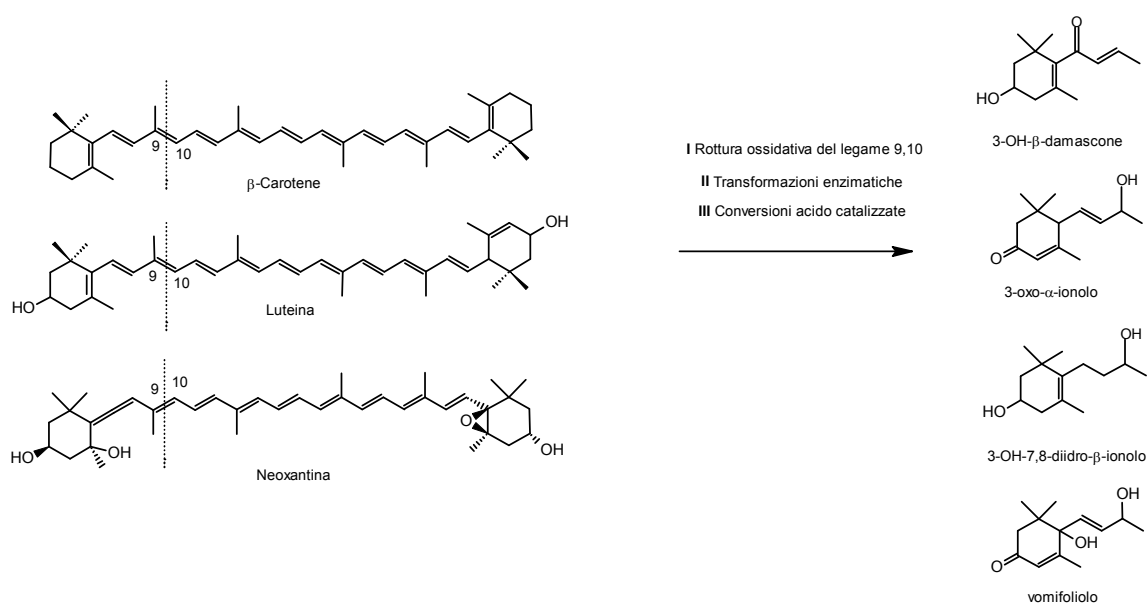


Figura 1.3 Schema della degradazione dei carotenoidi con formazione di norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio (C13-norisoprenoidi).

I norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio, sono caratterizzati da aromi caratteristici o possono essere precursori di aromi e dare un importante contributo all'aroma del vino e dei distillati.

Dal punto di vista chimico i norisoprenoidi si dividono in due gruppi: i megastigmani e i non megastigmani. I megastigmani hanno una struttura composta da un ciclo a sei atomi di carbonio sostituito da gruppi metilici sui carboni 1 e 5 e da una catena alifatica a quattro atomi di carbonio, insatura, sul carbonio C6 del ciclo. I megastigmani ossigenati sul carbonio C7 vengono inseriti nella serie damascone, di cui il composto più importante è il β -damascenone, dalla nota complessa di fiori, frutti esotici e miele, mentre

quelli ossigenati sul carbonio C9 sono inseriti nella serie ionone, ove il composto più importante è il β -ionone, dall'odore caratteristico di violetta. I non megastigmani sono altri norisoprenoidi a 13 atomi di carbonio che comprendono alcuni composti molto odorosi, tra cui il TDN (1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene) dalla nota di kerosene, vitispirani ed actinidoli, dall'odore di canfora (Winterhalter *et al.*, 1990; Strauss *et al.*, 1987).

I norisoprenoidi sono generalmente presenti nell'uva sottoforma di precursori poli-idrossilati e glicosidati non volatili. L'esigenza della idrossilazione e della glicosilazione dei composti terpenici e norisoprenoidici può dipendere dal fatto che in genere i composti non idrossilati sono tossici per i tessuti della pianta, mentre quelli idrossilati e glicosilati essendo idrosolubili possono essere meno tossici e più facilmente trasportabili e stoccabili in attesa di un loro utilizzo per qualche esigenza della pianta (ad es. come richiami sessuali, come antivirali, come antibatterici, come regolatori di crescita). I glicosidi dei norisoprenoidi non sono idrolizzati dalle glicosidasi dell'uva e del lievito ma da glicosidasi esogene fungine (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

In mezzo acido, diversi norisoprenoidi ossigenati, di solito poco odorosi, possono subire reazioni acido-catalizzate da cui hanno origine megastigmani come il β -damascenone oppure non megastigmani come il TDN o vitispirani e actinidoli (Strauss *et al.*, 1986).

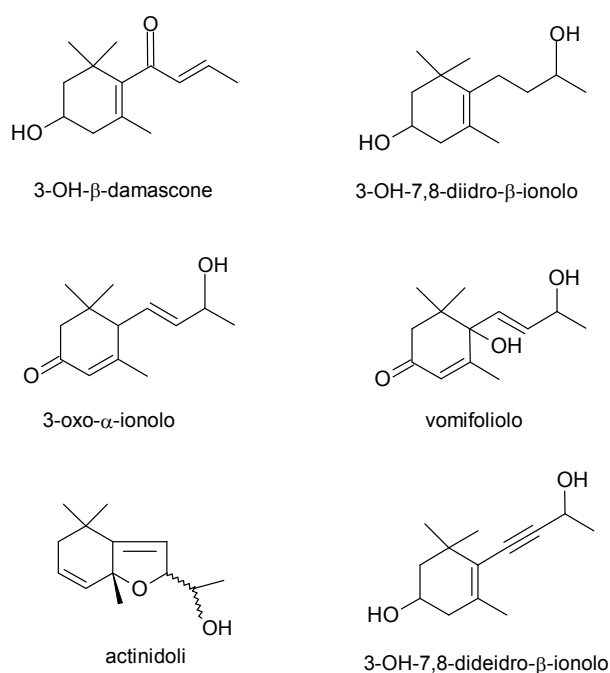


Figura 1.4 Struttura di alcuni C13-norisoprenoidi trovati nelle uve e nelle vinacce.

1.3.2.1 Precursori di C13-norisprenoidi

Alcuni norisprenoidi (3-OH- β -damascone, 3-oxo- α -ionolo e vomifoliolo) esistono sia in forma libera che glicosidata (Razungles *et al.*, 1993)

In ambiente acido, alcuni norisprenoidi ossigenati poco odorosi vengono trasformati in composti con sentori caratteristici (figure 1.5 e 1.6).

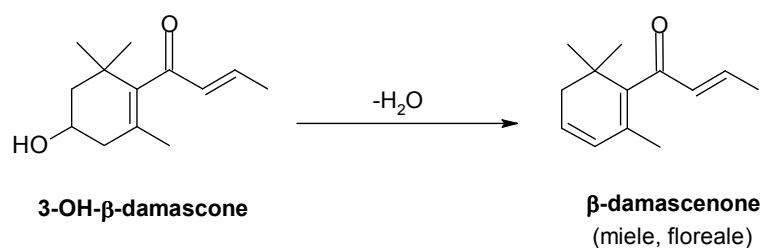


Figura 1.5 Formazione del β -damascenone dal precursore 3-OH- β -damascone.

Nel vino sono presenti diversi precursori del β -damascenone (Williams *et al.*, 1982c). Il β -damascenone è accompagnato sempre dal 3-OH- β -damascone, un composto privo di odore, il rapporto tra i due è di solito 1:9 (Versini *et al.*, 2002).

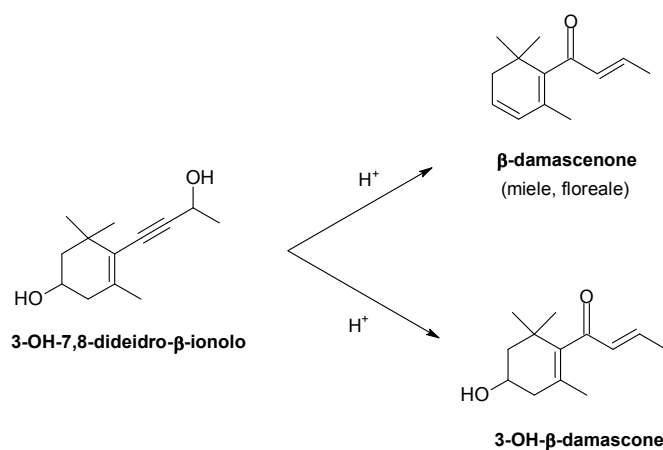


Figura 1.6 Formazione di β -damascenone e 3-OH- β -damascone dal precursore 3-OH-7,8-dideidro- β -ionolo.

Il 3-oxo- α -ionolo viene degradato in mezzi acidi a megastigma-4,6,8-trien-3-oni (5 isomeri) (Aasen *et al.*, 1972; Strauss *et al.*, 1987; Winterhalter e Schreirer, 1988) (Figura 1.7).

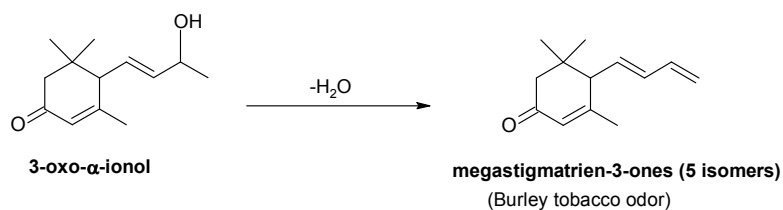


Figura 1.7 Formazione di cinque isomeri del megastigma-3-one dal precursore 3-oxo- α -ionolo

Il vomifoliolo che è resistente a pH 3, esso viene ridotto a 7,8-diidrovomifoliolo (Winterhalter e Schreier, 1988) a pH inferiori.

In figura 1.8 è mostrata la via di degradazione proposta per il vomifoliolo.

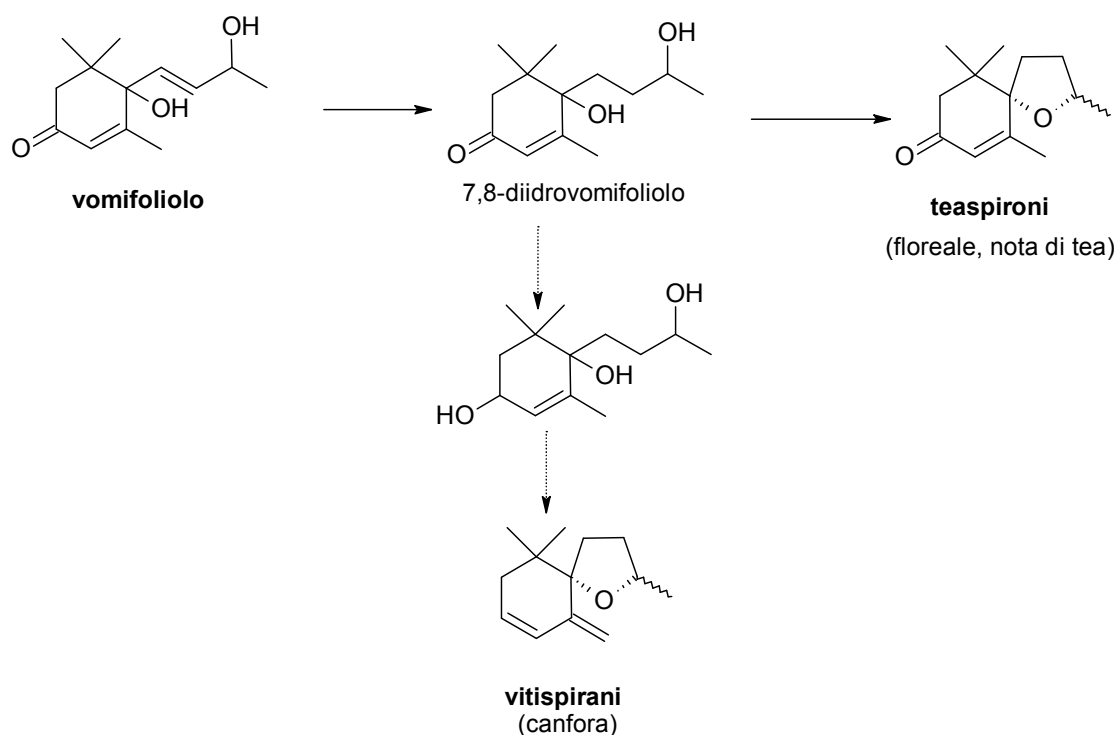


Figura 1.8 Via di formazione dei teaspironi e dei vitispirani a partire dal 7,8-diidrovomifoliolo (Winterhalter e Schreier, 1988).

1.3.3 Benzenoidi

La biosintesi di questi composti è legata a quella dei composti fenolici e delle lignine e risulta controllata dalla varietà in quanto, come è noto dallo studio dei composti fenolici, l'attività che presiede alla idrossilazione e alla metossilazione dell'anello benzenico B degli antociani dipende dalla cultivar.

Alla classe dei benzenoidi fanno parte composti con la comune caratteristica di avere un anello benzenico e comprende: 1) composti ad anello benzenico non sostituito (come l'alcol benzilico, β -feniletanolo, benzaldeide), 2) composti con un ossidrile sostituente (come salicilato di metile, 4-idrossibenzaldeide), 3) composti con due ossidrili sostituenti (derivati dell'acido salicilico), 4) composti con un gruppo funzionale guaiacolo (vanillina, alcol vanillico, ecc.), 5) composti con un ossidrile e due metossili sostituenti (come la siringaldeide) (Di Stefano, 1996).

In figura 1.10 è mostrata la struttura chimica di tre composti benzenoidi.

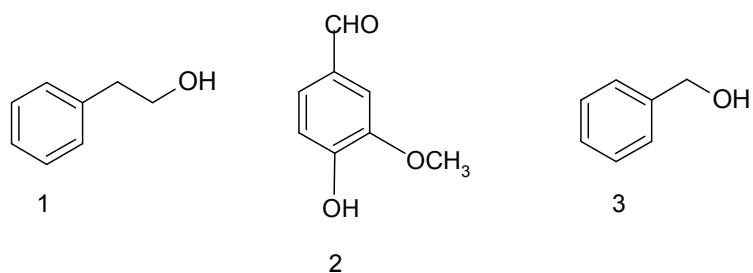


Figura 1.9 Composti benzenoidi. **1.** β -feniletanolo, **2.** vanillina, **3.** alcol benzilico.

1.4 Composti di fermentazione presenti nelle uve e vinacce

1.4.1 Alcoli superiori

Gli alcoli superiori sono alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio. La presenza di alcoli superiori nei prodotti fermentati è nota da molto tempo e sono stati proposti alcuni meccanismi per la loro formazione. Essi sono prodotti dai lieviti partendo dagli zuccheri ma la fonte principale sono gli amminoacidi.

Nella via di reazione proposta da Ehrlich l'amminoacido viene ossidato ad imminoacido da una deidrogenasi, quest'ultimo viene trasformato per idrolisi in α -chetoacido che poi viene decarbossilato ad aldeide (reazione di decarbossilazione) che a sua volta viene ridotta al corrispondente alcol (reazione di riduzione) dall'alcol deidrogenasi (ADH). Il risultato finale è che un amminoacido con n atomi di carbonio viene trasformato in un alcol con $n-1$ atomi di carbonio (Margalit, 2004). Secondo questa via biosintetica dall'amminoacido leucina si forma il 3-metil-1-butanol, dall'isoleucina il 2-metil-1-propanolo, dalla treonina l'1-propanolo, dalla fenilalanina il 2-feniletanol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Margalit, 2004).

I principali alcoli superiori che si trovano nelle vinacce sono: 1-propanolo (n-propanolo), 2-propanolo, 2-metil-1-propanolo (isobutanolo), 3-metil-1-butanol (isoamilico inattivo), 2-metil-1-butanol (isoamilico attivo), 1-esanol (n-esanol), alcol 2-feniletilico (β -feniletanol). La concentrazione di questi alcoli può aumentare in seguito ad alterazioni microbiche causate da lieviti o batteri. A causa della loro volatilità essi si trovano anche nei distillati a cui apportano caratteri particolari. Gli alcoli a sei atomi di carbonio, esanol ed esenoli, provengono dall'uva, sono responsabili di odori erbacei e sono formati al momento della disorganizzazione dei tessuti vegetali (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Nelle grappe gli alcoli superiori intesi come l'insieme di n-propanolo, sec-butanolo (2-butanolo), isobutanolo, 3-metil-1-butanol (isoamilico inattivo) e 2-metil-1-butanol "formano una specie di nota base dell'aroma desiderabile di un certo prodotto" (Versini e Margheri, 1979).

1.4.1.1. 2-butanolo

Il 2-butanolo è una sostanza che si forma nel corso della conservazione delle vinacce nei silos ed è presente nella materia prima solo in tracce. La formazione di questo

alcol è in relazione all'attività di batteri anaerobici o microaerofili (Usseglio-Tomasset, 1971). Esso costituisce un elemento di distinzione tra i distillati di vinaccia, in cui è costantemente presente ed i distillati di vino dove non deve superare i 5 mg % alcol anidro.

1.4.1.2 1-propanolo

Questo alcol nelle grappe è il meno rappresentato tra gli alcoli superiori, contribuendo in media con il 10.8%. Un suo incremento sensibile si ha quando si verifica un aumento importante di 2-butanolo (Usseglio-Tomasset, 1978).

1.4.2 Metanolo

Questo alcol non è un prodotto diretto della fermentazione. La fonte di metanolo è la pectina, un co-polimero dell'acido galatturonico e del suo estere metilico, dove l'esterificazione avviene nel 10-60% delle unità monomeriche (Margalit, 2004). L'idrolisi del legame estereo viene ad opera di enzimi pectinmetilesterasici. La pectina si trova soprattutto nella buccia dell'uva. Il contenuto di alcol metilico delle vinacce completamente fermentate, ottenute per torchiatura e vinificazione con macerazione, si mantiene basso anche nel corso dell'insilamento. Questo perché gli enzimi responsabili della demetilazione delle pectine sono stati largamente inattivati durante il corso della vinificazione stessa (Usseglio-Tomasset, 1973).

Gli alcoli superiori ed il metanolo sono componenti della vinaccia trasferiti alla grappa che destano problemi soprattutto dal punto di vista igienico e sanitario.

1.4.3 Aldeidi e chetoni

Le aldeidi e chetoni si formano durante la fermentazione alcolica. I principali aldeidi e chetoni presenti nel vino e nelle vinacce sono l'acetaldeide, l'acetoino ed il diacetile, altri sono presenti in tracce. L'acetaldeide è il principale composto presente nei vini, nelle vinacce e nei distillati ed è il prodotto dell'ossidazione dell'etanolo. Essa possiede una reattività elevata a causa della elettrofilicità del gruppo funzionale aldeidico e può combinarsi con vari composti come con l'etanolo per dare l'emiacetale e l'acetale. A causa di questi ultimi legami, l'acetaldeide non può venir completamente eliminata in distillazione. L'acetaldeide dotata di odore pungente ed erbaceo (Di Stefano e Ciolfi, 1982) diviene, nelle grappe, avvertibile e sgradevole oltre i 100-150 mg/100ml di alcol

anidro. Un contenuto di acetaldeide basso comporta un contenuto basso di acetale anch'esso dotato di odore erbaceo (Versini e Margheri, 1979). Sembra che le aldeidi non siano contenute naturalmente nell'uva, però è nota la presenza in fase prefermentativa di esenali e di esanale, i quali contribuiscono insieme agli alcoli a sei atomi di carbonio alle note aromatiche di erbaceo e vegetale (Ribéreau-Gayon et al., 1998).

L'acetoino ed il diacetile sono chetoni e sono sottoprodotti della fermentazione.

Nei vini la concentrazione di acetoino raggiunge nel corso della fermentazione un massimo di 100 mg/L nei che poi cala a circa 5-20 mg/L probabilmente per riduzione a 2,3-butandiolo (Guymon e Crowell, 1965). Il diacetile invece è stato trovato a basse concentrazioni che variano da 0.1-7 mg/L con un valore medio di 2.5 mg/L (Rankine *et al.*, 1969). Nelle grappe i livelli di acetoino trovati variano da 0.12 a 7.58 mg/L e di diacetile da 0.02 a 1.12 mg/L (Flamini *et al.*, 2005a).

1.4.4 Esteri

Gli esteri sono prodotti di condensazione fra un acido carbossilico ed un alcol con perdita di una molecola di acqua. Gli esteri presenti nel vino vengono classificati in due categorie: esteri neutri e acidi. Quelli neutri come gli acetati ed i butirrati, vengono formati attraverso processi enzimatici, quelli acidi vengono formati per esterificazione chimica tra gli alcoli e gli acidi del vino (soprattutto il malico ed il tartarico) a bassi pH (Margalit, 2004). Gli esteri neutri vengono anche detti esteri volatili. La formazione di questi esteri volatili dipende dalla temperatura di fermentazione e dalla concentrazione di alcol (Killian e Ough, 1979).

Gli esteri presenti nelle grappe si possono distinguere, ai fini organolettici, in tre gruppi:

- il primo gruppo comprende gli esteri più volatili quali i formiati e gli acetati di etile e di metile ed il propionato di etile; fra questi si distingue come concentrazione l'acetato di etile (dal caratteristico odore di aceto);
- il secondo gruppo è costituito dagli acetati di isoamile, isobutile e di esile, dagli esteri degli acidi carbossilici (detti anche acidi grassi) dal butirrico al caprilico (ottanoico) che hanno nota fruttata di fruttato, cognac, albicocca (Nykänen, 1986), dagli esteri etilici degli acidi caprico (decanoico, detto anche caprinico) e laurico (dodecanoico), dagli esteri metilici, butilici ed isoamilici degli acidi carbossilici

dal capronico (esanoico) al laurico caratterizzati da note di frutta esotica e presenti in concentrazione bassa;

- il terzo gruppo comprende gli esteri degli acidi grassi a peso molecolare elevato dal miristico (tetradecanoico) al linolenico (ottadecatrienoico) a “sensazione oleosa, rancida e sgradevole” (Versini e Margheri, 1979).

Dallo studio dei comportamenti organolettici di esteri del secondo gruppo, in particolare quelli con odore molto simile come capronato di etile e caprilato di etile, È emerso che a valori di concentrazione superiori alla loro soglia questi esteri hanno un effetto sinergico, cioè il complesso ha soglia inferiore alla somma delle singole soglie percettive (Salo *et al.*, 1972).

1.4.4.1 Acetato di etile

Una piccola parte di questo estere viene formato dai lieviti durante la fermentazione, ma la maggior parte viene dall'azione dei batteri acetici aerobi; sembra che i batteri lattici non abbiano la possibilità di sintetizzarlo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Esso è responsabile dello spunto acetico insieme all'acido acetico, anche se è l'acetato di etile che contribuisce di più all'accescenza (Corison *et al.*, 1979) a concentrazioni di 120-160 mg/L (l'acido acetico è percepibile solo a 700 mg/L) (Salo *et al.*, 1972). Nelle grappe se l'acetato di etile se non supera i 150-250 mg % mL alcol anidro può essere utile a compensare ed equilibrare gli odori troppo intensi degli esteri.

1.4.4.2 Lattato di etile

La formazione di questo idrossiestere è legata alla fermentazione malolattica. Durante questo processo viene prodotto per maggior parte acido lattico, dal quale il lattato di etile si formerebbe presumibilmente per intervento una esterasi di origine batterica. Il suo tenore aumenta nei vini durante l'invecchiamento per esterificazione chimica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Il suo odore nella grappa è una via di mezzo tra il melenso, latte acido e lampone e diviene stucchevole quando è superiore ai 150 mg/mL di alcol anidro (Versini e Margheri, 1979).

1.4.4.3 Esteri etilici degli acidi grassi

Gli esteri etilici degli acidi grassi vengono formati dai lieviti durante la fermentazione alcolica. La biosintesi parte dall'acetil-S-CoA, che con una reazione di condensazione di Claisen reagisce con il malonil-S-CoA per originare un nuovo acil-S-CoA con due atomi di carbonio in più. Dall'acetil-S-CoA si passa così al butiril-S-CoA, all'esamil-S-CoA e così via. Successivamente enzimi specifici catalizzano la rottura degli acil-S-CoA liberando il coenzima A e gli esteri etilici degli acidi grassi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

La formazione di questi esteri da parte dei lieviti in anaerobiosi porta a delle quantità superiori a quelle previste per la legge dell'azione di massa e durante il tempo si osserva una loro diminuzione per idrolisi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Essi contribuiscono all'aroma dei vini e dei distillati con caratteri di fruttato, florale, di miele e cera (Nykänen, 1986).

1.4.4.4 Esteri acetici degli alcoli superiori

Gli esteri acetici degli alcoli superiori sono esteri di origine fermentativa. Tra questi i più importanti per il loro contributo all'aroma sono l'acetato di isoamile, acetato di 2-feniletile, acetato di esile; sono presenti in quantità modesta però dotati di odore intenso e particolare di mela, banana, mela golden, rosa e miele (Nykänen, 1986). La formazione di questi esteri è favorita da una fermentazione lenta, dall'assenza di ossigeno e dalle basse temperature (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

1.5 Ocratossina A (OTA)

L'ocratossina (OTA) è prodotta dal metabolismo secondario di funghi che appartengono ai generi di *Penicillium* ed *Aspergillus* (*Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus*) (Soleas *et al.*, 2001). L'OTA, la cui struttura chimica è riportata in figura 1.10, è ormai considerata un comune contaminante in numerosi alimenti destinati al consumo umano e animale. È stata rinvenuta con una certa frequenza oltre che nei cereali, negli ortaggi, nella frutta secca, nella birra e in numerose altre bevande, anche in prodotti vinicoli quali uva, succhi di uva e vino (Tateo *et al.*, 1999).

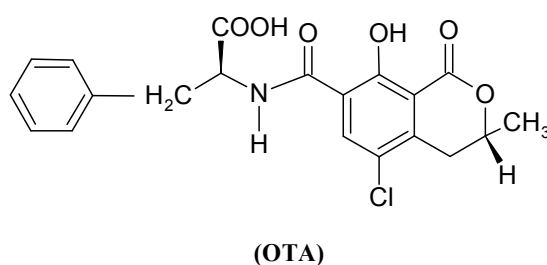


Figura 1.10 Struttura chimica dell'ocratossina A.

Per quanto riguarda la presenza dell'OTA nel vino i dati pubblicati fanno ritenere che la contaminazione avvenga sull'uva già in vigneto.

Con molta probabilità l'OTA riscontrata nei vini deriva in buona parte da quella prodotta sull'uva in vigneto. D'altra parte non si può escludere, un suo incremento nel periodo in cui l'uva raccolta è ammassata, trasportata in cantina e lasciata sui carri in attesa della pigiatura, ma ciò può avvenire solo se le bacche sono già contaminate. È comunque certo che l'OTA si forma prima della fermentazione alcolica.

Questa sostanza si può trovare in vinacce di particolari zone d'Italia. La presenza della tossina in biomasse di vinacce che possono stazionare in cantina o in distilleria anche per considerevoli periodi di tempo prima di venir distillate, rappresenta un rischio per potenziale per l'uomo e l'ambiente.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali e metodi-Composti varietali

Per tutti gli esperimenti è stata utilizzata vinaccia di Prosecco (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) raccolta a mano durante le vendemmie del 2005 e del 2006.

2.1.1 Campionamento della vinaccia della vendemmia 2005

Sono state utilizzate vinacce di uva Prosecco proveniente da un vigneto di Colbertaldo (TV) e vendemmiata il giorno 28/09/2005. I protocolli di acidificazione e stoccaggio delle vinacce sono stati attuati presso le distillerie Acquavite S.p.A. di Visnà di Vazzola (TV).

La quantità totale di vinacce giunta in distilleria era 9 quintali.

Dopo 4 ore dalla vendemmia è stata eseguita la pigiatura dell'uva e sono stati campionati 3 kg di pigiato (mosto+vinacce). Il pigiato è stato conservato a 11°C circa in un silos di metallo per 6 ore, poi trasportato in distilleria a bassa temperatura mediante un camion coibentato.

All'arrivo della vinaccia in distilleria è stata eseguita la sgrondatura del mosto ed il prelievo di 2 kg di vinaccia.

L'intera massa di vinaccia è stata suddivisa in due parti. La prima (3 quintali) è stata lasciata per una notte (15 ore) in un silos a 18°C (campione **TEST**), la seconda (6 quintali) è stata divisa a sua volta in due parti: una parte è stata insilata in 6 sacchi di plastica della capienza di 50 kg (quantità totale di vinaccia: 3 quintali) che sono stati messi in una camera alla temperatura controllata di 20°C (campione **TQ**); l'altra parte è stata acidificata con acido solforico al 33% (Cristalsapo Prodotti Chimici Industriali, Treviso) correggendo il pH delle vinacce ad un valore di 2.96 e posta in 5 sacchi di plastica (quantità totale di vinaccia 2.5 quintali) che sono stati conservati alla temperatura controllata di 20°C (campione **AC**).

Il giorno seguente la vinaccia **TEST** (3 quintali) rimasta per tutta la notte nel silos alla temperatura di 18°C, è stata posta in sei sacchi di plastica e conservata a 20°C come i campioni TQ ed AC per tutto il periodo di stoccaggio.

Dopo 15 e 30 giorni di stoccaggio sono stati campionati 2 Kg di vinaccia per ciascuna delle tre tesi (TEST, TQ, AC).

Come campione testimone è stata considerata una massa di vinaccia ottenuta dopo la sgrondatura del pigiato tenuta a temperatura ambiente per 15 ore (18°C) e poi conservata a 20°C.

Il riassunto del protocollo di campionamento eseguito è riportato in ALLEGATI-Figura 1.

Per ogni tesi sono stati raccolti due campioni di 1 kg ciascuno prelevando da punti diversi dei sacchi di plastica e da sacchi diversi per ciascuna tesi. Per ogni tesi sono stati prelevati 2 campioni da 1 kg ciascuno ($2 \times 1 \text{ kg}$), a 15 e 30 giorni di stoccaggio.

Le vinacce sono state conservate a -20°C e scongelate solo al momento dell'estrazione degli aromi.

2.1.2 Campionamento della vinaccia della vendemmia 2006

Per condurre lo studio sono state utilizzate vinacce di uva Prosecco provenienti da una cantina di Colbertaldo di Vidor (TV) vendemmiata a mano il giorno 25 settembre 2006. L'uva conferita in cantina è stata sottoposta a pigiadiraspatura ed a pressatura soffice. La vinaccia è stata raccolta in cassoni da 4 quintali e mentre scendeva dalla pressa si è effettuato il prelievo di 2 kg per le analisi chimiche.

La vinaccia è stata divisa in due parti: 9 quintali circa sono stati lasciati in cassoni a temperatura ambiente fino all'arrivo del camion e successivamente trasportati in distilleria, 6 quintali sono stati trasportati con camion refrigerato in distilleria dove sono stati scaricati e fatti sostare in un container refrigerato alla temperatura di 10°C.

La vinaccia è stata mantenuta in condizioni refrigerate solo per circa 3 ore. Al momento dello stoccaggio è stata misurata la temperatura che risultava di 19°C, la stessa della vinaccia non refrigerata.

I protocolli di acidificazione, di inoculo di lieviti selezionati e di stoccaggio delle vinacce sono stati attuati presso la distilleria Acquavite Spa di Visnà di Vazzola.

Prima di procedere con le operazioni di stoccaggio la massa non refrigerata è stata campionata (T0) e divisa in tre parti: 3 quintali sono stati conservati tal quali, 6 quintali sono stati acidificati con H₂SO₄ al 33% fino a pH 3, di questi 3 quintali sono stati inoculati con un ceppo di lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* "Blastocel FR95" (Perdomini, Verona, Italia). Le vinacce così suddivise sono state conservate in sacchi di plastica da 50 Kg. Ciascun sacco è stato pressato, chiuso e conservato in una

stanza termostata a 20°C. Per ogni tesi sono stati prelevati 2 campioni da 1 kg ciascuno (2×1 kg), a 15, 30, 109, 120 e 180 giorni di stoccaggio.

Lo schema di campionamento è riportato in Allegati- Figura 2.

Per motivi legati alle pratiche in cantina, la refrigerazione della vinaccia non è avvenuta, infatti la temperatura della vinaccia refrigerata al momento delle inizio delle procedure di stoccaggio era la stessa delle vinacce pervenute in distilleria con il trasporto non controllato. Sono stati pertanto studiati solo i campioni provenienti dalla massa di vinacce che nel protocollo sperimentale erano pervenute in distilleria con il trasporto non controllato.

2.1.3 Estrazione dei varietali

2.1.3.1 Estrazione dei composti volatili varietali dalle vinacce

L'estrazione dei composti varietali è stata eseguita utilizzando la metodica descritta da Di Stefano (1991), e modificata per le vinacce da Flamini *et al*, (2002a).

100 g di vinaccia, dopo essere stati scongelati a temperatura ambiente sono stati distillati in corrente di vapore utilizzando il distillatore per vinaccia tipo Procopio (Vetrotecnica, Padova) e sono stati raccolti 100 mL di distillato.

Questa soluzione è stata poi concentrata al 40% di etanolo (v/v) per mezzo di tre distillazioni successive ottenendo una soluzione finale di circa 12 mL.

La soluzione è stata poi trasferita in un matraccio da 20 mL aggiunta di 200 µL di l-eptanolo (Carlo Erba Analyticals,) 356 mg/L al 50% v/v di etanolo come standard interno, 1 g di NaCl (Fluka, Milano). I composti volatili sono stati estratti con 0.5 mL di isotano (1,1,1-trimetilpentano) (Fluka, Milano) mediante agitazione per 1 minuto. Dopo agitazione si è aggiunta acqua alla soluzione in modo da portare la fase organica al di sopra della base del collo del matraccio per prelevarla. La fase organica è stata analizzata mediante gascromatografia con rivelatore spettrometro di massa (GC/MS).

2.1.3.2 Estrazione dei composti liberi e glicosidati dalle vinacce dopo distillazione in corrente di vapore

Da 30 g di vinaccia residua dalla distillazione in corrente di vapore, sono stati estratti i composti liberi e glicosidati mediante immersione in 60 mL di metanolo (CH₃OH) (Fluka, Milano) per 4 ore in un ambiente protetto dalla luce.

La soluzione è stata poi omogeneizzata con l'apparato ULTRA TURRAX®-Ika® T18 basic (Ika® Works, INC., Wilmington, NC, USA) per 30 secondi.

L'omogenato è stato centrifugato a 4000 rpm per 10 min a 20°C utilizzando la centrifuga 4235A (A.L.C. srl, Milano). Il liquido surnatante è stato raccolto in un cilindro da 100 mL, il residuo solido è stato lavato con 16 mL di acqua deionizzata (sistema di purificazione Elix™ 5 Millipore, Milano), centrifugato nelle stesse condizioni come sopra ed il liquido è stato riunito al precedente. Il volume di metanolo della soluzione è stato ridotto sottovuoto a temperatura ambiente a circa 15 mL mediante evaporatore rotante LABOROTA 4000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim, Germany) ed il liquido ottenuto è stato posto in un matraccio da 200 mL e portato a volume con acqua in modo da avere una concentrazione finale di metanolo di circa il 7.5 %. Una concentrazione di metanolo superiore infatti provoca cali nel recupero degli aromi (dati non riportati). Questa soluzione è stata trattata con 2 g di polivinilpirrolidone (PVP) (Sigma-Aldrich) sotto agitazione per 30 minuti. La soluzione è stata centrifugata a 4000 rpm per 10 min a 20°C ed il surnatante raccolto in un matraccio da 200 mL. Alla soluzione sono stati aggiunti 200 µL di 1-eptanolo (Carlo Erba Analyticals, Milano) 178 mg/L al 50% v/v di etanolo come standard interno.

La procedura di estrazione è stata condotta utilizzando l'apparecchiatura VacMaster -10 sample processing station della Stepbio (Stepbio srl, Bologna, Italia), nella quale sono presenti 10 postazioni utilizzabili per l'estrazione in fase solida (SPE).

Le cartucce C18 Sep-Pack® da 10 g (Waters,USA) sono state condizionate mediante il passaggio di 40 mL di diclorometano (CH₂Cl₂) (J.T.Baker.), 30 mL metanolo (Romil SpS, Cambridge) e 50 mL acqua deionizzata. Un volume di 100 mL campione sono stati fatti passare attraverso la cartuccia sottovuoto. I composti polari sono stati lavati via facendo passare attraverso la cartuccia 60 mL di acqua. La cartuccia è stata poi portata a secco sotto vuoto.

I composti varietali liberi sono stati eluiti dalla fase solida usando 50 mL di diclorometano e i composti glicosidati sono stati recuperati mediante eluizione con 30 mL di metanolo.

La soluzione di diclorometano è stata anidrificata con sodio solfato anidro (Na₂SO₄) (Fluka, Milano), filtrata con carta da filtro a fascia blu (Whatman n.40), concentrata a 3 mL in una colonna di frazionamento Vigreux e successivamente concentrata a 200µL sotto flusso di azoto (N₂) prima dell'analisi con GC/MS.

La soluzione in metanolo dei varietali glicosidati è stata portata a secco sotto vuoto utilizzando l'evaporatore rotante. Il residuo è stato recuperato con 5 mL di tampone a pH 5 citrato fosfato costituito da acido citrico (Carlo Erba) 0.1 M e difosfato di sodio diidrateo 0.2 M (Riedel-de Haën), addizionato di 100 mg di enzima AR 2000 pectolitico con attività glicosidasi secondaria (Gist Brocades, Seclin, France) e lasciato per 15 ore in una stufa a temperatura di 40°C. L'enzima è quello che possiede l'attività glicosidasi più elevata tra i preparati commerciali (Sarry e Gunata, 2003).

Il campione è stato poi centrifugato a 4000 rpm per 10 min a 20°C, il surnatante è stato addizionato di 200 µL di 1-decanolo (Carlo Erba Analyticals,) 160.8 mg/L al 50% di etanolo come standard interno.

La soluzione è stata fatta passare attraverso una cartuccia C18 Sep-Pack® da 1 g (Waters, USA) precedentemente condizionata con 4 mL di diclorometano (CH₂Cl₂) (J.T.Baker, Olanda), 3 mL metanolo (Romil, Cambridge) e 5 mL acqua deionizzata. I composti polari sono stati lavati facendo passare attraverso la cartuccia 5 mL di acqua. La cartuccia è stata poi portata a secco sotto vuoto. I composti varietali liberi sono stati eluiti dalla fase solida usando 6 mL di diclorometano. La soluzione è stata anidrificata con Na₂SO₄ (Fluka), filtrata con carta da filtro a fascia blu (Whatman n.40) e concentrata a 200 µL sotto flusso di azoto (N₂) prima dell'analisi con GC/MS.

2.1.4 Analisi gascromatografiche

Il sistema GC/MS impiegato è della Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, un sistema di iniezione HP 6890 Series Injector, uno spettrometro di massa HP 5971.

La colonna analitica era capillare in silice fusa HP Innowax in polietilenglicole (Supelco, Milano) (lunghezza 30 m x 0.25 mm diametro interno; spessore film 0.25 µm). La temperatura dell'iniettore era di 250°C; l'iniezione in modalità splitless; il volume iniettato 0.5-1 µL; il gas di trasporto elio (He) con pressione in testa alla colonna di 12 psi. Programma di temperatura del forno per gli estratti isottanici: 0.5 min a 32°C, da 32°C a 60°C con incremento di 30°C/min, isoterma di 2 min, da 60°C a 160°C con incremento di 2°C/min, da 160°C a 230°C con incremento di 3°C/min, isoterma di 10 minuti. Programma di temperatura del forno per gli estratti in diclorometano: 1 min a 32°C, da 32°C a 160°C con incremento di 2°C/min, da 160°C a 230°C con incremento di 3°C/min, isoterma di 5 minuti.

L'identificazione dei composti è stata effettuata sulla base dei tempi di ritenzione ed utilizzando la libreria di spettri di massa NIST98 (Version 1.6) e la libreria ESTRATTI del laboratorio chimico CRA-VIT.

Lo spettrometro di massa costituito da un analizzatore quadrupolare, operava con energia di ionizzazione 70 eV, temperatura della transfer line 280°C. L'acquisizione dei segnali è avvenuta in modalità SCAN.

I composti sono stato quantificati come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di 1-eptanolo e come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di 1-decanolo.

Ogni esperimento è stato condotto una volta su due prelievi ed è stato calcolato il dato medio. Le tabelle ed i grafici sono stati realizzati con il software Excel (Microsoft, USA).

Le formule sono state disegnate con i programmi Isisdraw e Chems sketch.

In figura 6 di ALLEGATI è riportato il cromatogramma GC/MS dei principali composti volatili varietali di un campione di vinaccia Prosecco.

In figura 9 ed in figura 10 di ALLEGATI sono riportati rispettivamente il cromatogramma GC/MS dei principali composti varietali liberi e glicosidati di un campione di vinaccia Prosecco.

2.2 Materiali e metodi-composti di fermentazione

Sono stati studiati i campioni di vinaccia Prosecco (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) delle vendemmie 2006 (par. 2.1.2) e 2007 ed i campioni di vinaccia Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) della vendemmia 2007.

2.2.1 Campioni vendemmia 2007

2.2.1.1 Campionamento della vinaccia Prosecco

Sono state utilizzate vinacce di uva Prosecco provenienti dai vigneti di Villa Salvador di Fregona (TV). L'uva, vendemmiata il giorno 28 agosto 2007, è stata subito pigiadiraspata e sottoposta a pressatura soffice. La vinaccia è stata raccolta in due cassoni della capienza 4 quintali ciascuno e man mano che essa scendeva dalla pressa è stato effettuato il prelievo di 2 x 1 kg di vinaccia per le analisi chimiche. Man mano che scendeva dalla pressa è stata effettuata anche la refrigerazione della vinaccia stoccata nel cassone 2 ricoprendo con ghiaccio secco strati di vinaccia dello spessore di circa 15 cm. Sono stati utilizzati 40 kg di ghiaccio secco (Air liquide-Italia) per 4 quintali di vinaccia.

La vinaccia stoccata nel cassone 1 non è stata soggetta a nessun trattamento.

La vinaccia refrigerata (cassone 2) è stata fatta sostare all'ombra e quella non refrigerata in pieno sole per 6-7 ore prima dello stoccaggio definitivo.

Prima delle operazioni di acidificazione e di inoculo, sono stati prelevati due campioni di 1 kg di vinaccia dai due cassoni per le analisi chimiche, è stata misurata la temperatura che era di 19°C per la vinaccia non refrigerata e 15°C per la vinaccia refrigerata.

Prima di procedere alle operazioni di stoccaggio, la massa non refrigerata è stata campionata e poi divisa in tre parti: 150 kg sono stati conservati tal quali, 90 kg sono stati acidificati mediante addizione di una soluzione di H₂SO₄ al 33% fino a pH 3, i restanti 120 kg di vinaccia non refrigerata sono stati inoculati con il ceppo di lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* "Blastocel FR95" (Perdomini, Verona, Italia). Le vinacce così suddivise sono state stoccate in sacchi di plastica da 50 kg. Ciascun sacco è stato pressato, chiuso e conservato in una stanza termostata a 14°C per i primi 15 giorni di fermentazione, poi è stato portato in un deposito a temperatura ambiente per il restante periodo di stoccaggio.

Per ogni tesi sono stati prelevati 2 campioni da 1 kg ciascuno ($2 \times 1 \text{ kg}$), a 15, 30, 120 giorni di stoccaggio.

Lo schema dei campionamenti è riportato in ALLEGATI-Figura 3.

2.2.1.2 Campionamento della vinaccia Cabernet Sauvignon

Sono state utilizzate vinacce di uva Cabernet Sauvignon provenienti dai vigneti della zona di Vazzola (TV). Prima di procedere con le operazioni di stoccaggio si è effettuato il prelievo di 2 campioni da 1 kg di vinaccia per le analisi chimiche.

La vinaccia è stata immagazzinata in due cassoni da 4 quintali ciascuno.

Nel primo cassone la vinaccia è stata acidificata con una soluzione di H_2SO_4 al 33% fino a pH 2.89. Le operazioni di acidificazione sono state effettuate ricoprendo man mano il cassone con uno spessore di 15 cm di vinaccia e spruzzando tutta la superficie della vinaccia con la soluzione di acido. Nel secondo cassone la vinaccia non è stata soggetta a nessun trattamento.

Per ogni tesi sono stati prelevati 2 campioni da 1 kg ciascuno ($2 \times 1 \text{ kg}$), a 15, 30, 60 giorni di stoccaggio.

Lo schema dei campionamenti è riportato in ALLEGATI-Figura 4.

2.2.2 Estrazione dei composti volatili di fermentazione

I composti volatili di fermentazione sono stati estratti da 100 g di vinaccia mediante distillazione in corrente di vapore (apparecchiatura Procopio) e sono stati raccolti 100 mL di distillato. La soluzione è stata concentrata al 40% di etanolo (v/v) per mezzo di tre successive distillazioni ottenendo una soluzione finale di circa 10 mL.

I composti sono stati analizzati mediante gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma FID. Prima di ogni analisi si sono aggiunti al distillato 8 μL di n-pentanololo (Sigma, Milano) come standard interno.

In ALLEGATI-Figure 11 e 12 sono riportati rispettivamente i cromatogrammi GC/FID di un campione di vinaccia Prosecco e Cabernet Sauvignon.

2.2.3 Analisi gascromatografica dei composti volatili di fermentazione

Il sistema analitico utilizzato è stato un gascromatografo Carlo Erba Instruments 4300 ad iniezione manuale, dotato di una colonna impaccata Carbopack B 80/120 AW 6.6% Carbowax 20M (lunghezza 2 m, diametro interno 2 mm) (Supelco, Milano)

accoppiato ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) della Carlo Erba. La temperatura dell'iniettore era 250°C; il volume iniettato 0.5 µL; il gas di trasporto azoto alla pressione 3 kg/cm². I gas del rivelatore FID: 0.7 kg/cm² per idrogeno (H₂), 1 kg/cm² per l'aria. Programma di temperatura del forno: 1 min a 55°C, da 55 °C a 165°C con incremento di 6°C/min, isoterma di 3 min.

I fattori di risposta RF sono stati calcolati utilizzando una soluzione standard dei composti in esame.

L'identificazione dei composti è stata effettuata dal confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni standard.

Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software Chrom Card per Windows. Il programma impostato riportava i risultati come mg/100 mL di alcol anidro, questi sono stati convertiti in mg/kg vinaccia.

In figura 7 di ALLEGATI è riportato il cromatogramma GC/MS dei principali composti volatili varietali di un campione di vinaccia Cabernet Sauvignon.

2.2.4 Estrazione degli acidi organici

100 g di vinaccia Prosecco sono stati sospesi in 200 mL di H₂O deionizzata ed estratti a 50°C per 30 min sotto agitazione. Dopo raffreddamento il liquido è stato posto in un matraccio e addizionato del liquido della spremitura delle vinacce. La soluzione risultante è stata analizzata mediante cromatografia liquida HPLC (Panighel *et al.*, 2007).

2.2.5 Analisi cromatografica degli acidi organici

I campioni sono stati preparati per passaggio di 1 mL di soluzione attraverso una cartuccia da 360 mg C18 Sep-Pak® (Waters, USA) precedentemente attivata per passaggio di 3 mL metanolo e 5 mL di acqua deionizzata), e raccogliendo l'eluato in un matraccio da 10 mL. La cartuccia è stata poi lavata con 3 mL di H₂SO₄ 0.01 N seguito da 3 mL di H₂O deionizzata. Le soluzioni sono state raccolte nel matraccio e si è portato a volume con H₂O deionizzata. Prima dell'iniezione i campioni sono stati filtrati con filtri in acetato di cellulosa da 0.2 µm (Sartorius).

L'apparecchiatura HPLC utilizzata è stata una pompa SpectraSYSTEM P4000 (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA) con un loop di 20 µL, connessa ad un rivelatore SpectraSYSTEM UV6000LP (Thermo) operante alla lunghezza d'onda di 210 nm. L'autocampionatore era un SpectraSYSTEM AS3000 (Thermo); Colonna

analitica: Merck LiChrospher® 100 RP-18 (Merck Darmstadt, Germania) (lunghezza 250 mm, diametro interno 4.6 mm, dimensione delle particelle 5 µm) dotata di precolonna LiChroCART® 4-4 (Merck).

Condizioni cromatografiche: temperatura della colonna 30°C, eluizione isocratica fase mobile H₃PO₄ 5*10⁻³ M ad un flusso di 0.6 mL/min.

Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software ChromQuest version 4.1 (Thermo).

I fattori di risposta RF sono stati calcolati utilizzando una soluzione standard di acidi tartarico, malico, acetico al 10% di etanolo. L'identificazione dei composti è stata effettuata dal confronto con i tempi di ritenzione dei composti standard.

2.3 Materiali e metodi-composti carbonilici

Per le analisi dei composti carbonilici sono state utilizzate le vinacce di uva Prosecco proveniente da vigneti di Valdobbiadene della vendemmia 2005 (ALLEGATI-Figura 1).

Il campione di vinacce non acidificate quali prelevato 15 ore dopo lo stoccaggio è stato considerato il campione di riferimento al tempo zero (T 0). Il successivo campionamento di entrambe le tipologie di vinaccia acidificata e non è stato effettuato 15 giorni dopo lo stoccaggio (AC 15, TQ 15); il successivo campionamento è avvenuto 30 giorni dall'inizio dello stoccaggio (AC 30, TQ 30).

2.3.1 Estrazione dei composti carbonilici

La preparazione dei campioni per l'analisi dei composti carbonilici contenuti nelle vinacce è stata eseguita secondo i metodi proposti da Flamini *et al.* (2005).

100 g di vinaccia, dopo essere stati scongelati a temperatura ambiente, sono stati distillati in corrente di vapore fino ad ottenere 100 mL di distillato. Questo è stato concentrato al 20 % etanolo v/v mediante due distillazioni successive. Un volume di 10 mL di questo distillato è stato portato a pH 3.0 mediante l'aggiunta di circa 30 µL di HCl 1:5 (205 Romil SpS, Cambridge). La soluzione è stata poi addizionata di 200 µL o-clorobenzaldeide 0.1265 mmol (Aldrich) come standard interno (SI) e di 20 mg di *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilamina idrocloruro (PFBOA) (Fluka). La reazione di derivatizzazione è stata condotta per un ora a temperatura ambiente mantenendo la soluzione sotto agitazione. Dopo l'aggiunta di 1 g di cloruro di sodio (NaCl) (Fluka) alla

miscela di reazione, le ossime sono state estratte mediante estrazione liquido-liquido con 3 mL di una soluzione di etere etilico (J.T.Baker) /esano (J.T.Baker) 1:1 in imbuto separatore sotto agitazione per 5 minuti. L'estrazione è stata ripetuta per 3 volte successive (3x3 mL) e le fasi organiche riunite. La soluzione è stata anidrificata con Na₂SO₄ (Fluka), filtrata con filtro a fascia blu 110 mm (Whatman 40), concentrata ad 1 mL sotto flusso di azoto ed analizzata.

2.3.2 Preparazione delle soluzioni standard

Si è preparata una soluzione madre al 5% v/v di etanolo (Fluka, Milano) di standards dei composti carbonilici in concentrazione riportata in grassetto in tabella 3.1.

Composto carbonilico	purezza %	quantità prelevata	densità (g/mL)	peso teorico (mg)	peso reale (mg)	soluzione madre (mg/L)
Esanale (Merck)	100	50 µL	0.820	41.00	41.00	205.00
2-esenale (Aldrich)	98	50 µL	0.846	42.30	41.39	206.95
Acetoino (Fluka)	97	56.4 mg	1.013	54.71	54.71	273.55
Benzaldeide (Fluka)	99	40 µL	1.045	41.80	41.38	206.90
Diacetile (Aldrich)	97	40 µL	0.981	39.24	38.06	190.30

Tabella 2.1 Concentrazione dei composti carbonilici nella soluzione madre.

Partendo dalla soluzione madre si sono preparate soluzioni a concentrazioni decrescenti di composti carbonilici al 5% v/v di etanolo:

Composto carbonilico	Soluzione madre (mg/L)	Soluzione Standard A (mg/L)	Soluzione Standard B (mg/L)	Soluzione Standard C (mg/L)	Soluzione Standard D (mg/L)
Esanale	205.00	2.05	10.25	20.50	41.00
2-esenale	206.95	2.07	10.35	20.70	41.39
Acetoino	273.55	2.74	13.68	27.36	54.71
Benzaldeide	206.90	2.07	10.35	20.69	41.38
Diacetile	190.30	1.90	9.52	19.03	38.06

Tabella 2.2 Concentrazione dei composti carbonilici nelle soluzioni standard A, B, C, D.

Per tutte le soluzioni standard A, B, C, D, si è operato come per i campioni: sono state eseguite due distillazioni successive della soluzione standard per concentrare il campione al 20% v/v di etanolo. Si sono prelevati 10 mL di distillato ed il pH è stato aggiustato a 3.00 mediante l'aggiunta di circa 30 µl di HCl 1:5; si sono aggiunti 200 µL

di o-Cl benzaldeide (standard interno) e 20 mg di reattivo PFBOA. La reazione è stato condotta sotto agitazione per un ora a temperatura ambiente. Dopo l'estrazione mediante etere etilico/esano 1:1 (v/v) (3x3 mL) la fase organica è stata concentrata sotto flusso di N₂ ad 1 mL ed è stata eseguita l'analisi.

Dai dati ottenuti dall'analisi delle soluzioni standard è stata calcolata una retta di calibrazione multilivello per ogni analita.

2.3.2.1 Calcolo della percentuale di recupero con la distillazione

A partire dalla soluzione madre è stata preparata un ulteriore soluzione standard E come descritto nella tabella 2.3.

Composto	Soluzione madre etanolo/H₂O 5:95 (v/v) [mg/L]	Soluzione standard E etanolo/H₂O 20:80 (v/v) [mg/L]
Esanale	205.00	82
2-esenale	206.95	82.78
Acetoino	273.55	109.42
Benzaldeide	206.90	82.76
Diacetile	190.30	76.12

Tabella 2.3 concentrazione dei composti carbonilici nella soluzione standard E.

Questa soluzione è stata analizzata senza preliminare concentrazione mediante due distillazioni successive al fine di determinare le percentuali di recupero degli analiti.

2.3.3 Analisi gascromatografiche

Il sistema analitico impiegato è della Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, un sistema di iniezione HP 6890 Series Injector, uno spettrometro di massa HP 5971.

La colonna analitica era capillare in silice fusa HP Innowax in polietilenglicole (Supelco, Milano) (lunghezza 30 m x 0.25 mm diametro interno; spessore film 0.25 µm). La temperatura dell'iniettore era di 250°C; l'iniezione in modalità splitless; il volume iniettato 0.5 µL; il gas di trasporto elio (He) con pressione in testa alla colonna di 12 psi.

Programma di temperatura del forno: 5 min a 60°C, da 60 °C a 210°C con incremento di 3°C/min, isoterma di 5 min.

L'identificazione dei composti è stata effettuata dai tempi di ritenzione delle ossime degli standards disponibili commercialmente. Lo spettrometro di massa operava con energia di ionizzazione di 70 eV, temperatura della transfer line 280°C.

L'acquisizione dei segnali è avvenuta in modalità SIM del segnale m/z 181 e dei segnali caratteristici delle ossime di ciascuno dei composti carbonilici studiati: esanale (m/z 114; 239; 295), 2-esenale (m/z 112;250;293), acetoino (m/z 240), benzaldeide (m/z 301), diacetile (m/z 476), *o*-clorobenzaldeide (m/z 300).

I composti sono stato quantificati come mg/L di estratto e convertiti nei campioni di vinaccia in mg/Kg di vinaccia.

Ogni esperimento è stato condotto due volte ed è stata calcolata la media e la semidispersione. Le tabelle ed i grafici sono stati realizzati con il software Excel (Microsoft, USA).

2.4 Materiali e metodi-norisoprenoidi

I norisoprenoidi sono stati determinati nell'estratto metanolico come descritto nel paragrafo 2.1.3.2.

I carotenoidi sono stati estratti dalle bucce di 300 g di vinaccia Prosecco della vendemmia 2006 (non acidificata dopo 30 giorni di stoccaggio) con una soluzione di 500 mL di etere etilico (J.T. Baker)/esano (J.T.Baker) 1:1 per 15 ore sotto agitazione. Il volume di estratto è stato diviso in due parti uguali e portato fino a secchezza con evaporatore rotante LABOROTA 4000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim, Germany). Ad una parte sono stati aggiunti 60 mL di acqua deionizzata (pH 6), all'altra porzione 60 mL di acqua portata a pH 2.7 mediante aggiunta di 50 µL di HCl 1:5. Gli estratti sono stati idrolizzati mediante riflusso per 5 ore in condizioni neutre e acide ed i campioni sono stati raccolti dopo 30 minuti, 2 e 5 ore di idrolisi con prelievi di 10 mL ciascuno.

I norisoprenoidi che si sono formati per degradazione termica sono stati determinati mediante estrazione SPE con cartucce C18 Sep-Pack® da 1 g (Waters,USA) come descritto in paragrafo 3.2.3.2.

2.4.1 Analisi cromatografiche

Il sistema analitico impiegato è della Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, un sistema di iniezione HP 6890 Series Injector, uno spettrometro di massa HP 5971.

La colonna analitica era capillare in silice fusa HP Innowax in polietilenglicole (Supelco, Milano) (lunghezza 30 m x 0.25 mm diametro interno; spessore film 0.25 µm). La temperatura dell'iniettore era di 250°C; l'iniezione in modalità splitless; il volume iniettato 1 µL il gas di trasporto elio (He) con pressione in testa alla colonna di 12 psi. Programma di temperatura del forno: 1 minuto a 40°C, da 40°C a 160°C con incremento di 2°C/min, da 160°C a 230°C con incremento di 3°C/min, isoterma di 10 min. Lo spettrometro di massa operava con energia di ionizzazione di 70 eV, temperatura della transfer line di 280°C. L'acquisizione dei segnali è avvenuta in modalità SCAN.

2.5 Materiali e metodi - Ocratossina A (OTA)

2.5.1 Campionamento della vinaccia della vendemmia 2006

Sono state utilizzate vinacce di uva provenienti da cinque differenti varietà coltivate in Puglia: Uva di Troia, Negroamaro, Sangiovese, Trebbiano e Regina.

Per ciascuna varietà d'uva sono stati presi circa 10 kg di vinaccia, prelevati da punti diversi della massa totale. Dopo che la massa è stata ben mescolata, si sono prelevati subito due campioni da 0.5 kg di vinaccia dal cumulo, posti in sacchetti di plastica e congelati. Questi due campioni sono stati contrassegnati con la sigla CA e CB (Cumulo A e Cumulo B). I prelievi sono stati fatti in punti diversi della massa di 10 kg

In seguito c'è stata una divisione dei campioni. Sono stati presi:

- 3 kg di vinaccia non acidificata e posti in contenitori in vetro etichettati con la sigla TQ (Tal Quale);
- 3 kg di vinaccia non acidificata dalla massa rimanente dei 10 kg. Questa vinaccia è stata poi acidificata fino a pH 3, bagnandola con 150 mL di una soluzione contenente 15 mL di H₂SO₄ al 33%, mescolando tutta la massa facendo in modo che l'acido andasse a bagnare tutta la vinaccia; i 3 kg di vinaccia sono stati posti negli appositi contenitori in vetro etichettati su cui c'era scritto la sigla AC (acidificati)
- Gli ultimi 3 kg di vinaccia rimanente serviranno da riferimento.

Sono stati ottenuti sei campioni TQ in ambiente anaerobico, sei campioni AC in ambiente acidificato e sei campioni C in ambiente aerobico.

Dopo 5 giorni, 10 giorni e 20 giorni di fermentazione, sono stati prelevati due campioni da 0.5 kg di vinaccia ciascuno dal cumulo (campioni CA e C B), dalla vinaccia acidificata e dalla vinaccia non acidificata (campioni AC A e AC B e TQ A, TQ B) e messi in congelatore.

Lo schema di campionamento è riportato in Allegati-Figura 5.

2.5.2 Campionamento della vinaccia della vendemmia 2007

In seguito allo screening effettuato nella vendemmia 2006, i campionamenti nel 2007 sono stati effettuati solo su una varietà di vinaccia che aveva mostrato alti contenuti di OTA nelle analisi dei campioni della vendemmia 2006, e solo sul cumulo allo scopo di vedere l'andamento della tossina per un tempo di stoccaggio di 30 giorni. La procedura di campionamento è la stessa seguita nel 2006 ed i campionamenti sono stati fatti a 0, 5, 10, 20, 30 giorni di fermentazione.

2.5.3 Preparazione del Campione

Per la preparazione del campione è stata impiegata la metodica proposta da Garcia Moruno *et al.* (2004). A 40 g di campione di vinaccia costituito da bucce, vinaccioli e pezzi di raspo, sono stati addizionati 100 mL di cloroformio (Romil SpS, Cambridge), e la soluzione è stata lasciata in estrazione per una notte sotto agitazione.

Il volume di cloroformio recuperato varia dai 50-70 mL, questo valore dipende da quanto sono secche le bucce e quindi da quanto cloroformio è stato assorbito. Il cloroformio recuperato è stato portato a secco mediante evaporatore rotante LABOROTA a 30°C. Il campione in seguito è ripreso con 5 mL di fase mobile HPLC, la soluzione filtrata su filtro in fibra di vetro 934 AH con porosità 1.5 µm (Whatman) successivamente su un filtro per siringa GHP ACRODISC 0.2 µm (Waters, USA).

2.5.4 Analisi HPLC

Per eseguire le analisi HPLC sono state impiegate le condizioni cromatografiche riportate da Tonus *et al.* (2005). L'apparecchiatura HPLC utilizzata è stata una pompa SpectraSYSTEM P4000 (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA) con un loop di 20 µL, connessa ad un rilevatore fluorimetrico SpectraSYSTEM FL 3000

operante alle lunghezze d'onda di eccitazione (λ_{ecc}) 330 nm e di emissione (λ_{em}) 470 nm rispettivamente. L'autocampionatore era uno SpectraSYSTEM AS3000 (Thermo) con fornello integrato; colonna analitica C₁₈ Luna (Phenomenex, USA) (lunghezza 250 mm, diametro interno 3 mm, dimensione delle particelle 5 μm).

Condizioni cromatografiche: temperatura della colonna 30°C, eluizione isocratica, fase mobile costituita da una miscela di tampone acetato di sodio/acido acetico (acetato di sodio 4 mM/acido acetico 95:5 v/v, pH 3.50) e acetonitrile in proporzione 52:48 v/v, flusso di 0.5 mL/min, volume campione iniettato 20 μL .

Per l'elaborazione dei dati cromatografici è stato impiegato un il software ChromQuest versione 4.1.

2.5.5 Calcolo della Retta di Calibrazione

La retta di calibrazione è stata calcolata per più punti analizzando soluzioni standard di OTA in metanolo, comprese in un intervallo di concentrazioni da 0.5 $\mu\text{g/L}$ a 600 $\mu\text{g/L}$. La retta di calibrazione aveva equazione $A=13202 c$, $R^2=0.9998$.

2.5.6 Metodo di Conferma dell'OTA

La conferma della presenza dell'OTA nei campioni risultati positivi è stata eseguita mediante la sintesi del metilestere. Il campione, disciolto in fase mobile dopo l'analisi HPLC (1 mL circa), è addizionato di 10 mg di cloruro di sodio (Fluka, Milano) ed estratto con cloroformio (3x1 mL) (Romil SpS, Cambridge). Le fasi organiche sono riunite e portate a secco mediante evaporatore rotante. Il residuo è ripreso con 0.5 mL della soluzione del derivatizzante trifluoroboro metanolo ($2\text{CH}_3\text{OH-BF}_3$) (Riedel de Haen) e la reazione è condotta in bagnomaria a 60°C per 20 min. A fine reazione il campione è stato portato a secco sotto flusso di azoto e ripreso con 0.5 mL di fase mobile HPLC. Si è proceduto all'analisi nelle stesse condizioni cromatografiche utilizzate per l'analisi dell'OTA.

2.6 Materiali e metodi-uva e vinacce Incrocio Manzoni 6.0.13

Sono state utilizzate uve di Incrocio Manzoni 6.0.13 raccolte nell'autunno 2008.

2.6.1 Estrazione delle frazioni libere e legate dei varietali dalle uve

Per la preparazione dei campioni di uva sono stati applicati metodi già riportati in letteratura (Williams *et al.*, 1982; Di Stefano *et al.*, 1997; Mateo *et al.*, 1997; Ummarino *et al.*, 1999; Chassagne *et al.*, 2000; Flamini *et al.*, 2001).

100 acini di uva sono stati privati dei vinaccioli e separati in bucce e polpe: le bucce sono state estratte con 60 mL di metanolo (205 Romil SpS, Cambridge) per 4 ore. Le polpe sono state poste in un contenitore contenente 100 mg di sodio metabisolfito (Carlo Erba, Milano).

Polpe. Dopo omogeneizzazione con l'apparato ULTRA TURRAX®-Ika® T18 basic e centrifugazione (ALC 4235) a 4000 giri/min per 10 minuti, il liquido limpido è recuperato in un matraccio da 200 mL mentre le parti solide sono lavate con 30 mL di acqua, ancora centrifugate, ed il liquido limpido è stato riunito al succo. Dopo aver portato a volume con acqua distillata, la soluzione è stata trattata con 80 mg di enzima pectolitico "Pectazina DC" (Dal Cin Spa,) privo di attività glicosidica secondaria per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente la soluzione è stata centrifugata a 4000 giri/min per 5 minuti.

Bucce. Dopo la macerazione con metanolo, le bucce sono state omogeneizzate mediante ULTRA TURRAX®-Ika® T18 basic, centrifugate come sopra, con recupero del liquido limpido in un pallone sottoposto ad riduzione del contenuto metanolico mediante evaporatore rotante LABOROTA 4000 , mentre il residuo solido è stato lavato con 30 mL di acqua, nuovamente centrifugato e il liquido limpido è stato riunito alla fase organica in un matraccio da 200 mL. Dopo aver aggiustato il volume con acqua, la soluzione è stata trattata con 2 g di Polyclar AT (polivinilpirrolidone (PVP) (Sigma-Aldrich) per diminuire il contenuto polifenolico e filtrata con filtro compatto.

Composti varietali liberi

100 mL degli estratti delle polpe sono stati uniti a 100 mL di estratti delle bucce in un matraccio da 200 mL, ai quali sono addizionati 200 µl di una soluzione di 1-eptanolo 180 mg/l come standard interno. La soluzione è stata fatta passare per gravità attraverso una cartuccia C₁₈ Sep-Pak (Waters) da 10 g, preventivamente attivata mediante passaggio

di 50 mL di diclorometano, 30 mL di metanolo e 50 mL di acqua. Dopo caricamento, la cartuccia è stata lavata con 100 mL di acqua per rimuovere sali e composti polari, e si recuperano i composti liberi con 50 mL di diclorometano. Successivamente si eluisce con 30 mL di metanolo per recuperare i composti glicosidati.

Dopo disidratazione con sodio solfato, la soluzione contenente i composti liberi viene concentrata mediante distillazione con colonna di Vigreux di 40 cm di lunghezza, e portata a 200 μ L sotto flusso di azoto prima dell'analisi GC/MS.

Composti liberati mediante idrolisi enzimatica

La fase metanolica è portata a secco sotto vuoto mediante evaporatore rotante a 40 °C, ed il residuo è ripreso con 5 mL di una soluzione di tampone citrato-fosfato a pH 5. La soluzione viene poi addizionata di 200 mg di enzima AR 2000 a forte attività glicosidica secondaria (Gist Brocades, Seclin, France) e lasciata in termostato a 40°C per una notte. La soluzione viene poi addizionata di 200 μ L di una soluzione di 1-ottanolo (Carlo Erba, Milano) a concentrazione 178 mg/L come standard interno e fatta passare per gravità attraverso una cartuccia C₁₈ Sep-Pak da 1 g (Waters), preventivamente attivata con 5 mL di diclorometano, 3 mL di metanolo e 5 mL di acqua. Dopo caricamento, la cartuccia viene lavata con 5 mL di acqua e i composti liberati per idrolisi enzimatica sono eluiti con 6 mL di diclorometano e successivamente concentrati a 0,2 mL sotto flusso di azoto prima dell'analisi GC/MS.

2.6.2 Fermentazione della vinaccia

1 kg circa di uva Manzoni è stata pigiata in laboratorio utilizzando uno schiacciapatate. 300 g di vinaccia così ottenuta è stata addizionata di lievito *Saccharomyces cerevisiae* CHALLENGE EZferm (Esseco, Novara) e lasciata fermentare in una camera a 25°C per 65 ore tempo in cui la fermentazione era completa. Il grado Brix del mosto in cui si trovava la vinaccia era 6.7.

2.6.3 Estrazione dei composti varietali dalle vinacce

I composti volatili varietali delle vinacce e le frazioni libere e legate dei varietali dalle vinacce esauste sono stati estratti utilizzando le procedura descritte nei paragrafi 2.1.3.1 e 2.1.3.2 rispettivamente. È stato utilizzato lo stesso sistema analitico descritto in paragrafo 2.1.4.

La colonna analitica era capillare in silice fusa HP Innowax in polietilenglicole (Supelco, Milano) (lunghezza 30 m x 0.25 mm diametro interno; spessore film 0.25 μm). La temperatura dell'iniettore era di 200°C; la temperatura della transfer line 280 °C; iniezione in modalità splitless; il volume iniettato 0.5 μL ; il gas di trasporto elio (He) con pressione in testa alla colonna 12 psi. Programma di temperatura del forno: 3 min a 36°C, da 36°C a 160°C con incremento di 2°C/min, da 160°C a 230°C con incremento di 3°C/min, isoterma di 5 minuti. Lo spettrometro di massa quadrupolare operava con energia di ionizzazione di 70 eV, temperatura della transfer line 280°C. L'acquisizione dei segnali è avvenuta in modalità SCAN.

L'identificazione dei composti è stata effettuata utilizzando la libreria di spettri di massa NIST98 (Version 1.6) e la libreria ESTRATTI del laboratorio chimico CRA-VIT.

In ALLEGATI-Figura 8 è riportato il cromatogramma GC/MS dei principali composti volatili varietali liberi di un campione di vinaccia Incrocio Manzoni 6.0.13.

2.7 Misura del grado alcolico dei distillati

Per la determinazione della gradazione alcolica dei distillati, 100 g di vinaccia sono stati distillati in corrente di vapore con distillatore per vinaccia Procopio, raccogliendo 100 mL di distillato. Per la misura della densità è stata utilizzata una bilancia idrostatica Gibertini, impiegando 100 mL circa di distillato a 20°C ed usando le tabelle riportate da Miconi (2005) per la conversione della densità a grado alcolico.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I COMPOSTI VARIETALI

3.1 Studio dei profili degli aromi varietali liberi recuperabili con la distillazione: campioni vendemmia 2005

Sono stati studiati i campioni di vinaccia di uva Prosecco trattati e conservati secondo le modalità riportate in ALLEGATI-Figura 1. La preparazione del campione e le analisi sono state eseguite come descritto nei paragrafi 2.1.3.1. e 2.1.4 di MATERIALI e METODI. Sono stati determinati i composti volatili varietali e di fermentazione nei distillati recuperati con la distillazione in corrente di vapore. In Tabella 3.1 sono riportati i dati medi di due campioni.

Composti recuperati mediante distillazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Test 15 (<u>C</u>)	TQ 15	AC 15	Test 30 (<u>D</u>)	TQ 30	AC 30
Furan linalolo ossido	30 \pm 4	26 \pm 4	n.d.	45 \pm 3	54 \pm 5	22 \pm 3
Linalolo	595 \pm 14	1.042 \pm 27	765 \pm 45	593 \pm 14	1.055 \pm 33	963 \pm 31
α -terpineolo	49 \pm 2	75 \pm 4	84 \pm 4	67 \pm 4	90 \pm 6	101 \pm 5
Metil salicilato	111 \pm 6	114 \pm 4	n.d.	n.d.	214 \pm 10	132 \pm 6
Citronellolo	203 \pm 4	493 \pm 10	270 \pm 22	38 \pm 2	252 \pm 17	254 \pm 40
Geraniolo	481 \pm 11	596 \pm 16	531 \pm 5	453 \pm 54	701 \pm 54	529 \pm 45
β -feniletanolo	181 \pm 2	183 \pm 3	395 \pm 4	290 \pm 6	347 \pm 20	479 \pm 16

Tabella 3.1 Contenuti medi con le semidisposizioni di composti volatili varietali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) nei distillati in corrente di vapore delle vinacce di Prosecco a diverse modalità e tempi di stoccaggio. C è il campione Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria) prelevato a 15 giorni di stoccaggio; D è il campione Test prelevato a 30 giorni di stoccaggio, TQ e AC sono i campioni rispettivamente non acidificato e acidificato, e prelevati a 15 e 30 giorni di stoccaggio.

Il linalolo libero recuperato con la distillazione nei campioni non acidificati C (Test 15) e D (Test 30), è risultato inferiore a quello riscontrato nelle vinacce non acidificate (campioni TQ). Al contrario, livelli molto più elevati di linalolo libero sono stati trovati negli estratti delle vinacce C e D residue dalla distillazione (1003 e 1035 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rispettivamente, come da tabelle 3.2 e 3.3) rispetto ai campioni TQ 15 e TQ 30 (87 e 110 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva, rispettivamente).

In figura 3.1 sono riportati i contenuti medi dei terpenoli totali recuperati con la distillazione in corrente di vapore delle vinacce di Prosecco stoccate a diverse modalità e a diversi tempi di stoccaggio.

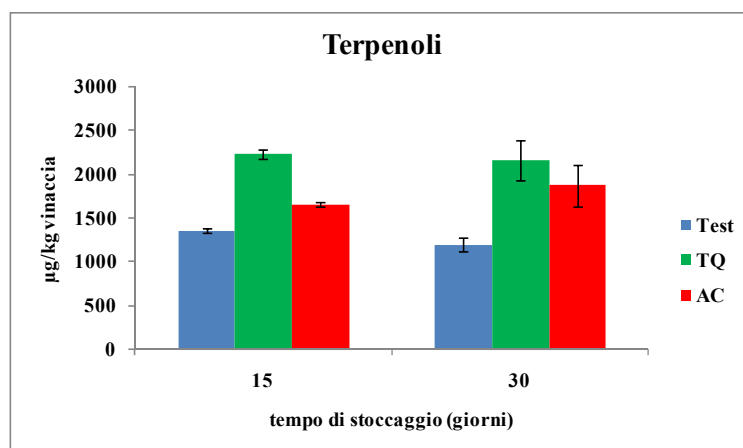


Figura 3.1 Contenuti medi di terpenoli totali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) recuperati con la distillazione in corrente di vapore delle vinacce di Prosecco stoccate con diverse modalità e a diversi tempi di stoccaggio. In azzurro sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria e poi stoccato), in verde nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Dopo 15 giorni il contenuto di terpenoli totali risulta superiore nelle vinacce tal quali (TQ) e rimane praticamente lo stesso a 30 giorni di stoccaggio con valori comparabili alle vinacce acidificate (AC). Nei campioni non acidificati C e D del testimone Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria), il contenuto di terpenoli totali è lo stesso a 15 e 30 giorni, e si mantiene inferiore rispetto alle altre due tesi.

3.2 Studio dei profili degli aromi varietali liberi e precursori di aromi nelle vinacce dopo la distillazione: campioni vendemmia 2005

Le determinazioni sono state eseguite sui campioni di vinaccia Prosecco vendemmiata nel 2005 e trattate e conservate secondo le modalità riportate in ALLEGATI-Figura 1. Sono stati determinati i profili dei composti varietali liberi e dei composti glicosidati rimasti nelle vinacce dopo la distillazione. La preparazione del campione e le analisi sono state eseguite come descritto nei paragrafi 2.1.3.2 e 2.1.4 dei MATERIALI e METODI. I risultati sono riportati nelle tabelle 3.2 e 3.3 come media di due campioni analizzati.

Aromi varietali estratti dalle vinacce ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ vinaccia)	Test 15 (C) liberi	TQ 15 liberi	AC 15 liberi	Test 15 (C) glicosidati	TQ 15 glicosidati	AC 15 glicosidati
Linalolo	1003 \pm 516	87 \pm 27	91 \pm 21	94 \pm 59	42 \pm 2	45 \pm 15
Geraniolo	168 \pm 20	216 \pm 71	175 \pm 18	41 \pm 11	66 \pm 3	163 \pm 36
OH-citronellolo	nd	nd	nd	36 \pm 20	84 \pm 7	78 \pm 20
Trans-8-OH-linalolo	nd	nd	nd	41 \pm 12	109 \pm 33	90 \pm 21
OH-geraniolo	444 \pm 40	374 \pm 26	186 \pm 32	295 \pm 14	417 \pm 37	515 \pm 93
Cis-8-OH-linalolo	444 \pm 40	374 \pm 26	186 \pm 32	295 \pm 14	417 \pm 37	515 \pm 93
7-OH- α -terpineolo	nd	nd	nd	103 \pm 16	129 \pm 35	66 \pm 27
Vanillina	1162 \pm 96	1487 \pm 477	1146 \pm 169	143 \pm 113	249 \pm 30	265 \pm 27
Alcol benzilico	645 \pm 324	530 \pm 187	447 \pm 200	488 \pm 54	659 \pm 132	830 \pm 246
β -feniletanolo	7500 \pm 2017	8152 \pm 1250	8675 \pm 2011	305 \pm 39	431 \pm 68	595 \pm 214
3-OH- β -damascone	487 \pm 137	293 \pm 115	155 \pm 84	90 \pm 14	138 \pm 72	207 \pm 112
3-oxo- α -ionolo	486 \pm 32	701 \pm 64	367 \pm 167	168 \pm 72	378 \pm 71	488 \pm 154
3-OH-7,8-diidro- β -ionolo	108 \pm 36	71 \pm 25	117 \pm 58	nd	nd	nd
3-OH-7,8-dideidro- β -ionolo	152 \pm 65	137 \pm 4	90 \pm 21	nd	nd	nd
Vomifoliolo	1817 \pm 158	626 \pm 119	669 \pm 104	1207 \pm 133	1418 \pm 480	1564 \pm 136

Tabella 3.2 Contenuti medi con le semidispersioni di composti varietali liberi (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e composti varietali glicosidati (espressi in μg di 1-decanolo/kg vinaccia) recuperati mediante estrazione con metanolo dalle vinacce di Prosecco dopo la distillazione in corrente di vapore, stoccate per 15 giorni secondo diverse modalità. C è il campione Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria) prelevato a 15 giorni di stoccaggio, TQ e AC sono i campioni rispettivamente non acidificato e acidificato e prelevati a 15 giorni di stoccaggio.

Aromi varietali estratti dalle vinacce ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ vinaccia)	Test 30 (D) liberi	TQ 30 liberi	AC 30 liberi	Test 30 (D) glicosidati	TQ 30 glicosidati	AC 30 glicosidati
Linalolo	1035 \pm 538	110 \pm 28	139 \pm 29	74 \pm 39	25 \pm 4	30 \pm 3
Geraniolo	228 \pm 34	231 \pm 57	203 \pm 26	7 \pm 2	44 \pm 9	131 \pm 8
OH-citronellolo	nd	nd	nd	19 \pm 4	19 \pm 7	42 \pm 19
Trans-8-OH-linalolo	164 \pm 21	16 \pm 7	nd	26 \pm 7	30 \pm 8	66 \pm 7
OH-geraniolo	634 \pm 35	581 \pm 59	302 \pm 8	157 \pm 28	212 \pm 1	403 \pm 25
Cis-8-OH-linalolo	634 \pm 35	581 \pm 59	302 \pm 8	157 \pm 28	212 \pm 1	403 \pm 25
7-OH- α -terpineolo	nd	nd	nd	59 \pm 31	92 \pm 11	121 \pm 51
Vanillina	1144 \pm 697	1387 \pm 802	1200 \pm 465	105 \pm 70	133 \pm 73	127 \pm 29
Alcol benzilico	615 \pm 149	600 \pm 173	530 \pm 185	250 \pm 10	454 \pm 120	756 \pm 99
β -feniletanolo	7753 \pm 1296	8148 \pm 1007	9218 \pm 1613	177 \pm 56	283 \pm 81	461 \pm 75
3-OH- β -damascone	303 \pm 21	512 \pm 87	240 \pm 63	22 \pm 10	48 \pm 6	116 \pm 40
3-oxo- α -ionolo	1049 \pm 445	256 \pm 113	264 \pm 53	164 \pm 55	149 \pm 10	430 \pm 120
3-OH-7,8-diidro- β -ionolo	182 \pm 44	136 \pm 42	76 \pm 28	nd	nd	nd
3-OH-7,8-dideidro- β -ionolo	199 \pm 45	179 \pm 38	129 \pm 32	nd	nd	nd
Vomifoliolo	3011 \pm 640	1766 \pm 7	830 \pm 104	607 \pm 208	698 \pm 84	2269 \pm 450

Tabella 3.3 Contenuti medi con le semidisposizioni di composti varietali liberi (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e composti varietali glicosidati (espressi in μg di 1-decanolo/kg vinaccia) recuperati mediante estrazione con metanolo dalle vinacce di Prosecco dopo la distillazione in corrente di vapore, stoccate per 30 giorni secondo diverse modalit . D   il campione Test (refrigerato a 18 C per 15 ore dall'arrivo in distilleria) prelevato a 30 giorni di stoccaggio, TQ e AC i campioni rispettivamente non acidificati e acidificati e prelevati a 30 giorni di stoccaggio.

I dati medi delle analisi di due prelievi di vinaccia relativa allo stesso campione presentavano talvolta semidisposizioni rilevanti: questo   dovuto alla intrinseca natura della materia prima che presenta grande eterogeneit  di struttura che rende difficoltoso il campionamento.

Ci  nonostante, le differenze riscontrate tra i diversi campioni spesso permettono di evidenziare delle differenze tra le tesi riconducibili alle diverse modalit  di stoccaggio.

Dopo 15 giorni di stoccaggio si osserva che il contenuto medio di terpenoli liberi nelle vinacce acidificate   inferiore a quello delle vinacce non trattate, parallelamente si osserva un contenuto superiore di composti glicosidati (tabella 3.2). Tale effetto risulta pi  marcato dopo 30 giorni di stoccaggio: nei campioni non acidificati i terpenoli liberi risultano in generale maggiori di quelli glicosidati, l'inverso   riscontrato nei campioni acidificati (tabella 3.3). Passando da 15 a 30 giorni di stoccaggio, si   riscontrato per ciascuna delle tre tesi un aumento dei livelli dei composti liberi e parallelamente una diminuzione dei composti glicosidati.

Nelle figure 3.2, 3.3, 3.4 sono riportate rispettivamente la somma dei terpenoli, norisoprenoidi e benzenoidi (β -feniletanolo+alcol benzilico+vanillina) nelle forme libere e glicosidate dopo 15 e 30 giorni di stoccaggio.

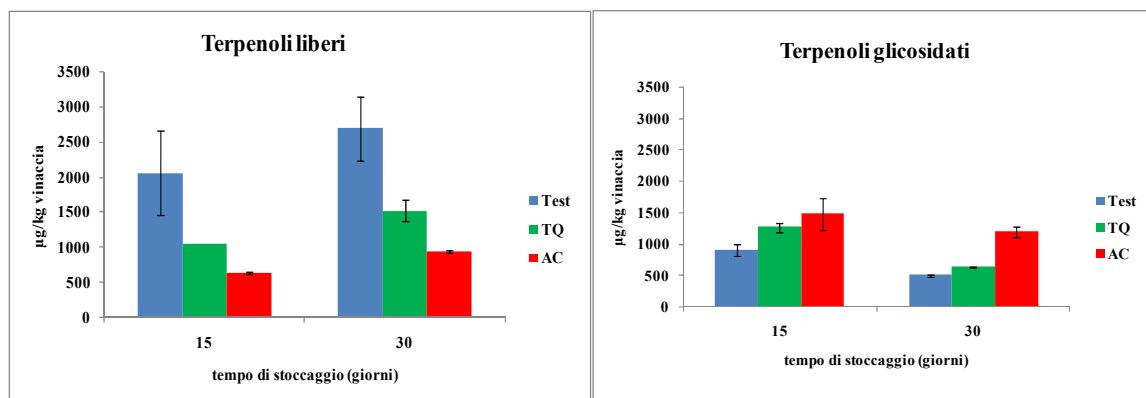


Figura 3.2 Contenuti medi di terpenoli liberi totali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e di terpenoli glicosidati totali (espressi in μg di 1-decanolo/Kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco a diverse modalità e tempi di stoccaggio. In azzurro sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria e poi stoccato), in verde nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

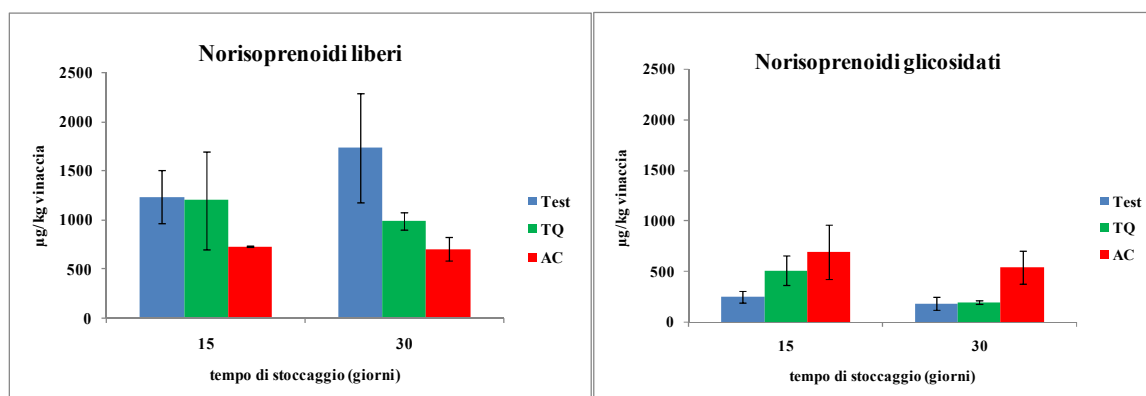


Figura 3.3 Contenuti medi di norisoprenoidi liberi totali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e di norisoprenoidi glicosidati totali (espressi in μg di 1-decanolo/Kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco a diverse modalità e tempi di stoccaggio. In azzurro sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria e poi stoccato), in verde nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

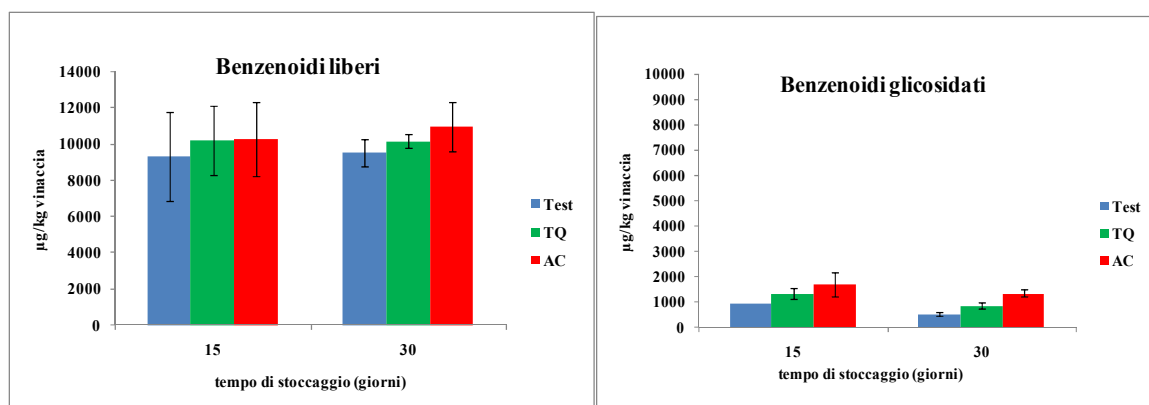


Figura 3.4 Contenuti medi di benzenoidi liberi totali (espressi in μg di 1-eptanolo/Kg vinaccia) e di benzenoidi glicosidati totali (espressi in μg di 1-decanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco a diverse modalità e tempi di stoccaggio. In azzurro sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria e poi stoccato), in verde nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

A 15 giorni di fermentazione si osserva che il contenuto medio di terpenoli liberi nelle vinacce acidificate è inferiore a quello delle vinacce non trattate e parallelamente nelle acidificate si riscontra un contenuto superiore di composti glicosidati (figura 3.2). Tale effetto risulta più marcato dopo 30 giorni di stoccaggio: nei campioni non acidificati i contenuti di terpenoli liberi risultano in generale maggiori di quelli glicosidati, l'inverso è stato riscontrato nei campioni acidificati. Passando da 15 a 30 giorni di stoccaggio, si è riscontrato per ciascuna delle tre tesi un aumento dei livelli dei composti liberi e parallelamente una diminuzione dei composti glicosidati.

A 15 giorni di stoccaggio i norisoprenoidi liberi nelle due tesi non acidificate (Test e TQ) sono paragonabili, mentre nelle acidificate sono leggermente inferiori, dopo 30 giorni si riscontra lo stesso andamento osservato per i terpenoli: nelle vinacce acidificate c'è un minore contenuto di liberi rispetto alle altre tesi e un maggiore contenuto di glicosidati (figura 3.3).

I benzenoidi liberi nelle diverse tesi sono stati in generale riscontrati in concentrazione paragonabile (figura 3.4).

Confrontando le somme dei terpenoli e dei norisoprenoidi liberi e glicosidati del campione testimone Test (refrigerato a 18°C durante le prime 15 ore dall'arrivo in distilleria) con il campione non refrigerato (entrambi in assenza di acidificazione) (figure 3.2 e 3.3), si osserva che il contenuto di composti liberi è superiore nel campione testimone. L'acidificazione sembra rallentare l'idrolisi dei terpenoli e dei norisoprenoidi glicosidati che viene operata dalle glicosidasi dell'uva presenti nelle vinacce. Questo

effetto è stato riscontrato anche in un precedente studio condotto su campioni di vinacce di Moscato (Salvadori, 2005).

In figura 3.5 sono riportate le somme del contenuto medio dei terpenoli liberi totali estratti in corrente di vapore e di quelli estratti con solvente. Come si può notare le vinacce acidificate presentano un contenuto inferiore di composti liberi sia a 15 giorni che a 30 giorni rispetto alle tesi non acidificate.

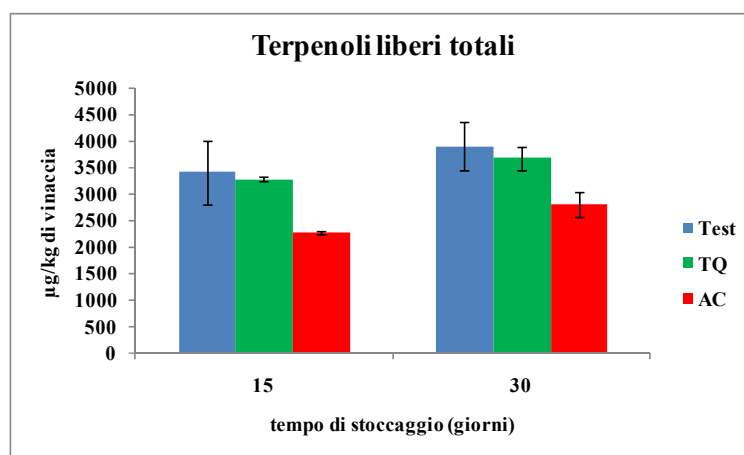


Figura 3.5 Somma dei contenuti di terpenoli totali liberi estratti in corrente di vapore ed estratti con solvente (espressi in µg di 1-eptanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco a diverse modalità e tempi di stoccaggio. In azzurro sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati Test (refrigerato a 18°C per 15 ore dall'arrivo in distilleria e poi stoccato), in verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, e in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

3.3 Studio dei profili degli aromi varietali liberi recuperabili con la distillazione: campioni vendemmia 2006

Le determinazioni sono state eseguite sui campioni di vinaccia Prosecco vendemmiata nel 2006 e trattate e conservate secondo le modalità riportate in ALLEGATI-Figura 2. La preparazione del campione e le analisi sono state eseguite come descritto nei paragrafi 2.1.3.1 e 2.1.4 di MATERIALI e METODI. Sono stati determinati i composti volatili varietali e di fermentazione recuperabili mediante distillazione in corrente di vapore. In tabella 3.4 sono riportati i dati medi di due campioni di vinaccia.

Composti recuperati mediante distillazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vinaccia)		TQ 15gg	AC 15gg	ACI 15gg	TQ 30gg	AC 30gg	ACI 30gg				
Benzaldeide		680 \pm 100	308 \pm 20	90 \pm 37	511 \pm 71	321 \pm 14	56 \pm 25				
Furan linalolo ossido		79 \pm 7	58 \pm 9	43 \pm 5	70 \pm 11	68 \pm 2	21 \pm 3				
Linalolo		909 \pm 41	818 \pm 12	469 \pm 78	905 \pm 79	596 \pm 80	415 \pm 15				
α -terpineolo		180 \pm 66	72 \pm 2	161 \pm 5	146 \pm 49	139 \pm 60	213 \pm 75				
Metil salicilato		264 \pm 14	179 \pm 32	48 \pm 48	290 \pm 29	146 \pm 21	Nd				
Citronellolo		413 \pm 15	373 \pm 28	119 \pm 14	380 \pm 34	299 \pm 13	74 \pm 26				
Etilsalicilato		74 \pm 6	44 \pm 2	nd	82 \pm 2	40 \pm 11	28 \pm 2				
Geraniolo		634 \pm 127	984 \pm 368	242 \pm 116	435 \pm 112	211 \pm 23	60 \pm 10				
β -fenilettil acetato		1107 \pm 65	1070 \pm 368	758 \pm 81	2131 \pm 138	1052 \pm 51	392 \pm 51				
β -feniletanolo		970 \pm 13	721 \pm 55	685 \pm 79	811 \pm 89	539 \pm 136	698 \pm 25				
Composti recuperati mediante distillazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vinaccia)		TQ 109gg	AC 109gg	ACI 109gg	TQ 120gg	AC 120gg	ACI 120gg	TQ 180gg	AC 180gg	ACI 180gg	ACI 180gg
Benzaldeide		549 \pm 88	866 \pm 342	97 \pm 39	621 \pm 131	715 \pm 9	110 \pm 1	862 \pm 109	540 \pm 54	777 \pm 35	
Furan linalolo ossido		191 \pm 34	75 \pm 11	121 \pm 4	154 \pm 27	195 \pm 19	179 \pm 48	nd	nd	nd	
Linalolo		912 \pm 109	862 \pm 101	219 \pm 34	860 \pm 30	1006 \pm 65	292 \pm 3	803 \pm 30	813 \pm 107	1120 \pm 179	
α -terpineolo		226 \pm 45	191 \pm 35	275 \pm 30	180 \pm 38	172 \pm 9	310 \pm 51	275 \pm 8	367 \pm 193	300 \pm 9	
Metil salicilato		180 \pm 24	100 \pm 21	134 \pm 18	155 \pm 52	239 \pm 2	144 \pm 11	154 \pm 54	46 \pm 4	98 \pm 12	
Citronellolo		194 \pm 19	182 \pm 6	77 \pm 47	127 \pm 13	206 \pm 9	64 \pm 14	138 \pm 9	87 \pm 10	63 \pm 12	
Etilsalicilato		324 \pm 61	172 \pm 41	nd	290 \pm 17	138 \pm 38	Nd	nd	nd	145 \pm 16	
Geraniolo		579 \pm 24	448 \pm 309	nd	511 \pm 76	606 \pm 3	125 \pm 9	493 \pm 123	238 \pm 14	336 \pm 36	
β -fenilettil acetato		4546 \pm 104	4547 \pm 710	1499 \pm 100	2215 \pm 374	4436 \pm 50	2124 \pm 172	468 \pm 9	255 \pm 11	336 \pm 83	
β -feniletanolo		1566 \pm 79	1094 \pm 9	1141 \pm 124	1241 \pm 228	1475 \pm 249	1071 \pm 195	1316 \pm 64	1683 \pm 107	1173 \pm 114	

Tabella 3.4 Contenuti medi con le semidispersioni di composti volatili varietali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) nei distillati in corrente di vapore delle vinacce di Prosecco a tempi di stoccaggio e modalità diversi. TQ = campioni non acidificati; AC = campioni acidificati; ACI = campioni acidificati ed inoculati con lieviti selezionati prima dello stoccaggio, prelevati a 15, 30, 109, 120, 180 giorni di stoccaggio.

In figura 3.6 sono riportate le somme dei contenuti medi dei terpenoli liberi, monitorati durante l'intero periodo di stoccaggio, e misurati nei campioni di vinaccia acidificati ed acidificati + inoculati con lieviti selezionati.

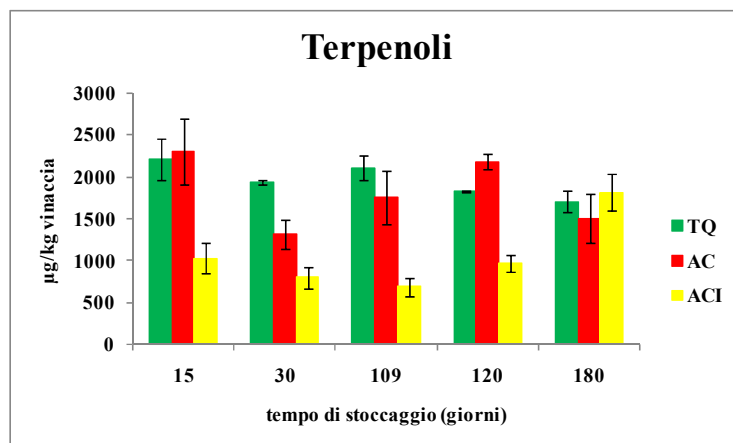


Figura 3.6 Contenuti medi di terpenoli liberi (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) recuperati con la distillazione in corrente di vapore delle vinacce di Prosecco stoccate a tempi e con modalità diversi. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati ed inoculati. TQ, campioni di vinaccia non acidificati; AC, campioni di vinaccia acidificati; ACI campioni acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Come si può osservare in figura 3.6, a 15, 109, e a 180 giorni di stoccaggio il contenuto totale di terpenoli liberi nelle vinacce tal quali ed acidificate è paragonabile. Dopo 120 giorni nelle vinacce acidificate si osserva un contenuto leggermente maggiore di terpenoli rispetto alle altre tesi. Tuttavia, in entrambi i campioni la quantità assoluta subisce modeste variazioni durante l'intero periodo.

Le vinacce acidificate+inoculate presentano contenuti inferiori di terpenoli liberi rispetto alle altre due tesi fino a 120 giorni, i contenuti diventavano comunque paragonabili dopo 6 mesi di stoccaggio.

3.4 Studio dei profili degli aromi varietali liberi e precursori di aromi della vinaccia: campioni vendemmia 2006

Le determinazioni sono state eseguite sui campioni di vinaccia Prosecco vendemmiata nel 2006 e trattate e conservate secondo le modalità riportate in ALLEGATI-Figura 2. Sono stati studiati i profili dei composti varietali liberi e glicosidati rimasti nelle vinacce dopo la distillazione in corrente di vapore. Per la preparazione del campione e le analisi sono state impiegate le metodiche descritte nei paragrafi 2.1.3.2 e 2.1.4 dei MATERIALI e METODI. Nelle tabelle 3.5 e 3.6 sono riportati i risultati delle analisi.

Aromi varietali estratti dalle vinacce ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vinaccia)	TQ 15gg liberi	AC 15gg liberi	TQ 30gg liberi	AC 30gg liberi	TQ 15gg glicosidati	AC 15gg glicosidati	TQ 30gg glicosidati	AC 30gg glicosidati
Linalolo	119 \pm 6	116 \pm 1	126 \pm 17	155 \pm 16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Geraniolo	299 \pm 13	280 \pm 14	314 \pm 1	264 \pm 34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Endiolo	305 \pm 79	338 \pm 33	434 \pm 10	383 \pm 24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OH-citronellolo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65 \pm 24	60 \pm 13	72 \pm 10	58 \pm 16
Cis-8-OH linalolo	699 \pm 163	545 \pm 41	745 \pm 70	748 \pm 41	413 \pm 81	398 \pm 92	371 \pm 78	274 \pm 87
OH-geraniolo	699 \pm 163	545 \pm 41	745 \pm 70	748 \pm 41	413 \pm 81	398 \pm 92	371 \pm 78	274 \pm 87
7-OH- α -terpineolo	392 \pm 4	253 \pm 3	482 \pm 199	352 \pm 161	90 \pm 17	90 \pm 15	98 \pm 8	83 \pm 22
Vanillina	649 \pm 4	703 \pm 1	782 \pm 222	890 \pm 115	126 \pm 7	136 \pm 12	115 \pm 15	136 \pm 41
Alcol benzilico	627 \pm 79	564 \pm 35	712 \pm 88	660 \pm 121	1705 \pm 39	1715 \pm 168	1407 \pm 246	1461 \pm 114
β -fenilletanolo	7855 \pm 2142	6653 \pm 1709	6653 \pm 572	7750 \pm 270	728 \pm 24	765 \pm 63	664 \pm 119	621 \pm 36
3-OH- β -damascone	384 \pm 95	187 \pm 11	313 \pm 110	200 \pm 10	116 \pm 6	108 \pm 8	64 \pm 5	80 \pm 1
3-oxo- α -ionolo	700 \pm 180	577 \pm 123	625 \pm 24	640 \pm 76	274 \pm 57	293 \pm 23	281 \pm 35	226 \pm 32
3-OH-7,8-diidro- β -ionolo	n.d.	89 \pm 20	150 \pm 11	119 \pm 19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-OH-7,8-dideidro- β -ionolo	118 \pm 27	105 \pm 12	91 \pm 2	92 \pm 8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabella 3.5 Contenuti medi con le semidispersioni di composti varietali liberi (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e composti varietali glicosidati (espressi in μg di 1-decanolo/Kg vinaccia) recuperati mediante estrazione con metanolo delle vinacce di Prosecco stoccate per 30 giorni secondo modalità diverse, dopo la distillazione in corrente di vapore. TQ = campioni non acidificati; AC = campioni acidificati prelevati a 15 e 30 giorni di stoccaggio.

Aromi varietali estratti dalle vinacce ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vinaccia)	TQ 109gg	AC 109gg	TQ 120gg	AC 120gg	TQ 180gg	AC 180gg	TQ 109gg	AC 109gg	TQ 120gg	AC 120gg	TQ 180gg	AC 180gg
	liberi	liberi	liberi	liberi	liberi	liberi	glicosidati	glicosidati	glicosidati	glicosidati	glicosidati	glicosidati
Linalolo	71 \pm 14	18 \pm 3	54 \pm 3	43 \pm 4	56 \pm 15	43 \pm 13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Geraniolo	144 \pm 67	173 \pm 40	108 \pm 58	109 \pm 31	0 \pm 0	0 \pm 0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Endiolo	494 \pm 28	504 \pm 137	675 \pm 36	416 \pm 110	481 \pm 43	542 \pm 64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OH-citronellolo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26 \pm 5	17 \pm 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cis-8-OH-linalolo	745 \pm 14	916 \pm 41	551 \pm 46	658 \pm 49	940 \pm 426	251 \pm 12	130 \pm 49	125 \pm 11	105 \pm 28	78 \pm 11	n.d.	180 \pm 65
OH-geraniolo	745 \pm 14	916 \pm 41	551 \pm 46	658 \pm 49	940 \pm 426	251 \pm 12	130 \pm 49	125 \pm 11	105 \pm 28	78 \pm 11	n.d.	180 \pm 65
7-OH- α -terpineolo	n.d.	n.d.	174 \pm 62	66 \pm 1	490 \pm 54	306 \pm 18	40 \pm 17	65 \pm 22	20 \pm 1	25 \pm 4	n.d.	n.d.
Vanillina	2288 \pm 106	2352 \pm 239	2564 \pm 71	1382 \pm 637	1814 \pm 15	1706 \pm 111	94 \pm 41	162 \pm 3	231 \pm 38	244 \pm 2	179 \pm 26	285 \pm 44
Alcol benzilico	793 \pm 9	801 \pm 57	684 \pm 97	681 \pm 57	662 \pm 4	537 \pm 7	413 \pm 39	492 \pm 18	392 \pm 88	357 \pm 32	330 \pm 220	1086 \pm 291
β -fenilletanolo	10357 \pm 1179	9315 \pm 246	9792 \pm 94	8888 \pm 510	14025 \pm 888	13356 \pm 1653	239 \pm 43	252 \pm 7	236 \pm 38	223 \pm 20	188 \pm 49	823 \pm 267
3-OH- β -damascone	404 \pm 1	618 \pm 12	404 \pm 49	432 \pm 39	231 \pm 11	80 \pm 23	30 \pm 6	30 \pm 5	12 \pm 3	7 \pm 1	n.d.	n.d.
3-oxo- α -ionolo	1170 \pm 242	1440 \pm 2	1607 \pm 21	874 \pm 190	2109 \pm 19	873 \pm 485	152 \pm 19	131 \pm 27	88 \pm 7	109 \pm 3	120 \pm 9	661 \pm 0
3-OH-7,8-diidro- β -ionolo	141 \pm 18	246 \pm 9	305 \pm 49	309 \pm 17	189 \pm 6	131 \pm 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-OH-7,8-dideidro- β -ionolo	278 \pm 89	356 \pm 28	238 \pm 47	316 \pm 30	218 \pm 33	129 \pm 19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabella 3.6 Contenuti medi con le semidispersioni di composti varietali liberi (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e composti varietali glicosidati (espressi in μg di 1-decanolo/Kg vinaccia) recuperati mediante estrazione con metanolo delle vinacce di Prosecco stoccate per 6 mesi secondo modalità diverse, dopo distillazione in corrente di vapore. TQ = campioni non acidificati; AC = campioni acidificati prelevati a 109, 120, 180 giorni di stoccaggio.

Dall'esame delle tabelle 3.5 e 3.6 si può notare che i livelli dei terpenoli liberi totali e glicosidati totali risultano paragonabili nelle due tesi - tal quale ed acidificata - fino a 120 giorni di stoccaggio (tabelle 3.5 e 3.6).

L'andamento del linalolo a 15 e 30 giorni nei liberi non acidificati ed acidificati (tabella 3.5) è analogo a quello che si riscontra nei campioni del 2005: il contenuto rimane uguale a 15 giorni, per poi diventare superiore nelle vinacce acidificate a 30 giorni.

A 6 mesi di stoccaggio le vinacce acidificate presentano un calo drammatico dei terpenoli liberi, mentre permane un discreto livello di precursori in forma glicosidata. Questi ultimi risultano praticamente assenti nei campioni non acidificati (tabella 3.6, figura 3.7).

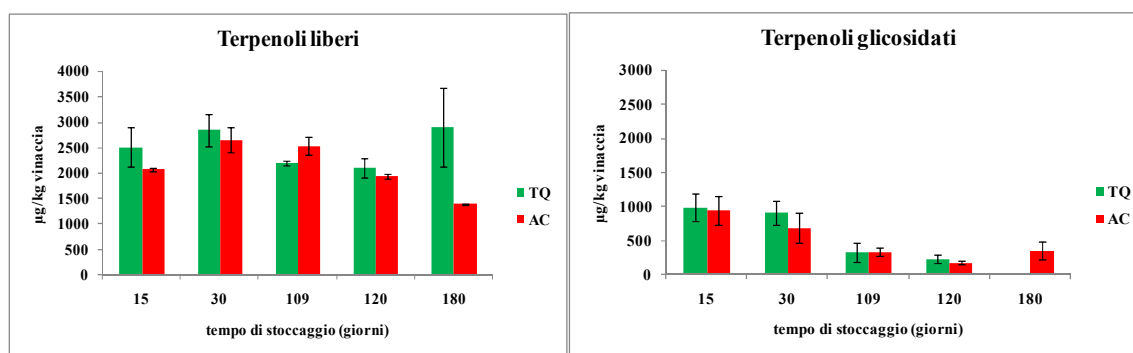


Figura 3.7 Contenuti medi di terpenoli liberi totali (espressi in µg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e di terpenoli glicosidati totali (espressi in µg di 1-decanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

L'elevato contenuto di terpenoli liberi totali delle vinacce tal quali a 180 giorni (6 mesi) può essere ascritto all'eterogeneità della materia prima, dove si evidenzia una considerevole differenza tra i due campionamenti (figura 3.7). Nell'ipotesi che uno dei due campionamenti dia un contributo per eccesso, il contenuto di terpenoli liberi risulterebbe simile a quello riscontrato dopo 120 giorni.

Nelle figure 3.8 e 3.9 sono riportate rispettivamente la somma dei norisoprenoidi e benzenoidi (β -feniletanolo+alcol benzilico+vanillina) nelle forme libere e glicosidate dopo 15, 30, 109, 120, 180 giorni di stoccaggio.

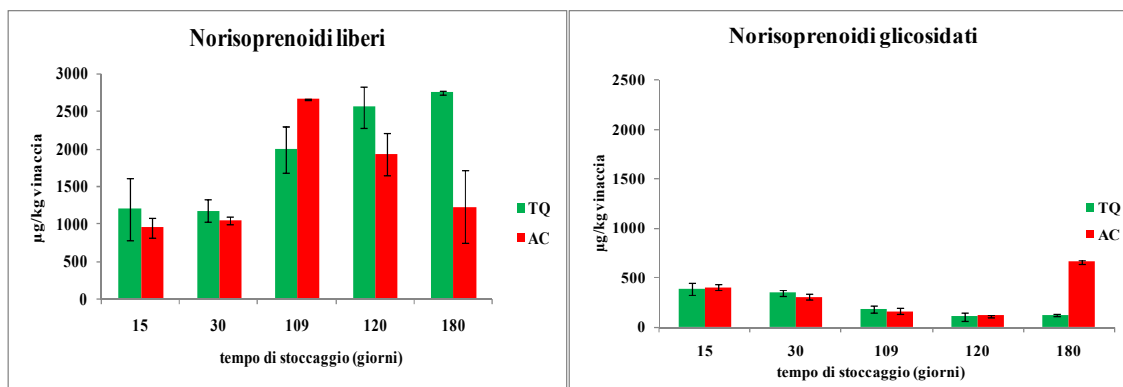


Figura 3.8 Contenuti medi di norisoprenoidi liberi totali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e di norisoprenoidi glicosidati totali (espressi in μg di 1-decanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

I livelli di norisoprenoidi liberi totali, similmente ai norisoprenoidi glicosidati, sono paragonabili nelle due tesi fino a 120 giorni di stoccaggio. Dopo 180 giorni si osserva un sensibile calo nelle vinacce acidificate, accompagnato da un livello maggiore di glicosidati rispetto all'altra tesi. In generale, i contenuti norisoprenoidi glicosidati totali tendono a calare nei primi 120 giorni di stoccaggio, rimanendo più elevati dopo 180 giorni nelle vinacce acidificate.

I composti benzenoidi liberi e glicosidati risultano paragonabili nelle due tesi, e rivelano una tendenza ad incrementare nel tempo (figura 3.9). Questo potrebbe essere dovuto a processi di degradazione a carico della lignina.

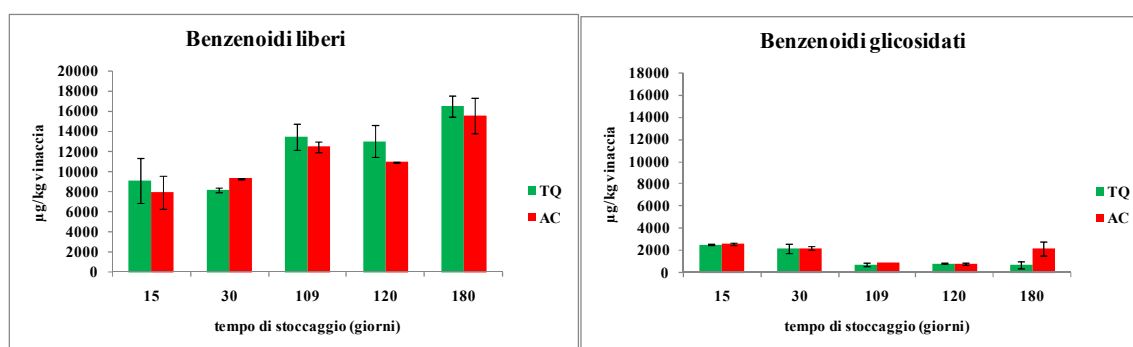


Figura 3.9 Contenuti medi di benzenoidi liberi totali (espressi in μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) e di benzenoidi glicosidati totali (espressi in μg di 1-decanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi (verde vinacce tal quali, rosso vinacce acidificate). In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC= campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

In figura 3.10 sono riportate le somme del contenuto medio dei terpenoli liberi totali estratti in corrente di vapore e di quelli estratti con solvente. Si osserva che fino a un mese di stoccaggio le vinacce acidificate presentano un contenuto inferiore rispetto alle tesi non acidificate. Questo conferma quanto osservato nei campioni provenienti dalla vendemmia dell'anno 2005. A 109 e 120 giorni i contenuti nelle due tesi risultano paragonabili, mentre alla fine dello stoccaggio si è osservato una riduzione dei terpenoli nelle vinacce acidificate. Questo potrebbe essere legato a fatto che l'acidificazione promuove processi di degradazione chimica dei composti.

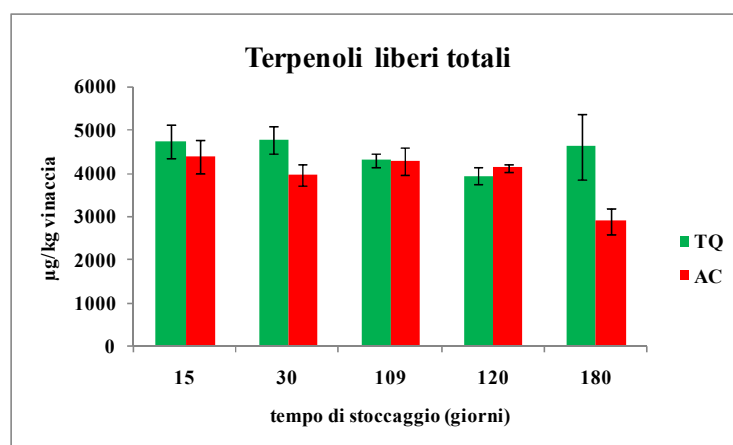


Figura 3.10 Somma dei contenuti di terpenoli liberi totali estratti in corrente di vapore ed estratti con solvente (espressi in µg di 1-eptanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi.

In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso quelli nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

3.5 I precursori di aromi nor-isoprenoidi nelle vinacce di Prosecco

Nell'ambito dei composti aromatici varietali dell'uva, i composti norisoprenoidi rappresentano una frazione qualitativamente importante in quanto sono caratterizzati da note varietali peculiari. Tuttavia, nei distillati, i composti norisoprenoidi contribuiscono in misura minore all'aroma della grappa in quanto essi sono poco volatili e quindi poco recuperabili con la distillazione, (Di Stefano e Borsa, 2006).

È stata eseguita l'estrazione dei precursori di aromi nor-isoprenoidi (frazione dei carotenoidi) dalle vinacce come descritto nel paragrafo 2.4 della sezione MATERIALI e METODI. Successivamente è stato studiato l'effetto del pH della soluzione nella reazione di idrolisi dell'estratto dei carotenoidi provenienti da vinacce di Prosecco non acidificate e stoccate per 30 giorni. Questo studio è stato condotto per verificare se l'acidificazione può promuovere la formazione dei norisoprenoidi dai carotenoidi e/o la loro successiva decomposizione. In tabella 3.7 sono riportati i contenuti di precursori di aromi, estratti a riflusso in condizioni neutre ed acide.

Composti estratti µg/kg vinaccia	pH 6 30 min riflusso	pH 6 2 ore riflusso	pH 6 5 ore riflusso	pH 2.7 30 min riflusso	pH 2.7 2 ore riflusso	pH 2.7 5 ore riflusso
3-OH-β-damascone	257	268	199	220	129	209
3-oxo-α-ionolo	593	779	563	632	696	615
3-OH-7,8-diidro-β-ionolo	129	152	107	131	126	125
actinidolo a	6	10	14	4	10	14
actinidolo b	11	16	23	9	16	20
vomifoliolo	352	527	382	953	978	872

Tabella 3.7 Contenuti di norisoprenoidi liberi (espressi in µg di 1-eptanolo/kg vinaccia) presenti negli estratti a riflusso delle vinacce di Prosecco a diversi tempi di reazione e condizioni di pH.

I dati in tabella evidenziano che la formazione di norisoprenoidi derivati dai carotenoidi non mostra particolari differenze se l'idrolisi è condotta in condizioni acide (pH 2.7) o neutre (pH 6.0), e che solo la formazione di vomifoliolo sembra essere favorita dalle condizioni acide.

3.6 Studio dei precursori di aromi nor-isoprenoidi nella vinaccia

I norisoprenoidi liberi e glicosidati sono stati determinati come descritto nel paragrafo 2.1.3.2 in MATERIALI E METODI su campioni di vinaccia di Prosecco vendemmiata nel 2006. In figura 3.10 sono riportati i contenuti medi dei norisoprenoidi liberi, ed in figura 3.11 dei composti glicosidati, entrambi estratti con metanolo dalle vinacce acidificate e non acidificate.

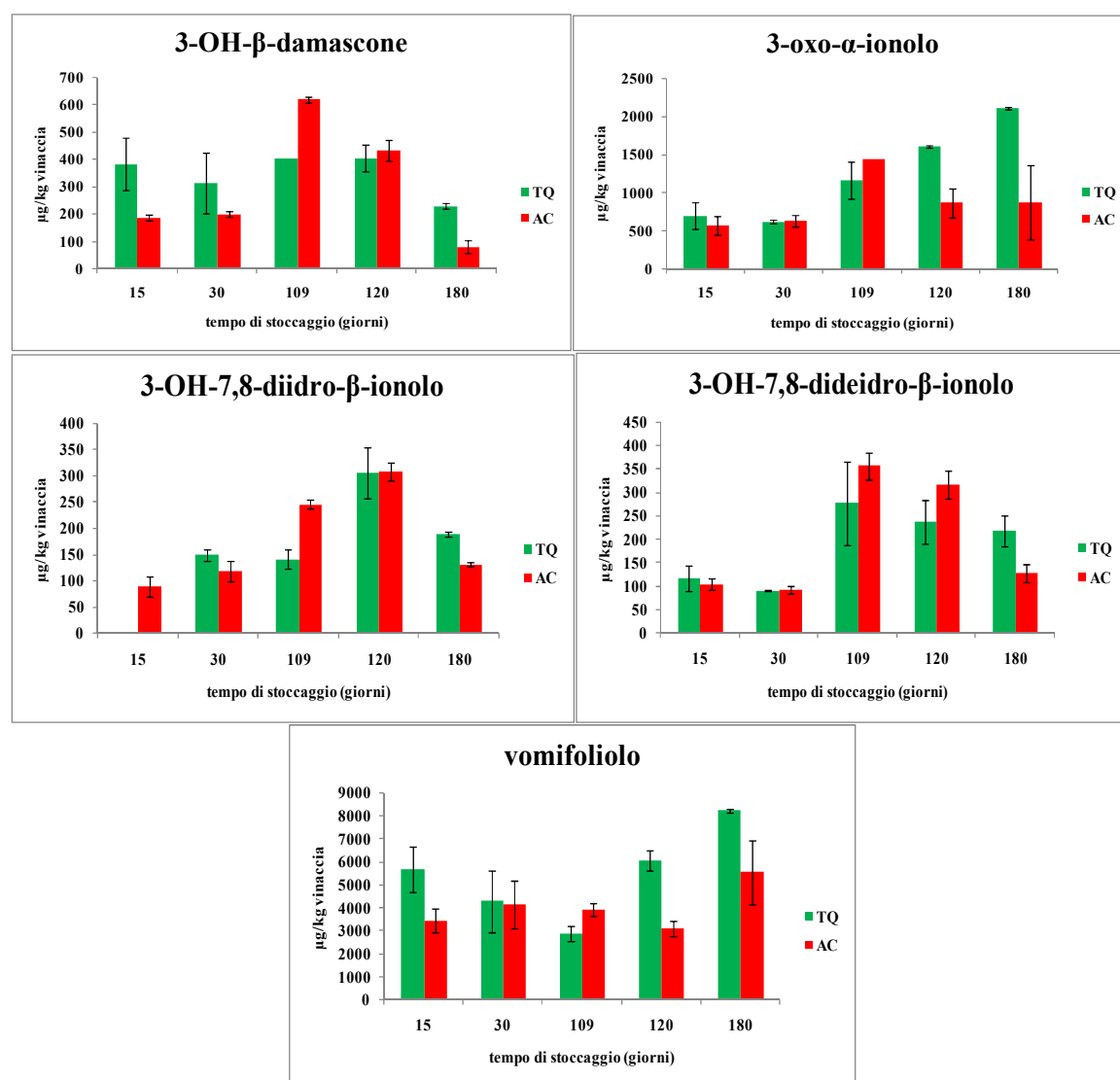


Figura 3.10 Contenuti medi dei norisoprenoidi liberi totali (espressi in µg di 1-eptanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC= campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisperzione calcolata per i due prelievi analizzati.

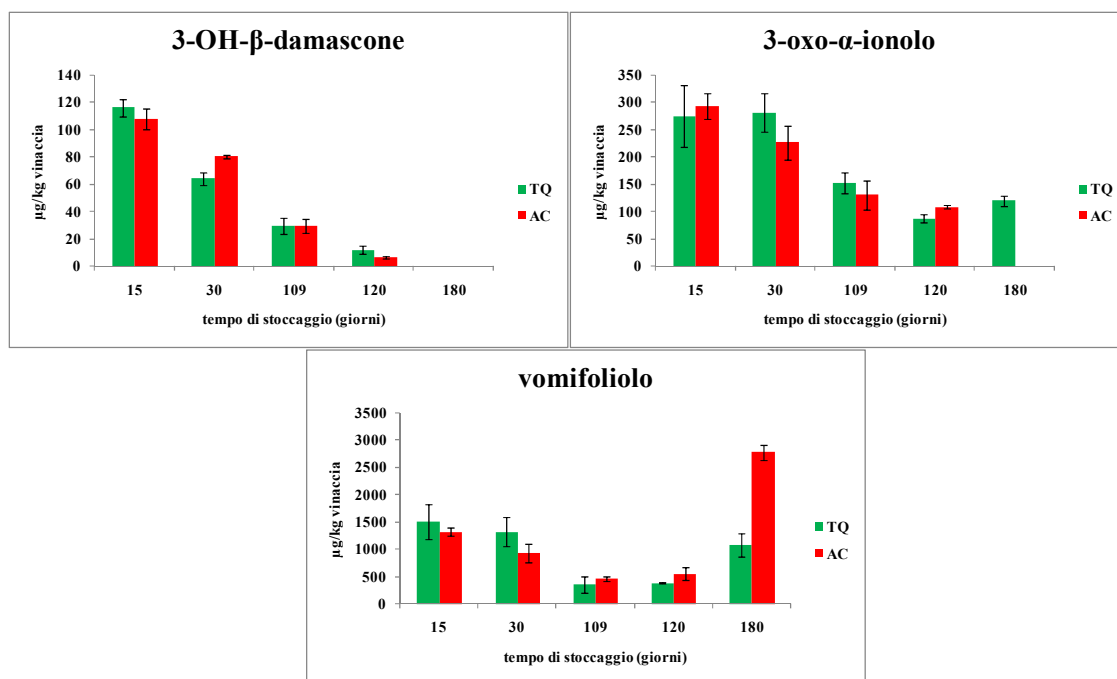


Figura 3.11 Contenuti medi dei norisoprenoidi glicosidati totali (espressi in µg di 1-decanolo/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

L'acidificazione induce la formazione di maggiori quantità di 3-OH-7,8-dideidro-β-ionolo, 3-oxo-α-ionolo e vomifoliolo liberi durante i tempi più lunghi di stoccaggio. I valori più elevati 3-OH-7,8-dideidro-β-ionolo e vomifoliolo liberi si osservano nel primo mese di stoccaggio. È degna di nota l'assenza di il 3-OH-7,8-diidro-β-ionolo nelle vinacce non acidificate nei primi 15 giorni di stoccaggio.

In entrambe le tesi, sono risultati assenti il 3-OH-7,8-diidro-β-ionolo e il 3-OH-7,8-dideidro-β-ionolo glicosidati, e si è evidenziato un calo drammatico nel tempo del 3-OH-β-damascone e del 3-oxo-α-ionolo glicosidati. Il 3-OH-β-damascone risulta completamente assente dopo 6 mesi mentre il 3-oxo-α-ionolo è ancora presente solo nelle vinacce non acidificate. La quantità di vomifoliolo, paragonabile nelle due tesi, subisce dapprima un calo e poi una crescita nel tempo. Esso risulta presente in livelli particolarmente elevati nelle vinacce acidificate a fine stoccaggio.

In generale, l'acidificazione non sembra esercitare un effetto rilevante sull'idrolisi dei precursori glicosidati dei norisoprenoidi. Precedenti studi suggeriscono che una acidificazione più spinta delle vinacce (ad esempio, a pH = 1) potrebbe indurre una maggiore formazione di aromi: il 3-oxo-α-ionolo viene degradato in mezzi acidi per formare cinque megastigma-4,6,8-trien-3-oni isomeri (Aasen *et al.*, 1972; Strauss *et al.*,

1987), il vomifoliolo, resistente a pH 3, viene ridotto a 7,8-diidrovomifoliolo a pH più bassi (Winterhalter e Schreier, 1988).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE
I COMPOSTI DI FERMENTAZIONE

4.1 Studio dei principali metaboliti di fermentazione nelle vinacce di uva Prosecco in relazione ai tempi ed alle modalità di conservazione: vendemmia 2006

Come accade per i composti varietali, talvolta i dati medi delle analisi di due prelievi di vinaccia dello stesso campione presentavano differenze rilevanti. La valutazione dei dati operata al fine di individuare le differenze tra le tesi e riconducibili alle diverse modalità di stoccaggio, è stata pertanto fatta in funzione delle variabilità riscontrate.

Su campioni di vinaccia di uva Prosecco, è stato indagato l'effetto dell'acidificazione unita all'inoculo di un ceppo di lieviti selezionati prima dello stoccaggio. In particolare, sono stati studiati:

- l'andamento dei principali metaboliti di fermentazione (acetaldeide, metanolo, 2-propanolo, acetato di etile, 1-propanolo, 2-butanolo, isobutanolo, 1-butanolo, alcoli isoamilici, lattato di etile, etanolo) durante un periodo di stoccaggio di 180 giorni;
- i livelli di composti quali acido lattico, acido malico ed acido acetico, potenzialmente legati allo sviluppo di batteri lattici ed acetici, durante un periodo di 180 giorni;
- l'andamento dei principali esteri acetici ed etilici durante i 180 giorni di stoccaggio delle vinacce.

La descrizione del protocollo di campionamento e lo schema di campionamento sono riportati rispettivamente in paragrafo 2.1.2 di MATERIALI E METODI ed in ALLEGATI-Figura 2. Le vinacce sono state studiate a partire da 15 giorni dopo lo stoccaggio, tempo in cui la fermentazione alcolica è completata.

4.1.1 Principali metaboliti volatili di fermentazione

composto	acetaldeide	metanolo	2-propanolo	acetato di etile	1-propanolo	2-butanolo	isobutanolo	1-butanolo	alcooli isoamilici	lattato di etile	esano
tempo stoccaggio	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
TQ 15	125.39±13.42	338.50±9.40	17.55±15.82	78.00±40.82	40.41±5.60	0.84±0.35	45.33±5.74	0.64±0.10	84.47±7.75	113.81±15.29	21.78±10.94
AC 15	106.77±22.84	378.17±87.18	34.19±25.43	68.82±55.51	34.57±5.87	0.67±0.46	41.53±7.30	0.59±0.11	76.49±22.87	97.01±21.02	8.31±1.51
ACI 15	86.22±2.93	340.80±46.85	33.62±10.66	31.57±50.72	21.90±4.39	0.58±3.71	44.74±3.35	0.54±0.01	79.46±6.15	10.81±11.16	6.61±2.98
TQ 30	140.74±1.10	471.22±48.79	47.27±22.10	155.43±27.63	47.31±4.13	0.58±1.90	52.68±5.43	0.94±0.05	82.52±4.10	171.08±0.94	7.55±0.82
AC 30	98.21±18.36	436.64±100.47	21.75±4.25	110.77±64.64	38.02±8.73	0.53±0.03	52.04±13.49	0.68±0.17	86.27±24.08	118.90±10.79	10.31±0.06
ACI 30	134.42±5.92	337.43±7.24	19.69±20.39	62.30±23.40	22.53±1.40	0.49±0.11	48.18±2.37	0.56±0.01	86.49±2.66	23.90±7.37	7.23±2.46
TQ 109	61.07±27.64	431.36±73.18	19.08±3.76	253.70±5.50	47.80±2.84	21.18±0.35	37.63±0.90	0.64±0.00	69.71±4.40	90.41±35.03	8.95±0.04
AC 109	54.23±2.15	398.69±34.89	43.04±32.44	182.25±33.70	66.14±1.04	43.91±2.29	42.58±0.51	0.59±0.04	76.79±1.81	82.77±0.72	9.26±1.59
ACI 109	112.04±7.57	381.32±71.06	26.96±11.63	64.09±11.77	17.01±0.92	0.53±1.54	42.50±0.27	0.39±0.02	81.38±0.50	10.32±7.33	2.52±0.26
TQ 120	48.30±7.26	549.19±14.30	55.80±3.42	201.54±9.97	51.41±0.01	10.48±0.01	50.28±0.58	0.77±0.02	80.45±1.90	115.33±3.29	2.98±0.01
AC 120	60.21±6.38	372.74±19.31	20.67±7.79	180.55±3.45	61.49±0.36	42.96±0.04	41.34±0.67	0.58±0.00	74.74±1.94	61.46±0.65	7.80±0.06
ACI 120	100.31±3.79	335.09±70.37	20.58±12.03	71.87±25.29	15.45±1.36	0.57±0.44	36.93±3.50	0.35±0.06	70.15±5.51	10.23±4.07	2.19±0.68
TQ 180	79.86±7.83	504.56±4.37	18.79±3.39	263.65±0.03	34.38±0.82	1.48±0.07	52.79±2.26	0.61±0.03	92.41±2.96	64.36±1.46	4.64±0.44
AC 180	61.98±21.38	383.99±4.45	18.97±3.03	90.45±5.81	19.27±0.48	0.54±0.02	40.13±1.47	0.41±0.01	63.25±3.30	43.57±1.65	4.47±0.65
ACI 180	36.06±14.09	518.53±118.03	20.17±5.71	172.15±47.42	24.46±3.29	0.61±0.08	49.83±8.74	0.53±0.04	124.80±21.35	81.01±2.12	3.86±0.86

Tabella 4.1 Contenuti medi (espressi in mg/kg vinaccia) con le semidispersioni dei principali composti volatili di fermentazione delle vinacce Prosecco stoccate tal quali, dopo acidificazione e dopo acidificazione ed inoculo di lieviti selezionati per un periodo di 180 giorni. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati.

L'acidificazione della vinaccia, che viene operata soprattutto per limitare l'attività degli enzimi pectinmetilesterasi che determina la produzione del metanolo (Versini e Inama, 1981), si è rivelata utile per stoccaggi superiori a 3 mesi.

Per quanto riguarda il contenuto di acetaldeide, composto che ad alte concentrazioni nel distillato conferisce al prodotto un odore pungente e sgradevole, si sono osservati i seguenti andamenti: i livelli maggiori sono stati riscontrati nei campioni di vinacce acidificate e inoculate nel periodo compreso tra 30 e 120 giorni. In queste vinacce il contenuto riscontrato a 109 e 120 giorni è risultato doppio rispetto alle altre due tesi.

Diversamente, non si sono osservate differenze significative nel contenuto di acetaldeide tra i campioni di vinacce acidificate e di quelle non acidificate.

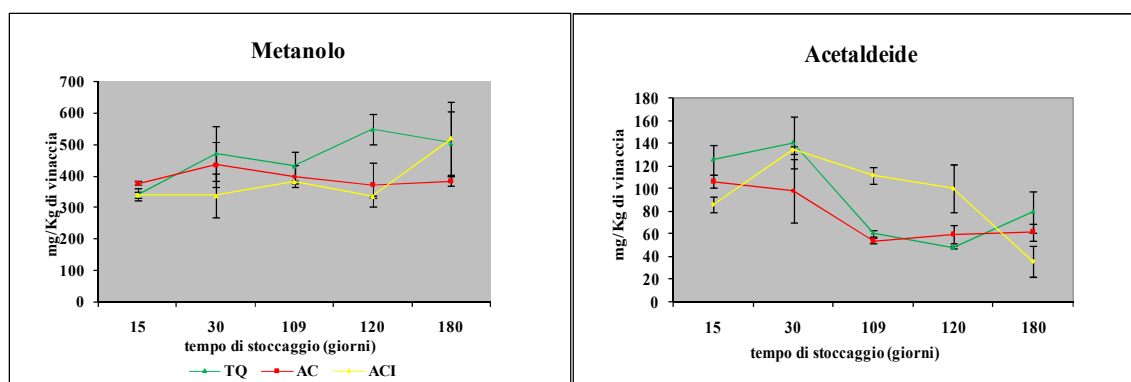


Figura 4.1 Andamento del contenuto medio di metanolo ed acetaldeide (mg/kg vinaccia) delle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

I livelli di 2-butanolo (figura 4.2), composto indice di fermentazioni batteriche che avvengono negli strati più bassi delle vinacce in condizioni anaerobiche (Usseglio-Tomasset, 1971), hanno evidenziato che nei primi 3 mesi non ci sono state significative differenze tra i campioni stoccati secondo le diverse modalità, ma dai 3 ai 4 mesi di stoccaggio si osserva un forte incremento nei campioni non inoculati con i lieviti selezionati, mentre i livelli più elevati sono stati riscontrati nel campione acidificato analogamente all'1-propanolo la cui produzione da parte di microrganismi è riportato essere correlata a quella del 2-butanolo (Usseglio-Tomasset, 1971). Dopo 6 mesi i livelli nelle tre tesi tornavano ad essere tra loro in linea.

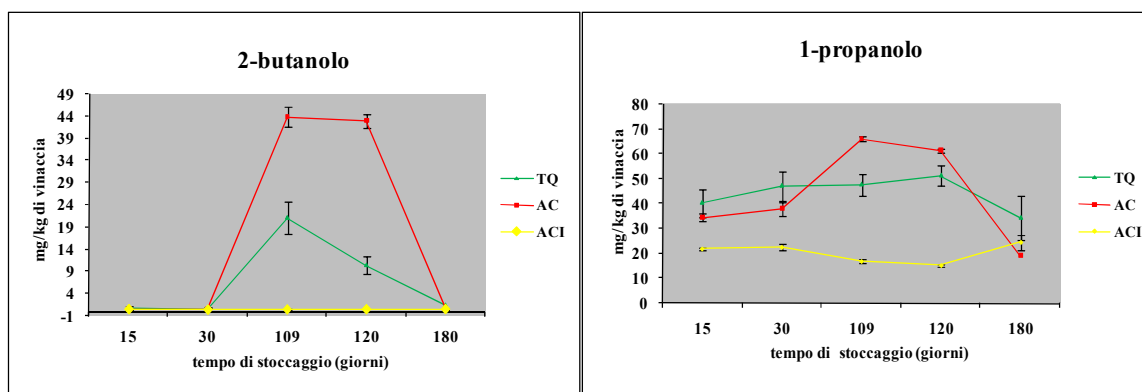


Figura 4.2 Andamento del contenuto medio di 2-butanolo e 1-propanolo (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

I livelli di 2-butanolo, 1-propanolo (figura 4.2), 1-butanolo (figura 4.5) e lattato di etile (figura 4.3), composti che si formano durante la fermentazione e ad opera di batteri, risultano più elevati dopo 3 mesi di conservazione nelle vinacce tal quali ed acidificate, in accordo con l'elevata carica batterica che era stata riscontrata nell'ambito di altri studi condotti sugli stessi campioni, mentre sono inferiori nelle vinacce acidificate+inoculate in accordo con i livelli bassi di popolazione batteriche trovati (Prof. V. Corich e Prof. A. Giacomini, comunicazione personale).

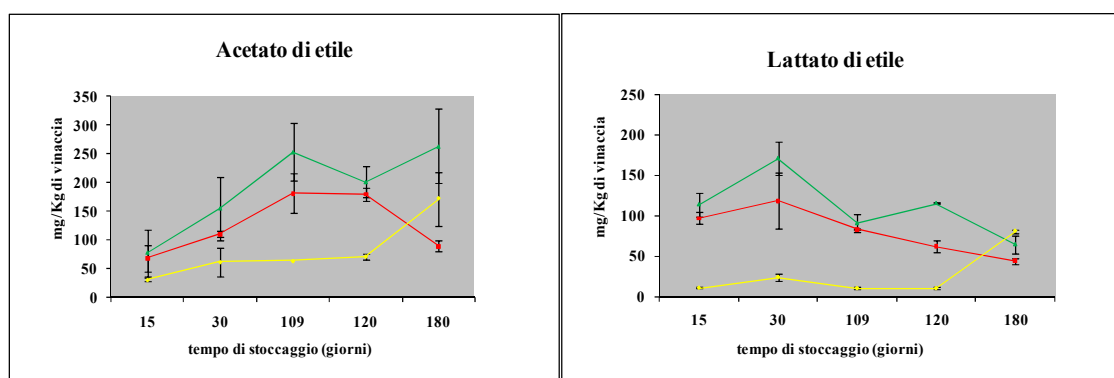


Figura 4.3 Andamento del contenuto medio di lattato di etile ed acetato di etile (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate per un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI, campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

In tutte le tesi l'acetato di etile, composto responsabile dell'acescenza delle vinacce che si sviluppa in condizioni aerobiche, aumenta costantemente durante l'intero periodo di stoccaggio (figura 4.3). Questo incremento risulta sensibilmente minore nelle vinacce acidificate+incolate fino a 120 giorni di stoccaggio, per poi subire un sensibile incremento negli ultimi 2 mesi. Il basso valore riscontrato dopo 6 mesi nelle vinacce acidificate, è ragionevolmente imputabile alla variabilità nel campionamento della vinaccia legato alla natura eterogenea della materia prima.

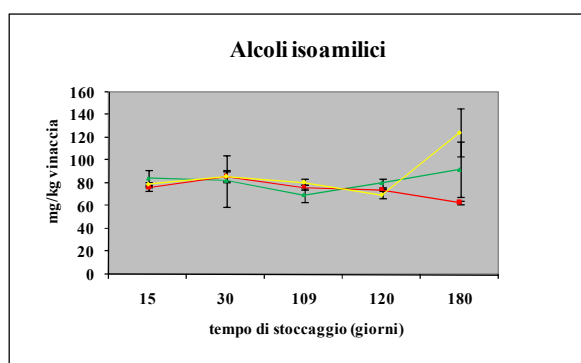


Figura 4.4 Andamento del contenuto medio degli alcoli isoamilici (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati + inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI, campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

Gli alcoli isoamilici e l'isobutanolo (figure 4.4 e 4.5) hanno un andamento costante durante tutto il periodo di stoccaggio in tutte e tre le tesi, in accordo con quanto era stato precedentemente riportato da Usseglio-Tomasset (1971).

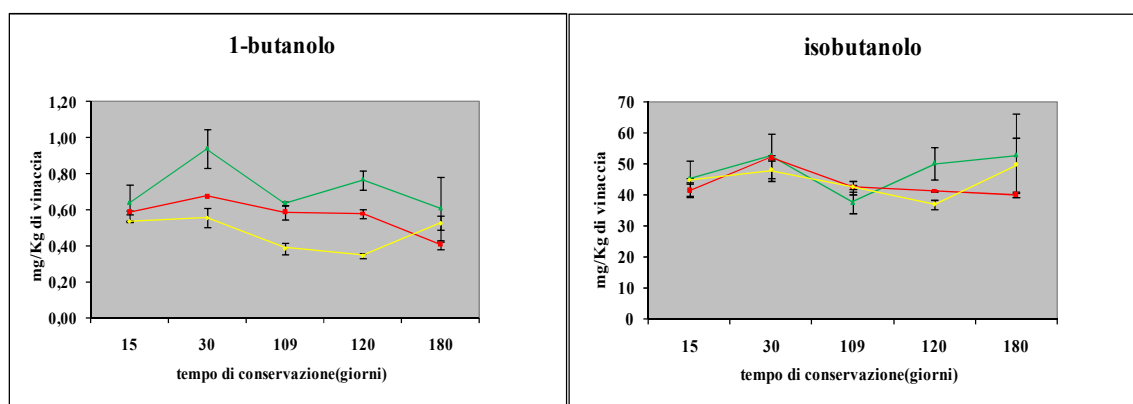


Figura 4.5 Andamento del contenuto medio di 1-butanolo ed isobutanolo (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei

campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

L'alcol alifatico 1-esanolo, che si forma per l'attività dell'enzima lipoossigenasi, presenta in tutte le tesi livelli simili e costanti durante i primi 30 giorni, successivamente tende in generale a calare. Nelle vinacce acidificate+inoculate si riscontrano livelli più bassi nel periodo tra 30 e 109 giorni di stoccaggio. La variabilità dell'1-esanolo nelle vinacce tal quali prelevate al primo campionamento è attribuibile all'eterogeneità della massa (figura 4.6).

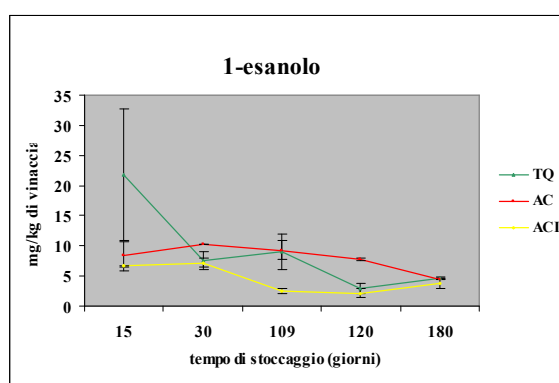


Figura 4.6 Andamento del contenuto medio di 1-esanolo (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati + inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

4.1.2 Andamento dell'acido lattico, acido malico ed acido acetico durante lo stoccaggio delle vinacce Prosecco 2006 (180 giorni)

In tabella 4.2 sono riportati i contenuti medi di etanolo, acidi lattico, malico ed acetico delle vinacce tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate durante uno stoccaggio di 180 giorni. La procedura di estrazione degli acidi è descritta nel paragrafo 3.2.4 di MATERIALI e METODI.

Come si evidenzia dai dati relativi al contenuto di etanolo, dopo 15 giorni la fermentazione è completata. Al termine dello stoccaggio si osserva una perdita di etanolo nelle vinacce conservate tal quali (che già presentavano un grado alcolico leggermente inferiore) ed in quelle acidificate + inoculate. Al contrario, nelle vinacce acidificate il livello di etanolo rimane pressoché costante per l'intero periodo di stoccaggio.

Campioni vinaccia	Etanolo % v/v	Acido malico g/kg vinaccia	Acido lattico g/kg vinaccia	Acido acetico g/kg vinaccia
TQ 15	5.22±0.34	0.31±0.06	1.01±0.12	0.73±0.12
TQ 30	5.29±0.34	0.33±0.04	1.87±0.12	1.53±0.06
TQ 109	4.73±0.23	0.28±0.02	1.76±0.05	3.22±0.22
TQ 120	5.16±0.30	0.37±0.04	2.23±0.13	3.64±0.08
TQ 180	3.29±0.25	0.34±0.02	1.45±0.07	3.33±0.16
AC 15	4.70±0.31	0.32±0.01	1.23±0.11	0.76±0.05
AC 30	5.13±0.31	0.22±0.05	1.33±0.08	0.92±0.09
AC 109	4.26±0.19	0.21±0.04	1.26±0.06	2.55±0.20
AC 120	4.38±0.34	0.22±0.07	1.44±0.10	4.53±0.50
AC 180	4.24±0.15	0.25±0.02	0.57±0.04	1.80±0.11
ACI 15	4.35±0.12	0.74±0.05	0.26±0.03	0.63±0.03
ACI 30	4.60±0.20	0.32±0.03	0.18±0.03	0.40±0.04
ACI 109	3.89±0.22	0.51±0.04	0.21±0.02	2.61±0.06
ACI 120	3.80±0.12	0.41±0.04	0.19±0.04	4.04±0.23
ACI 180	3.40±0.10	0.29±0.04	1.87±0.05	3.23±0.15

Tabella 4.2 Contenuti medi di etanolo (% v/v) nei distillati in corrente di vapore e contenuti medi di acido malico, acido lattico ed acido acetico (g/kg vinaccia) nell'estratto a caldo delle vinacce Prosecco stoccate tal quali, acidificate ed acidificate + inoculate durante il periodo di 180 giorni. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le semidispersioni sono state calcolate per i due prelievi analizzati

Nelle figure 4.7 – 4.10 sono riportati rispettivamente gli andamenti di etanolo, acido lattico, acido malico ed acido acetico delle vinacce durante un periodo di stoccaggio di 180 giorni.

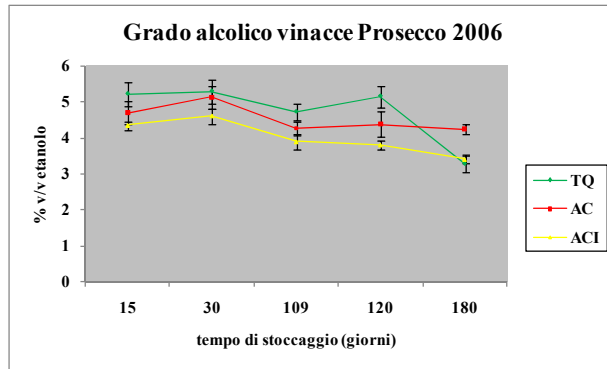


Figura 4.7 Andamento del contenuto medio di etanolo (% v/v) misurato nel distillato in corrente di vapore delle vinacce di Prosecco stoccate tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate per un periodo di stoccaggio di 120 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati + inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

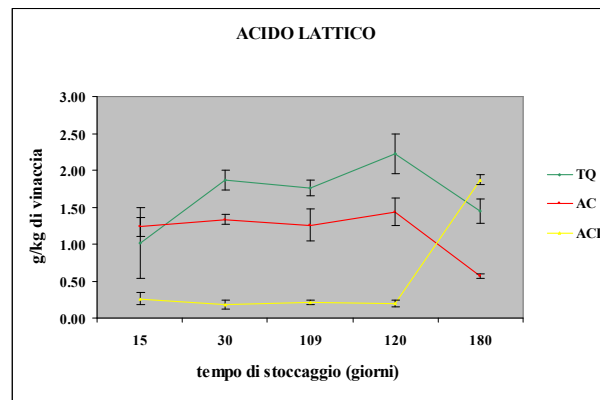


Figura 4.8 Andamento del contenuto medio di acido lattico (g/kg di vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ, campioni di vinaccia non acidificati; AC, campioni di vinaccia acidificati; ACI, campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

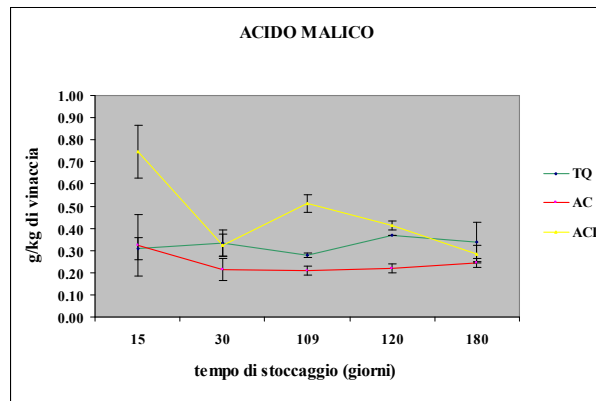


Figura 4.9 Andamento del contenuto medio di acido malico (g/kg di vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

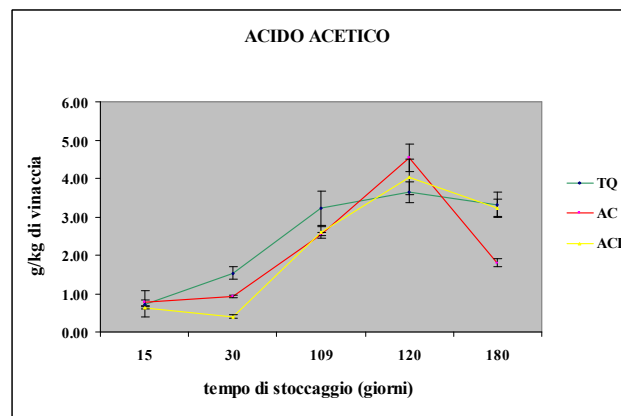


Figura 4.10 Andamento del contenuto medio di acido acetico (g/kg di vinaccia) nelle vinacce di Prosecco tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati + inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

L'acido malico si mantiene a valori costanti per tutto il tempo di stoccaggio con valori leggermente inferiori nelle vinacce acidificate (figura 4.9).

Si osserva un effetto inibente dell'acidificazione rispetto alla formazione dell'acido lattico ed acetico dopo il primo mese di stoccaggio (figure 4.8 e 4.10). Il contenuto più elevato di acido lattico è stato riscontrato nelle vinacce non acidificate dopo 120 giorni (4 mesi) di stoccaggio (2.23 g/kg), mentre il campione acidificato è risultato quello con il livello più basso dopo 6 mesi. Al contrario, il campione acidificato + inoculato ha mantenuto livelli particolarmente bassi di acido lattico per i primi 4 mesi di stoccaggio, probabilmente dovuto a un'inibita attività dei batteri lattici. In questo

campione si riscontra tuttavia un importante incremento negli ultimi due mesi che lo porta al livello di acido lattico del campione non acidificato (dati in tabella 4.2).

In tutte le tesi, l'acido acetico cresce costantemente dopo il primo mese di stoccaggio per poi subire un decremento negli ultimi due mesi (figura 4.10).

4.1.3 Andamento dei principali esteri durante lo stoccaggio delle vinacce Prosecco 2006 (180 giorni)

In figura 4.11 sono riportati i contenuti medi dei principali esteri acetici delle vinacce tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate durante uno stoccaggio di 180 giorni (determinazione descritta in paragrafo 2.1.3.1 di MATERIALI e METODI).

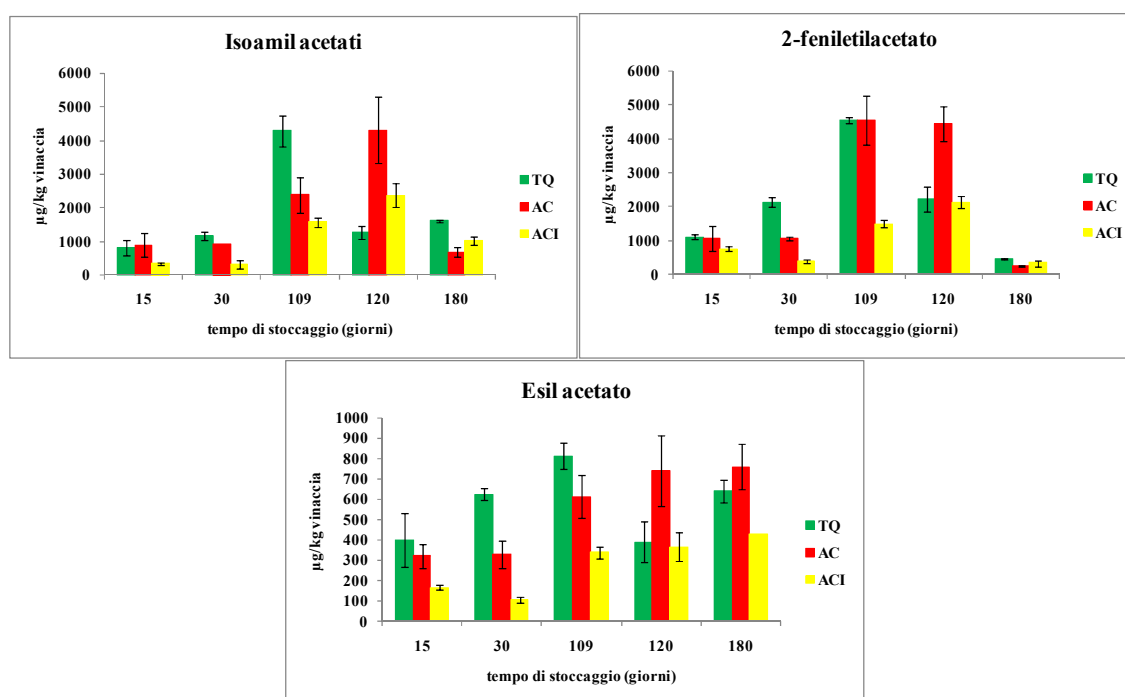


Figura 4.11 Contenuto medio dei principali esteri acetici (μg di 1-eptanolo /kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi per periodo di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

I contenuti medi dei due esteri 2-fenilettilacetato ed esilacetato è tendenzialmente basso durante tutto il periodo di stoccaggio nelle vinacce acidificate+inoculate, tranne a 120 giorni dove il contenuto è uguale a quello delle vinacce non trattate.

I contenuti di 2-fenilettilacetato, che in generale aumentano nel tempo in tutti i campioni, presentano a 120 giorni un contenuto doppio nelle vinacce acidificate rispetto alle altre due tesi. Nelle vinacce tal quali se ne osserva una decrescita dopo i 109 giorni di stoccaggio.

L'acetato di esile cresce nel tempo, in particolare nelle vinacce tal quali ed acidificate ma si mantiene a livelli più bassi nelle vinacce acidificate + inoculate.

In tutte le tesi, gli acetati isoamilici risultano mantenersi in livelli contenuti per i primi 30 giorni, per poi crescere e dopo 109 giorni il livello nelle vinacce stoccate tal

quali risulta circa doppio rispetto alle vinacce acidificate ed acidificate + inoculate. Questi esteri raggiungono il livello massimo dopo 3-4 mesi di stoccaggio, per poi decrescere (figura 4.11).

In figura 4.12 sono riportati i contenuti medi dei principali esteri etilici delle vinacce tal quali, acidificate, acidificate ed inoculate durante uno stoccaggio di 180 giorni.

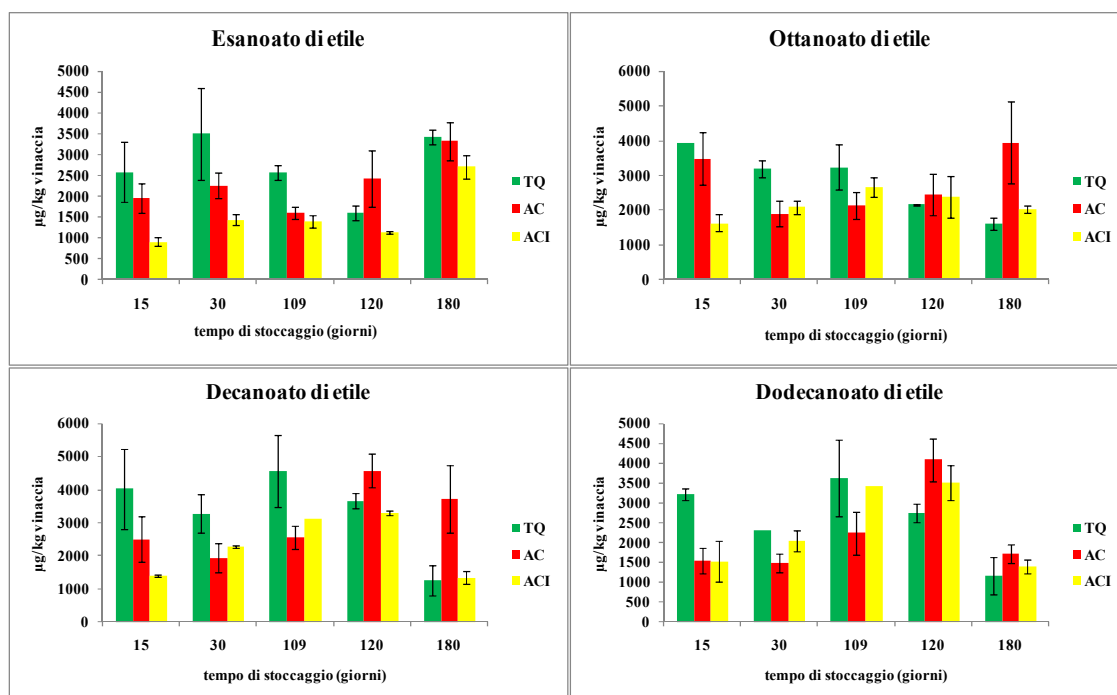


Figura 4.12 Contenuto medio dei principali esteri etilici (μg di 1-eptanolo/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco stoccate secondo tempi e modalità diversi per periodo di 180 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati, in giallo nei campioni acidificati+inoculati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati; AC = campioni di vinaccia acidificati; ACI = campioni di vinaccia acidificati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Al termine dello stoccaggio le tre tesi presentavano contenuti simili di esanoato di etile, anche se il livello si è mantenuto più basso nelle vinacce acidificate+inoculate fino a 120 giorni di stoccaggio. Non si sono riscontrate differenze significative tra le vinacce tal quali ed acidificate.

Dopo 6 mesi le vinacce acidificate presentano una quantità di ottanoato di etile doppia rispetto alle altre tesi. Il calo più marcato si osserva nelle vinacce tal quali. Anche i livelli di decanoato e dodecanoato di etile tendono a mantenersi più elevati nelle vinacce acidificate rispetto alle altre due tesi nei tempi più lunghi di stoccaggio (figura 4.12).

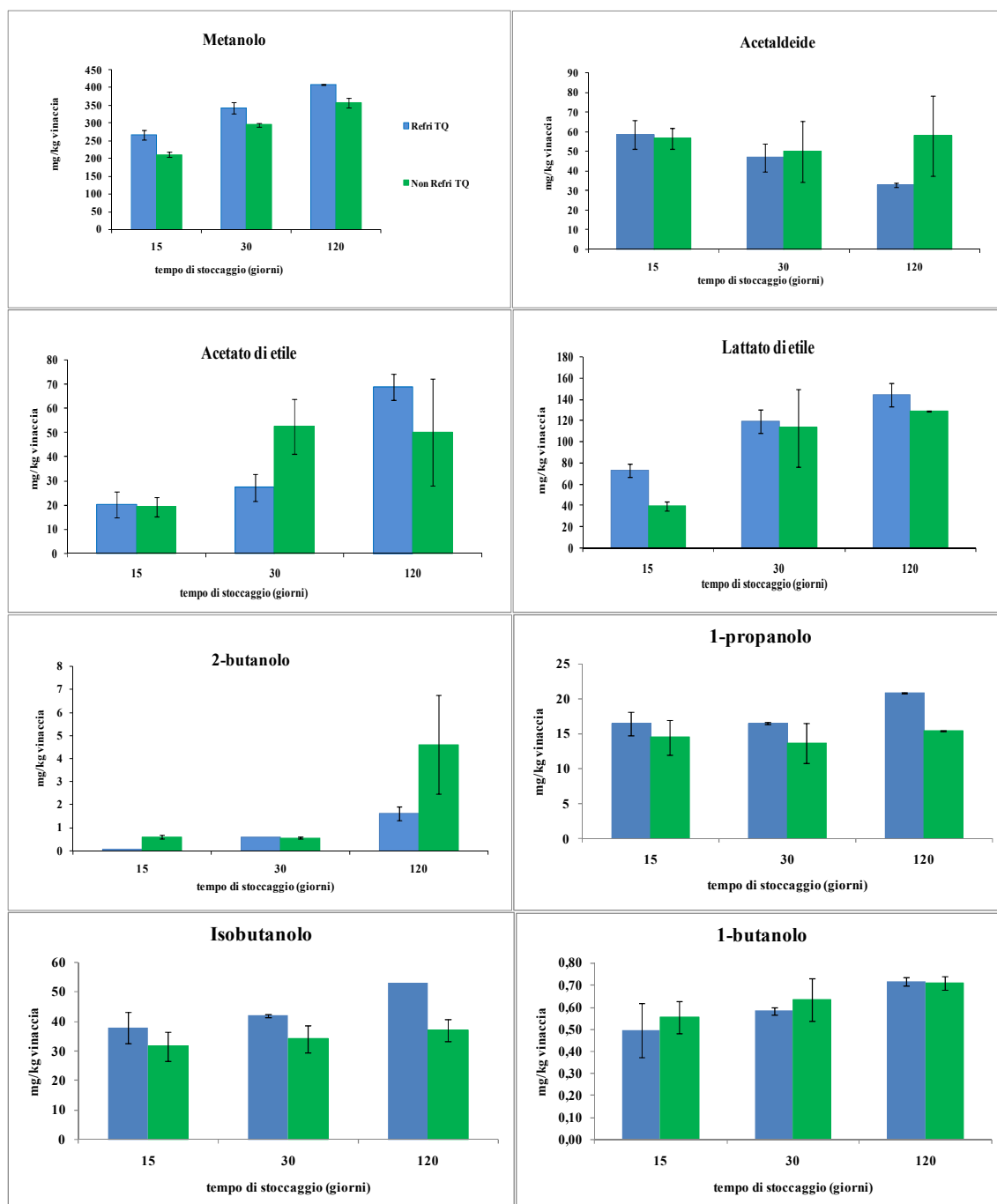
4.2 Studio dei principali metaboliti di fermentazione nelle vinacce di uva Prosecco in relazione ai tempi ed alle modalità di conservazione: vendemmia 2007

Sulla vinaccia di uva Prosecco, è stato indagato l'effetto della refrigerazione unita all'inoculo di un ceppo di lieviti selezionati operato prima dello stoccaggio, sull'andamento dei principali metaboliti di fermentazione (acetaldeide, metanolo, 2-propanolo, acetato di etile, 1-propanolo, 2-butanolo, isobutanolo, 1-butanolo, alcoli isoamilici, lattato di etile, etanolo) durante un periodo di 180 giorni. Le analisi sono state effettuate sui campioni prelevati a 15, 30, 120 giorni di stoccaggio.

La descrizione del protocollo di campionamento e lo schema di campionamento sono riportati rispettivamente nel paragrafo 2.2.1.1 di MATERIALI E METODI ed in ALLEGATI-Figura 3.

4.2.1 Effetto della refrigerazione sui composti di fermentazione

Nella figura 4.13 (pp. 89 e 90) sono riportati i contenuti medi dei principali composti di fermentazione delle vinacce refrigerate tal quali (Refri TQ) e non refrigerate tal quali (Non Refri TQ) durante uno stoccaggio di 120 giorni.



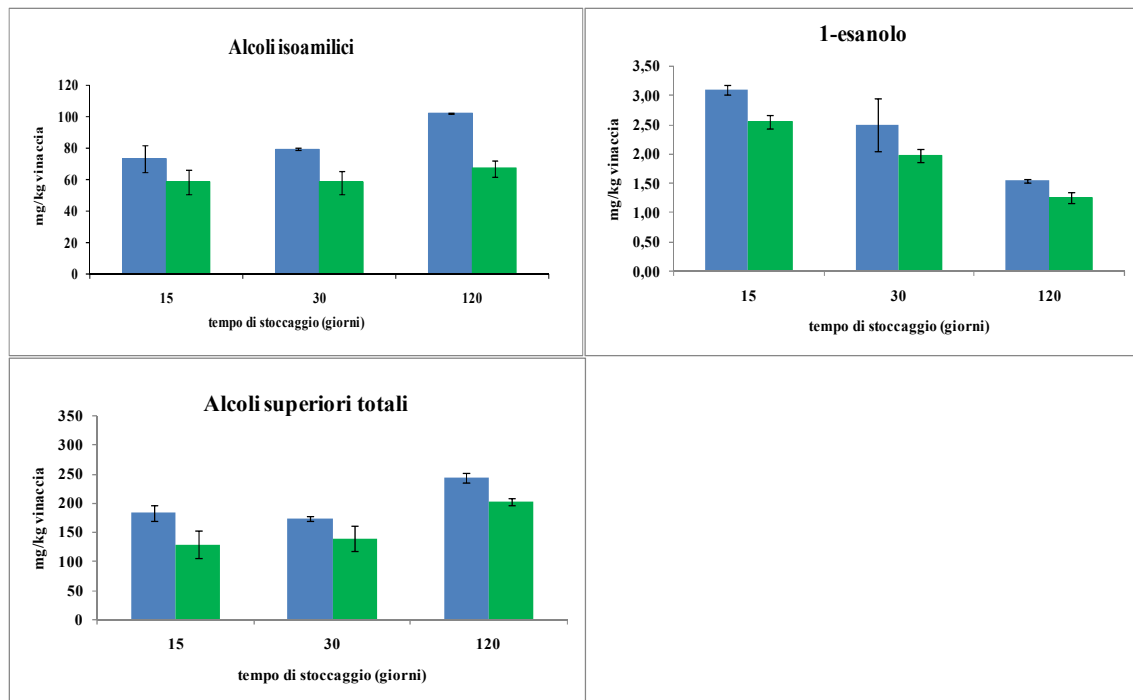


Figura 4.13 Contenuti medi dei principali composti di fermentazione (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco refrigerate e non refrigerate dopo un periodo di stoccaggio di 120 giorni. In azzurro sono riportati i contenuti medi nei campioni refrigerati tal quali, in verde nei campioni non refrigerati tal quali. Refri TQ = campioni di vinaccia refrigerati; Non Refri TQ = campioni di vinaccia non refrigerati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Dalla figura si può osservare durante lo stoccaggio delle vinacce una crescita del metanolo che presenta livelli leggermente superiori nelle vinacce refrigerate, l'acetaldeide subisce un decremento in particolare nelle vinacce refrigerate, l'acetato ed il lattato di etile in generale crescono vistosamente, e maggiormente nelle vinacce refrigerate, così come il 2-butanolo che però al termine dello stoccaggio risultava nettamente superiore nei campioni non refrigerati indice di attacchi batterici della vinaccia.

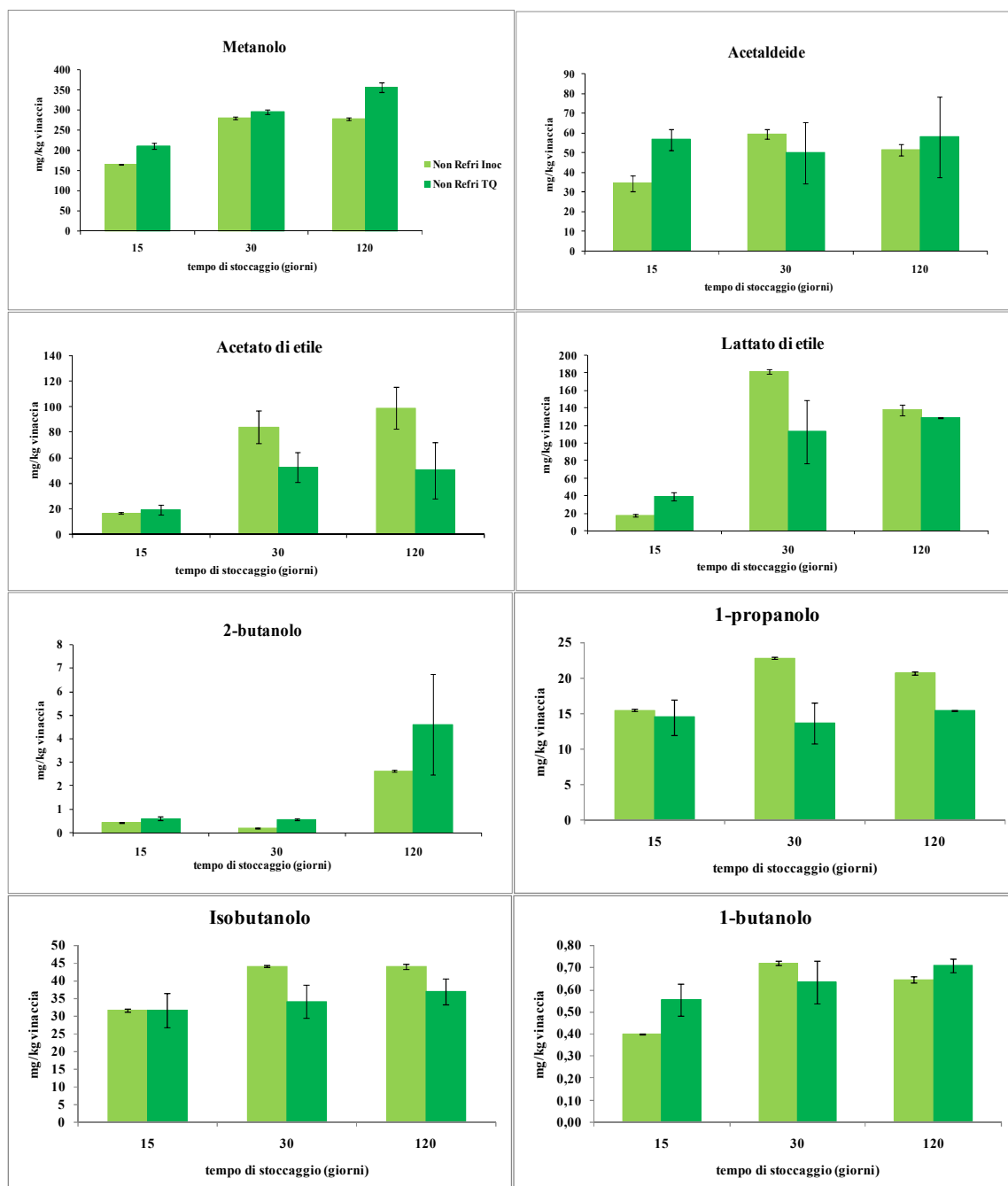
1-propanolo ed isobutanolo presentano andamenti costanti durante l'intero periodo di stoccaggio in entrambe le tesi, e sono leggermente superiori nelle vinacce refrigerate, così come gli alcoli isoamilici che risultano leggermente maggiori nelle vinacce refrigerate.

Il livello di 1-esanolo in generale è calato durante lo stoccaggio ed è risultato leggermente superiore nelle vinacce refrigerate.

Il livello di alcoli superiori totali (somma di 2-propanolo, 1-propanolo, 2-butanolo, isobutanolo e dei due alcoli isoamilici) è risultato mantenersi superiore nelle vinacce refrigerate.

4.2.2 Effetto dell'inoculo di lieviti selezionati sui composti di fermentazione

Nella figura 4.14 (pp. 91 e 92) sono riportati i contenuti medi dei principali composti di fermentazione delle vinacce non refrigerate inoculate con lieviti selezionati (Non Refri Inoc) e non refrigerate tal quali (Non Refri TQ) durante uno stoccaggio di 120 giorni.



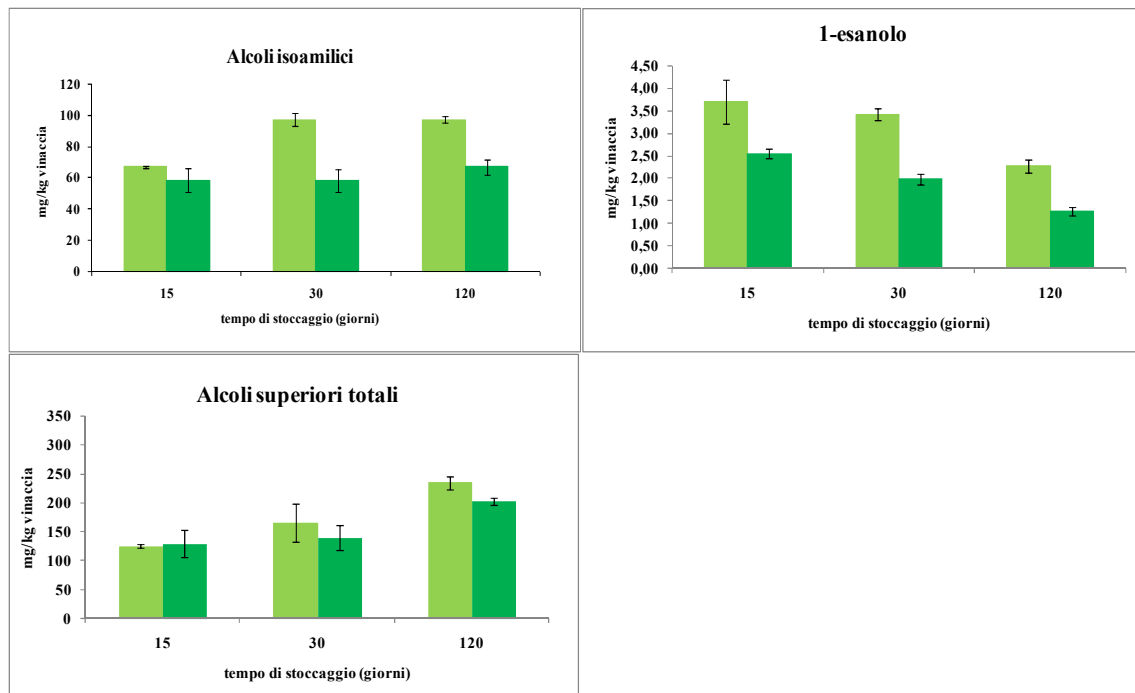


Figura 4.14 Contenuti medi dei principali composti di fermentazione (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco non refrigerate inoculate e non refrigerate dopo un periodo di stoccaggio di 120 giorni. In verde chiaro sono riportati i contenuti medi nei campioni non refrigerati inoculati, in verde nei campioni non refrigerati tal quali. Non Refri Inoc = campioni di vinaccia refrigerati; Non Refri TQ = campioni di vinaccia non refrigerati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisposizione calcolata per i due prelievi analizzati.

Il contenuto di metanolo cresce nel tempo di stoccaggio risultando tendenzialmente maggiore nelle vinacce inoculate; i livelli di acetaldeide risultano simili nelle due tesi e costanti nel tempo. L'acetato ed il lattato di etile crescono durante lo stoccaggio risultando maggiori nelle tesi non inoculate, probabilmente a causa di una maggiore attività esterasica da parte di lieviti autoctoni.

Il 2-butanolo si mantiene a contenuti bassi per il primo mese in entrambi i campioni, al termine dello stoccaggio cresce sensibilmente ma con livelli paragonabili nelle due tesi anche se, sempre a causa dell'eterogeneità della massa su cui è stato eseguito il campionamento, uno dei prelievi a 120 giorni di vinacce non inoculate presentava contenuti maggiori rispetto all'altro che era invece in linea con i dati della vinaccia inocolata.

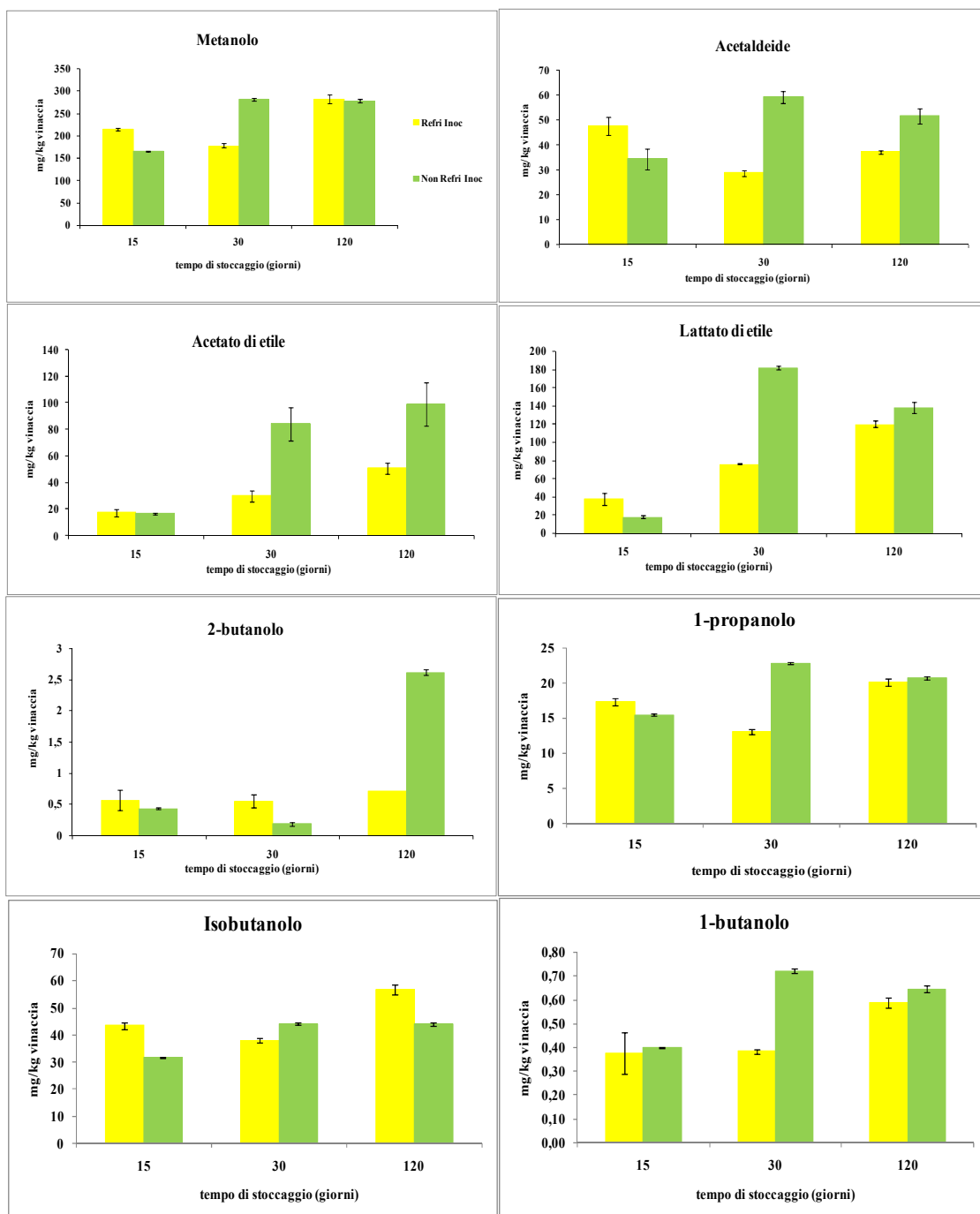
La vinaccia inocolata presentava livelli maggiori di 1-propanolo, isobutanolo ed alcoli isoamilici, i cui livelli restano pressoché costanti nel tempo così come l'1-butanolo.

Il livello di 1-esanolo cala durante lo stoccaggio, e presenta contenuti superiori nelle vinacce non refrigerate + inoculate.

Il livello di alcoli superiori totali (somma di 2-propanolo, 1-propanolo, 2-butanolo, isobutanolo e dei due alcoli isoamilici) è risultato essere tendenzialmente superiore nelle vinacce inoculate.

4.2.3 Effetto dell'inoculo di lieviti selezionati unito alla refrigerazione sui composti di fermentazione

Nella figura 4.15 (pp. 94 e 95) sono riportati i contenuti medi dei principali composti di fermentazione delle vinacce refrigerate e inoculate con lieviti selezionati (Refri Inoc) e non refrigerate e inoculate (Non Refri Inoc) durante uno stoccaggio di 120 giorni.



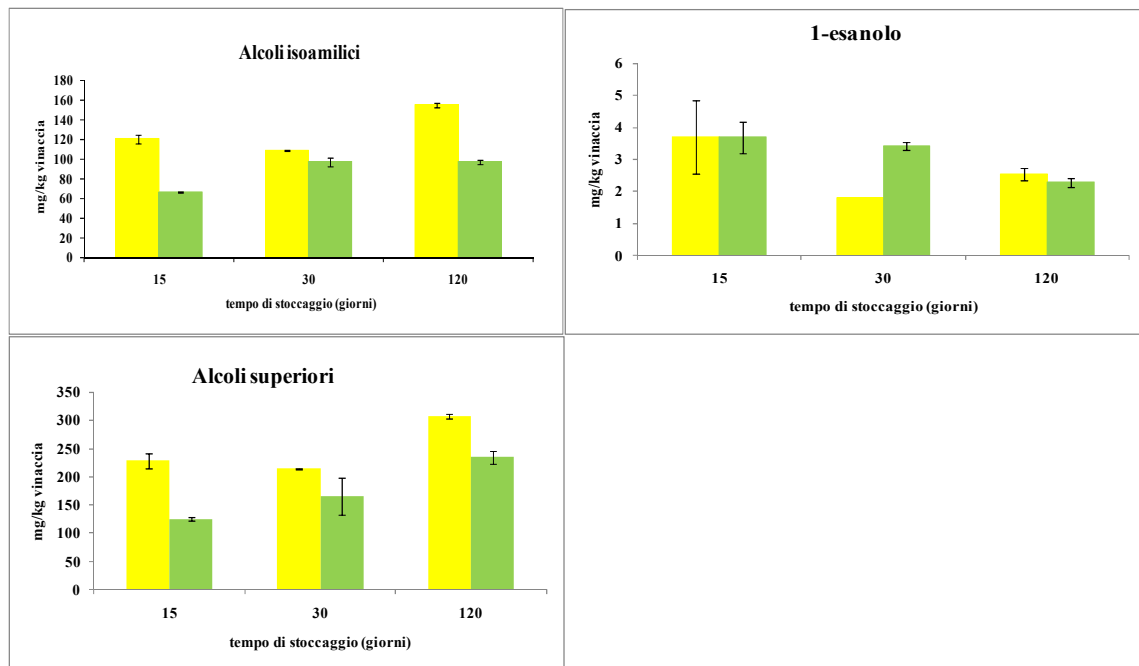


Figura 4.15 Contenuti medi dei principali composti di fermentazione (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Prosecco refrigerate e inoculate e non refrigerate e inoculate dopo un periodo di stoccaggio di 120 giorni. In giallo sono riportati i contenuti medi nei campioni refrigerati e inoculati, in verde nei campioni non refrigerati e inoculati. Refri Inoc = campioni di vinaccia refrigerati ed inoculati; Non Refri Inoc = campioni di vinaccia non refrigerati ed inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Differenze significative nei livelli di acetaldeide si riscontrano tra le tesi. I valori più bassi sono stati riscontrati nelle vinacce refrigerate + inoculate dopo 1 mese di stoccaggio. In modo analogo, l'acetato e il lattato di etile (che crescono durante lo stoccaggio) si mantengono però più bassi nelle vinacce refrigerate + inoculate. Il 2-butanolo è aumentato sensibilmente dopo 120 giorni nelle vinacce non refrigerate + inoculate, ma si mantiene a livelli costanti nei campioni refrigerati. I livelli di alcoli isoamilici e alcoli superiori totali (somma di 2-propanolo, 1-propanolo, 2-butanolo, isobutanolo e dei due alcoli isoamilici) risultano superiori nelle vinacce refrigerate+inoculate.

4.2.4 Il contenuto di etanolo

Per la determinazione del grado alcolico si è proceduto come descritto nel paragrafo 2.7 di MATERIALI E METODI.

Nella figura 4.16 sono riportati i contenuti medi di etanolo nelle vinacce: refrigerate (Refri TQ), non refrigerate (NN Refri TQ), non refrigerate e inoculate (NN Refri In), refrigerate e inoculate (Refri In), durante uno stoccaggio di 120 giorni.

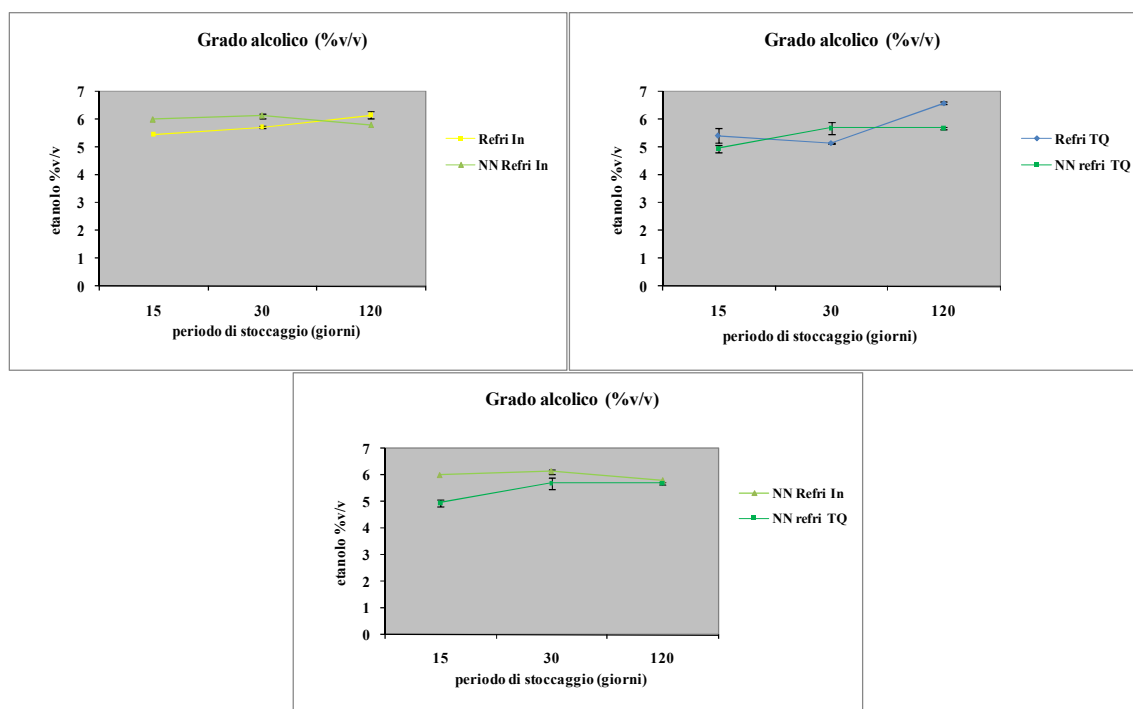


Figura 4.16 Andamento del contenuto di etanolo (% v/v di etanolo) delle vinacce di Prosecco refrigerate tal quali (azzurro), non refrigerate tal quali (verde), refrigerate inoculate (giallo) e non refrigerate inoculate (verde chiaro) durante un periodo di stoccaggio di 120 giorni.

Refri TQ = campioni di vinaccia refrigerati tal quali; NN Refri TQ = campioni non refrigerati tal quali; NN = Refri In, campioni non refrigerati e inoculati; Refri In = campioni refrigerati e inoculati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Dopo 120 giorni di stoccaggio, le vinacce refrigerate presentavano un contenuto di etanolo superiore (6.60 % v/v) a quelle non sottoposte a trattamento (5.70 % v/v) e si evidenzia un ulteriore incremento dell' alcol dopo 30 giorni, probabilmente a causa di una residua attività fermentativa dei lieviti.

Dopo i primi 15 giorni di stoccaggio, le vinacce inoculate presentano un grado alcolico medio del 6.0 % (v/v), contro il 4.97 % (v/v) delle vinacce non inoculate: le vinacce inoculate hanno già terminato la fermentazione rispetto alle non inoculate. Per il restante periodo di stoccaggio i livelli sono risultati comparabili.

Tra le vinacce refrigerate + inoculate e le vinacce non refrigerate + inoculate non si è osservata una differenza significativa durante l'intero periodo di stoccaggio.

4.3 Studio dei principali metaboliti di fermentazione nelle vinacce di uva Cabernet-Sauvignon in relazione ai tempi ed alle modalità di conservazione: vendemmia 2007

Le vinacce di uve rosse di Cabernet Sauvignon provengono da una vinificazione in rosso, pertanto al momento dello stoccaggio sono completamente fermentate. Ne consegue che i composti ritrovati nelle vinacce sono soprattutto composti di fermentazione. Poiché le vinacce provengono da una vinificazione con macerazione hanno un basso contenuto di composti varietali.

Lo stoccaggio delle vinaccia, per periodi normalmente fino ad un mese, viene comunque operata sia al fine di consentire la fermentazione degli zuccheri residui, sia per necessità di produzione legate all'impossibilità di distillarle al momento dell'arrivo in distilleria.

È stato indagato l'effetto dell'acidificazione della vinaccia di uva Cabernet-Sauvignon prima dello stoccaggio in relazione:

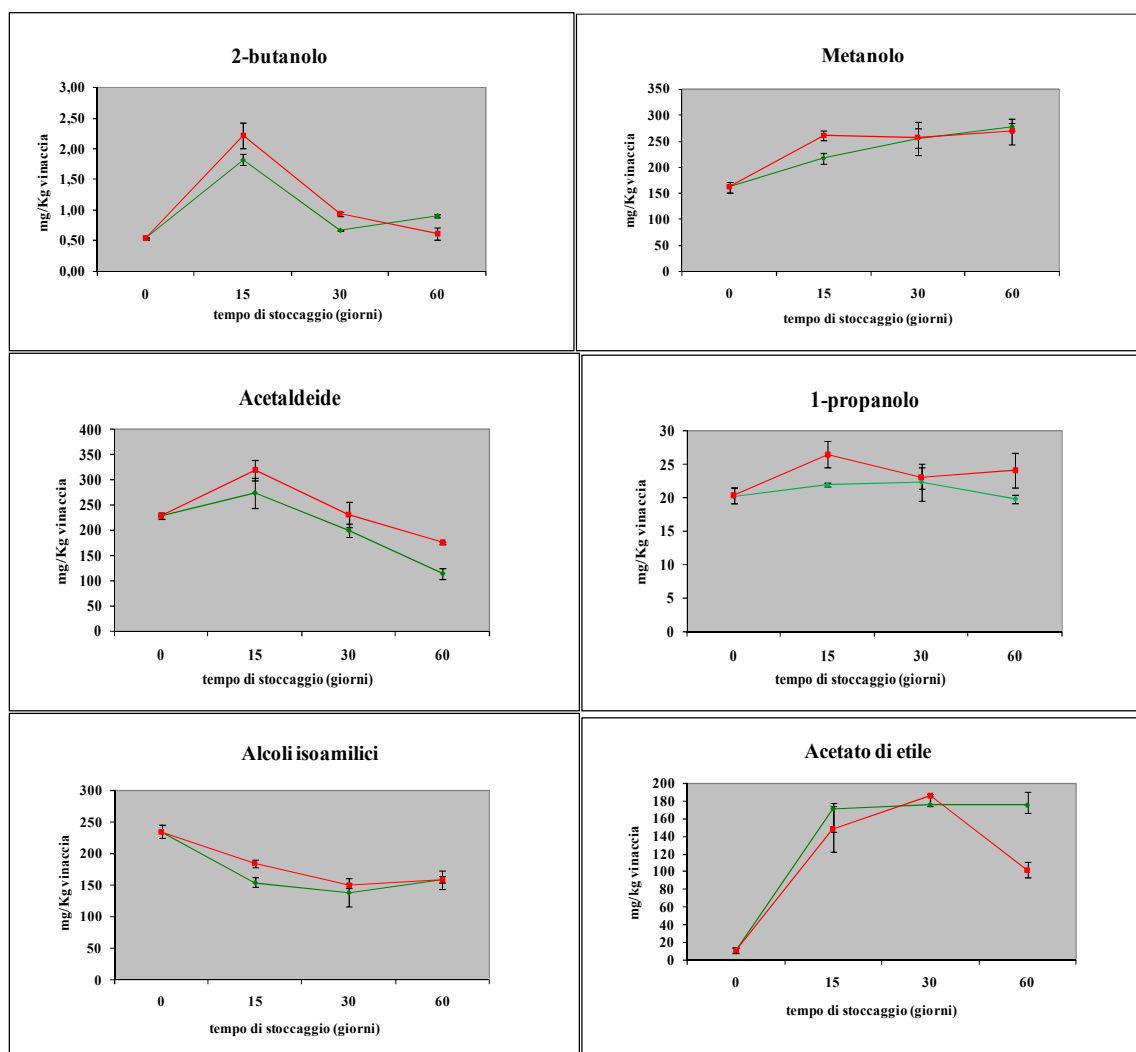
- ai principali metaboliti di fermentazione (acetaldeide, metanolo, 2-propanolo, acetato di etile, 1-propanolo, 2-butanolo, isobutanolo, 1-butanolo, alcoli isoamilici, lattato di etile, etanolo) durante un periodo di stoccaggio di 60 giorni;
- ai principali esteri acetici ed etilici durante lo stesso periodo.

La descrizione del protocollo di campionamento e lo schema di campionamento sono riportati rispettivamente in paragrafo 2.2.1.2 di MATERIALI E METODI ed in ALLEGATI-Figura 4.

4.3.1 Principali metaboliti volatili di fermentazione

Il trattamento di acidificazione della vinaccia di rossa viene operato al fine di preservarla dagli attacchi batterici (Versini, 1995).

In figura 4.17 (pp. 99-100) sono riportati i contenuti medi dei principali composti di fermentazione delle vinacce tal quali ed acidificate durante un periodo di stoccaggio di 60 giorni.



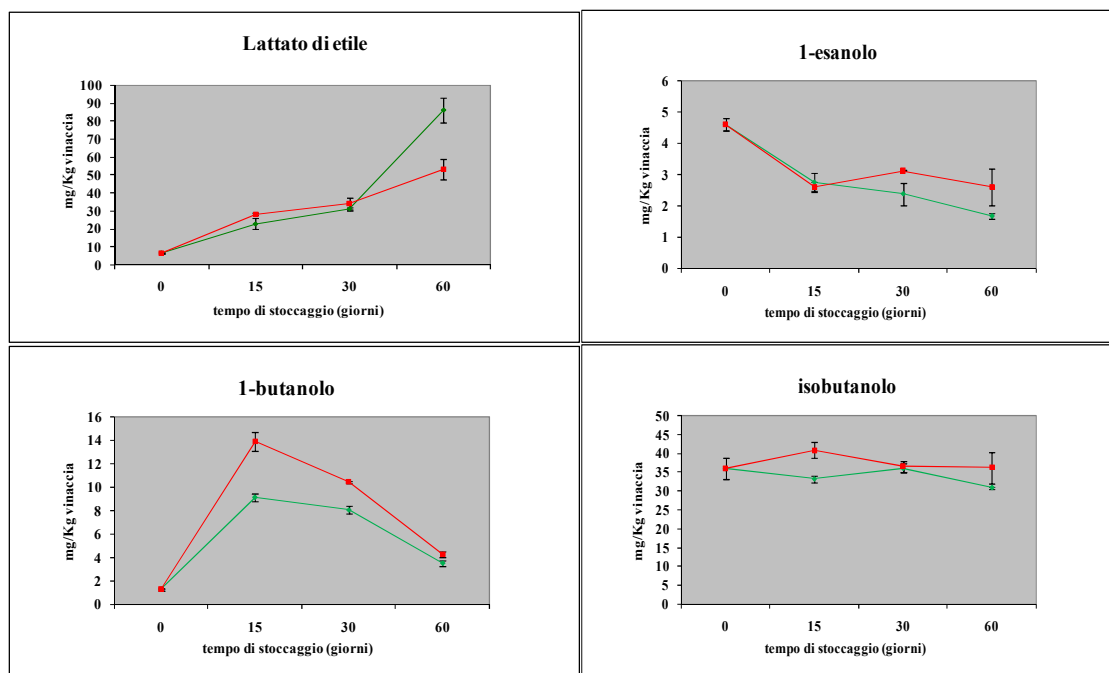


Figura 4.17 Contenuto medio di metanolo, acetaldeide, 2-butanolo, 1-propanolo, acetato di etile, lattato di etile, alcoli isoamilici, 1-butanol, isobutanolo e 1-esanolo (mg/kg vinaccia) nelle vinacce di Cabernet Sauvignon stoccate tal quali (verde), acidificate (rosso) per un periodo di 60 giorni. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

In generale per il metanolo non si rivelano particolari differenze tra le due tesi, mentre si osservano contenuti leggermente superiori di acetaldeide e 2-butanolo nelle vinacce acidificate. Si riscontrano contenuti di 2-butanolo nelle vinacce rosse più bassi delle quelle bianche, in accordo con quanto riportato da Usseglio-Tomasset (1971). L'acidificazione ha rivelato mantenere più bassi i livelli di acetato e lattato di etile per tempi di stoccaggio superiori ai 30 giorni.

4.3.2 Principali esteri acetici ed etilici

Le vinacce di Cabernet Sauvignon (già fermentate) non hanno rivelato contenuti di terpenoli in livelli apprezzabili.

In figura 4.18 sono riportati i contenuti degli esteri etilici degli acidi grassi caratterizzati da note fruttate e floreali positive nel corso dello stoccaggio.

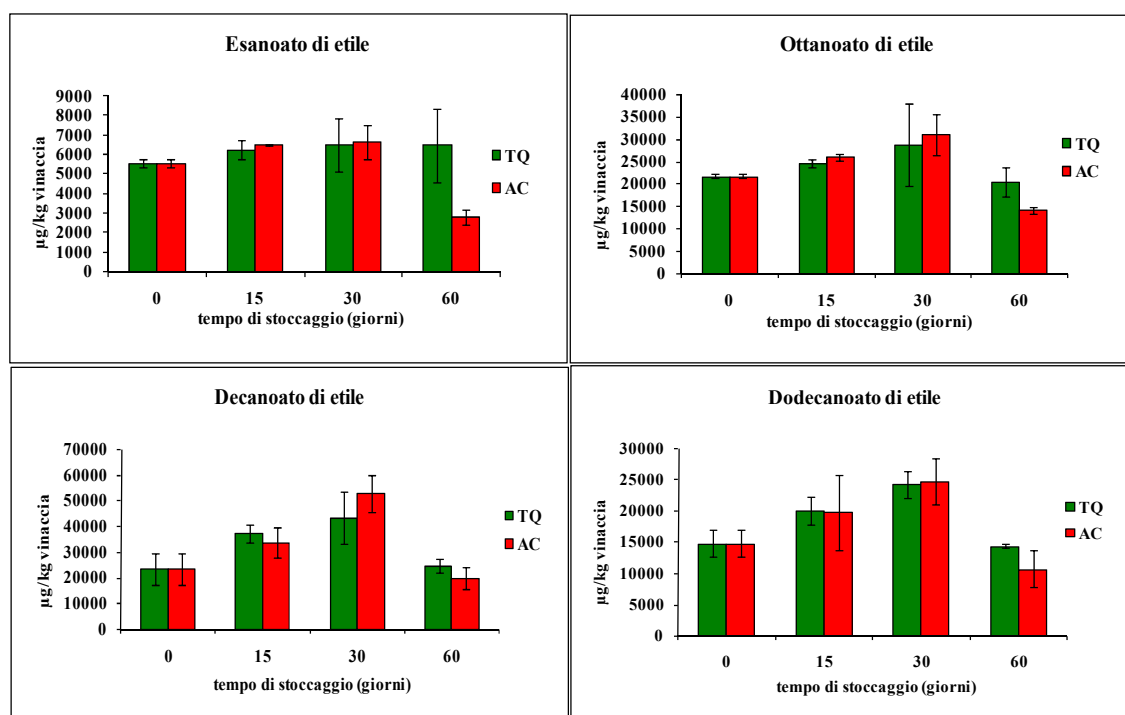


Figura 4.18 Contenuti medi dei principali esteri etilici ($\mu\text{g/kg}$ vinaccia) nelle vinacce di Cabernet Sauvignon stoccate per un periodo di 60 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

In generale si riscontra un incremento degli esteri etilici durante il primo mese di stoccaggio, seguito da un dimezzamento nel secondo mese. I campioni acidificati presentano tendenzialmente livelli maggiori (fino a circa +25% per il decanoato di etile dopo un mese) rispetto ai campioni stoccati non acidificati.

In figura 4.19 sono riportati gli andamenti degli esteri acetici n-esilacetato (che conferisce una nota mela golden al distillato) e 2-fenilettilacetato (dalla caratteristica nota olfattiva di rosa e miele) nelle vinacce stoccate acidificate e non acidificate.

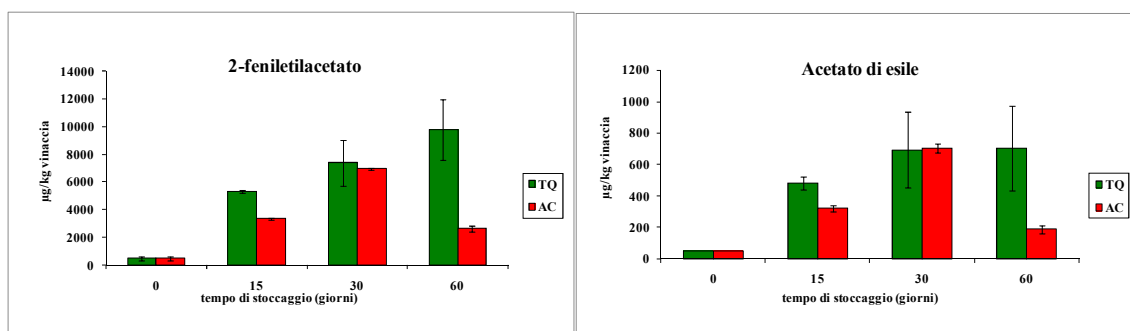


Figura 4.19 Contenuti medi dei principali esteri acetici ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vinaccia) nelle vinacce di Cabernet Sauvignon stoccate per un periodo di 60 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Dopo i primi 15 giorni si riscontrano incrementi notevoli dei due esteri, maggiormente nelle vinacce non acidificate. Dopo 30 giorni il livelli nelle due tesi risulta paragonabile. Dopo 60 giorni nelle vinacce acidificate si nota un decremento del 2-fenilettilacetato di oltre il 60%, e di acetato di esile del 40%, rispetto ai campioni non acidificati. Si può ipotizzare che la condizione di stoccaggio in ambiente acido comporti una idrolisi degli esteri acetici, rivelata nelle vinacce dopo 60 giorni di stoccaggio.

4.3.3 Il contenuto di etanolo

Per la determinazione del grado alcolico si è proceduto come descritto nel paragrafo 2.7 di MATERIALI E METODI. In figura 4.20 è riportato il contenuto medio di etanolo nelle vinacce acidificate e non acidificate durante uno stoccaggio di 60 giorni.

Il contenuto di etanolo delle diverse tesi oscillava tra 3.8 % (v/v) e 5 % (v/v). A fine stoccaggio non è stata riscontrata differenza tra le vinacce acidificate e tal quali, che presentavano una gradazione media del 4.12 % (v/v) e 3.91 % (v/v), rispettivamente.

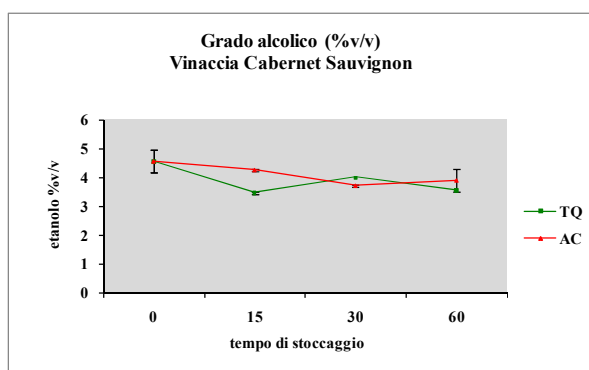


Figura 4.20 Contenuti di etanolo (% v/v) nelle vinacce di Cabernet Sauvignon stoccate per un periodo di 60 giorni. In verde sono riportati i contenuti medi nei campioni non acidificati, in rosso nei campioni acidificati. TQ = campioni di vinaccia non acidificati, AC = campioni di vinaccia acidificati. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati

4.4 Studio dei principali composti carbonilici recuperabili nelle vinacce con la distillazione: vendemmia 2005

È stato valutato l'effetto dell'acidificazione operata prima dello stoccaggio sulla vinaccia di uva Prosecco sui contenuti di alcuni dei principali composti carbonilici rilevanti dal punto di vista organolettico e che con la distillazione possono in buona parte essere trasferiti al prodotto.

I composti carbonilici, in generale caratterizzati da basse soglie sensoriali, hanno un ruolo importante nella formazione dell'aroma della grappa. I composti studiati, esanale, 2-esenale, 3-idrossi-2-butanone (acetoino), 2-3-butandione (diacetile) e benzaldeide, sono stati determinati mediante estrazione dalle vinacce con una distillazione in corrente di vapore, ed è stato usato un metodo analitico che consiste nella derivatizzazione con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilammina (PFBOA) e la determinazione delle ossime derivate mediante GC/MS.

Le determinazioni sono state eseguite sui campioni di vinaccia Prosecco vendemmiata nel 2005 e trattate e conservate secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.3 della sezione MATERIALI e METODI. La preparazione del campione e le analisi sono state eseguite come descritti nei paragrafi 2.3.1 e 2.3.3.

4.4.1 L'analisi qualitativa delle PFBOA-ossime

In seguito alla reazione di derivatizzazione con PFBOA si formano due isomeri geometrici *syn* ed *anti* per i composti monocarbonilici e quattro di-ossime isomere per i composti dicarbonilici quali il diacetile (Cancilla e Que Hee, 1992; Flamini, 2005). Di conseguenza nel cromatogramma si trovano due picchi corrispondenti agli isomeri Z ed E per i composti monocarbonilici, mentre per il diacetile sono presenti i due segnali relativi alla mono-ossima, ed i tre segnali corrispondenti agli isomeri (Z,Z), (E,E), (Z,E)+(E,Z) relativi alle di-ossime (i due isomeri Z,E e E,Z si sovrappongono dando lo stesso segnale). I tempi di ritenzione cromatografici ed i segnali massa/carica (m/z) caratteristici dei composti studiati sono riportati nella tabella 4.3.

Picco N°	composto	RT1 (min)	RT2 (min)	RT3 (min)	segnali m/z
IS	SI	43.73	44.59		300
1	esanale	22.71	22.97		239; 295
2	2-esenale	27.92	28.37		250; 293
3	acetoino	33.85	35.68		240
4	benzaldeide	39.4	39.66		301
5	diacetile	40.13	42.26	44.59	476

Tabella 4.3 Tempi di ritenzione cromatografici (RT) e segnali m/z caratteristici delle ossime dei composti studiati e dello standard interno (SI).

I segnali registrati in modalità Selected-Ion-Monitoring (SIM) utilizzati per la conferma identificativa degli analiti sono: per l'esanale m/z 239 relativo al riarrangiamento delle aldeidi alifatiche sature (Figura 4.21a), m/z 295 relativo allo ione molecolare dell'ossima corrispondente, per la 2-esenale m/z 250 relativo al riarrangiamento delle aldeidi alifatiche insature (Figura 4.21b), m/z 293, relativo allo ione molecolare dell'ossima corrispondente.

La conferma identificativa della benzaldeide e dell'*o*-clorobenzaldeide (SI) è stata ottenuta registrando i segnali dello ione molecolare delle ossime a m/z 301 e 300 rispettivamente, per l'acetoino il segnale m/z 240 corrispondente ad un frammento dell'ossima. La conferma identificativa del diacetile è stata ottenuta registrando lo ione molecolare della di-ossima m/z 476.

Nelle figure 4.22 – 4.26 sono riportati gli spettri di frammentazione dei composti carbonilici studiati.

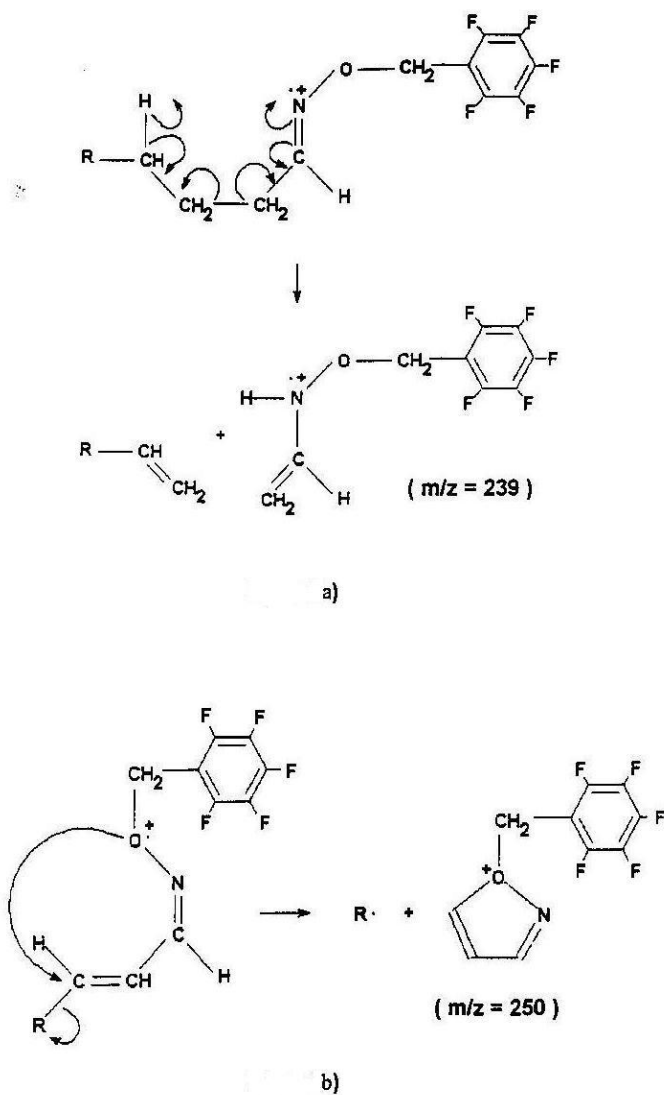


Figura 4.21 Frammentazioni che portano alla formazione dello ione m/z 239 nel caso delle PFBOA-ossime di aldeidi sature (a) e dello ione m/z 250 nel caso delle aldeidi α,β -insature (b).

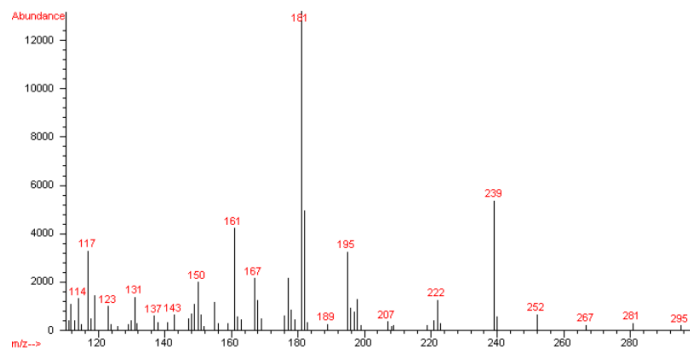


Figura 4.22 Spettro di frammentazione delle PFB-ossime dell'esanale.

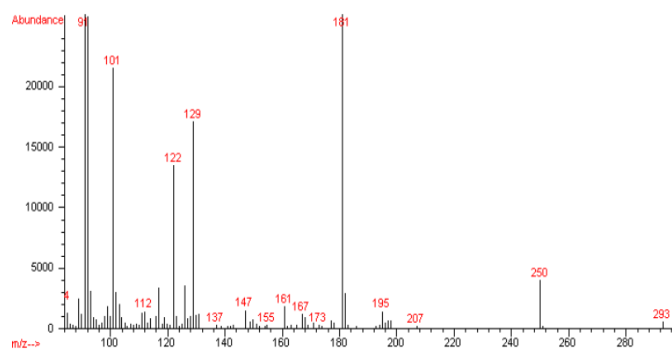


Figura 4.23 Spettro di frammentazione delle PFB-ossime della 2-esenale.

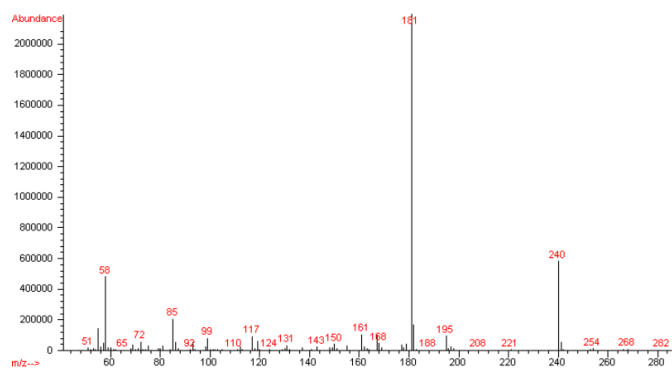


Figura 4.24 Spettro di frammentazione delle PFB-ossime dell'acetoino.

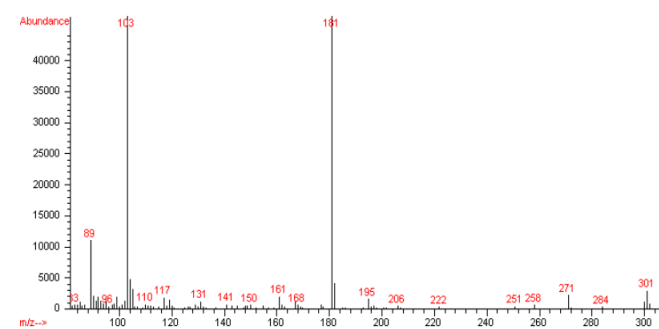


Figura 4.25 Spettro di frammentazione delle PFB-ossime della benzaldeide.

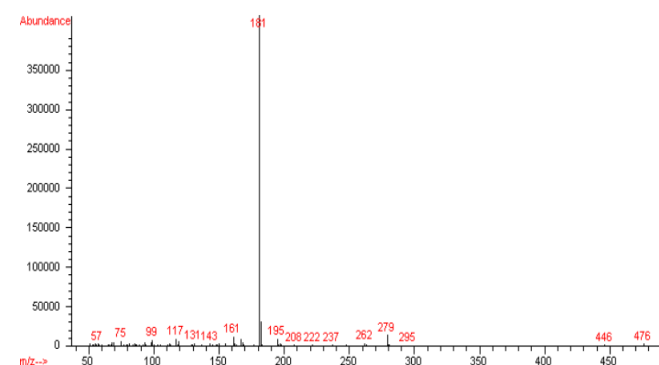


Figura 4.26 Spettro di frammentazione delle PFB-ossime del diacetile.

4.4.2 L'analisi quantitativa delle PFBOA-ossime

Per l'analisi quantitativa è stato impiegato come standard interno la *o*-clorobenzaldeide, in quanto il tempo di ritenzione delle PFBOA-ossime corrispondenti è paragonabile a quello dei derivati dei composti studiati, e non è presente nei campioni.

L'analisi quantitativa è stata eseguita registrando in modalità Selected-Ion-Monitoring (SIM) il segnale m/z 181 corrispondente allo ione pentafluorobenzile essendo questo, come si evidenzia dagli spettri di massa riportati nelle figure 5.2-5.6, il picco base delle PFBOA-ossime. In figura 5.7 è riportato il cromatogramma relativo all'analisi di un campione di vinaccia acidificata dopo 30 giorni di stoccaggio ottenuto registrando i segnali m/z 181, 300, 239, 295, 250, 293, 240, 301, 476 in modalità SIM.

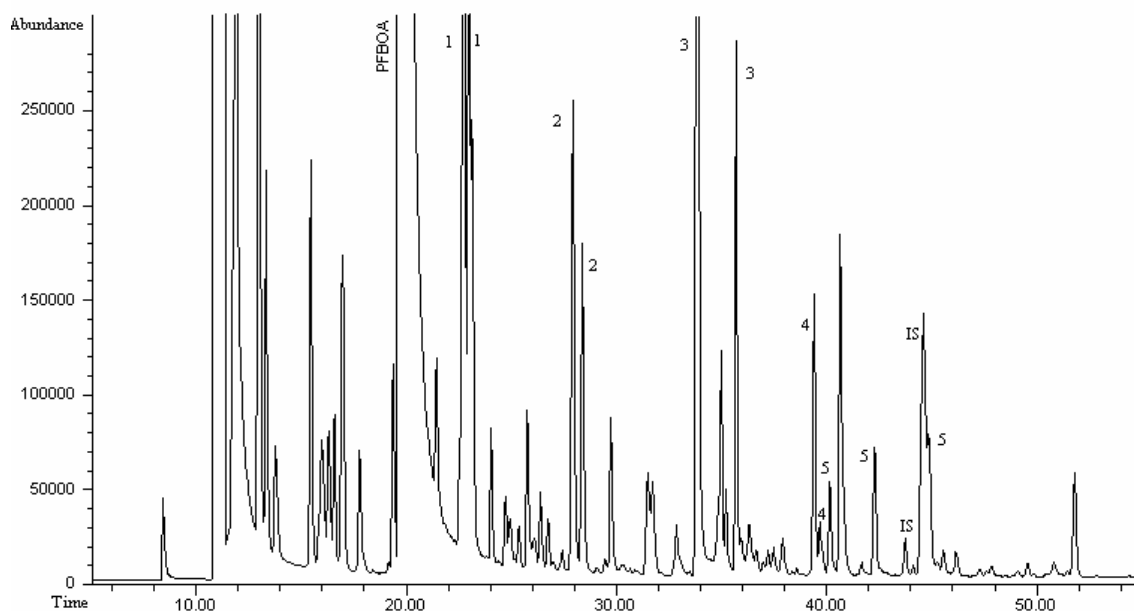


Figura 4.27 Cromatogramma di un campione di vinaccia acidificata dopo 30 giorni di stoccaggio (AC 30), ottenuto registrando i segnali m/z 181, 300, 239, 295, 250, 293, 240, 301, 476 in modalità SIM.

Confrontando il Total-Ion-Chromatogram (TIC) in figura 4.27 con l'Extracted-Ion-Chromatogram ottenuto estrapolando il segnale m/z 181 (figure 4.28a e 4.28b), si evidenziano una maggiore risoluzione dei segnali delle ossime, una notevole riduzione del numero dei segnali non corrispondenti alle ossime ed il considerevole abbassamento della linea di base, indicando come la quantificazione eseguita sul segnale m/z 181 fornisca buona sensibilità ed ottima selettività.

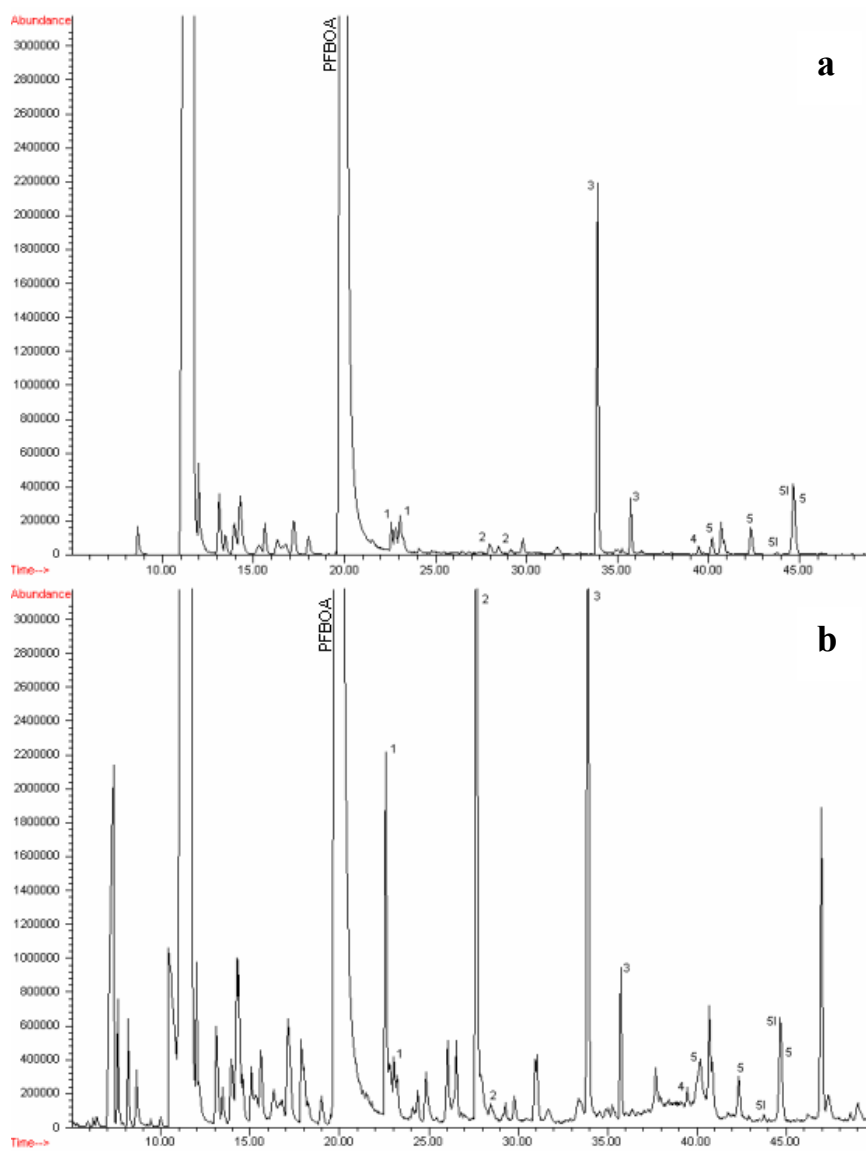


Figura 4.27 - Extracted-Ion-Chromatogram (a) ottenuto estrapolando dal Total Ion Chromatogram (TIC) (b) il segnale m/z 181.

Le rette di calibrazione sono state calcolate con soluzioni di standard (paragrafo 2.3.2) a concentrazioni simili a quelle aspettate in un distillato di vinaccia e comprese tra 1.9-20.5 mg/L. Le curve di calibrazione calcolate per i cinque composti indagati sono riportate nella figura 4.29.

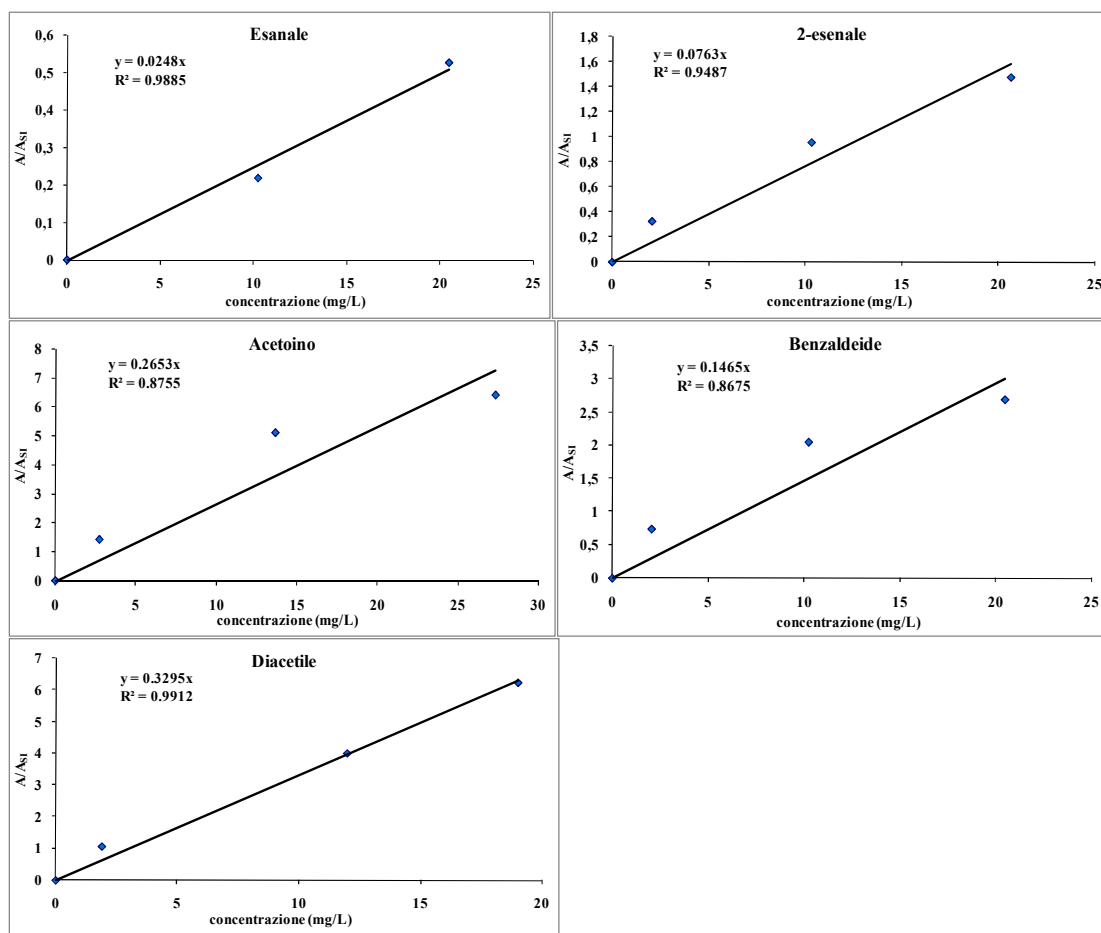


Figura 4.29 Rette di calibrazione costruite normalizzando l'area dei composti carbonilici standard rispetto all'area dello standard interno.

Il derivato del diacetile che si forma maggiormente dalla reazione con PFBOA è la di-ossima (rispetto alla mono-ossima), questo composto è stato pertanto quantificato sui segnali del prodotto di-sostituito.

Il fattore di risposta calcolato per ciascun composto è rappresentato dal coefficiente angolare della curva di calibrazione ed è relativo a tutto il procedimento analitico, computa pertanto la percentuale di recupero nelle due distillazioni, le rese di reazione di derivatizzazione, le eventuali perdite durante la fase di estrazione e concentrazione, la risposta analitica GC/MS.

Le percentuali di recupero dei singoli composti nelle due distillazioni successive operate per concentrare i campioni, sono state calcolate sulla base dei risultati dell'analisi della soluzione standard (STD) C sottoposta alle distillazioni, e della soluzione standard (STD) E analizzata senza essere stata concentrata. Le concentrazioni delle soluzioni standard (STD) C e (STD) E sono entrambe riportate in tabella 2.3, paragrafo 2.3.2.1 di MATERIALI e METODI.

In tabella 4.4 sono riportati i risultati in mg/L e le percentuali di recupero calcolate per ciascun composto.

Composto	Soluzione STD C	Soluzione STD E	Recupero
	mg/L	mg/L	%
Esanale	0.941	3.604	26
2-esenale	2.264	6.706	34
Acetoino	21.889	120.604	18
Benzaldeide	4.330	10.952	40
Diacetile	4.140	9.728	43

Tabella 4.4 Percentuale di recupero di ciascun composto carbonilico in seguito alla concentrazione della soluzione standard C (STD C) mediante due distillazioni successive per ottenere la soluzione standard E (STD E).

Come si evidenzia dalla tabella, il basso fattore di risposta riscontrato per le due aldeidi alifatiche (esanale e 2-esenale) è dato da una bassa percentuale di recupero. L'acetoino, per il quale si riscontra un recupero ancora più basso in distillazione - come ci si aspetterebbe per il composto più polare, presenta invece un fattore di risposta relativamente elevato come probabile conseguenza di una maggiore resa di reazione. L'acetoino è infatti il composto che presenta il gruppo carbonilico più elettrofilo, e che pertanto ha maggiore attitudine a subire l'attacco nucleofilo da parte del gruppo amminico della PFBOA.

4.4.3 Analisi dei composti carbonilici nelle vinacce

Nella tabella 4.5 sono riportati i contenuti medi dei composti carbonilici nel campione di vinaccia non acidificato ad inizio stoccaggio (T 0), dopo 15 giorni (TQ 15) e dopo 30 giorni (TQ 30) di stoccaggio.

In figura 4.30 è riportato l'andamento del contenuto di etanolo nei campioni non acidificati ed acidificati durante lo stoccaggio di 30 giorni. Per ciascuna tesi sono state eseguite due ripetizioni.

Composti estratti dalle vinacce	T 0 mg/kg	TQ 15 mg/kg	TQ 30 mg/kg
Esanale	13.039±2.843	145.097±3.735	73.618±14.963
2-esanale	16.070±0.873	21.473±2.313	9.057±2.446
Acetoino	10.224±0.360	34.254±7.774	26.480±8.843
Benzaldeide	0.559±0.055	4.795±0.219	2.147±0.750
Diacetile	0.871±0.245	5.222±0.894	3.895±1.030

Tabella 4.5 Contenuti medi dei composti carbonilici (mg/kg di vinaccia) nelle vinacce non acidificate per un periodo di stoccaggio di 30 giorni. T0, campione non acidificato ad inizio stoccaggio; TQ, campione non acidificato.

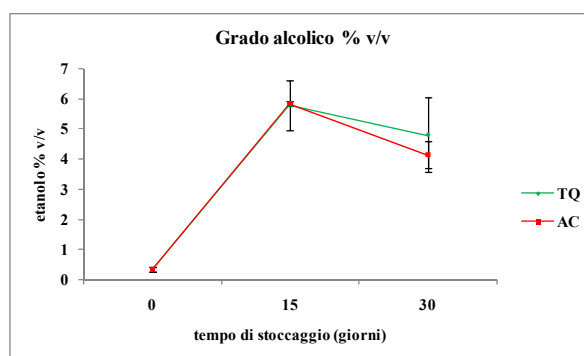


Figura 4.30 Andamento dell'etanolo (% v/v di etanolo) nelle vinacce di Prosecco tal quali (verde), acidificate (rosso) per un periodo di stoccaggio di 30 giorni. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidisperzione calcolata per i due prelievi analizzati.

I livelli di alcol etilico nei campioni indicano l'avvenuta fermentazione delle vinacce dopo 15 giorni di stoccaggio (figura 4.30), quando i campioni presentavano un contenuto medio di etanolo di 5.78 % (v/v).

Tutti i composti studiati sono stati trovati a valore di concentrazione superiore alla soglia olfattiva di percezione in matrice idroalcolica (Porretta, 2000).

Il livello di esanale, il composto presente in maggiore concentrazione, risulta aumentato di oltre 10 volte dopo 15 giorni (tabella 4.5), dopo 30 giorni il livello risulta però ridotto di circa la metà, anche se rimane sempre molto maggiore di quello

inizialmente presente nelle vinacce non fermentate (T 0). Al contrario, la concentrazione di 2-esenale non subisce un importante incremento in seguito alla fermentazione (dopo 15 giorni), e dopo 30 giorni di stoccaggio risulta addirittura inferiore del T 0 (tabella 4.5 e figura 4.31). Come era da aspettarsi, i livelli di acetoino e di diacetile incrementano notevolmente dopo 15 giorni (Arlete Mascarehnas, 1984; Martineau *et al.*, 1995; Flamini, De Luca e Di Stefano, 2002), e subiscono un successivo calo a 30 giorni di stoccaggio. Diacetile ed acetoino sono infatti prodotti da lieviti e batteri; il diacetile deriva dal metabolismo dei batteri lattici, in particolare dalla degradazione dell'acido citrico. Elevati livelli di diacetile possono essere favoriti da un insilamento non adeguato delle vinacce (vinacce a contatto con l'aria). Anche la benzaldeide risulta incrementata con la fermentazione, ed è riscontrata ad una concentrazione di 4.8 mg/kg dopo 15 giorni di conservazione.

4.4.4 Effetto dell'acidificazione sui composti carbonilici nelle vinacce

Nella tabella 4.6 sono riportati i contenuti medi riscontrati nei campioni acidificati dopo 15 giorni (AC 15) e dopo 30 giorni (AC 30) di stoccaggio.

In figura 4.31 sono riportati gli andamenti dei cinque composti carbonilici nei campioni non acidificati ed acidificati durante i 30 giorni di stoccaggio.

Composti estratti dalle vinacce	T 0 mg/kg	AC 15 mg/kg	AC 30 Mg/kg
Esanale	13.039±2.843	114.904±35.500	131.497±5.665
2-esenale	16.070±0.873	14.300±2.561	13.984±0.219
Acetoino	10.224±0.360	22.256±1.066	25.932±2.535
Benzaldeide	0.559±0.055	2.717±0.430	3.277±0.691
Diacetile	0.871±0.245	6.340±0.293	3.712±0.003

Tabella 4.6 Contenuti medi dei composti carbonilici (mg/kg di vinaccia) nelle vinacce acidificate stoccate per un periodo di 30 giorni. T0 = campione non acidificato ad inizio stoccaggio; AC = campione acidificato.

L'acidificazione non è risultata avere un effetto significativo sul contenuto alcolico dei campioni (figura 4.30).

Dalla figura 4.31, si evidenziano dopo 15 giorni maggiori livelli di 2-esenale, acetoino e benzaldeide nei campioni non acidificati, suggerendo che una minore attività batterica possa essere avvenuta nei campioni acidificati. Anche i livelli di benzaldeide dopo 15 giorni di stoccaggio sono circa il doppio nei campioni di vinaccia non acidificata.

Al contrario, dopo 30 giorni di stoccaggio si osserva che i livelli di esanale e di 2-esenale nei campioni non acidificati si sono ridotti a circa la metà (tabella 4.5 e figura 4.31), mentre le due aldeidi alifatiche e l'acetoino nei campioni acidificati risultano aumentati o pressoché costanti, e sono maggiori rispetto ai campioni tal quali (tabella 4.6 e figura 4.31). Anche nei campioni acidificati la benzaldeide aumenta in seguito alla fermentazione, risulta però minore dopo 15 giorni, e confrontabile dopo i 30, rispetto ai campioni non acidificati.

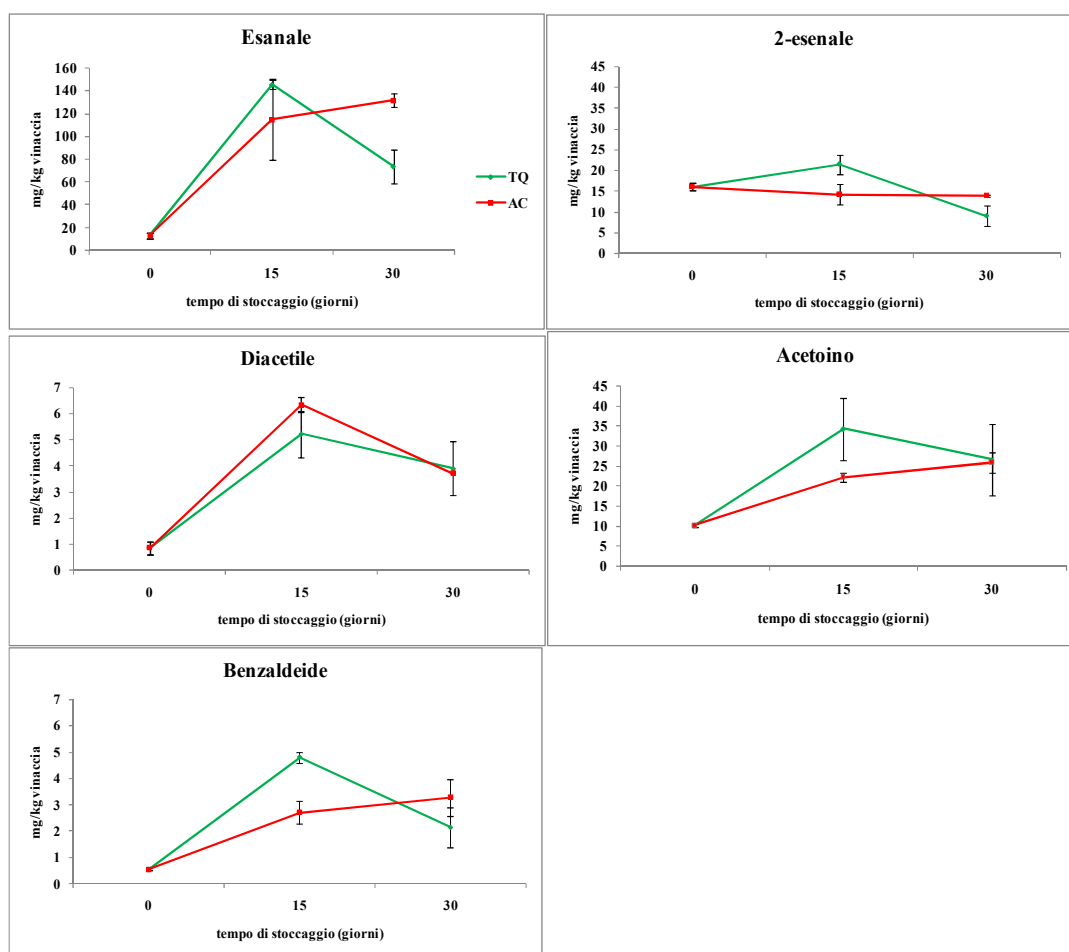


Figura 4.31 Andamento dei contenuti di esanale, 2-esenale, acetoino, benzaldeide, diacetile nelle vinacce non acidificate (verde) e acidificate (rosso) a 15 e 30 giorni di stoccaggio. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

OCRATOSSINA A

5.1 Indagine sulla presenza di OTA nelle vinacce destinate alla distillazione

Sono stati studiati i campioni ottenuti da vinacce di uve provenienti da 5 differenti varietà coltivate in Puglia, raccolte durante la vendemmia 2006. Successivamente, è stato effettuato uno screening su queste 5 varietà. Questo ha permesso di individuare quelle varietà risultate positive alla ocratossina A (uva di Troia) e su queste sono state effettuate le analisi sui campioni provenienti dalla vendemmia del 2007.

La descrizione del protocollo di campionamento e lo schema di campionamento sono riportati rispettivamente nel paragrafo 2.5 di MATERIALI E METODI ed in ALLEGATI-Figura 5.

5.1.1 Campionamento 2006

Lo scopo di questo lavoro era il monitoraggio del contenuto di OTA su campioni di vinacce conservate con due modalità diverse (tal quali e acidificate) a diversi tempi di conservazione (5, 10, 20 giorni di stoccaggio). Il cumulo è stato stoccato all'aperto al riparo sotto una tettoia. Durante il periodo di stoccaggio le temperature nell'arco della giornata variavano tra 13 e 27 °C. Le condizioni di stoccaggio dei campioni nei vasi di vetro differivano principalmente dal cumulo per condizioni maggiormente anaerobiche. Per fare uno screening si è deciso di procedere solo all'analisi del vinacce stoccate per un periodo di 10 giorni.

Nella tabella 5.1 sono riportati i contenuti medi di OTA nei campioni prelevati dal cumulo iniziale (C10gg), dalle vinacce tal quali (TQ10gg) e dalle vinacce acidificate (AC10gg) dopo i 10 giorni di stoccaggio.

Varietà di vinaccia	Cumulo10gg (µg/kg)	TQ 10gg (µg/kg)	AC 10gg (µg/kg)
Negroamaro	7.31±3.04	8.50±2.10	5.30±0.04
Regina	33.64±3.75	48.19±9.66	27.79±1.30
Sangiovese	11.51±0.29	3.85±1.11	5.31±4.18
Trebbiano	12.43±4.25	7.25±2.57	13.45±1.47
Uva di Troia	46.13±3.23	31.76±6.87	43.83±3.63

Tabella 5.1 Contenuti medi di OTA (espressi in µg/kg vinaccia) nei campioni di vinaccia di cinque varietà d'uva prelevati dopo 10 giorni di stoccaggio. (Cumulo 10gg = vinacce prelevate dal cumulo, TQ 10gg = vinacce tal quali, AC 10gg = vinacce acidificate).

Per ciascuna tesi sono state eseguite due ripetizioni. Le due analisi ripetute su ciascun campione rivelano una certa variabilità nei dati quantitativi (dati non riportati), principalmente legata alla contaminazione eterogenea dei campioni, ma comunque in generale la seconda analisi conferma la tendenza riscontrata nella prima. L'aspetto che appare subito evidente, è la presenza di OTA in tutti i campioni analizzati. In particolare, nelle vinacce di uva di Troia e Regina la tossina ha raggiunto livelli di 46 – 48 mg/kg di vinaccia. Per tre dei campioni si osserva un minore contenuto di OTA nelle vinacce conservate tal quali rispetto al cumulo, mentre per le altre due varietà si riscontrano livelli maggiori del 135% e del 143% rispettivamente. Questo suggerisce che il tempo di conservazione delle vinacce prima della loro lavorazione sembra non ha un significativo effetto inibente sullo sviluppo dell'OTA.

Anche l'acidificazione delle vinacce prima dello stoccaggio non sembra aver avuto un significativo effetto sui livelli di OTA rispetto al cumulo.

I dati meteorologici medi registrati durante il periodo vendemmiale 2006 nelle tre zone di provenienza delle uve Regina e Uva di Troia (le vinacce in cui è stato riscontrato un contenuto di OTA particolarmente elevato) e Trebbiano e Sangiovese sono riportati in tabella 5.2.

Condizioni metereologiche 2006				
Valori	Settembre		Ottobre	
	Temperatura °C	Umidità (%)	Temperatura °C	Umidità (%)
Minimi	7	55	8.5	67
Massimi	37	50	27	70

Tabella 5.2 Dati meteorologici medi nell'anno 2006 nelle zone da cui provenivano le varietà di vinaccia di Uva di Troia, Regina, Trebbiano e Sangiovese.

Si evidenzia che il clima nel periodo vendemmiale è risultato con una considerevole piovosità e temperature medie di 19 – 22 °C, condizioni che è riportato essere idonee allo sviluppo dei funghi ocratossigeni.

Nella figura 5.1 è riportato il cromatogramma di un campione di vinaccia di Uva di Troia del 2006, caratterizzato da un alto contenuto di ocratossina.

Nella figura 5.2 il cromatogramma relativo all'analisi dello stesso campione riportato in figura 5.1, dopo la reazione di esterificazione.

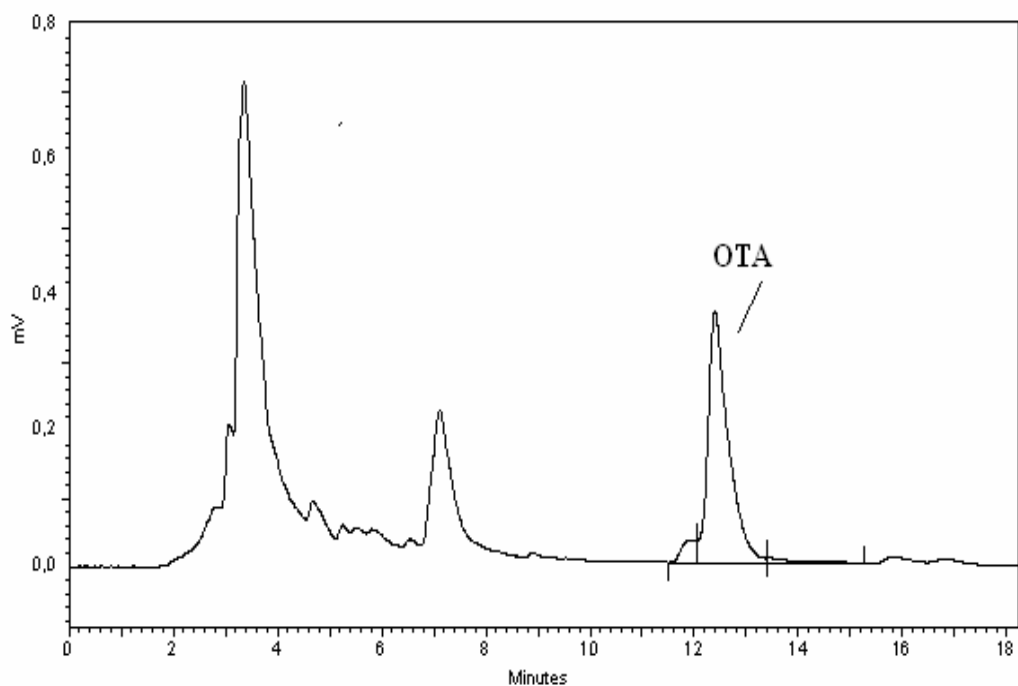


Figura 5.1 Cromatogramma della vinaccia di Uva di Troia-annata 2006 acidificata dopo 10 giorni di stoccaggio (AC10gg_A) ([OTA] = 47.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vinaccia).

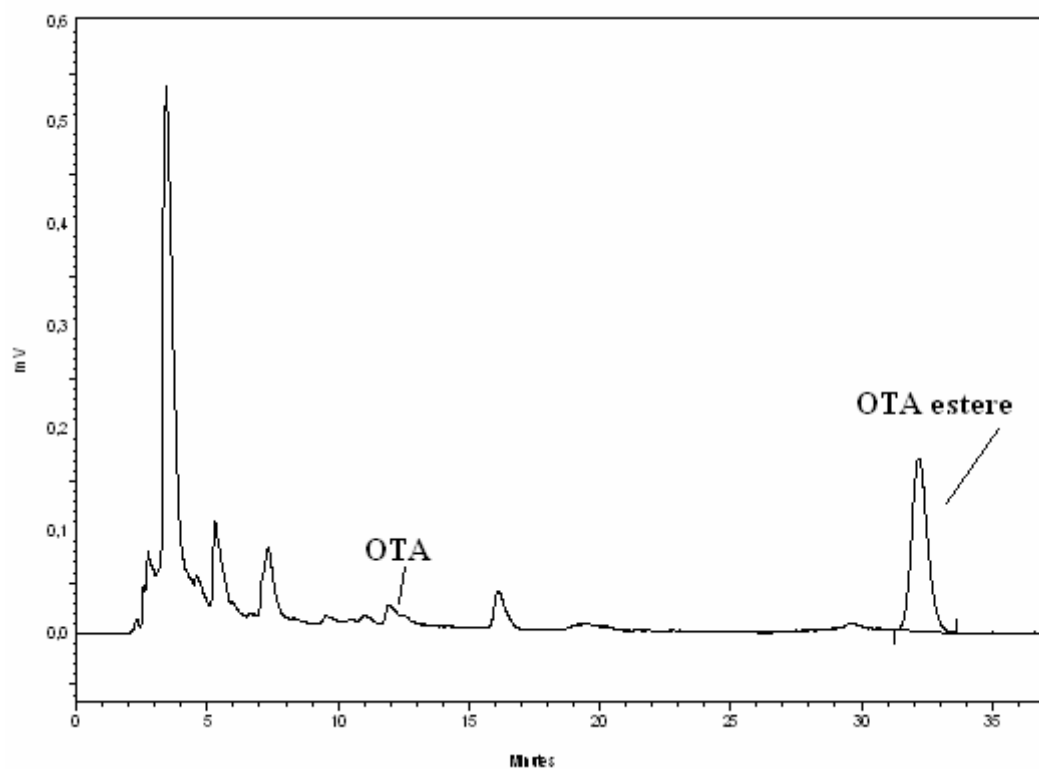


Figura 5.2 Cromatogramma del campione in figura 5.1 analizzato dopo la reazione di esterificazione (metodo di conferma).

5.1.2 Campionamento 2007

Allo scopo di vedere l'andamento della tossina per un tempo di 30 giorni, i campionamenti nel 2007 sono stati effettuati solo sul cumulo di una delle varietà di vinaccia che avevano mostrato alti contenuti di OTA nell'anno precedente. In tabella 5.3 vengono riportati i dati relativi le vinacce di Uva di Troia.

Varietà di vinaccia	Cumulo 0 gg	Cumulo 5 gg	Cumulo 10 gg	Cumulo 20 gg	Cumulo 30 gg
	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
Uva di Troia	1.32±0.11	1.87±0.09	2.01±0.65	3.67±0.31	5.53±0.74

Tabella 5.3 Contenuti medi di OTA (espressi in µg/kg vinaccia) nei campioni prelevati dal cumulo di Uva di Troia dopo 0, 5, 10, 20, 30 giorni.

In questo caso le analisi hanno rivelato nei campioni un basso contenuto di OTA. In tabella 5.4 sono riportati i dati relativi alle condizioni meteorologiche nell'anno 2007 nella zona da cui provenivano i campioni di vinaccia di Uva di Troia.

Condizioni metereologiche 2007				
Valori	Settembre		Ottobre	
	Temperatura °C	Umidità (%)	Temperatura °C	Umidità (%)
Minimi	13.5	62	10	83
Massimi	30	83	13	84

Tabella 5.4 Dati meteorologici medi nell'anno 2007 nelle zone da cui provenivano le varietà di vinaccia Uva di Troia.

L'annata meteorologica 2007 è stata molto calda, con temperature massime elevate (30 – 45°C) ed una scarsa piovosità nel mese di agosto. Queste condizioni è riportato non essere particolarmente favorevoli allo sviluppo di funghi ocratossigeni. Un aspetto concomitante, ed indicatore dell'andamento climatico, è stata l'assenza della tignoletta che, grazie alla mancanza di pioggia ed alla bassa umidità, non si è sviluppata.

Il confronto dell'andamento delle temperature medie durante i periodi vendemmiali del 2006 e del 2007, evidenzia una temperatura media nel mese di ottobre (periodo di stoccaggio delle vinacce) molto superiore per il primo anno (18 °C) rispetto all'anno successivo (11 °C), e la temperatura massima durante il mese settembre 2006 è stata di 37 ° C, rispetto 30 °C del settembre 2007. Questi andamenti climatici hanno probabilmente avuto un ruolo molto rilevante nello sviluppo dei funghi ocratossigeni.

Si riscontra comunque una crescita dell'OTA, seppur minima, durante tutto il periodo di conservazione (tabella 5.3).

6. APPENDICE

6. Studio delle vinacce di Incrocio Manzoni 6.0.13

La varietà Incrocio Manzoni 6.0.13, comunemente denominato Manzoni bianco, deriva dall'incrocio di Riesling renano e Pinot bianco. L'uva di questa varietà è complessivamente povera di linalolo (inferiori a 20-30 µg/L nel vino), ma è caratterizzata da elevati tenori di ho-diolo I (2,6-dimetil-3,7-octadiene-2,6-diolo), un composto tipico della varietà Riesling renano riscontrato nei vini fino a livelli superiori 400 µg/L. Questo composto, caratterizzato da un aroma particolare, nei vini con due o più anni d'invecchiamento è precursore per perdita di una molecola d'acqua dei composti ho-trienolo e nerolo ossido, caratterizzati rispettivamente da sentore di fiori di tiglio e nota resinosa (Versini *et al.*, 2005).

Per indagare il potenziale aromatico che può essere trasferito ai prodotti, sono stati determinati gli aromi liberi ed i precursori di aromi glicosidati estratti dall'uva. In tabella 6.1 sono riportati i contenuti medi di aromi varietali liberi e glicosidati estratti dalle uve Incrocio Manzoni 6.0.13 (procedura descritta nel paragrafo 2.6.1 di MATERIALI e METODI).

Composti identificati nell'estratto d'uva	liberi glicosidati	
	µg/kg di uva	
2-esenale	325±9	n.d.
3-metil-1-butanolo	n.d.	71±2
3-metil-3-buten1-olo	n.d.	54±5
3-metil-2-buten-1-olo	n.d.	39±1
1-esanolo	48±5	18±4
3-esen-1-olo	14±1	n.d.
2-esen-1-olo	43±2	n.d.
Furan linalolo ox trans	n.d.	82±10
Furan linalolo ox cis	n.d.	51±6
Linalolo	22±6	82±14
α-terpineolo	n.d.	36±7
Piran linalolo ox trans	n.d.	41±3
Piran linalolo ox cis	n.d.	53±9
Nerolo	n.d.	4±4
eso-2-OH cineolo	n.d.	33±7
Geraniolo	n.d.	38±4
Diendiolo I	55±0	281±48
Diendiolo II	n.d.	21±1
8-OH diidrolinalolo	n.d.	40±7
8-OH-linalolo trans	n.d.	126±25
8-OH-linalolo cis	n.d.	340±56
7-OH terpineolo	n.d.	369±68
Alcol benzilico	70±11	824±134
β-feniletanolo	158±5	527±88
Acetovanillone	n.d.	49±9
Alcol omovanillico	n.d.	109±10
3-OH-β-damascone	n.d.	68±9
3-oxo-α-ionolo	n.d.	157±19
3-OH-7,8-dideidro-α-ionolo	n.d.	39±3
Vomifoliolo	n.d.	701±182

Tabella 6.1 Aromi varietali identificati nell'estratto di uve Incrocio Manzoni 6.0.13. Le concentrazioni dei composti liberi sono espresse in µg/kg vinacce di 1-eptanolo, le concentrazioni dei composti glicosidati in µg/kg vinacce di 1-decanolo.

Successivamente sono stati studiati i profili aromatici delle vinacce fermentate che vengono impiegate per la produzione dei distillati, costituiti dai composti varietali e di fermentazione recuperati con la distillazione in corrente di vapore, e dagli aromi varietali e precursori di aromi non recuperati con la distillazione ed estratti dalle vinacce esauste con metanolo.

In tabella 6.2 sono riportati i composti recuperati mediante distillazione in corrente di vapore dalle vinacce fermentate, ed in tabella 6.3 i composti liberi e glicosidati estratti dalle vinacce esauste come descritto nei paragrafi 2.1.3.1 e 2.1.3.2 di MATERIALI e METODI).

Composti recuperati mediante distillazione	liberi µg/kg di vinaccia
2-esenale	242±27
Capronato di etile	3224±592
Acetato di esile	150±30
1-esanolo	1464±66
Caprilato di etile	3547±721
Linalolo	176±1
Caprato di etile	2123±141
α-terpineolo	69±11
Citronellolo	91±22
Laurato di etile	970±6
β-feniletanolo	325±19
Acido ottanoico	1809±232
Esadecanoato di etile	513±204
Linoleato di etile	356±42
Linolenato di etile	200±3
Acido tetradecanoico	3027±341

Tabella 6.2 Composti identificati nel distillato in corrente di vapore delle vinacce fermentate e nell'estratto delle vinacce dopo distillazione. Le concentrazioni dei composti liberi sono espresse in µg/Kg vinacce di 1-eptanolo.

Composti estratti dalle vinacce	liberi	glicosidati
	µg/kg di vinaccia	
3-metil-1-butanolo	n.d.	210±14
3-metil 3-buten1-olo	n.d.	n.d.
3 metil 2-buten-1-olo	n.d.	n.d.
1-esanolo	107±10	90±6
Furan linalolo ox trans	n.d.	89±9
Furan linalolo ox cis	n.d.	132±9
Benzaldeide	62±20	n.d.
Piran linalolo ox trans	n.d.	57±4
Piran linalolo ox cis	n.d.	70±9
eso-2-OH cineolo	n.d.	55±0
Geraniolo	n.d.	0±0
Diendiolo I	132±52	36±9
Diendiolo II	59±10	n.d.
8-OH-linalolo trans	n.d.	104±19
8-OH-linalolo cis	n.d.	162±23
7-OH terpineolo	n.d.	223±61
Alcol benzilico	355±63	1503±92
β-feniletanolo	7465±850	326±36
Acetovanillone	n.d.	135±4
Alcol omovanillico	n.d.	111±16
Vanillina	1222±50	117±11
3-OH-β-damascone	n.d.	139±2
3-oxo-α-ionolo	n.d.	332±12
3-OH-7,8-dideidro-α-ionolo	n.d.	66±10
Vomifoliolo	n.d.	1231±365

Tabella 6.3 Composti identificati nell'estratto delle vinacce fermentate dopo distillazione in corrente di vapore. Le concentrazioni dei composti liberi sono espresse in µg/kg vinacce di 1-eptanolo, le concentrazioni dei glicosidati in µg/kg vinacce di 1-decanolo.

Tra i composti recuperabili con la distillazione si riscontra la presenza di rilevanti contenuti degli esteri capronato, caprilato e caprato di etile, caratterizzati da positive note fruttate. Tra i composti varietali si riscontrano importanti livelli di linalolo, diversamente dalle uve si riscontra la presenza di α-terpineolo libero sviluppato per idrolisi della forma glicosidata con la fermentazione delle vinacce e in distillazione. Si riscontra inoltre la presenza del citronellolo, assente nelle uve, ma probabilmente formatosi dalla trasformazione del geraniolo ad opera di lieviti (Di Stefano *et al.* 1992). Si riscontra inoltre la completa assenza del nerolo e geraniolo che sono presenti nelle uve in forma glicosidata, a causa dei riarrangiamenti chimici promossi in particolare in distillazione, che portano alla formazione di linalolo e α-terpineolo (Usseglio-Tomasset, 1995; Tateo e

Bononi, 1995). Essendo un composto relativamente polare, il diendiolo I non viene recuperato con la distillazione e, assieme al diendiolo II liberato dalla forma glicosidata nella fermentazione della vinaccia, si ritrova nell'estratto metanolico delle vinacce esauste. I di-idrossi terpeni (cis- e trans- idrossilinalolo, 7-idrossi terpineolo), i piran e furan linalolo ossidi ed i quattro composti norisoprenoidi (3-OH- β -damascone, 3-oxo- α -ionolo, 3-OH-7,8-dideidro- α -ionolo, vomifoliolo), presenti nell'uva solo nelle forme glicosidate, non vengono liberati con la fermentazione né con la distillazione, ed alla fine si ritrovano negli estratti metanolici delle vinacce solo in forma glicosidata. Infine, nelle vinacce fermentate si riscontrano importanti livelli di β -feniletanolo e vanillina liberi (quest'ultima non riscontrata nelle uve ed evidentemente sviluppata in fermentazione e distillazione) che non sono recuperati con la distillazione.

7. ALLEGATI

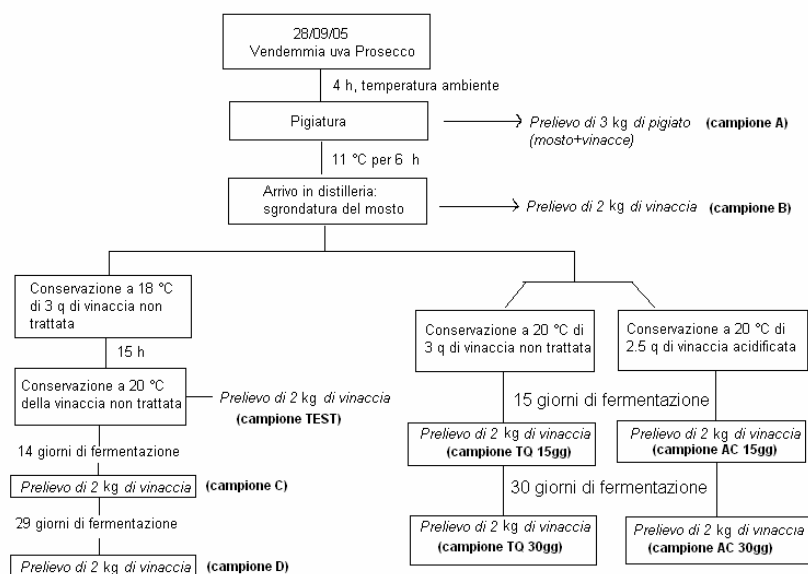


Figura 1 Schema di campionamento della vinaccia di uva Prosecco della vendemmia 2005.

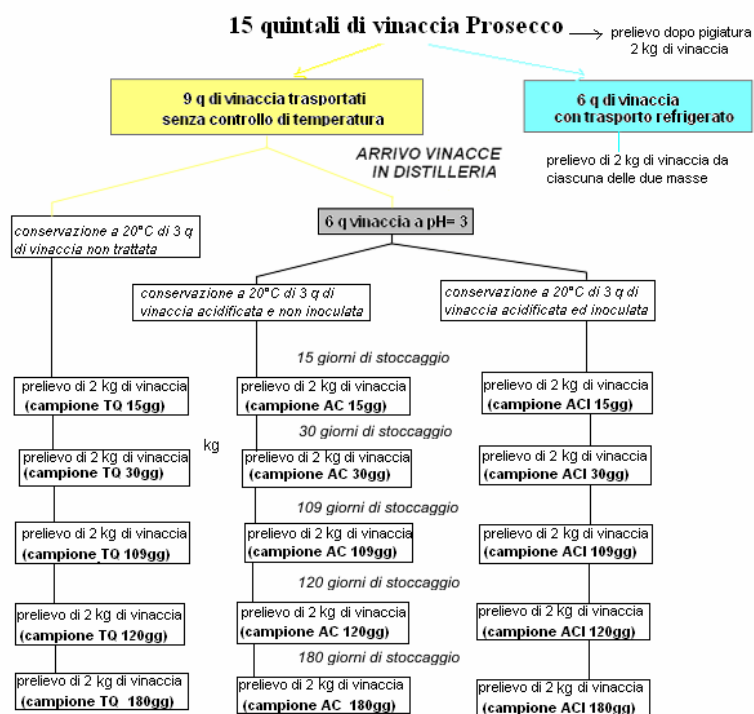


Figura 2 Schema di campionamento della vinaccia di uva Prosecco della vendemmia 2006.

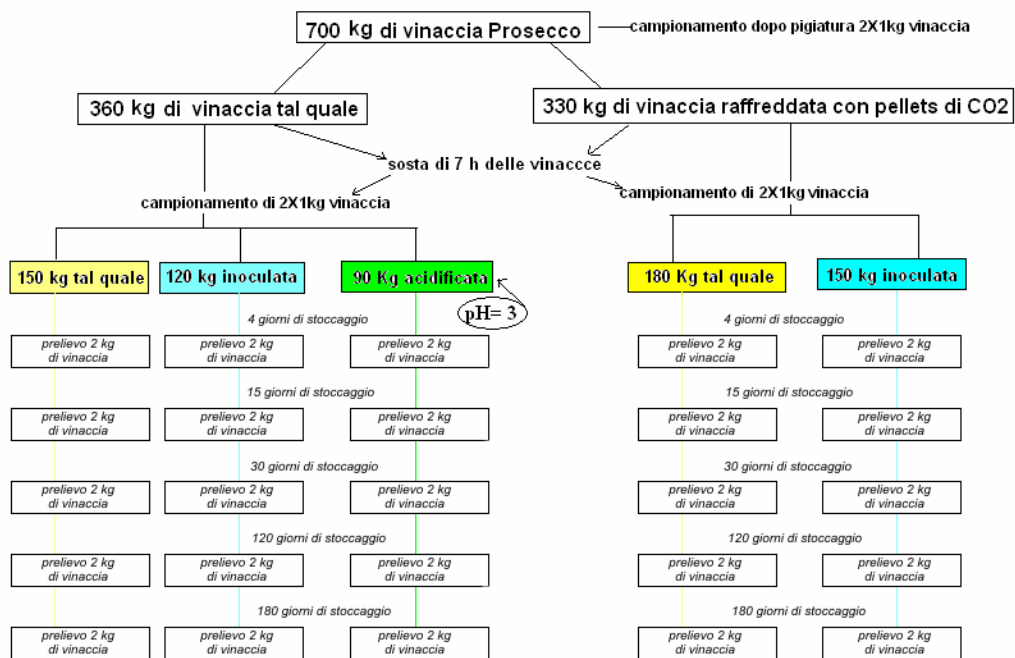


Figura 3 Schema di campionamento della vinaccia di uva Prosecco della vendemmia 2007.

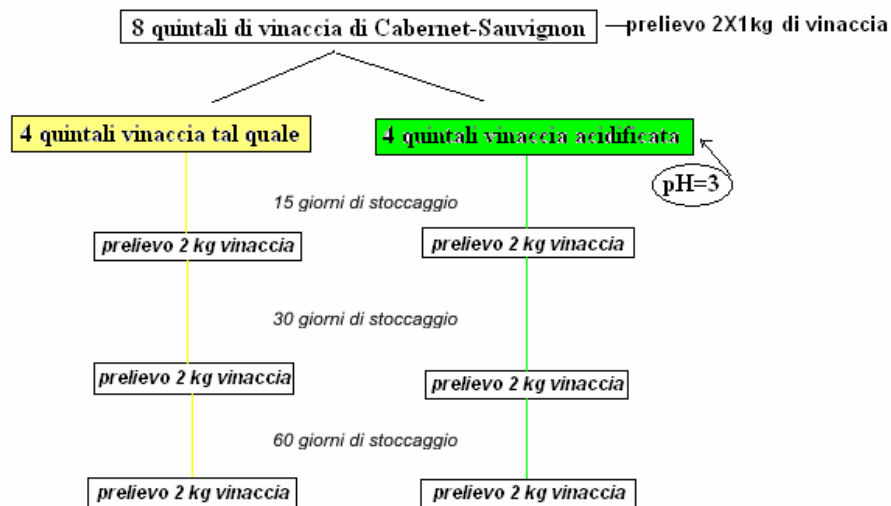


Figura 4 Schema di campionamento della vinaccia di uva Cabernet Sauvignon della vendemmia 2007.

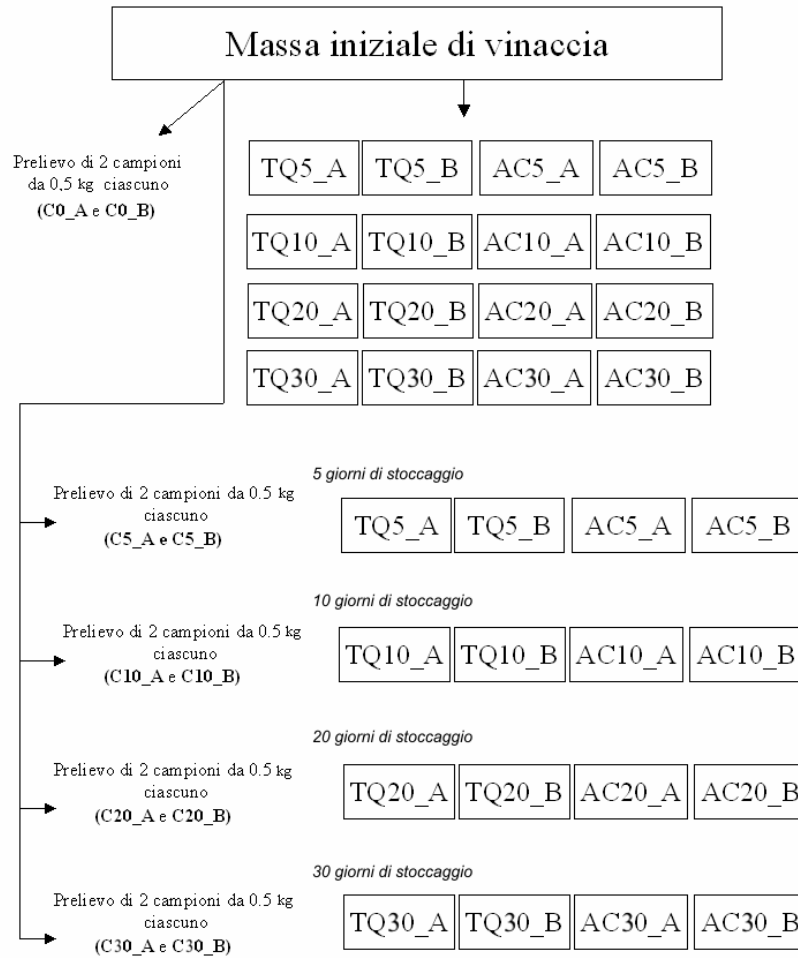


Figura 5 Schema di campionamento delle vinaccia di uva Regina, Trebbiano, Sangiovese, Trebbiano e Uva di Troia delle vendemmie 2006 e 2007.

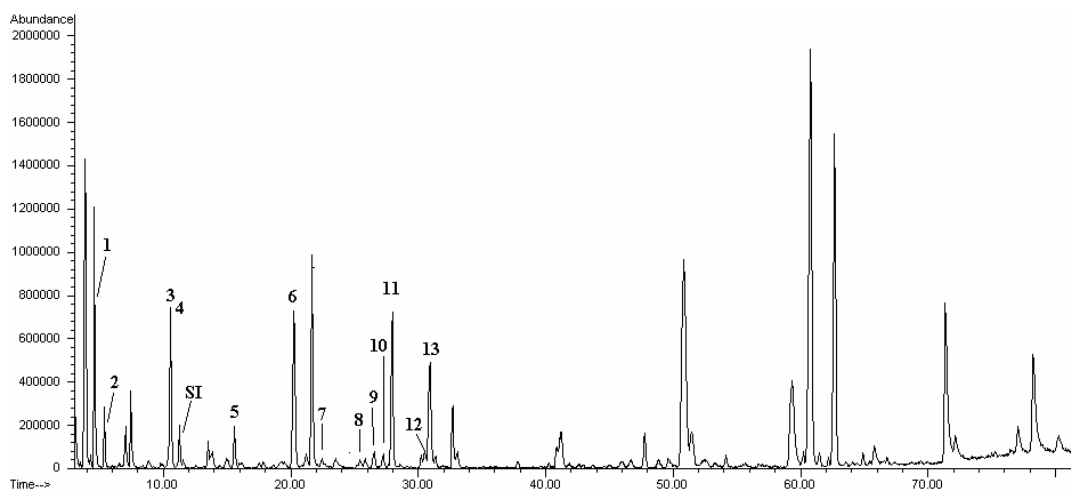


Figura 6 Cromatogramma GC/MS (acquisizione in SCAN) dei principali composti liberi dell'estratto in corrente di vapore di un campione di vinaccia Prosecco non acidificata a 109 giorni di stoccaggio (TQ 109 gg) della vendemmia 2006. **1.** esanoato di etile, **2.** esilacetato, **3.** cis linalolo ossido, **4.** ottanoato di etile, **SI** 1-eptanolo, **5.** linalolo, **6.** decanoato di etile, **7.** α -terpineolo, **8.** metilsalicilato, **9.** citronello, **10.** etilsalicilato, **11.** 2-feniletilacetato, **12.** geraniolo, **13.** dodecanoato di etile.

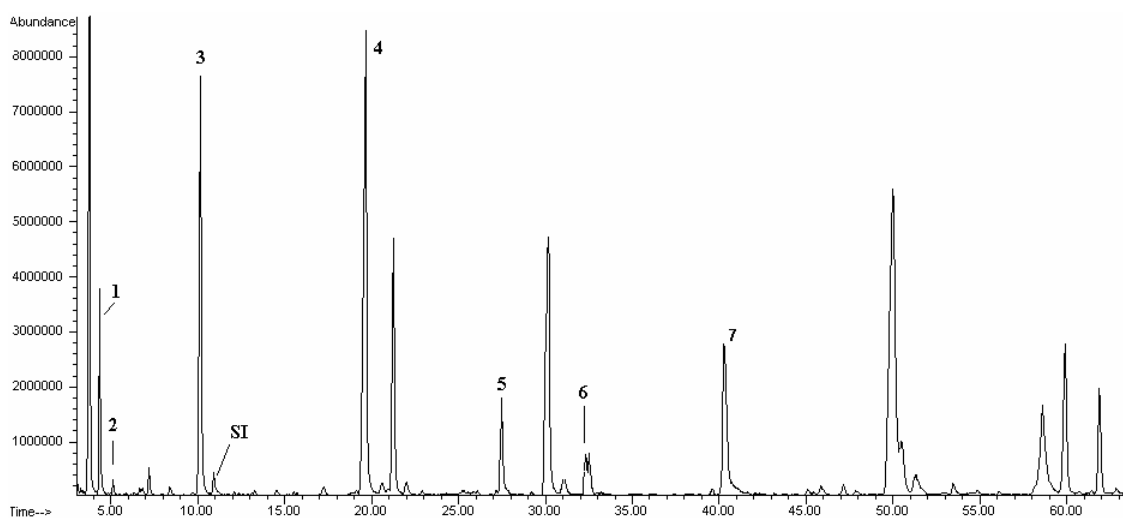


Figura 7 Cromatogramma GC/MS (acquisizione in modalità SCAN) dei principali composti liberi nell'estratto in corrente di vapore di un campione di vinaccia di uva Cabernet Sauvignon non acidificata a 30 giorni di stoccaggio (TQ 30) della vendemmia 2007. **1.** esanoato di etile, **2.** acetato di esile, **3.** ottanoato di etile, **SI** 1-eptanolo, **4.** decanoato di etile, **5.** 2-feniletilacetato, **6.** β -feniletanolo, **7.** tetradecanoato di etile.

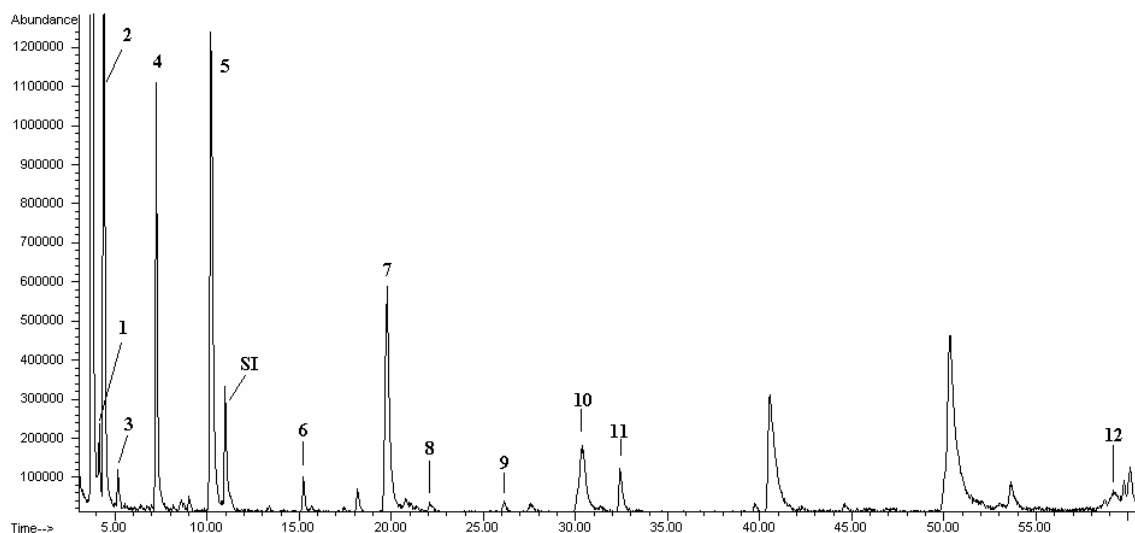


Figura 8 Cromatogramma GC/MS (acquisizione in modalità SCAN) dei principali composti liberi nell'estratto in corrente di vapore della vinaccia Incrocio Manzoni 6.0.13. **1.** 2-esenale, **2.** esanoato di etile, **3.** esilacetato, **4.** 1-esanolo, **5.** ottanoato di etile, **SI.** 1- eptanolo, **6.** linalolo, **7.** decanoato di etile, **8.** α -terpineolo, **9** citronello, **10** dodecanoato di etile, **11.** β -feniletanolo, **12.** acido dodecanoico.

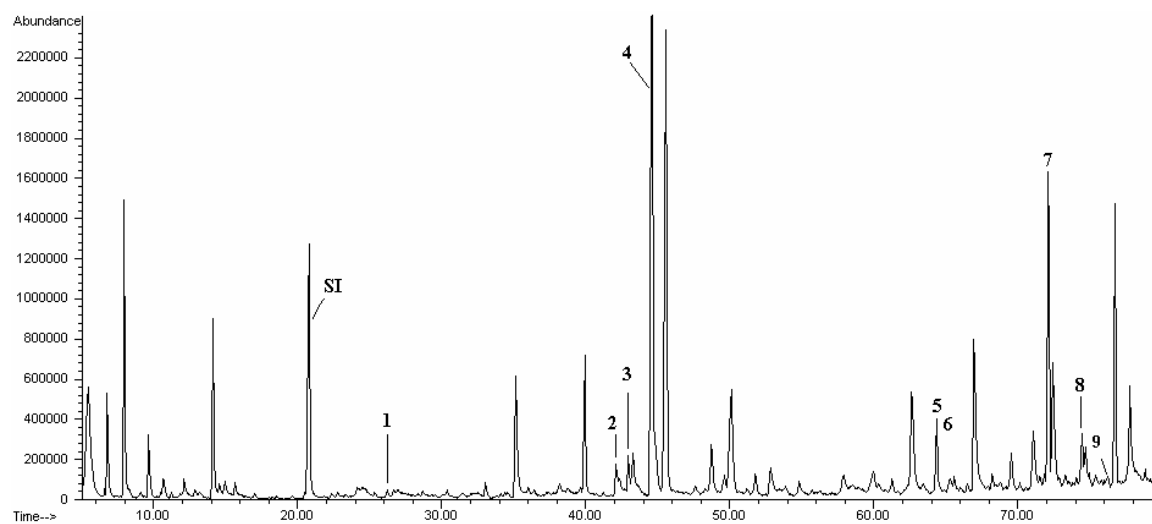


Figura 9 Cromatogramma GC/MS (acquisizione in SCAN) dei principali composti liberi recuperati mediante estrazione con metanolo di un campione di vinaccia di uva Prosecco non acidificata a 15 giorni di stoccaggio (TQ 30) della vendemmia 2005. **SI** 1-eptanolo, **1.** linalolo, **2.** geraniolo, **3.** alcol benzilico, **4.** β -feniletanolo, **5.** 8-OH linalolo cis , **6.** 8-OH geraniolo, **7.** vanillina, **8.** 3-oxo α -ionolo, **9.** 3-OH-7,8-diidro- β -ionolo.

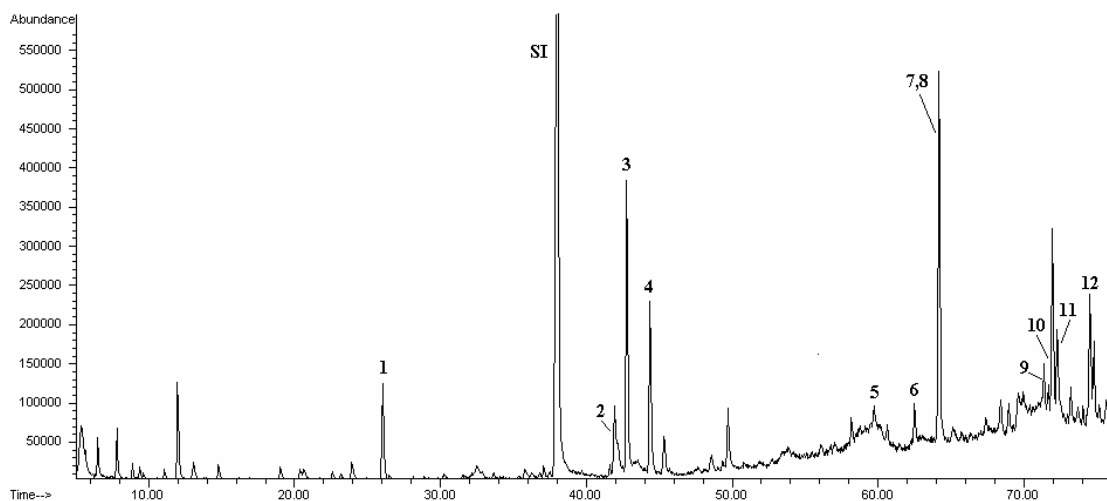


Figura 10 Cromatogramma GC/MS (acquisizione in modalità SCAN) dei principali composti glicosidati recuperati mediante estrazione con metanolo di un campione di vinaccia di uva Prosecco non acidificata a 30 giorni di stoccaggio (Test 30) della vendemmia 2005. **1.** linalolo, **SI** 1-decanolo, **2.** geraniolo, **3.** alcol benzilico, **4.** β -feniletanolo, **5.** OH-citronellolo, **6.** 8-OH linalolo trans, **7.** 8-OH linalolo cis, **8.** 8 OH-geraniolo, **9.** 7-OH- α -terpineolo, **10.** 3-OH- β -damascone, **11.** vanillina, **12.** 3 oxo- α -ionolo.

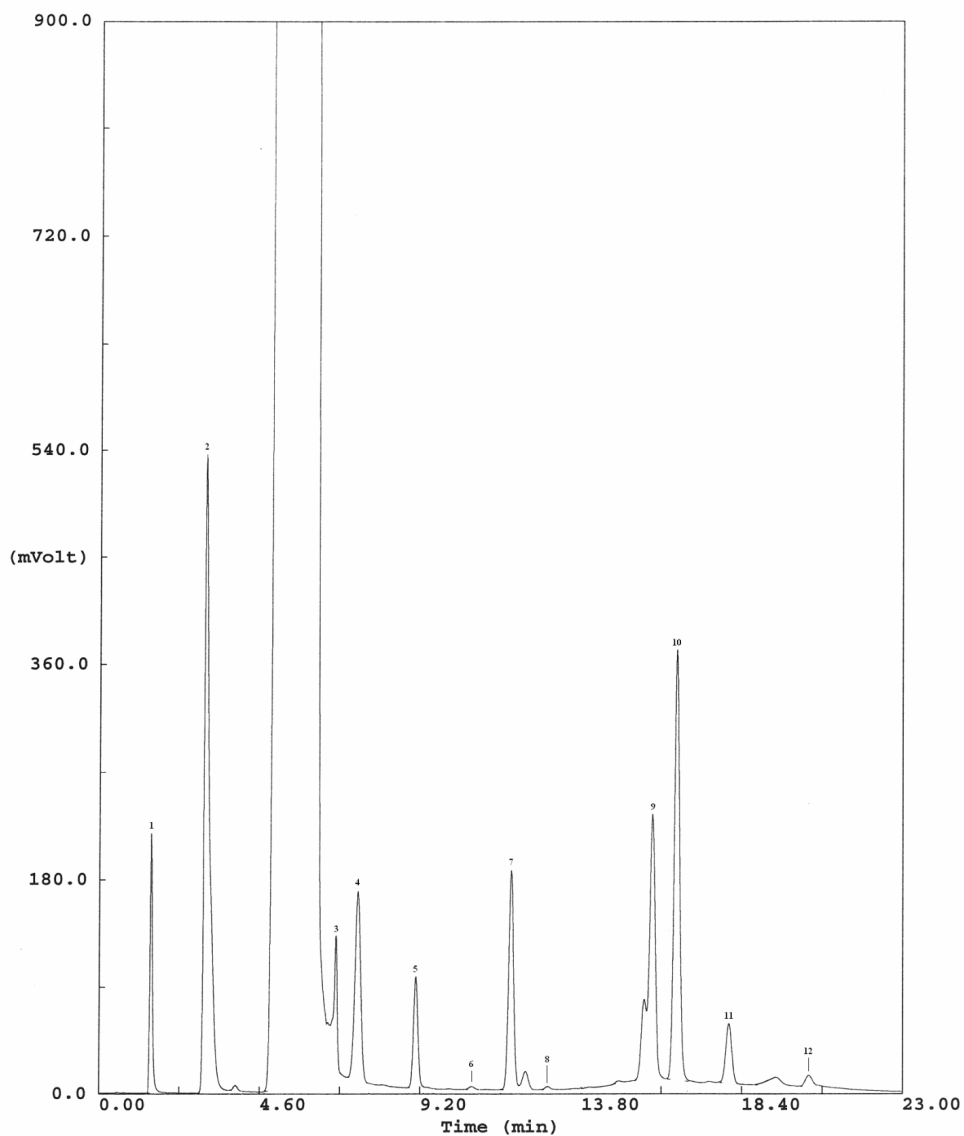


Figura 11 Cromatogramma GC/FID dei principali composti volatili di fermentazione di un campione di vinaccia di uva Prosecco non refrigerata tal quale a 30 giorni di stoccaggio (NN Refri TQ 30) della vendemmia 2007. **1.** acetaldeide, **2.** metanolo, **3.** 2 propanolo, **4.** acetato di etile, **5.** 1-propanolo, **6.** 2-butanolo, **7.** isobutanolo, **8.** 1-butanolo, **9.** alcoli isoamilici, **10.** 1-pentanol (SI), **11.** lattato di etile, **12.** 1-esanolo.

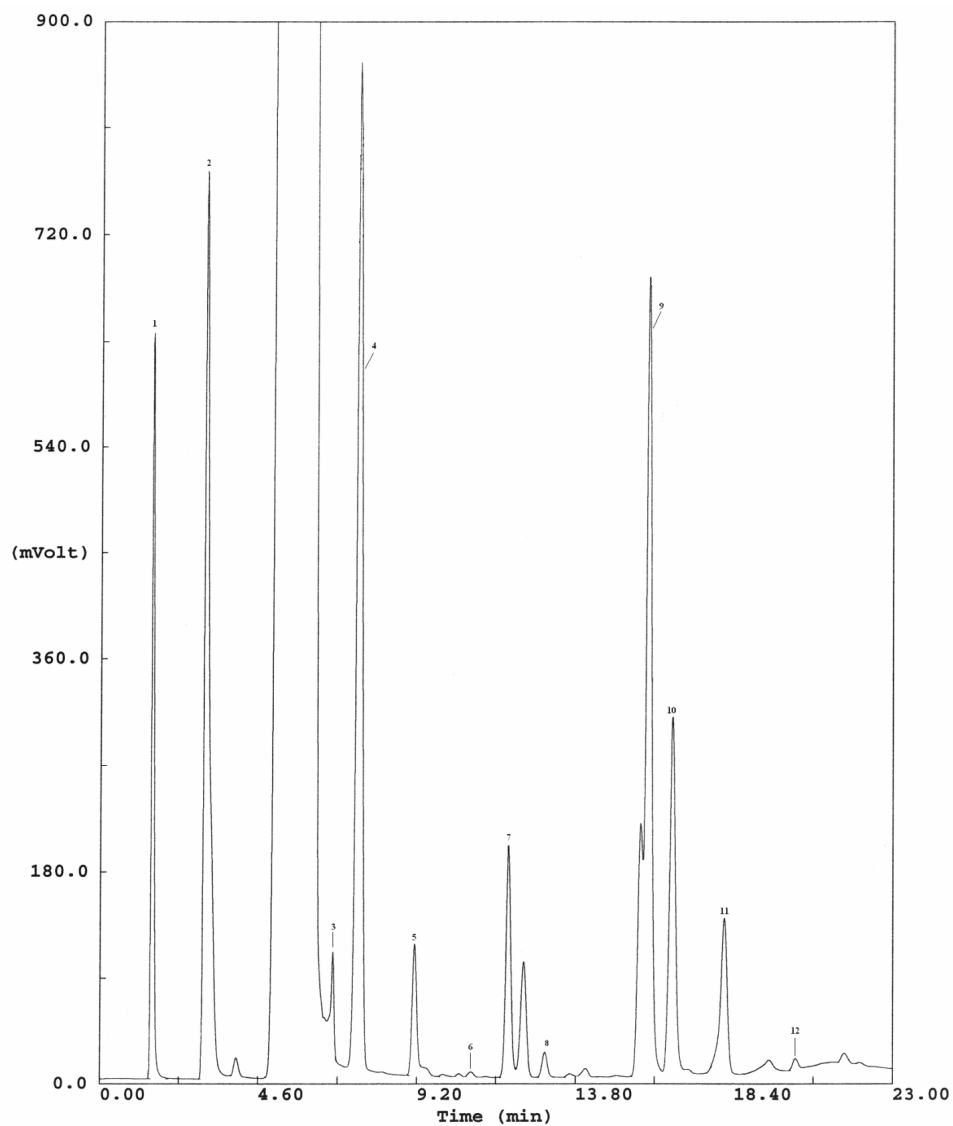


Figura 12 Cromatogramma GC/FID dei principali composti volatili di fermentazione di un campione di vinaccia di uva Cabernet Sauvignon non acidificata a 60 giorni di stoccaggio (TQ 60) della vendemmia 2007. **1.** acetaldeide, **2.** metanolo, **3.** 2 propanolo, **4.** acetato di etile, **5.** 1-propanolo, **6.** 2-butanolo, **7.** isobutanolo, **8.** 1-butanolo, **9.** alcoli isoamilici, **10.** 1-pentanol (SI), **11.** lattato di etile, **12.** 1-esanolo.

8. CONCLUSIONI

Conclusioni

La qualità della vinaccia è legata ai metodi impiegati per il trasporto, stoccaggio e la fermentazione, e determina le caratteristiche finali della grappa. In questo lavoro sono stati indagati gli effetti dell'acidificazione, refrigerazione ed aggiunta di lieviti selezionati sui composti volatili e varietali della vinaccia.

Nella vinaccia di Prosecco, l'acidificazione ha rivelato rallentare l'idrolisi dei precursori glicosilati di aromi (terpenoli e norisoprenoidi), inibisce almeno in parte la formazione di lattato ed acetato di etile, potenzialmente legati alla flora batterica endogena, limita il livello di metanolo nei stoccaggi superiori a tre mesi, non ha rivelato inibire la formazione di 2-butanolo. Dopo 15 giorni di stoccaggio, si è evidenziato un effetto inibente nei confronti dei processi che portano allo sviluppo di esanale, 2-esenale, acetoino e benzaldeide, ma tale effetto si osserva anche nei confronti dei successivi processi che portano alla degradazione di tali composti, che dopo 30 giorni risultavano maggiori nei campioni acidificati.

Nel caso delle vinacce rosse, l'acidificazione ha evidenziato il vantaggio di ridurre gli incrementi di acetato e lattato di etile durante il primo mese di stoccaggio, e di mantenerli più bassi anche nei tempi di stoccaggio più lunghi.

La refrigerazione delle vinacce (**18°C per 15 ore prima dello stoccaggio**) ha indotto maggiori livelli di aromi liberi, possibilmente a causa di una ridotta attività di lieviti e batteri potenzialmente competitiva con le glicosidasi dell'uva. In relazione ai composti volatili di fermentazione, non ha rivelato influire sui livelli di metanolo, acetaldeide, lattato di etile ed alcoli superiori totali, ha comunque rallentato la formazione del 2-butanolo.

L'inoculo di lieviti selezionati prima dello stoccaggio ha rivelato limitare lo sviluppo di acetato e lattato di etile nelle vinacce, e del 2-butanolo. Unito alla refrigerazione, ha rivelato rallentare la formazione di 2-butanolo per tempi di stoccaggio superiori ad un mese, e la formazione di acetato di etile, lattato di etile ed acetaldeide nei tempi di stoccaggio superiori a 15 giorni.

In relazione alla presenza di ocratossina A (OTA) in biomasse di fecce e vinacce potenzialmente a rischio, in due dei campioni indagati questa è stata riscontrata in concentrazioni fino a 4–5 mg/quintale di vinaccia già dopo 10 giorni dalla pigiatura, con una tendenza a crescere durante il primo mese di stoccaggio. I livelli di OTA nelle vinacce sono risultati comunque essere fortemente influenzati anche dalle condizioni climatiche e dell'annata. I livelli riscontrati, che risultano **circa 25 volte** maggiori dei limiti massimi di OTA fissati per l'uva (0.002 mg/kg, Regolamento CE n° 123/2005), potrebbero considerarsi potenzialmente rischiosi anche se presenti in un materiale non alimentare, a causa della manipolazione di masse considerevoli di fecce e vinacce in cantina e distilleria da parte degli operatori, ed al loro impiego per la produzione di farine destinate al consumo animale o come concime organico. L'acidificazione non ha rivelato influenzare i livelli della tossina nella vinaccia, probabilmente a causa del fatto che lo sviluppo dei funghi ocratossigeni che avviene principalmente nei tempi che precedono lo stoccaggio, durante le fasi di vendemmia, trasporto e vinificazione. Un ulteriore studio dovrebbe comunque essere condotto per verificare se i processi industriali a cui vengono successivamente sottoposte le biomasse (distillazione, produzione di farine, compostaggio, esposizione all'ambiente per tempi prolungati, ecc.) possono indurre la degradazione della tossina.

Sulla base dei risultati della ricerca, si evidenzia come le procedure di trasporto, stoccaggio e fermentazione delle vinacce dovrebbero essere mirate ai tempi di stoccaggio ed alle caratteristiche che si desiderano per il prodotto finale.

9. BIBLIOGRAFIA

Aasen A.J., Kimland B., Almquist S.O., Enzell C.R. (1972) New tobacco constituents. Structure of five isomeric megastigmatrienones. *Acta Chem Scand* **26**: 2573-2576.

Arlete Mascarenhas M. (1984) The occurrence of malolactic fermentation and diacetyl content of dry table wines from north-eastern Portugal. *Am J Enol Vitic* **35**: 49-51.

Battista F. (2006) Studio dei principali composti carbonilici nella vinaccia di Prosecco in relazione alle diverse condizioni di stoccaggio. *Tesi di laurea*, Università degli Studi di Padova.

Baumes R., Wirth J., Bureau S., Günata Y., Razungles A. A. (2002) Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines *Analytica Chimica Acta*, **458**: 3-14.

Boatto V., Galletto L., Rossetto L., Trestini S. (2003) Dati di mercato nei vari canali di vendita. Accademia della Grappa e delle Acquaviti – Osservatorio sulla Grappa.

Boido E., Lloret A., Medina K., Carrau F., Dellacassa E. (2002) Effect of b-glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tunnat wine during the malolactic fermentation. *J Agric Food Chem* **50**: 2344-2349.

Cancilla D.A., Que Hee S.S. (1992) O-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)methylhydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds. *J Chromatogr* **627**: 1-16.

Chassagne D., Alexandre H., Massoutier C., Salles C., Feuillant M. (2000). The aroma glycosides composition of Burgundy Pinot noir must. *Vitis Research Note* **39(4)**: 177-178.

Corison C.A., Ough C.S., Berg H.W., Nelson K.E. (1979) Must acetic acid and ethyl acetate as mold and rot indicators in grapes. *Am J Enol Vitic* **30(2)**: 130-134.

Da Porto C., Freschet G. (2003) Study of some volatile compounds of raw grappa obtained using marc treated in different ways and stored in plastic tunnels. *Journal of Wine Research* **14(2/3)**: 139-146.

D.P.R 16 Luglio 1997, n.297. Regolamento recante norme in materia di produzione e commercializzazione di acquaviti, grappa, brandy italiano e liquori. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana 12.09.1997 n.213.

De Revel G., Bertrand A. (1993) A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. *J Sci Food Agric* **61**: 267-271.

De Revel G., Bertrand A. (1994) Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. In: *Trends in Flavour Research*. H. Maarse and D.G. van der Heij (Eds.). Elsevier Science B.V., 353-361.

De Rosa T., Castagner R. (1994) *Tecnologie della grappa e dei distillati d'uva*. Edizioni Edagricole, Bologna.

Di Stefano R., Ciolfi G. (1982) Produzione di acetaldeide da parte di stipiti di lieviti di specie diverse. *Riv Vitic Enol* **35**: 474-480.

Di Stefano R. (1986) I costituenti della grappa di Moscato. *Vini d'Italia* **28 (2)**: 41-48.

Di Stefano R. (1991) Proposition d'une methode de preparation de l'echantillon pour la determination des terpenes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bull OIV* **4**:721-725.

Di Stefano R., Magiorotto G., Gianotti S. (1992) Trasformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. *Riv Vitic Enol* **42(1)**: 43-49.

Di Stefano R., Magiorotto G., Di Bernardi D., Melia V., Sparacio A., Fina B., Sparla S. (1995). Evoluzione dei composti terpenici durante il processo di appassimento dell'uva Zibibbo di Pantelleria. *L'Enotecnico* **31(10)**: 73-84.

Di Stefano R. (1996) Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. *Riv Vitic Enol* **(1)**: 51-56.

Di Stefano R., Pigella R., Gentilini N., Calò A., Costacurta A., Crespan M. (1997). Caratterizzazione di alcuni biotipi di "Prosecco" attraverso lo studio dei metabolici secondari. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia di Asti* **27**: 137-149.

Di Stefano R., Borsa D. (2006) Composti aromatici varietali di grappe e distillati d'uva da monovitigno. *Riv Vitic Enol* **59 (1)**: 37-56.

Flamini R., Dalla Vedova A., Calò A. (2001). Studio sui componenti monoterpenici di 23 accessioni di uve Moscato: correlazioni tra profilo aromatico e varietà. *Riv Vitic Enol* **2/3**: 35-49.

Flamini R., Dalla Vedova A., Castagner R., Salvador M. (2002a) Il profilo aromatico della grappa di Prosecco: gli aromi dalle vinacce al distillato. *L'Enologo* (12):89-94.

Flamini R., De Luca G., Di Stefano R. (2002b) Changes in carbonyl compounds in Chardonnay and Cabernet Sauvignon wines as a consequence of malolactic fermentation. *Vitis* 41(2):107-112.

Flamini R., Tonus T., Dalla Vedova A. (2002c) A GC-MS method for determining acetaldehyde in wines. *Riv. Vitic. Enol.*, 2/3:15-21.

Flamini R., Dalla Vedova A., Panighel A. (2005a) Study of carbonyl compounds in some Italian marc distillate (grappa) samples by synthesis of *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine derivatives. *Riv. Vitic. Enol.* **58(1)**: 51-63.

Flamini R., Dalla Vedova A., Panighel A., Perchiazzi N., Ongarato S. (2005b) Monitoring of principal carbonyl compounds involved in malolactic fermentation of wine by solid-phase microextraction and positive ion chemical ionization GC/MS analysis. *J Mass Spectrom.* **40**: 1558-1564.

Flamini R. (2005) Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieved by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **40**: 705-713.

Fregoni M. (2005). *Viticultura di qualità*. Phytoline editore, Rivoli veronese, Verona.

Garcia Moruno E., Sanlorenzo C., Di Tommaso D., Di Stefano R., (2004). Un metodo per la determinazione dell'Ocratossina A nelle uve: applicazione allo studio dell'influenza del sistema di appassimento delle uve sul contenuto di Ocratossina A. *Riv Vitic Enol* **1/2**: 3-11.

Gomez E., Martinez A., Laencina J. (1994) Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grape varieties. *Vitis* **33**: 1-4.

Guedes de Pinho P., Silva Ferreira A.C., Mendes Pinto M., Gomez Benitez J., Hogg T.A. (2001) Determination of carotenoid profiles in grapes, musts, and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric Food Chem* **49**: 5484-5488.

Günata Y.Z., Bayonove C.L., Baumes R.L., Cordonnier R.E. (1985a) The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some grape aroma components. *J of Chromatography* **331**:83-90.

Günata Y.Z., Bayonove C.L., Baumes R.L., Cordonnier R.E. (1985b) Stability of free and bound fractions of some aroma components of grape cv Muscat during the wine processing. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**:112-114.

Günata Y.Z., Bitteur S., Brillouet J.M., Bayonove C.L., Cordonnier R.E. (1988) Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research* **184**:139-149.

Günata Y.Z., Blondeel C., Vallier M.J., Lepoutre J.P., Sapis J.C., Watanabe N. (1998) An endoglycosidase from grape berry skin of cv M. Alexandrie, hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J Agric Food Chem* **46**: 2748-2753.

Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998.

Guymon J.F., Crowell E.A. (1965) The formation of acetoin and diacetyl during fermentation, and the level found in wines. *Am J Enol Vitic* **16**: 85-91.

Hock R., Benda J, Schreier P. (1984) Formation of terpenes by yeasts during alcoholic fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch* **179**:450-452.

Killian E., Ough C.S. (1979) Fermentation esters formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am J Enol Vitic* **30(4)**: 301-305.

Lamonarca Rocco. (2007) Indagine sulla presenza di Ocratossina A nelle vinacce destinate alla distillazione in diverse condizioni di stoccaggio. *Tesi di laurea*, Università degli Studi di Padova.

Maicas S., Mateo J.J. (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *App. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 322-335.

Margalit Y. (2004) Concepts in wine chemistry. 2nd edition, Crum J.D. editor, *The Wine Appreciation Guild*, San Francisco, CA, USA.

Martineau B., Henick-Kling T., Acree T.E. (1995) Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *Am J Enol Vitic* **46**: 385-388.

Mateo J.J., Jiménez M. (2000) Review: Monoterpenes in grape juice and wines. *J Chromatogr A* **881**: 557-567.

Mateo J.J., Gentilini N., Huerta T., Jiménez M., Di Stefano R. (1997) Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *J Chromatogr A* **778**: 219–224.

Miconi C. 2005. Misure densimetriche e rifrattometriche su mosti, vini e distillati. Unione Ex Allievi della Scuola di Viticoltura e di Enologia di Conegliano. Editrice Arti grafiche Spa, Conegliano.

Misselhorn K. (1975) Formation of acetals in rum: a kinetic study. *Annal Technol Agric* **3-4**: 371-381.

Nykänen L. 1986. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Vitic* **37(1)**: 84-96.

Ogawa K., Ijima Y., Guo W., Watanabe N., Usui T., Dong S., Tong Q., Sakata K. (1997) Purification of a β -Primeverosidase concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves (Cv. Shuixian) to be processed to Oolong tea. *J Agric Food Chem* **45(3)**: 877-882.

Panighel A., Dalla Vedova A., Flamini R. (2007) Alcohol and sugar control in grape marcs for grappa production by a HPLC method in comparison with usual methods. *Riv Vitic Enol* **(1)**: 25-34.

Porretta S. (2000). *Analisi Sensoriale & Consumer Science*. Editore Chiriotti, 159-164.

Rankine B.C., Fornachon J.C.M., Bridson D.A.(1969) Diacetyl in Australian dry wines and its significance in wine quality. *Vitis* **8**: 129-134.

Rapp A., Mandery H. (1986) Wine aroma. *Experientia* **42**: 873-884.

Razungles A., Günata Y.Z., Pinatel S., Baumes R.L., Bayonove C.L. (1993) Etude quantitative de composés terpéniques et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins . *Sci des Aliments* **13**: 59-72.

Regolamento CEE N. 1576/89. Regole generali relative alla definizione, alla designazione e alla presentazione delle bevande spiritose. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, 12.06.1989, L 160.

Regolamento (CE) N.123/2005 della Commissione del 26 gennaio 2005 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda l'ocratossina A. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 28 gennaio 2005, L 25/3.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 1998. *Trattato di enologia II*. Edizione Edagricole, Bologna.

Ronkainen P., Brummer S., Suomalainen H. (1970) Diacetyl and formic acid as decomposition products of 2-acetolactic acid. *Acta Chem. Scand.* **24(9)**:3404-3406.

Ruberto G., Renda A., Amico V., Tringali C. (2008) Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology* **99**: 261-268.

Salo P., Nykänen L., Suomalainen H. (1972) Odor thresholds and relative intensities of volatile aroma components in an artificial beverage imitating whisky. *J. Food Science* **37**: 394-398.

Salvatori M. (2005) La grappa di Moscato: influenza del metodo e delle condizioni di stoccaggio delle vinacce sui composti volatili varietali. *Tesi di laurea*, Università degli Studi di Padova.

Sarry J.E., Günata Z. (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry* **87**: 509-521.

Silva M.L., Malcata F.X. (1998) Relationships between storage conditions of grape pomace and volatile composition of spirits obtained therefrom. *Am J Enol Vitic* **49(1)**: 56-64.

Sinnott M. L. (1990) Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90(7)**: 1171-1202.

Skouroumounis G.K., Sefton M.A. (2000) Acid-catalyzed hydrolysis of alcohols and their β -D-glucopyranosides. *J Agric Food Chem* **48**: 2033-2039.

Soleas G.J., Yan J., Goldberg D.M. (2001) Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J Agric Food Chem* **49**: 2733-2740.

Strauss C.R., Dimitriadis E., Wilson B., Williams P.J. (1986) Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatile C13 norisoprenoids of *Vitis Vinifera* grapes. *J Agric Food Chem* **34**: 145-149.

Strauss C.R., Wilson B., Anderson R., Williams P.J. (1987a) Development of precursors of C13 nor-isoprenoid flavorants in Riesling grapes. *Am J Enol Vitic* **38(1)**: 23-27.

Strauss C.R., Wilson B., Williams P.J. (1987b) 3-oxo- α -ionol, vomifoliol and roseoside in *Vitis vinifera* fruit. *Phytochemistry* **26(7)**: 1995-1997.

Tateo F., Bononi M., Fuso-Nerini A., Lubian E., Martello S., Commissati I. (1999) ricerca e determinazione dell'ocratossina A nei vini. *Industria delle bevande* **12**: 592-596.

Tomasi D., Flamini R., Calò A., Pol M., Dalla Vedova A., Costacurta A. (2000) Studio dei precursori di aromi varietali contenuti nel mosto di uva Prosecco. *L'Enologo* **(6)**: 97-102.

Tonus T., Flamini R., Dalla Vedova A., Spadetto S. (2005c). Studio dei metodi chimici per il monitoraggio dell'Ocratossina A (OTA) nell'uva. *Riv Vitic Enol* (1): 3-12.

Ummarino I., Guidoni S., Di Stefano R. (1999). Profilo terpenico di vitigni aromatici. *Quaderni della Scuola di Specializzazione in Scienze Viticole ed Enologiche* **23**: 83-100.

Usseglio-Tomasset L. (1970) Studio chimico-analitico e gascromatografico della Grappa Piemontese. *Vini d'Italia* **XII**: 97-120.

Usseglio-Tomasset L. (1971a) Le caratteristiche della grappa derivanti dall'evoluzione dei costituenti volatili delle vinacce durante il periodo di insilamento e dalle modificazioni apportate dal processo di distillazione. *Vini d'Italia* **XIII**: 453-462.

Usseglio-Tomasset L. (1973) Aggiornamento sulla conoscenza dei componenti della grappa ed osservazioni sull'affidabilità dei metodi di analisi relativi. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia di Asti.*, pp. 3-19.

Usseglio-Tomasset L. (1978) Gli alcoli superiori: un problema per la grappa. *Vini d'Italia* **12**: 291-294.

Versini G, Margheri G. (1979) Rapporto fra i costituenti volatili della Grappa e le caratteristiche organolettiche. *Vini d'Italia* **XXI**: 269-277.

Versini G, Inama S. (1981) Risultati di una sperimentazione per l'inibizione della formazione del 2-butanolo nella conservazione della vinaccia. *Il Giornale dei Distillatori* **236**: 2-4.

Versini G., Inama S., Pilzer B. (1992) Aroma characteristics of Gewürtztraminer grape distillate and grappa in relation to the varietal aroma distribution in berry parts and in comparison with other monovarietal distillates. In: “*Elaboration et connaissance des spiritueux: Recherche de la Qualité, Tradition et Innovation*”. Cantagrel R., BNIC ed., Proc. 1^{er} Symposium Scientifique International de Cognac, France Lavoiser-TEC&DOC pp 69-76.

Versini G., Rapp A., Dalla Serra A., Pichler U., Ramponi M. (1994a) Methyl trans granate and farnesoate as markers for Gewürtztraminer grape skins and related distillates. *Vitis* **33**: 139-142.

Versini G., Orriols I. , Dalla Serra A. (1994b) Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines. *Vitis* **33**: 165-170.

Versini G. (1995) Problematiche della qualità della grappa e punti critici del processo. *Atti Accademia Italiana Della Vite e del Vino – Siena*, Edizioni grafiche Lama, Piacenza 47: 231-236.

Versini G., Carlin S., Dalla Serra A., Nicolini G., Rapp A. (2002) Formation of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphtalene and other norisoprenoids in wine: considerations on the kinetics. In: *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, Editors Winterhalter P. and Rouseff R. ACS Symposium Series 802, pp 285-299.

Versini G., Nicolini G., Violoni M. (2005) Il profumo del Muller Thurgau una questione di alchimia...anzi di chimica. *L'Assaggio* **11**: 33-35.

Voirin S.G., Baumes R.L., Sapis J.C., Bayonove C.L. (1992) Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II. Qualitative and quantitative determination of glycosides in grape. *Journal of Chromatography* **595**: 269-281.

Waldmann D., Winterhalter P. (1992) Identification of a novel vitispirane precursor in Riesling wine. *Vitis* **31**: 169-174.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. (1980) Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat grapes. *J Agric Food Chem* **28**:766-771.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R.A. (1982a) Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* **21**: 2013-2020.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R.A. (1982a) Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene β -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J Agric Food Chem* **30**:1219-1223.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R.A. (1982c) Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juices and wines. *J Chromatogr* **235**:471-480.

Wilson, B.; Strauss, C.R.; Williams, P.J. (1986) The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some grape varieties. *Am J Enol Vitic* **37(2)**: 107-111.

Winterhalter P., Schreier P. (1988) Free and bound C₁₃ norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit. *J Agric Food Chem* **36**: 1251-1256.

Winterhalter P., Sefton M.A., Williams P.J. (1990) Volatile C₁₃-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am J Enol Vitic* **41(4)**: 277- 283.

Winterhalter P., Rouseff R. (2002) *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, Editors Winterhalter P. and Rouseff R. ACS Symposium Series 802, pp 1-17.

Wirth J. , Wenfei G., Baumes R., Gunata Z. (2001) Volatile compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape berries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars. *J Agric Food Chem* **49**: 2917-2923.

Ringraziamenti

Numerose persone hanno svolto un ruolo fondamentale nel completamento di questo progetto.

Desidero ringraziare il Professor Giorgio Ponchia per i suoi preziosi consigli durante i tre anni di dottorato.

Sono profondamente grata al Dr. Riccardo Flamini per avermi dato l'opportunità di inserirmi in un lavoro, per me nuovo, per i numerosi consigli e l'assistenza durante questi tre anni e per le numerose ore dedicate alla mia tesi.

Sono grata alla Prof. Viviana Corich e al Prof. Alessio Giacomini per aver provveduto dati e preziose informazioni.

Ringrazio Antonio Dalla Vedova e Mirko De Rosso per aver generosamente condiviso le conoscenze tecniche e per aver fornito importanti informazioni per la preparazione di questo lavoro.

Desidero anche ringraziare il team del Prof. Tomasi per aver condiviso campioni, strumentazione e materiali.

Desidero inoltre esprimere la mia gratitudine a tutti i miei colleghi dottorandi con i quali ho condiviso soddisfazioni e sacrifici in questa indimenticabile esperienza.

Un grazie speciale va allo staff del Laboratorio Chimico dell'Acquavite per aver fornito campioni e attrezzature.

Questa tesi di dottorato è stata resa possibile grazie al finanziamento dell'Accademia della Grappa e delle Acquaviti e dall'Azienda Acquavite S.p.A. A loro va la mia profonda e sentita riconoscenza. Un pensiero di particolare riconoscenza al CRA-VIT di Conegliano.

Infine desidero ringraziare la mia famiglia, in particolare mamma Severina che mi è sempre stata vicina, sopportando pazientemente tutti i miei momenti difficili e spronandomi ad andare avanti; un grazie speciale a Rosanna, Vittorio e Martino per l'interesse dimostrato nel mio lavoro per il loro preziosissimo aiuto nell'ultima fase della stesura.