



*Studio per l'applicazione della tecnologia ad ultrasuoni
nella filiera enologica*

A Ph.D. dissertation presented by
Paola Ferraretto

to the
University of Udine

for the degree of Ph.D. in the subject of
Food Science (Cycle XXV)
Department of Food Science

UNIVERSITY OF UDINE
Italy
March 2014

Coordinator: Mara Lucia Stecchini, Full Professor
Department of Food Science
University of Udine, Italy

Supervisors: Emilio Celotti, Associate Professor
Department of Food Science
University of Udine, Italy

Reviewers: Andrea Curioni, Full Professor
Department of Agronomy Food Natural Resources
Animals and Environment
University of Padova, Italy

Roberto Ferrarini, Associate Professor
Department of Department of Biotechnology
University of Verona, Italy

SOMMARIO

INTRODUZIONE	1
1 GLI ULTRASUONI	1
1.1 IL SUONO E LE VIBRAZIONI SONORE	1
1.1.1 Gli ultrasuoni: generalità e storia	2
1.1.2 Classificazione degli ultrasuoni e loro effetto.....	5
1.1.3 Componenti del generatore di ultrasuoni	9
1.2 SONOCHIMICA	11
1.3 APPLICAZIONI DEGLI ULTRASUONI	12
1.3.1 Applicazione degli ultrasuoni nel settore delle tecnologie alimentari	13
2 BIBLIOGRAFIA	21
PARTE PRIMA	27
INDAGINE SULLA CAPACITÀ ESTRAENTE DEGLI ULTRASUONI SUI COMPOSTI FENOLICI E SULLA RESA IN SUCCO	27
INTRODUZIONE	27
1. PREMESSA	27
2. STRUTTURA E COMPONENTI CELLULARI DELLA BUCCIA D’UVA	28
2.1 TECNOLOGIA DELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO	30
2.1.1 Fattori che determinano l’estrazione dei polifenoli in macerazione	31
2.1.2 Diffusibilità delle frazioni fenoliche	31
2.1.3 Dinamica di estrazione degli antociani	32
2.1.4 Diffusibilità dei tannini	32
2.1.5 Conduzione della macerazione	32
2.1.6 Influenza dell’anidride solforosa	33
2.1.7 Influenza della temperatura.....	34
2.1.8 Utilizzo di enzimi pectolitici.....	34
2.2 TECNICHE DI ESTRAZIONE DEI COMPOSTI POLIFENOLICI	34
2.3 I VINACCIOLI	40
2.3.1 Estrazione di polifenoli dai vinaccioli.....	41
2.3.2 I tannini dei vinaccioli.....	41
2.3.3 Sensazioni di astringenza e di amaro	42
3..... EFFETTO DEL TRATTAMENTO AD ULTRASUONI SULLA COMPONENTE POLIFENOLICA DELLE BUCCE E DEI VINACCIOLI E SULLA RESA IN SUCCO	47

3.1	SCOPO DEL LAVORO	47
3.2	EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SUL PIGIATO	47
3.2.1	Materiali e metodi	47
3.2.2	Risultati e discussione	56
3.3	EFFETTO DEGLI ULTRASUONI SULLA RESA IN SUCCO	61
3.3.1	Materiali e metodi	61
3.3.2	Risultati e discussione	63
3.4	EFFETTO DEL TRATTAMENTO AD ULTRASUONI SUI VINACCIOLI	64
3.4.1	Materiali e metodi	64
3.4.2	Risultati e discussione	69
4	CONCLUSIONI	84
5	BIBLIOGRAFIA	85
	PARTE SECONDA	93
	INDAGINE SUGLI EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SULLE FECCE FINI E SULLA STABILITÀ PROTEICA DEI VINI BIANCHI	93
1	PREMESSA BIBLIOGRAFICA	93
1.1	STABILITÀ PROTEICA	93
1.1.1	Le proteine in enologia	93
1.1.2	L'origine delle proteine presenti nel vino	94
1.1.3	Le proteine presenti negli acini d'uva	95
1.1.4	Le proteine presenti nei mosti e nei vini	96
1.1.5	Le condizioni di maturazione dell'uva e le proteine del vino	99
1.2	LA CASSE PROTEICA	100
1.2.1	Le proteine responsabili della torbidità nei vini	100
1.2.2	Fattori di origine non proteica coinvolti nella casse proteica	101
1.2.3	Il meccanismo della casse proteica	102
1.2.4	Controllo enologico dell'instabilità proteica con bentonite	105
1.2.5	Tecniche alternative alla bentonite per la rimozione delle proteine	105
1.3	I COLLOIDI DEL LIEVITO	106
1.3.1	La parete cellulare del lievito	106
1.3.2	La liberazione di macromolecole dall'autolisi del lievito	108
1.3.3	Tecniche tradizionali e innovative per favorire la lisi del lievito	109
1.3.4	Fecce e mannoproteine	109

2	SCOPO DEL LAVORO	112
3	MATERIALI E METODI.....	113
3.1	TRATTAMENTI SULLE FECCE	113
3.2	TRATTAMENTO AD ULTRASUONI SU VINO BIANCO.....	116
3.3	ANALISI STATISTICA	116
3.4	CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE COLLOIDALE E MACROMOLECOLARE.....	117
3.4.1	Quantificazione dei colloidali solubili	117
3.4.2	Diametro medio delle particelle colloidali	117
3.4.3	Carica elettrica superficiale delle particelle colloidali	117
3.4.4	Quantificazione della frazione proteica	118
3.4.5	Caratterizzazione delle proteine e glicoproteine	120
3.4.6	Quantificazione dei polisaccaridi	123
3.4.7	Test di stabilità proteica	124
3.5	RISULTATI E DISCUSSIONE	126
3.5.1	studio degli effetti degli ultrasuoni sulle fecce finI.....	126
3.5.2	Effetti diretti degli ultrasuoni sul vino instabile.....	150
4	CONCLUSIONI	159
5	BIBLIOGRAFIA	161
	PARTE TERZA.....	171
	EFFETTO DEGLI ULTRASUONI SULLA COMPONENTE FENOLICA DEI VINI ROSSI.....	171
1	LA STABILITÀ DEL COLORE DEI VINI ROSSI.....	171
1.1	STABILITÀ DEGLI ANTOCIANI	171
1.2	STABILITÀ DEI TANNINI	173
1.3	I MECCANISMI DI STABILIZZAZIONE DEL COLORE	174
1.3.1	La copigmentazione	175
1.3.2	La polimerizzazione diretta.....	176
1.3.3	La polimerizzazione mediata – l'intervento dell'acetaldeide	176
2	SCOPO DEL LAVORO	178
3	VALUTAZIONE SULLA COMPONENTE POLIFENOLICA DEI VINI ROSSI	179
3.1	MATERIALI E METODI – INDAGINE SUI VINI ROSSI.....	179
3.1.1	Campioni e condizioni di trattamento	179

3.1.2	Determinazioni analitiche	179
3.1.3	Analisi sensoriale	180
3.1.4	Analisi statistica	181
3.2	RISULTATI E DISCUSSIONE	182
3.2.1	Vini rossi da tavola.....	182
3.2.2	Vino Raboso	190
3.2.3	Analisi sensoriale	195
3.3	CONCLUSIONI	200
3.4	MATERIALI E METODI – INDAGINE SU SIMILVINO E VINO AGGIUNTO DI TANNINO	201
3.4.1	Campioni e condizioni di trattamento	201
3.4.2	Determinazioni analitiche	202
3.4.3	Analisi sensoriale	203
3.4.4	Analisi statistica	204
3.5	RISULTATI E DISCUSSIONE	205
3.5.1	Soluzione similvino aggiunta di tannino idrolizzabile	205
3.5.2	Soluzione similvino aggiunta di tannino condensato	208
3.5.3	Vino aggiunto di tannino condensato.....	212
3.5.4	Vino aggiunto di tannino condensato ed acetaldeide	219
3.5.5	Vino Merlot	225
3.6	CONCLUSIONI	230
4	BIBLIOGRAFIA	231
	CONCLUSIONI GENERALI	233

RIASSUNTO

In un' enologia in cui si assiste ad un riassetto produttivo delle filiere agroalimentari, ad una rinnovata sensibilità dei consumatori verso i costi, e che si affaccia sul mercato mondiale, in cui sempre più competitors cercano di conquistare la loro fetta di mercato, l'innovazione gioca un ruolo fondamentale e crescente.

Una tecnologia innovativa, come quella rappresentata dagli ultrasuoni, trova applicazione nel campo delle tecnologie alimentari da circa una decina di anni, ed in tale settore il loro utilizzo è ormai consolidato. Sebbene ci siano i presupposti teorici, in enologia lo sviluppo pratico di questa tecnica è presente ancora in 'fase embrionale'.

Per le varietà a bacca rossa risulta di fondamentale importanza l'estrazione dei polifenoli dall'uva, ed in particolare di quelle sostanze che influenzano le proprietà organolettiche dei vini finiti. L'ottimizzazione delle condizioni di estrazione di antociani e tannini può portare ad un maggior grado di polimerizzazione e conseguentemente ad un colore più intenso e stabile.

Per alcuni vini bianchi, invece, è pratica tradizionale la sosta lunga *sur lies*, la quale comporta un miglioramento della qualità in termini di maggiore stabilità e di migliori caratteristiche organolettiche.

Il fenomeno della cavitazione, effetto degli ultrasuoni, provocando la rottura delle strutture della parete del lievito potrebbe facilitare la liberazione del contenuto cellulare.

Lo scopo di questo lavoro è stato di indagare gli effetti provocati dal trattamento con ultrasuoni sul pigiato di uve a bacca rossa, sui vinaccioli, sulla feccia, e sul vino giovane, al fine di verificare la possibilità di accelerare l'estrazione delle sostanze polifenoliche, promuoverne la polimerizzazione, e facilitare il rilascio di colloidali protettori dalle cellule di lievito dopo la fermentazione.

A seguito di alcune prove preliminari, è stato elaborato un disegno sperimentale che ha permesso di ottimizzare il numero di prove in funzione delle variabili di trattamento, tempo (t) ed amplitudine (%). Le prove che hanno dato i migliori risultati sono state quindi scelte per essere confrontate con altre pratiche comuni, quali la macerazione classica, nel caso del pigiato, la lisi naturale (*sur lies*), e l'enzimaggio della feccia, nel caso della feccia di lievito.

Poiché i trattamenti condotti al 90% di amplitudine sono risultati quelli più efficaci in termini di estrazione, le prove sulle diverse matrici sono state condotte a tale percentuale di amplitudine per tempi variabili di 3 e 5 minuti.

Dalle prove condotte su diverse varietà di uva raccolte alla maturità tecnologica si è riscontrato un aumento del 50% dell'indice di polifenoli totali e del 100% ed oltre, per alcuni campioni, degli antociani. Le prove di microvinificazione del pigiato trattato con ultrasuoni, e svinato rispettivamente dopo 2, 3 e 4 giorni, hanno indicato un evidente risparmio, in termini di tempo, fino anche a tre giorni di macerazione sia per il contenuto di polifenoli che per quello di antociani, rispetto ai cinque giorni di macerazione classici.

È possibile pertanto ipotizzare che il trattamento ad ultrasuoni presenti delle vantaggiose proprietà ausilio-estrattive che permettono di accelerare la liberazione e la diffusione dei composti fenolici contenuta a livello dei tessuti epidermici, risparmiando tempo in fase di macerazione.

I trattamenti ad ultrasuoni per valutare l'eventuale effetto litico provocato nei confronti delle strutture cellulari dei lieviti sono stati effettuati sulle fecce fini di vini bianchi secondo lo schema previsto dal piano sperimentale. Si è visto che il rilascio nel mezzo di frazioni di diversa natura (quali colloidali, proteine e polisaccaridi) aumentava principalmente all'aumentare del tempo di trattamento e secondariamente della percentuale di amplitudine. Questo rapido rilascio si traduce in una possibile accelerazione delle cinetiche di affinamento dei vini sulle fecce.

Poiché l'applicazione degli ultrasuoni, per 3 minuti al 90% di amplitudine, ha dato risultati soddisfacenti per i nostri obiettivi, è stata scelta per il confronto con altre tecniche come la sosta *sur lies* e l'enzimaggio; tale tecnica è risultata vantaggiosa subito dopo il trattamento e per tempi inferiori ad un mese.

Infine, essendo noto che le mannoproteine del lievito hanno un effetto positivo nei confronti della stabilità proteica, della feccia trattata con gli ultrasuoni è stata addizionata a due vini instabili, quindi sono stati eseguiti dei test per valutarne gli effetti sulla stabilità proteica. Allo stesso scopo, gli ultrasuoni sono stati applicati direttamente su tre vini bianchi instabili.

Non è stato riscontrato un effetto stabilizzante delle aggiunte di feccia trattata con ultrasuoni, ma sono stati osservati miglioramenti della stabilità proteica per uno dei vini rispetto al controllo. Non essendo stato rilevato un effetto comune sui diversi campioni analizzati, si ritiene opportuno effettuare delle prove preliminari su ogni tipo di matrice su cui si intende applicare la tecnologia degli ultrasuoni.

L'applicazione diretta degli ultrasuoni sul vino ha portato ad un incremento dell'instabilità con possibili effetti positivi sul trattamento di chiarifica. Inoltre, si è riscontrato un aumento del numero delle particelle con diametro minore ed una diminuzione di quelle di maggiore dimensioni, fenomeno che potrebbe essere dovuto ad una ristrutturazione delle interazioni tra colloidali.

Su vini rossi giovani, infine, sono state indagate le capacità stabilizzanti degli ultrasuoni nei confronti dei polimeri tannino-antociano, al fine di utilizzarli per promuovere l'affinamento rapido e ridurre i tempi tra produzione e commercializzazione.

I trattamenti ad ultrasuoni su vini con caratteristiche chimico-analitiche diverse hanno portato a risultati diversi. La componente colore non ha subito cambiamenti in seguito a trattamento, fattore importante che influisce sulla qualità finale del prodotto.

I risultati più interessanti sono stati registrati relativamente ai composti tannici; il contenuto di catechine è aumentato per tutti i campioni sottoposti a trattamento, così come quello dell'indice di acido cloridrico. È probabile, quindi, che il trattamento favorisca il rilascio di catechine monomere dai tannini e la polimerizzazione di tutti i tannini presenti.

Si è registrato anche un aumento dell'indice di etanolo, fattore che rafforza la tesi di un riarrangiamento probabilmente dovuto ad un incremento della reattività dei composti polisaccaridici presenti.

Considerati i validi risultati ottenuti in tutti i settori analizzati, la tecnologia ad ultrasuoni promette sicuramente applicazioni di notevole interesse. Vanno definite le caratteristiche tecniche impiantistiche in modo da ottimizzare i diversi processi ed i costi per il trattamento di masse importanti, compatibili con quelle comunemente trasformate nelle cantine di medie e grosse dimensioni, soprattutto ipotizzando un trattamento in continuo.

ABSTRACT

Since the whole agro-food production chain undergoes a reorganization, the consumers pay more attention to prices, and the wine production faces a global market full of competitors trying to gain their shares, the technical innovation in enology plays an increasingly important role.

The ultrasound (US) technology is an innovative technique that appeared in food production about ten years ago and nowadays it is a well established practice. However, in wine production, although some research has been carried out and there may be good premises, the practical application is still in an early stage.

The extraction of phenolic compounds is of fundamental importance in red grapes, particularly for those substances that affect the organoleptic properties of wine. Improvements on the extraction methods and conditions will lead to a better polymerization of tannins and anthocyanins, which gives a stronger and more stable colour.

On some white wines, the traditional technique of aging “*sur lies*” improves the quality in terms of stability and organoleptic properties.

The cavitation process induced by US leads to the breakage of the yeast cells walls, thus facilitates the leakage of the cell content after the fermentation.

The aim of this work is to study the effects produced by the US on crushed red grapes, seeds, lees, and young wines, in order to verify the possible speeding up of the extraction, the polymerization of the phenolic compounds, and the release of colloids from the yeast cells.

After some preliminary tests, an experimental design has been created to optimize the test conditions, like time and ultrasound amplitude.

The tests that gave the best results in the laboratory have been compared to the common enological practices, like traditional maceration of the crushed grapes, aging “*sur lies*”, and use of enzymes on lees.

The treatments that gave the best extraction results have been those at 90% amplitude, thus the tests have been performed on various samples at this amplitude, for 3-5 minutes.

The results of those tests carried out on different varieties of grape (all of them harvested at enological maturity) showed a 50% increase of the total phenolic compounds index, and an increase up to 100% and more of the anthocyanins in same samples.

The US has been applied on crushed grapes before microvinification; during these trials, peelings have been removed from the wine after 2, 3 and 4 days and the measured phenolic compounds and anthocyanins content have shown that the US can save up to 3 days of maceration, comparing to the traditional treatment that usually takes 5 days.

It might therefore be assumed that the US treatment the extraction of phenolic matter from skin tissues, hence save time during maceration.

In order to evaluate the lysing effect possibly played on the yeasts cell structure, some trials have been performed with US on fine lees from white wines, according to the experimental outline.

The results shown that the release of yeast cell compounds (as colloids, proteins, and polysaccharides) was increasing mostly together with the increasing duration of the treatment, and only marginally with the increasing amplitude percentage. This rapid release of cell compounds implies an acceleration of the maturation kinetic of wines on lees.

Since a 3 minute treatment with 90% amplitude gave satisfactory results to our goals, this kind of procedure has been compared with traditional techniques like the use of enzymes and the aging '*sur lies*'; the US technique proved to be an immediate advantage if compared to less than one month aging.

Moreover, since the mannoproteins of the yeast increase the protein stability in wine, some lees have been treated with ultrasounds, then added to two unstable wines, and consequently the protein stability of the wine has been measured again, in order to evaluate its variation due to the effect of the treatment.

The addition of US-treated lees on white wine had no stabilizing effect, but in one of the samples it caused an increase of the protein stability unambiguously.

As there was not any common effect of the treatment on the diverse samples analyzed, a preliminary test on each product is to be recommended before applying this technology.

The direct use of ultrasounds on wine led to an instability increase, and probably to positive effects on the sequent fining treatments.

Moreover, an increase in small size particles, and a drop in big size ones has been noticed; this occurrence may be triggered by a rearrangement of the interaction among colloids.

For the same reason ultrasounds have also been applied on 3 unstable white wines.

The stabilizing properties of ultrasounds on tannins and anthocyanins have been tested on young red wines, in order to investigate the chance to accelerate the aging process, and shorten the time between production and commercialization.

Good results have been reached in each test and the use of ultrasound it is proving to be a viable and promising technology for wine production.

However, properties and features of plant equipments for large scale application have still to be defined, in order to optimize the process and the costs in medium and large-sized wine companies, in comparison with the traditional way.

INTRODUZIONE

1 GLI ULTRASUONI

1.1 IL SUONO E LE VIBRAZIONI SONORE

Il suono è un'oscillazione compiuta dalle particelle (atomi e molecole) in un mezzo elastico. Le oscillazioni sono spostamenti delle particelle intorno alla posizione di riposo e lungo la direzione di propagazione dell'onda, provocati da movimenti vibratorii.

Tali vibrazioni provengono da un determinato oggetto, detto sorgente del suono, il quale trasmette il proprio movimento alle particelle adiacenti in virtù delle proprietà meccaniche del mezzo. Iniziando ad oscillare, le particelle trasmettono il movimento a quelle vicine, e queste a loro volta ad altre ancora, provocando una variazione locale della pressione; in questo modo, un semplice movimento vibratorio si propaga meccanicamente originando un'onda sonora (o onda acustica) (Cheeke, 2002).

Il suono si dice puro o complesso se la velocità di spostamento e la pressione sonora - nel caso di fluido - o la velocità di spostamento e la tensione - nel caso di solido - variano con legge temporale sinusoidale o semplicemente periodica.

Nei gas e nei liquidi le perturbazioni possono propagarsi sotto forma di onde longitudinali che determinano movimenti oscillatorii delle molecole nella direzione di propagazione del suono senza però produrre spostamenti complessivi di queste.

Nei materiali solidi, invece, l'esistenza di forze elastiche in grado di reagire a sollecitazioni tangenziali fa sì che il suono si propaghi, non solo per onde longitudinali, ma anche per onde trasversali; la velocità di propagazione dipende dal tipo di mezzo, indefinitamente esteso o limitato. Le onde trasversali, comunque, si diffondono sempre con velocità inferiore rispetto a quelle longitudinali.

L'onda sonora trasporta energia che si sposta nella direzione (x) di espansione con velocità di propagazione v . Le onde sonore trasportano sia energia, sia quantità di moto, quindi esercitano una pressione, chiamata di radiazione, sugli ostacoli che incontrano.

Nella loro espansione da una sorgente naturale o artificiale, le onde sonore seguono le leggi generali dei fenomeni ondulatorii.

Il suono, essendo caratterizzato da una serie di vibrazioni e propagandosi in maniera identica trascorso un tempo T , detto periodo, è considerato un fenomeno periodico le cui onde sinusoidali sono definite da alcuni parametri fisici quali: il *periodo*, l'*ampiezza*, la *frequenza*, la *lunghezza d'onda* e l'*intensità* (Fig.1).

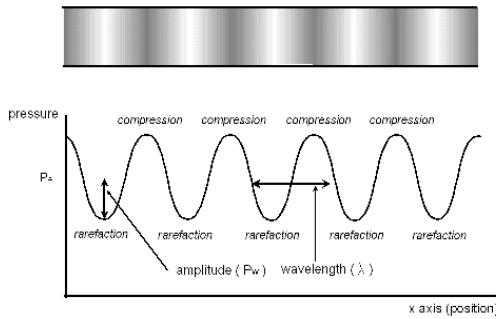


Figura 1: Andamento sinusoidale di un'onda sonora (Suslick, 1994).

Dove:

Periodo (T): intervallo di tempo tra due condizioni di moto identiche consecutive;

Amplitudine (P_w): massima distanza dalla posizione di equilibrio che può essere raggiunta da una particella oscillante nell'istante considerato;

Frequenza (f): numero di oscillazioni che avvengono nell'unità di tempo. È l'inverso del periodo ($f = 1/T$);

Lunghezza d'onda (λ): distanza che l'onda percorre in un intervallo di tempo pari al periodo di vibrazione delle particelle della sorgente, ossia la minor distanza, nella direzione di propagazione, tra due punti che si trovano contemporaneamente nella stessa fase di moto vibratorio. Generalmente è legata alla frequenza dalla relazione $\lambda = v/f$, dove v è la velocità acustica delle onde ultrasoniche.

1.1.1 Gli ultrasuoni: generalità e storia

Gli ultrasuoni (US) sono onde di natura meccanica che, per potersi propagare, necessitano di un mezzo elastico (Mason, 1996). Suoni ed ultrasuoni differiscono per la frequenza: le onde sonore si propagano alle frequenze udibili dall'orecchio umano (da 16 Hz a 16-20 kHz), gli ultrasuoni, invece, si estendono a partire da frequenze superiori ai 20 kHz (limite superiore di udibilità per l'orecchio umano) fino alle frequenze di 10 MHz, per lasciare poi il posto al cosiddetto regime ipersonico (Fig. 2).

Gli ultrasuoni, essendo onde meccaniche, si propagano in un mezzo con trasferimento di energia e non di particelle; queste ultime, infatti, oscillano semplicemente attorno alla loro posizione di equilibrio, con trasferimento di energia da una particella ad un'altra. L'oscillazione può propagarsi nel mezzo in varie direzioni, e si possono pertanto distinguere in onde longitudinali ed onde trasversali. Nelle onde longitudinali, il movimento oscillatorio delle particelle del mezzo di trasmissione è parallelo alla direzione di propagazione, mentre in quelle trasversali è perpendicolare. Le onde longitudinali (o di compressione) possono propagarsi in qualsiasi mezzo, mentre le onde trasversali solo nei mezzi solidi. L'onda ultrasonora è un'onda longitudinale caratterizzata dall'alternanza di cicli di compressione e rarefazione del mezzo in cui si propaga, che comportano variazioni di pressione all'interno dello stesso; l'energia viene trasferita dal moto delle particelle.

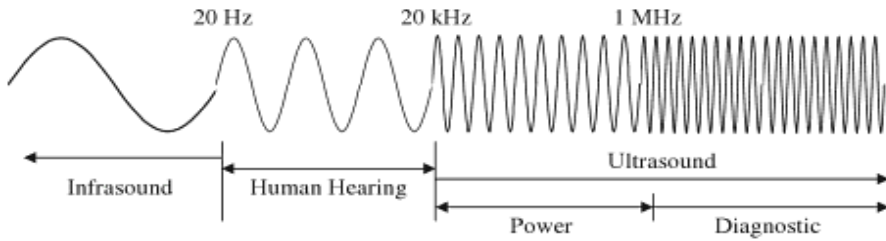


Figura 2: Frequenze delle onde sonore (Feng et al., 2011).

L'effetto fondamentale degli ultrasuoni su un fluido continuo è quello di imporre una pressione acustica (P_a) in aggiunta a quella idrostatica che già agisce sul mezzo. La pressione acustica è un'onda sinusoidale che dipende dal tempo (t), dalla frequenza (f) e dall'ampiezza massima dell'onda di pressione, $P_{a,max}$. (Patist e Bates, 2008):

$$P_a = P_{a,max} \sin(2\pi ft)$$

L'ampiezza massima dell'onda di pressione ($P_{a,max}$) è direttamente proporzionale alla potenza elettrica in ingresso del trasduttore. Alle basse intensità, l'onda di pressione induce movimenti e rimescolamenti all'interno del fluido, definiti come streaming acustico (Leighton, 1994). Ad intensità più elevate, la pressione locale della fase di espansione del ciclo precipita al di sotto della tensione di vapore del liquido, provocando la crescita di minuscole bolle (create dai nuclei gassosi presenti nel liquido). Un ulteriore aumento genera una pressione negativa transitoria nel fluido, comportando la crescita delle bolle e la formazione di nuove cavità per effetto della tensione sul liquido (Mason, 1998).

Durante il ciclo di compressione, le bolle si ritirano ed il loro contenuto viene riassorbito nel liquido. Poiché la superficie della bolla si è ingrandita, non tutto il vapore viene riassorbito, pertanto dopo un certo numero di cicli la bolla cresce (Fig. 3).

La bolla oscilla in base la frequenza applicata fino ad un certo valore critico poi, in un unico ciclo di compressione, implode (Patist e Bates, 2008).

Questo processo di compressione e rarefazione delle particelle del mezzo e il loro conseguente collasso è noto come fenomeno della cavitazione, l'effetto più importante degli ultrasuoni ad alta energia.

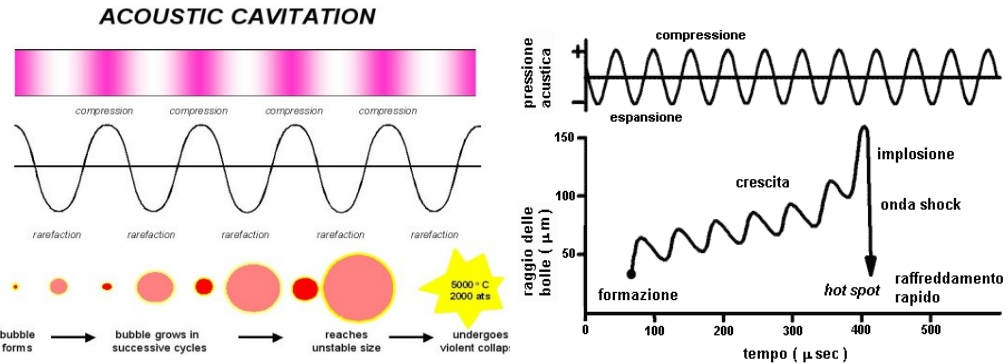


Figura 3: Crescita e collasso di una bolla transitoria e cavitazione: dinamica delle microbolle; un liquido irradiato con US produce delle cavità al suo interno; queste aumentano di dimensioni oscillando finché collassano generando elevate pressioni e temperature (Suslick, 1994).

Storicamente gli ultrasuoni si sono sviluppati come una branca dell'acustica. Parallelamente al progresso nella comprensione della propagazione delle onde acustiche si è assistito allo sviluppo delle tecnologie in grado di generare gli ultrasuoni. Il primo generatore di ultrasuoni può essere considerata la *Savant wheel* nel 1830 (operante a 24 kHz), seguita dal fischietto di Galton (1876) e dalla *Koenig's fork* (1899).

Forte impulso all'evoluzione degli ultrasuoni viene dato, nel 1880, dai fratelli Curie, con la scoperta della piezoelettricità, fenomeno che permette di trasformare un impulso meccanico in impulso elettrico e viceversa.

Il naufragio del Titanic e la minaccia dei sommergibili tedeschi portano all'esperimento di Langevin nel 1915, ritenuto la reale nascita degli ultrasuoni (Cheeke, 2002). Nell'esperimento viene dimostrata la possibilità dell'utilizzo delle onde sonore ad alta frequenza per l'individuazione di oggetti, e l'uso del quarzo come trasduttore.

Risale al 1917 la prima applicazione commerciale degli ultrasuoni (Singh *et al.*, 1998): il SONAR (SOund NAVigation and Ranging).

A cavallo delle due guerre il forte sviluppo delle macchine generatrici di ultrasuoni ad elevata potenza, fu dovuto soprattutto ad Alfred L. Loomis, che per primo, nel 1927, scoprì l'effetto chimico degli ultrasuoni (Suslick, 1994).

Solo dopo questo intenso periodo di ricerche, negli anni '40 sono comparse le prime applicazioni industriali, dagli anni '60 le industrie hanno mostrato via via sempre più interesse, dai primi anni '70 sono disponibili dei veri e propri impianti, e ai giorni nostri trovano impiego in numerosissimi settori.

L'applicazione chimica degli ultrasuoni, nota come sonochimica, è diventata un nuovo campo di ricerca a partire dagli anni '80, ma le prime ricerche risalgono alla fine dell'800, quando Thornycroft e Barnaby segnalano forti vibrazioni e rapida erosione nei propulsori dei cacciatorpedinieri. Essi imputano questi fenomeni alla formazione di grosse bolle (o cavità) create dalle eliche, ed alla loro implosione dovuta all'elevata pressione dell'acqua

e riescono a ridimensionare il problema aumentando la dimensione delle eliche e riducendone la velocità di rotazione.

Successivamente Lord Rayleigh, nel 1917, conferma che l'enorme turbolenza, il calore e la pressione prodotti dall'implosione delle bolle di cavitazione sulla superficie dei propulsori rappresentano la causa dei fenomeni segnalati.

1.1.2 Classificazione degli ultrasuoni e loro effetto

Gli ultrasuoni, come già descritto, sono onde sonore con un intervallo di frequenze che va da 20 kHz a 10 MHz. All'interno di questo intervallo è possibile fare un'ulteriore suddivisione (Feng *et al.*, 2011); possono infatti avere caratteristiche sostanzialmente differenti a seconda della frequenza a cui sono generati, e della quantità di energia generata del campo acustico [caratterizzata da potenza sonora (W), intensità del suono (W/m^2) o densità di energia sonora (W/m^3)], in:

- US power influenzano la reattività chimica e sono raggruppabili in due sottofamiglie: 1) US ad alta energia ($I = 10$ a $1000 W/cm^2$) caratterizzati da basse frequenze (20 kHz - 100 kHz), che trovano impiego in alcuni processi delle tecnologie alimentari; 2) US di potenza intermedia, caratterizzati da medie frequenze (100 kHz - 1 MHz);
- US diagnostic a bassa energia ($I < 1 W/cm^2$), impiegati nelle misurazioni fisiche, e prevalentemente ad utilizzo medico-diagnostico con alte frequenze (5 MHz -10 MHz).

Gli ultrasuoni hanno la particolarità di propagarsi in un liquido, provocando non solo una variazione della pressione, ma anche onde meccaniche. Le onde acustiche forniscono al mezzo, nel caso un liquido, energia meccanica. Questa energia viene trasmessa e provoca l'eccitazione vibrazionale delle molecole: il surplus di energia vibrazionale provoca un riscaldamento con formazione di bolle di gas microscopiche che inizialmente crescono di dimensioni, ma poi in seguito all'aumento della pressione del mezzo vengono compresse violentemente, con conseguente implosione (Ince *et al.*, 2001).

Le bolle hanno un diametro di qualche micrometro, mentre il tempo di vita delle bolle è dell'ordine dei microsecondi. Si possono distinguere due tipi di cavitazione: nel primo tipo - detto cavitazione stabile - la bolla rimane stabile intorno ad una dimensione di equilibrio per molti cicli di compressione-decompressione; nel secondo tipo, detto cavitazione transitoria, la bolla cresce in un solo ciclo, raddoppia la sua dimensione e in seguito collassa. La cavitazione transitoria è propria delle bolle che inizialmente possiedono dimensioni minori (Leighton, 1994).

Le condizioni che si stabiliscono dipendono dalla frequenza e dall'ampiezza della pressione acustica applicata, dal raggio delle bolle e dalle proprietà del liquido in cui esse sono intrappolate. Questo fenomeno si manifesta più facilmente nei liquidi che

contengono aria o gas, ma può manifestarsi anche in un liquido privo di gas, nel caso in cui la pressione acustica applicata sia maggiore della pressione idrostatica nel liquido.

Quando una bolla è esposta agli ultrasuoni, la pressione acustica agisce come una forza esterna che ne fa variare il raggio, aumentando le sue dimensioni; la bolla si comporta come un sistema oscillante, con un'elasticità data dal gas contenuto al suo interno ed un'inerzia che è quella del liquido che circonda la bolla e che oscilla con la parete della bolla stessa.

Il risultato è che essa, in condizioni di equilibrio, ha una frequenza propria il cui valore è inversamente proporzionale al suo raggio; quando la frequenza del campo acustico applicato si avvicina alla frequenza propria della bolla, questa tende ad avere un comportamento risonante e l'ampiezza delle sue oscillazioni dipende da quanto sono vicini i due valori di frequenza, e dal valore della pressione applicata. In prossimità della risonanza, le oscillazioni assumono un carattere di forte non-linearità, con effetti che si manifestano sia nel campo acustico, sia nel mezzo stesso, talvolta producendo sensibili modificazioni chimiche e fisiche.

I comportamenti delle bolle in oscillazione sotto l'azione del campo acustico possono essere diversi:

- *'diffusione rettificata'*: il raggio di equilibrio della bolla tende a crescere nel tempo; si presenta alle intensità acustiche più basse e la cavità si sviluppa in un processo lento.

- *cavitazione non inerziale o stabile*: durante le fasi di compressione e di espansione, il gas può diffondere attraverso la superficie della bolla verso il liquido esterno o verso l'interno della bolla stessa, e poiché l'area della superficie è maggiore durante l'espansione che nel corso della compressione, il risultato è che vi entra più gas di quello che ne esce. Tale fenomeno avviene solo con l'irradiazione di fasci ultrasonori continui e ad esempio occorrono circa 1000 cicli affinché una bolla arrivi in condizioni di risonanza ad 1 MHz. Questo tipo di cavitazione è importante nell'utilizzo terapeutico degli ultrasuoni.

- *cavitazione inerziale o transiente*: caratterizzata da una fase di espansione relativamente lenta della bolla all'interno del campo ultrasonoro, caratterizzato da onde di compressione e depressione. Durante la fase di pressione negativa (depressione) si ha l'ingrandimento della bolla fino ad un volume molto più grande di quello in condizione di equilibrio. Durante la fase di pressione positiva (compressione), l'enorme pressione esercitata sulla bolla, la comprime in modo rapido e violento, fino a farla collassare su se stessa con conseguente implosione e rilascio di energia. Con l'implosione delle bolle di gas, si verifica un'emissione di grande quantità di energia localizzata, che porta al raggiungimento di altissime pressioni e temperature ed alla formazione di punti caldi detti 'hot spot'; caratterizzati da temperature anche superiori a 5000 K, pressioni di circa 1000 atmosfere ed un tempo di vita inferiore al μs (Fig. 4).

Le variazioni quasi istantanee di densità, pressione e temperatura all'interno del fluido in cui si propaga l'onda ultrasonica possono produrre anche onde cosiddette di shock, ossia onde di pressione che possono anche essere estremamente intense (Leighton, 1994).

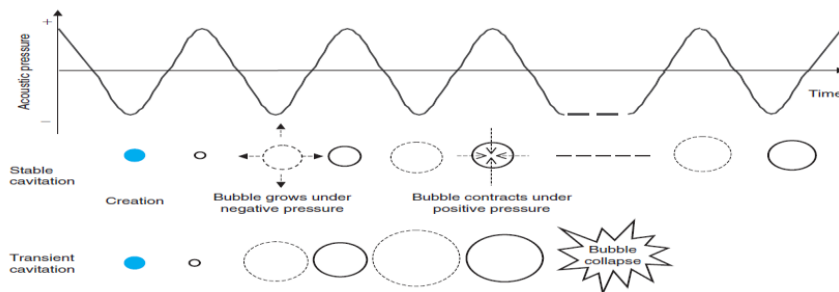


Figura 4: Relazione dei due principali tipi di cavitazione, inerte o stabile e transitoria, con la pressione acustica creata dalle onde. (Leighton, 1994).

Il fatto di avere una cavitazione stabile piuttosto che transitoria dipende da diversi parametri, quali temperatura, pressione, frequenza ed intensità degli ultrasuoni, tipo di solvente e gas presente nell'ambiente di reazione. L'implosione delle bolle di cavitazione crea delle condizioni fisico-chimiche molto particolari, con effetti di vario tipo.

Effetti fisici

Quando una soluzione viene attraversata da ultrasuoni di intensità sufficientemente alta, questi possono alterare e/o distruggere la struttura del solvente. In tali condizioni infatti le forze intramolecolari non riescono a mantenere coese le molecole provocando la formazione di bolle di gas nella soluzione - le *bolle di cavitazione* - che si formano in un punto dello spazio chiamato *soglia di cavitazione*. Queste bolle possono avere due destini: oscillare attorno ad una dimensione di equilibrio, o crescere rapidamente e successivamente collassare. Il collasso delle bolle crea condizioni drastiche di pressione e temperatura: localmente si arriva a 2000 bar e fino a 2000-5000 K (Suslick, 1994; Yasui, 2002). Rispetto alla cavitazione stabile, quella instabile comporta temperature più elevate dal momento che le bolle risultano più grandi.

Questi livelli di temperatura sono dovuti alla rapidissima compressione adiabatica della bolla. La zona in cui la temperatura è elevata è puntiforme, e vi è un forte scambio termico tra il liquido e l'ambiente circostante; in questo modo la temperatura del mezzo non aumenta molto.

Effetti chimici

Gli effetti chimici provocati dagli ultrasuoni possono essere di vario tipo. È possibile individuare nell'ambiente di reazione tre parti distinte: la zona interna alla bolla di cavitazione (ambiente gassoso), l'interfaccia liquido-bolla ed il liquido stesso (Mason, 1990).

Nel sistema gassoso avvengono reazioni di pirolisi, come ad esempio la pirolisi dell'acqua; conseguentemente all'interfaccia bolla-liquido e nella massa liquida si avrà la formazione di radicali (Fig. 5):

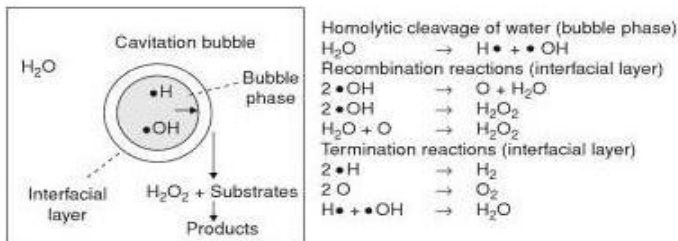


Figura 5: Schema di reazione semplificato che illustra i processi chimici che possono verificarsi all'interno delle bolle di cavitazione, nello strato interfacciale e nel liquido (Zhang, 2011).

I radicali che si formano possono essere di varia natura, ma in ambiente acquoso quello che si incontra più frequentemente è il radicale ossidrilico - $OH\bullet$ - estremamente reattivo ed in grado di attaccare facilmente qualsiasi substrato organico presente nell'ambiente di reazione. In alternativa esso può ricombinarsi con un altro radicale $OH\bullet$ a dare H_2O_2 , specie ossidante che, insieme agli $OH\bullet$ che non hanno reagito all'interfaccia, può migrare nella soluzione e reagire con le specie presenti. Nella zona di interfaccia, dove le temperature raggiungono i 2000K (Suslick, 1989), vi possono avvenire reazioni del soluto con i radicali $OH\bullet$ o reazioni di degradazione termica.

Date le condizioni che si vengono a formare all'interno del liquido sonicato, gli ultrasuoni possono provocare effetti radicalici e/o meccanici. I primi sono di maggior rilievo ed importanza e sono costituiti dalla sonolisi delle molecole e dalla distruzione della struttura del solvente e di quella del soluto.

Gli effetti meccanici, invece, possono influenzare i processi elettrochimici, modificare alcune proprietà dei solidi e causare particolari effetti in sistemi liquido-liquido e gas-liquido, soprattutto agevolando l'emulsione nei primi e la dispersione del soluto nel solvente negli ultimi.

I processi radicalici avvengono prima di tutto nelle bolle di cavitazione, le quali contengono vapori di solvente, gas disciolti ed eventuali soluti volatili. La pirolisi del solvente porta alla formazione dei radicali in fase gassosa. Quando la microbolla implode si formano radicali altamente reattivi, soprattutto radicali ossidrilici se si è in ambiente acquoso. Se, invece, si utilizzano solventi organici, o se nella bolla sono presenti composti organici volatili, il collasso della bolla originerà anche radicali organici.

I radicali che si formano nella bolla possono reagire in fase gassosa, o migrare nella massa liquida o all'interfaccia gas-liquido. I radicali all'interfaccia della bolla e nella massa liquida possono ricombinarsi tra di loro originando perossido di idrogeno ed acqua. La

formazione di radicali in acqua viene influenzata dalla presenza di gas disciolti, soprattutto dall'ossigeno.

In un ambiente attraversato da onde ultrasoniche molti sono i processi radicalici; la maggior parte avviene all'interno delle microbolle o all'interfaccia bolla-soluzione. Soltanto una piccola frazione delle specie radicaliche prodotte ha un tempo di vita sufficientemente lungo da riuscire a diffondere nel liquido, per lo meno nel caso della sonicazione a basse frequenze. L'unica specie, originata da processi radicalici ed in grado di diffondere facilmente lontano dalla bolla, è il perossido di idrogeno. La diffusione di questi radicali è dovuta principalmente all'azione della rottura delle bolle di cavitazione in bolle più piccole (Yasui, 2002).

I soluti non volatili possono reagire limitatamente alla zona dell'interfaccia o nel liquido (Nam *et al.*, 2003), mentre i soluti volatili possono anche entrare nella bolla e venire degradati durante il collasso della stessa (Okuno *et al.*, 2000).

1.1.3 Componenti del generatore di ultrasuoni

La tecnica comunemente adottata per generare vibrazioni meccaniche ad alta frequenza, è quella di trasformare delle oscillazioni elettriche in oscillazioni meccaniche per mezzo di un opportuno trasduttore, ossia di un dispositivo atto a convertire energia in forme diverse.

I componenti base di un sonicatore sono (Fig. 6):

- Generatore: trasforma l'energia elettrica in corrente alternata ad alta frequenza;
- Trasduttore (o convertitore): trasforma la corrente alternata in vibrazioni meccaniche (ultrasuoni).
- Sonda: amplifica la vibrazione sonora longitudinale prodotta dal convertitore - l'aumento dell'amplificazione provoca una più intensa azione di cavitazione ed una maggiore efficacia del processo. L'energia trasferibile dalla fonte dipende da due fattori (Povey, 1997): le caratteristiche del materiale che costituiscono sonda e trasduttore e la zona di emissione che deve essere preferibilmente di piccole dimensioni. Date le sue proprietà meccaniche e l'inerzia chimica, il materiale più utilizzato è solitamente il titanio, ma possono essere anche di alluminio o acciaio. La sonda può esser posta a diretto contatto con la matrice da trattare o essere inserita in una specifica camera di trattamento (Zhang *et al.*, 2011).
- Puntale (sonotrodo), soggetto ad usura, di durata variabile a seconda delle condizioni e dell'intensità dell'energia applicata. Come per la sonda, il materiale più comunemente impiegato è il titanio.

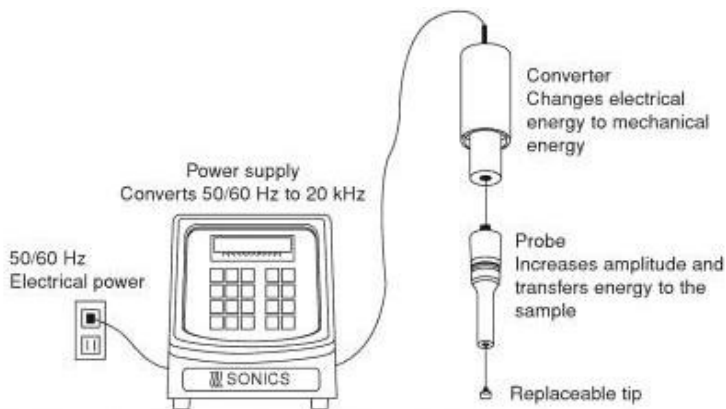


Figura 6: Schema di un tipico sistema con sonda ultrasonica (Zhang, 2011).

Il generatore fornisce impulsi di energia ad alto voltaggio e ad alta frequenza, trasformando la normale corrente alternata a 220 Volt e 60 Hz in energia elettrica a circa 1000 Volt e 20.000 Hz.

I sonicatori più evoluti regolano l'energia emessa in funzione della temperatura e della viscosità del liquido; rilevano i cambiamenti di impedenza ed aumentano o diminuiscono elettronicamente la potenza trasmessa alla sonda.

Il trasduttore è il componente più importante di qualsiasi dispositivo ad ultrasuoni, esso infatti converte l'energia elettrica ad alta frequenza proveniente dal generatore in vibrazione meccanica alla frequenza specifica. L'oscillazione viene poi trasmessa e concentrata grazie all'azione di una sonda che irradia energia nel liquido in cui è immersa sotto forma di onde di pressione.

I trasduttori elettromeccanici principalmente utilizzati si basano sul loro effetto magnetostrittivo e piezoelettrico (Povey e Mason, 1998):

Magnetostrittivi: sfruttano il principio della magnetostrizione; un'istantanea applicazione di un campo magnetico alternato comporta la contrazione e l'allungamento del materiale ferromagnetico con produzione di un'onda sonora che attraversa il liquido sonicato (Zhang *et al.*, 2011).

L'energia elettrica alternata, dal generatore ultrasonico, viene prima convertita in un campo magnetico alternato che viene poi usato per indurre vibrazioni meccaniche a frequenza ultrasonica in strisce risonanti di nichel o altro materiale magnetostrittivo attaccate alla superficie per essere vibrare. Questa tipologia di trasduttori presenta il principale vantaggio di fornire una robusta fonte di vibrazioni ultrasoniche per applicazioni ad alta energia, come il lavaggio ad ultrasuoni, e di essere molto resistenti e durevoli. A causa delle costrizioni meccaniche, e per le possibili complicazioni elettriche e

magnetiche, i trasduttori ad alto potere magnetostrittivo operano spesso a frequenze oltre i 20 KHz con l'inconveniente che il range superiore di frequenza è pari a 100 kHz oltre il quale il metallo non risponde abbastanza velocemente per l'effetto magnetostrittivo, mentre quelli piezoelettrici, operando su una gamma di frequenze più ampia (Megahertz), risultano generalmente la scelta migliore in sonochimica, specialmente per le condizioni di laboratorio. I trasduttori magnetostrittivi sono generalmente meno efficienti di quelli piezoelettrici per il fatto che il trasduttore magnetostrittivo richiede una doppia conversione di energia (da elettrica a magnetica da magnetica a meccanica) ed in ogni conversione viene persa un po' di efficienza.

Piezoelettrici: risalgono al 1880 con la scoperta dell'effetto piezoelettrico dei fratelli Curie, e rappresentano il tipo di trasduttore più comunemente impiegato; essi convertono l'energia elettrica alternata direttamente in energia meccanica attraverso l'effetto piezoelettrico per il quale certi materiali cambiano dimensione se agli stessi viene applicata una carica elettrica.

Se lungo l'asse di un cristallo piezoelettrico viene applicato un campo elettrico alternato, il cristallo si espande e si contrae lungo tale asse. Quando la frequenza del campo elettrico applicato si avvicina alla frequenza naturale di un generico modo di vibrazione longitudinale del cristallo, l'ampiezza della vibrazione meccanica risultante del cristallo diventa significativa. Poiché i materiali ceramici sono molto fragili, vengono disposti a "sandwich" tra i blocchi dei metalli. Questa struttura non solo protegge la ceramica dalla rottura, ma impedisce il surriscaldamento dei blocchi di metallo che possono agire come dissipatori di calore.

L'energia elettrica a frequenza ultrasonica è fornita al trasduttore dal generatore ultrasonico. Questa energia elettrica è applicata all'elemento piezoelettrico nel trasduttore che vibra. Queste vibrazioni vengono amplificate dalle masse risonanti del trasduttore e dirette al liquido. Inizialmente questi trasduttori erano costituiti da materiali piezoelettrici come cristalli di quarzo naturale e titanato di bario (BaTiO_3) o solfato di litio (Li_2SO_4), fragili ed instabili. I trasduttori odierni incorporano materiali piezoelettrici più robusti, più efficienti ed altamente stabili quali metaniobato di piombo (PbNb_2O_6) e zirconato titanato di piombo (PZT) che presentano anche effetto elettrostrittivo.

Tra i due tipi di trasduttori quello più utilizzato è il trasduttore piezoelettrico, che rispetto ai traduttori magnetostrittivi offre una conversione elettromeccanica maggiore (Rana, 2010); manifesta un'efficacia del 95% e può essere utilizzato su tutta la gamma degli ultrasuoni.

1.2 SONOCHIMICA

La sonochimica è quel ramo della chimica che impiega gli ultrasuoni al fine di provocare determinate reazioni chimiche. Essa differisce dalle tradizionali forme di energia in

quanto, a differenza di fonti quali calore, luce e radiazioni ionizzanti, quantità estremamente elevate di energia termica vengono immesse nel sistema in tempi molto ridotti. Le elevatissime temperature e pressioni raggiunte, insieme alla straordinaria capacità di scambio termico, generate dall'implosione delle bolle di cavitazione fanno degli ultrasuoni un'inusuale meccanismo di produzione di energia chimica.

Le discipline nelle quali la sonochimica trova maggiori applicazioni sono la chimica e la scienza dei materiali. Tra gli effetti riscontrabili nelle reazioni che avvengono in ambiente sonochimico ricordiamo:

- riduzione dei tempi di reazione
- incremento della resa
- riduzione dei periodi di induzione
- degradazione e modificazione di polimeri
-

La sonochimica viene anche utilizzata in campo medico, ad esempio per la diagnosi, la risonanza e l'ecografia - tecniche che non alterano o distruggono i tessuti viventi - e nel settore delle acque reflue (acque molto ricche di sostanze organiche possono infatti essere sottoposte a sonicazione per degradare i composti organici presenti in esse).

1.3 APPLICAZIONI DEGLI ULTRASUONI

Gli ultrasuoni possono essere sfruttati sia per il loro effetto meccanico sia per quello chimico. L'importanza dei due effetti varia in funzione della frequenza impiegata (Feng *et al.*, 2011; Suslick, 1994).

Alle basse frequenze (20-100 kHz) predomina l'effetto meccanico dovuto alla cavitazione di tipo instabile, più ci si avvicina ai 20 kHz e maggiore è la violenza con cui le bolle collassano (Laborde *et al.*, 1998). Alle frequenze medie (200-500 kHz) è prevalente l'effetto chimico, in quanto vi è maggiore formazione di bolle che però collassano meno violentemente.

Alle alte frequenze (> 1 MHz) sia l'effetto chimico che quello fisico, legati alla cavitazione, sono minimi, mentre è preponderante l'effetto del flusso acustico. Le alte frequenze vengono utilizzate, ad esempio, per le pulizie di oggetti delicati, che potrebbero danneggiarsi in presenza di cavitazione.

Di seguito (Tab. 1) si riportano alcuni esempi dell'applicazione degli ultrasuoni utilizzati per migliorare e facilitare diverse tipologie di processo:

Effetti meccanici	Effetti chimici e biochimici
Cristallizzazione di grassi, zuccheri, ecc.	Azione battericida
Degasaggio e distruzione di schiume	Trattamento acque reflue
Estrazione di aromi	Modifica della crescita delle cellule viventi
Filtrazione ed essiccamento	Alterazione attività enzimatica
Congelamento	Sterilizzazione delle attrezzature
Miscelazione ed omogeneizzazione	
Precipitazione di polveri aerodisperse	
Intenerimento della carne	

Tabella 1: Effetti meccanici, chimici e biochimici degli US.

1.3.1 Applicazione degli ultrasuoni nel settore delle tecnologie alimentari

Le tecnologie di trasformazione dei prodotti alimentari sono un settore in continuo sviluppo. I cambiamenti dei gusti dei consumatori e la necessità di offrire prodotti sempre più sicuri e di qualità comportano una ricerca innovativa in continua evoluzione. L'introduzione di nuove tecnologie, infatti, può favorire una riduzione dei tempi di processo ed un miglioramento nella gestione delle condizioni di processo. Questi aspetti sono strettamente legati all'ottenimento di prodotti di alta qualità in modo da preservare il più possibile le caratteristiche naturali del prodotto. Un altro aspetto molto importante, che deve essere tenuto in considerazione, è la riduzione del fabbisogno energetico dei processi, così da limitare sia i costi ambientali che quelli economici.

Le proprietà degli ultrasuoni hanno suscitato negli anni sempre più interesse nell'industria alimentare, in quanto la promozione di reazioni fisiche e chimiche può portare ad un vantaggio strategico nelle varie fasi della lavorazione.

Gli ultrasuoni, al giorno d'oggi, vengono considerati una tecnologia emergente e promettente nell'industria di trasformazione alimentare dal momento che possono produrre modificazioni meccaniche, chimiche e biochimiche permanenti nei liquidi (dovute all'intensa cavitazione) e nei gas (per generazione di campi acustici ad alta intensità).

Dagli anni '90, l'utilizzo degli ultrasuoni è diventato una alternativa tecnologica, applicabile su larga scala, nell'industria di trasformazione (Bates e Patist, 2010); gli ultrasuoni vengono applicati nelle tecnologie alimentari per i loro effetti meccanici e/o chimici nei processi di omogeneizzazione, miscelazione, estrazione, filtrazione, cristallizzazione, disidratazione, fermentazione, degasaggio, come azione antischiama, riduzione delle dimensioni delle particelle, modifiche temporanee o permanenti della viscosità, modulazione della crescita delle cellule viventi, distruzione cellulare e dispersione di aggregati, inattivazione di microrganismi ed enzimi e sterilizzazione delle attrezzature (Mason, 1996).

Gli effetti di questa tecnologia, proprio per questi motivi, sono ritenuti interessanti

nell'industria alimentare, tuttavia non vi sono studi approfonditi riguardanti la loro applicazione nel campo delle bevande fermentate. Un loro possibile utilizzo nella filiera enologica potrebbe rappresentare un'importante innovazione tecnologica promuovendo reazioni termodinamicamente possibili, ma cinematicamente lente rispetto a quelle che sono le esigenze produttive.

L'interazione dell'energia acustica con un alimento viene attuata principalmente attraverso un mezzo liquido dal momento che la cavitazione e le azioni fisiche e chimiche indotte dalla stessa svolgono un ruolo importante nelle modificazioni della qualità di un alimento durante la sua trasformazione. È proprio l'implosione, infatti, che crea un substrato inusuale per le reazioni chimiche, rompendo meccanicamente l'involucro cellulare e migliorando il trasferimento del materiale intracellulare (Feng *et al.*, 2011).

All'interfaccia solida e liquida, anche il getto d'acqua formatosi per cavitazione transiente potrebbe essere un fattore che va a contribuire su alcuni cambiamenti nelle proprietà globali di un prodotto alimentare. Tutti gli effetti chimici e fisici degli ultrasuoni sono microscopici; tuttavia, l'interazione di queste reazioni chimiche e fisiche - indotte dalla cavitazione, con l'alimento si manifesta attraverso modificazioni macroscopiche che possono essere percepite dal consumatore in termini di consistenza, colore e sapore (Feng *et al.*, 2011).

Gli ultrasuoni ad alta intensità sono diventati uno strumento efficace per le applicazioni commerciali su larga scala da una decina di anni, solo recentemente infatti è stata ottimizzata la progettazione delle attrezzature e sono stati migliorati i rendimenti dei sistemi a flusso continuo. Come per tutte le altre tecnologie di trasformazione più innovative, gli ultrasuoni ad alta potenza non rispecchiano una tecnologia standard e pertanto devono essere studiati e sviluppati per ogni singola tipologia di applicazione (Patist e Bates, 2008).

In base alla frequenza utilizzata e all'ampiezza dell'onda sonora applicata, ne consegue un certo numero di effetti fisici, chimici e biochimici utilizzabili per una varietà di applicazioni (Knorr *et al.*, 2004).

Gli ultrasuoni ad alta frequenza/bassa energia (Diagnostic US) vengono utilizzati principalmente come tecnica analitica per il controllo della qualità e delle fasi di processo e per l'ispezione non distruttiva, applicata nella determinazione di concentrazione, viscosità, composizione, ecc degli alimenti (Floros e Liang, 1994; McClements, 1995; Mason *et al.*, 1996; Mason, 1998).

L'applicazione degli ultrasuoni ad alta energia/intensità (US power) porta, nel processo di trasformazione degli alimenti, ad un miglioramento della qualità con caratteristiche simili al prodotto fresco (colore, consistenza, sapore e nutrienti). Non vi è alcun lavoro scientifico che documenti una possibile correlazione tra gli effetti della cavitazione con le condizioni di processo che possono essere utilizzate per prevedere possibili modificazioni della qualità. Si possono trarre conclusioni limitatamente agli specifici alimenti che sono stati oggetto di studio in base ai parametri applicati. (Feng e Lee, 2011).

Nel settore alimentare la tecnologia degli ultrasuoni trova applicazioni in diversi processi:

- ✓ **ESTRAZIONE:** molti lavori riportano l'applicazione degli ultrasuoni per ridurre il tempo di estrazione di composti naturali che con le tecniche convenzionali impiegherebbero normalmente ore o giorni. Diverse classi di composti come aromi, polifenoli, sostanze organiche e minerali vengono estratte, con trattamento ad US, in modo efficiente da una varietà di matrici. Gli effetti meccanici facilitano una maggiore penetrazione del solvente nelle cellule migliorandone il trasferimento oltre all'effetto cavitazione che provoca la rottura delle pareti cellulari ed il rilascio del loro contenuto nel mezzo (Mason, 1996; Toma *et al.*, 2001; Patist e Bates, 2008; Dolatowski Z.J *et al.*, 2007). Pertanto, con questa tecnologia si ottengono rese maggiori in tempi minori con temperature di processo sono più basse (Vinatoru, 2001).

- ✓ **EMULSIONE:** l'implosione di una bolla di cavitazione lungo la superficie di contatto fra due liquidi immiscibili è in grado di dare un'emulsione altamente stabile anche a bassa energia (Canselier *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2006). Questo effetto viene sfruttato soprattutto nel settore petrolchimico, chimico, cosmetico e farmaceutico, in quello alimentare specificatamente nella tecnologia in linea dei succhi di frutta, delle maionesi e del ketchup (Wu *et al.*, 2000).

- ✓ **CRISTALLIZZAZIONE:** gli ultrasuoni ad alta intensità possono influenzare il processo di cristallizzazione attraverso l'avvio della nucleazione, il controllo dello sviluppo e la formazione di piccoli cristalli (Luque de Castro e Priego-Capote, 2007; Virone *et al.*, 2006). Il congelamento assistito con ultrasuoni permette di ridurre i tempi di formazione dei cristalli e garantisce una loro maggiore omogeneità riducendo il danno cellulare e preservando l'integrità del prodotto (Zheng e Sun, 2006).

- ✓ **FILTRAZIONE:** l'energia vibrazionale generata dagli ultrasuoni permette di mantenere le particelle in sospensione ed in movimento, lasciando libere le superfici dei filtri e facilitando il passaggio del solvente nei pori. Essa crea anche una superficie priva di attrito consentendo al liquido o alle particelle più piccole di passare più facilmente, migliorando il flusso e riducendo i tempi di processo (Telsonic, 2007).
Un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che in tal modo si allunga la vita del filtro; la continua cavitazione che si ha a livello della superficie del filtro stesso evita intasamenti e/o incrostazioni (Patist e Bates, 2008).

- ✓ **SEPARAZIONE:** alla base di questa tecnologia vi è un nuovo principio relativo alla separazione delle particelle; gli ultrasuoni ad alta energia impiegati su un'emulsione a bassa frequenza (< 30 kHz) possono essere impiegati per separare la stessa nei suoi componenti acqua ed olio (Pangu e Feke, 2004; Gardner e Apfel, 1993). Questo principio va però ampiamente sviluppato prima della commercializzazione dal momento che gli ultrasuoni ad alta potenza possono provocare facilmente l'effetto opposto provocando un'emulsione più stabile o una dispersione.
- ✓ **VISCOSITÀ:** gli ultrasuoni possono sia aumentare che diminuire la viscosità e, in base alla loro intensità, l'effetto può essere permanente o temporaneo (Patist e Bates, 2008).
- ✓ **ANTISCHIUMA:** il trattamento ad ultrasuoni viene utilizzato per ottenere bevande gasate senza schiuma, nei sistemi di fermentazione o in altri processi dove la schiuma peggiora la qualità dei prodotti (Gallego-Juárez, 1998; Morey *et al.*, 1999).
- ✓ **FERMENTAZIONE:** ad alta intensità, gli ultrasuoni possono rompere le cellule e/o denaturare gli enzimi, a bassa intensità migliorano il trasferimento di massa di reagenti e prodotti attraverso l'interfaccia o attraverso la parete cellulare (Sinisterra, 1992; Pitt e Rodd, 2003). Matsuura *et al.* (1994) hanno rilevato un aumento della fermentazione in sake, vino e birra conseguente all'applicazione degli ultrasuoni a bassa intensità applicati in fase di fermentazione; questo sembra derivare dal fatto che gli ultrasuoni allontanano la CO₂ (prodotta durante la fermentazione) che normalmente inibisce la fermentazione.
- ✓ **INATTIVAZIONE ENZIMATICA E MICROBICA:** gli effetti promettenti degli ultrasuoni nella conservazione degli alimenti hanno suscitato recentemente notevole interesse; Knorr (2004) riscontra una riduzione significativa di *E. coli* nell'uovo intero liquido dopo trattamento. Generalmente, la maggior parte dei microrganismi ha mostrato una maggiore sensibilità agli ultrasuoni a temperature superiori a 50 °C (Sala *et al.*, 1995; Villamiel e de Jong, 2000). Gli ultrasuoni abbinati ad un trattamento termico diventano, pertanto, efficaci a basse temperature con conseguente miglioramento della qualità del prodotto (Knorr *et al.*, 2004).

La 'pastorizzazione' ad ultrasuoni a 50 ° C ha la potenzialità di preservare la qualità di molti prodotti alimentari in termini di proprietà fisico-chimiche, colore e sapore se confrontata con le tecniche convenzionali di pastorizzazione che prevedono temperature molto più elevate.

La percentuale di inattivazione delle cellule di *Saccharomyces cerevisiae* attraverso ultrasuoni varia in funzione dell'amplitudine dell'onda ultrasonica e del numero iniziale di cellule ed è più alta per amplitudini più alte e per un basso numero di cellule iniziali (Tsukamoto *et al.*, 2004). Inoltre l'applicazione degli ultrasuoni abbinata ad altre tecniche di disinfezione (calore, pressioni, antibiotici, raggi UV) ha un effetto sinergico se paragonato a quello dei singoli trattamenti. Gli effetti del trattamento migliorano con l'aumento dell'intensità e diminuiscono all'aumentare della frequenza (Jiranek *et al.*, 2008).

A parte le numerose operazioni in cui trovano applicazione gli ultrasuoni, di interesse notevole per l'industria alimentare risulta anche il guadagno, in termini di riduzione dei costi e del miglioramento della qualità, come ad esempio (Mason, 2010):

- Riduzione delle perdite di prodotto (taglio)
- Riduzione dei danni strutturali (congelamento)
- Risparmio di tempo (marinatura, filtrazione, ossidazione)
- Riduzione dei costi di riscaldamento e raffreddamento (cottura, congelamento)
- Miglioramento della shelf-life (emulsione)
- Miglioramento della struttura del prodotto (miscelazione, essiccazione)
- Sicurezza microbiologica (antischiama, degasaggio, sterilizzazione)

1.3.1.1 Applicazioni nel settore enologico

La tecnologia ad ultrasuoni ad alta potenza, che trova diverse applicazioni nel settore alimentare e delle bevande, non è ancora stata introdotta nel settore enologico anche se sono parecchi gli studi relativi agli effetti su alcune fasi di processo della filiera.

Nei lavori di Yap *et al.* (2007) e Jiranek *et al.* (2008) vengono riassunte le potenziali applicazioni nel settore enologico - intensificazione della fermentazione, miglioramento dei processi post-fermentativi, estrazione del colore e degli aromi, effetto antischiama e degasaggio - ed in particolare vengono approfonditi gli aspetti relativi alla microbiologia del vino - riduzione microrganismi contaminanti prima dell'inoculo, accelerazione dell'autolisi, pulizia e sanificazione di botti e serbatoi, eliminazione di *Brettanomyces Dekkera* dalle barrique.

Nello studio di Guerrero *et al.* (2001) sugli effetti degli ultrasuoni sulla sopravvivenza di *Saccharomyces cerevisiae* dopo l'applicazione di un trattamento ad ultrasuoni con variazione di pH, temperatura ed amplitudine, risulta che la resistenza del lievito diminuisce all'aumentare dell'amplitudine. Sono stati registrati valori di riduzione decimale significativi a temperature moderate per effetto combinato con gli ultrasuoni, mentre diminuzioni del pH hanno influenzato scarsamente la sensibilità cellulare del lievito se non per alcuni livelli di amplitudine.

Le osservazioni strutturali al microscopio hanno, inoltre, confermato l'esplosione delle pareti cellulari con fuoriuscita del contenuto cellulare, nonché danni a livello subcellulare, conseguenti all'applicazione degli ultrasuoni (Fig. 7).

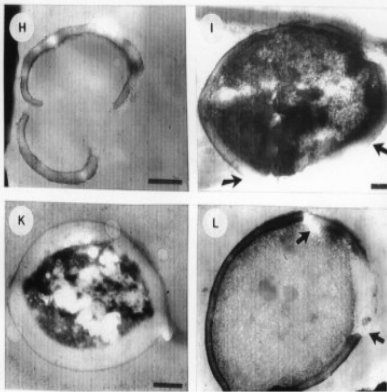


Figura 7: (H) resti della parete cellulare e membrana plasmatica; (I): disorganizzazione del contenuto interno, rottura della parete e della membrana plasmatica con rilascio parziale del contenuto cellulare; (K): contenuto interno completamente disorganizzato, rigonfiamento e rottura delle pareti cellulari, presenza di alcuni frammenti subcellulari fuori dalla cellula; (L): rottura della parete e membrana cellulare e perdite delle sostanze interne (Guerrero et al., 2001).

Diversi studi sono stati condotti per valutare i possibili effetti degli ultrasuoni sull'estrazione del colore e degli aromi (Bates e Patist, 2010; El Darra *et al.*, 2013, Ferraretto *et al.*, 2013); il colore rosso ed i composti aromatici, infatti, sono localizzati nelle cellule della buccia ed il loro rilascio viene facilitato dall'azione meccanica, dalla morte dei tessuti e delle cellule, dalla temperatura e dalla presenza di alcool. La cavitazione provocata dagli ultrasuoni sarebbe in grado, provocando la rottura delle pareti e membrane cellulari, di favorire la fuoriuscita di tali sostanze. Studi preliminari sono stati condotti da una società australiana, Cavitus, sulle bucce di Pinot Nero, di un'uva da tavola americana e di Cabernet Sauvignon: gli ultrasuoni provocano un significativo aumento del contenuto di antociani e dell'intensità del colore. Già dopo pressatura i campioni trattati presentavano il 27% in più rispetto al testimone (Bates e Patist, 2010).

Gli ultrasuoni, come dimostrato dagli studi successivi, possono pertanto essere una tecnica utile al miglioramento dell'estrazione del colore e degli aromi dal pigiato e portare benefici relativamente all'efficienza dei costi di processo e della qualità del vino, e rappresentare una valida alternativa per l'ottenimento dell'intensità colorante voluta così come quella ottenuta con la fermentazione in gradiente di temperatura, con la macerazione post-fermentativa o con l'aggiunta di enzimi al mosto non fermentato. Costi e tempi vengono però di gran lunga ottimizzati.

Cavitus, inoltre, ha brevettato un sistema di pulizia e disinfezione delle botti dell'industria enologica. L'applicazione di trattamenti ad ultrasuoni ad alta energia con l'obiettivo di eliminare i residui solidi, e l'eventuale contaminazione da *Brettanomyces* e *Dekkera*, delle botti di rovere si è dimostrata efficace nella disinfezione e sanitizzazione delle botti (Fig. 8).

Il sistema Cavitus è un sistema completamente automatizzato, progettato per rendere le operazioni di pulizia più moderne. Le botti di vino utilizzate vengono riempite con acqua

ad una temperatura ottimale predeterminata, segue quindi l'applicazione di energia sonora per alcuni minuti attraverso un sonotrodo inserito in un foro. È stato dimostrato che l'utilizzo di acqua a 60 °C ad alta pressione rimuove dal 50% al 90% dei residui solidi presenti sulla superficie interna della botte, mentre un trattamento con ultrasuoni raggiunge una percentuale superiore al 99%. La combinazione di ultrasuoni per cinque minuti e temperatura a 60 °C ha prodotto una riduzione 1000 volte maggiore (Yap *et al.*, 2008).

In questo modo, vengono rimossi i tartrati ed eliminati i *Brettanomyces* presenti sulla superficie e nei pori della barrique (Clark, 2008).

I principali vantaggi di questa applicazione sono pertanto rappresentati dalla:

- diminuzione dei costi;
- allungamento della 'vita' delle barrique;
- diminuzione dell'impiego di composti chimici;
- eliminazione degli antociani assorbiti dal legno che potrebbero essere utilizzati dai *Brettanomyces*/*Dekkera* come fonte di carbonio.

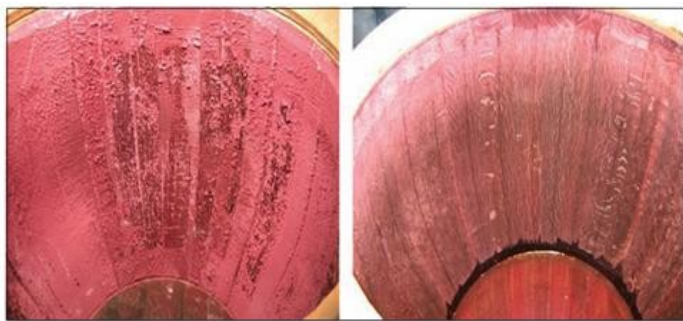


Figura 8: Barrique di vino utilizzata prima (sinistra) e dopo la pulizia col dispositivo ad US Cavitus per la pulizia delle botti (Yap A., Cavitus Pty. Ltd.).

Tra le applicazioni degli ultrasuoni come metodo non distruttivo del controllo qualità si riporta uno studio di Winder *et al.* (1970) per la determinazione dell'alcool ed estratto dei vini ed una tecnica più recente proposta da Lamberti *et al.* (2009) per il monitoraggio della fermentazione alcolica.

Matsuura *et al.* (1994) hanno monitorato l'accelerazione della crescita cellulare e la formazione di esteri dovuta ad irradiazione ultrasonica, indagando sulla possibilità di applicare onde ultrasoniche alla frequenza di 43 kHz per controllare la fermentazione di vino, birra e sake da una soluzione di riso contenente zuccheri, con l'obiettivo di ridurre i livelli di anidride carbonica disciolta e gestire al meglio la fermentazione.

Pochi, invece, sono gli studi sull'invecchiamento dei vini accelerato dall'applicazione di metodi fisici, a differenza di quelli chimici: Suslick nel 1989 ipotizza che, durante un trattamento ad ultrasuoni, le alte temperature e pressioni effetto dalla cavitazione, possono provocare la rottura dei polimeri chimici in numerose particelle e la loro ricombinazione.

Secondo Chang *et al.* (2002), l'applicazione di onde ultrasonore con frequenze di 20 kHz favorisce l'invecchiamento di vino di riso (sake) in tempi molto più rapidi di quelli convenzionali, migliorandone l'aroma e/o il gusto, con una qualità finale del prodotto

molto simile a quello tradizionale: 16 trattamenti ad ultrasuoni hanno dato gli stessi risultati del vino invecchiato per un anno. Il trattamento ad ultrasuoni ha, quindi, le potenzialità per essere una valida alternativa al metodo di invecchiamento di vini prodotti da diverse materie prime, ma non per tutte (per il vino di mais infatti i risultati non hanno rispettato le aspettative).

Nel 2005, lo stesso autore, pubblica i risultati di un'ulteriore prova condotta sempre su vino di riso (sake): un vino invecchiato tradizionalmente per un un anno viene comparato a quello sottoposto a trattamento con ultrasuoni a due diverse frequenze - 20 kHz e 1,6 MHz. Le caratteristiche analitiche e qualitative del prodotto finale trattato risultano analoghe a quelle del vino invecchiato tradizionalmente e le potenze più alte danno effetti ancora migliori.

Masuzawa (2000) approfondisce gli effetti degli ultrasuoni sui composti fenolici del vino rosso, essendo già noti quelli sull'accelerazione dell'invecchiamento del vino (Shimakawa, 1970). Il trattamento è stato effettuato per 10 giorni continuativamente a 30 kHz, a 4 pressioni d'onda diverse (1,8 kPa, 5,8 kPa, 10 kPa e 20 kPa) e confrontato con il campione non irradiato. I composti fenolici, valutati secondo gli indici di Glories, hanno subito modificazioni in seguito all'irradiazione: l'indice di etanolo e di gelatina sono risultati più elevati per le pressioni più basse, mentre per ad alte pressioni (10 e 20 kPa) diminuiscono a comprovare l'impedimento di invecchiamento e la polimerizzazione. Dai risultati ottenuti, l'autore presuppone un effetto di polimerizzazione dei composti polifenolici nel vino rosso promossa dagli ultrasuoni alle basse pressioni sonore, anche se quelle superiori a 10 kPa la ostacolano.

Koiwai *et al.* (2007) stabiliscono che il trattamento a 25,1 kHz favorisce l'estrazione delle catechine da te verde alle basse temperature, sostanze che solitamente vengono estratte attraverso solvente organico ed acqua calda (le temperature elevate comportano infatti un decadimento qualitativo del te verde e perdita di catechine). Vi è un aumento dell'estrazione all'aumentare della pressione sonora.

Studi non ancora pubblicati hanno valutato i possibili effetti degli ultrasuoni relativamente alla stabilità tartarica. Gli ultrasuoni, essendo utilizzati in alcuni settori come promotori della cristallizzazione di sali, possono trovare applicazione nel settore enologico come agente coadiuvante la precipitazione del bitartrato di potassio nei vini. La tecnologia in oggetto va a promuovere le cinetiche di nucleazione, ossia l'aggregazione dei sali di potassio, in particelle ben definite disperse nel liquido.

2 BIBLIOGRAFIA

Bates D., Patist A. (2010). Industrial applications of high power ultrasonics in the food, beverage and wine industry in *Case studies in novel food processing technologies: innovations in processing, packaging, and predictive modelling*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 197, pp. 119-138. Cavitus Pty Ltd, 32 Spring Gully Rd, Crafers, SA 5052, Australia.

Canselier J.P., Delmas H., Wilhelm A.M., Abismail B. (2002). Ultrasound emulsification –An overview. *Journal of Dispersion Science and Technology* 23, 333-349.

Chang A.C., Chen Fa C. (2002). The application of 20 kHz ultrasonic waves to accelerate the aging of different wines. *Food Chemistry* 79, 501-506.

Cheeke J. David N. (2002). *Fundamental and Applications of Ultrasonics*. Second Edition. CRC Press.

Clark J.P. (2008) An update on ultrasonics, *Food Technology* 26, 75-77

Dolatowski Z.J., Stadnik J., Stasiak D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum - Technologia Alimentaria* 6, 3, 89-99.

El Darra N., Grimi N., Maroun R.G., Louka N., Vorobiev E. (2013). Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *European Food Research and Technology* 236, 1, 47-56.

Feng H., Lee H. (2011). Chapter 22: Effect of Power Ultrasound on Food Quality in *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, H. Feng et al. (Eds.), Food Engineering Series, Springer Science + Business Media, pp. 552-582.

Feng H., Lee H. (2011). Effect of Power Ultrasound on Food Quality. In *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Ed. Springer 559-582.

Ferraretto P., Cacciola V., Batllò Ferran I., Celotti E. (2013). Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis . *Italian Journal of Food Science* 25, 2, 160-168.

Floros J.D., Liang H.H.(1994). Acoustically assisted diffusion through membranes. *Food Technology* 48, 79–84.

Freitas S., Hielscher G., Merkle H., Gander B. (2006). Continuous contact and contamination free ultrasonic emulsification – A useful tool for pharmaceutical development and production. *Ultrasonic Sonochemistry* 13, 76-85

Gallego-Juárez J.A. (1998). Some applications of air-borne power ultrasound to food processing. In M. J.W. Povey & T. J. Mason (Eds.), *Ultrasound in Food Processing* 127-143. London: Blackie Academic & Professional.

Gardner E.A., Apfel R.E. (1993). Using acoustics to study and simulate the coalescence of oil drops surrounded by water. *Journal of Colloids and Interface Science* 159, 226-237.

Guerrero S., López-Malo A., Alzamora S.M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 31-39.

Ince N.H., Tenczali G., Belen R.K., Apikyan I.G. (2001). Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental* 29, 167.

Jiranek V., Grbin P., Yap A., Barnes M., Bates D. (2008) High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology, *Biotechnology Letters* 30, 1, 1-6.

Knorr D., Zenker M., Heinz V., Lee D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing, *Trends in Food Science & Technology* 15, 261-266.

Koiwai H., Masuzawa N. (2007). Extraction of Catechins from Green Tea Using Ultrasound. *Japanese Journal of Applied Physics* 46, 7B, 4936-4938.

Laborde J.-L., Bouyer C., Caltagirone J.-P., Gerard A. (1998). Acoustic bubble cavitation at low frequencies. *Ultrasonics* 36, 589–594.

Lamberti N., Ardia L., Albanese D. and Di Matteo M. (2009). An ultrasound technique for monitoring the alcoholic wine fermentation, *Ultrasonics* 49, 94-97.

Leighton T.G. (1994). *The acoustic bubble*. San Diego. Academic Press 312-426.

Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2007). Ultrasound assisted crystallization (sonocrystallization). *Ultrasonics Sonochemistry* 14, 717-724.

Mason T.J. (1990). *Chemistry with Ultrasound*. Amsterdam: Elsevier Applied Science.

Mason T.J., Paniwnyk L., Lorimer J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3, 253-260.

Mason T.J. (1998). Power ultrasound in food processing – The way forward. In M.J.W. Povey & T.J. Mason (Eds.), *Ultrasound in Food Processing* (103-126). London: Blackie Academic & Professional.

Mason T.J., Paniwnyk L., Chemat F., Abert Vian M. (2010). Ultrasonic Food Processing In *Alternatives to Conventional Food Processing*, Andrew Proctor (ed.), RSC Green Chemistry Series.

Masuzawa N, Ohdaira E, Ide M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics* 39, 5B, 2978-2979.

Matsuura K., Hirotsune M., Nunokawa Y., Satoh M., Honda K. (1994). Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77, 1, 36-40.

McClements D.J. (1995). Advances in the application of ultra-sound in food analysis and processing. *Trends in Food Science* 6, 293–299.

Nam S.N., Han S.K., Kang J.-W., Choi H. (2003). Kinetics and mechanism of the sonolytic destruction of non-volatile organic compounds: investigation of the sonochemical reaction zone using several OH \cdot monitoring techniques. *Ultrasonics Sonochemistry* 10, 139-147.

Okuno H., Yim B., Mizukoshi Y., Nagata Y., Maeda Y. (2000). Sonolytic degradation of hazardous organic compounds in aqueous solution. *Ultrasonics Sonochemistry* 7, 261-264.

Pangu G.D., Feke D.L. (2004). Acoustically aided separation of oil droplets from aqueous emulsions. *Chemical Engineering Science* 59, 3183–3193.

Patist A., Bates D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147–154.

Pitt W.G., Rodd A. (2003). Ultrasound increases the rate of bacterial growth. *Biotechnology Progress* 19, 1030-1044.

Povey M.J.W. (1997). *Ultrasonic Techniques for Fluids Characterization*. San Diego: Academic Press.

Povey M.J.W., Mason T.J. (1998). *Ultrasound in food processing*. London: Blackie Academic and Professional.

Rana N. (2010). *Ultrasonication: emerging and promising technology for food processing industry*. Junior researcher at SRM University, India, presentation at Food Innovation 2010.

Rolle P. (2007). Traitements aux Ultrasons sur vendanges: Impact sur le rendement en jus, l'extraction des composés phénoliques et l'activité laccase. *Rapport Diplôme National d'Oenologie*. Università della Borgogna e di Udine.

Sala F.J., Burgos J., Condon S., Lopez P., Raso J. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In G.W. Gould (Ed.), *New Methods of Food Preparation*, 176-204. London: Blackie Academic and Professional.

Shimakawa S. (1970). *Applications of High-Power Ultrasound*. Nikkan-Kogyou Shinbun-sha, Tokyo.

Singh V., Kaur K.P., Khurana A., Kad G.L. (1998). Ultrasound: A Boon in the Synthesis Of Organic Compounds. *Resonance* 3, 9, 56-60.

Sinisterra JV. (1992). Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, 30, 3, 180-185.

Suslick K.S. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, February 80-86.

Suslick K.S. (1994). The Chemistry of Ultrasound, in *Encyclopaedia Britannica Yearbook of Science and the Future*. Britannica: Chicago 138-155.

Telsonic Group (2007). *Ultrasonic screening technology*, Bronschhofen, Switzerland.

Toma M., Vinatoru M., Paniwnyk L., Mason T.J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 2, 137-142.

Tsukamoto I., Yim B., Stavarache C.E., Furuta M., Hashiba K., Maeda Y. (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonic Sonochemistry* 11, 61-65.

- Villamiel M., de Jong P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. *Agriculture and Food Chemistry* 48, 472-478.
- Vinatoru M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 303-313.
- Virone C., Kramer H.J. M., van Rosmalen G.M., Stoop A.H., Bakker T.W. (2006). Primary nucleation induced by ultrasonic cavitation. *Journal of Crystal Growth* 1, 9-15.
- Winder W.C., Aulik D.J., Rice A.C. (1970). An ultrasonic method for direct and simultaneous determination of alcohol and extract content of wines, *American Journal of Enology and Viticulture* 21, 1, 1-11.
- Wu H., Hulbert G.J., Mount J.R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 211-218.
- Yap A., Jiranek V., Grbin P., Barnes M., Bates D. (2007). The application of high power electronics to enhance winemaking processes and wine quality. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 22, 2, 44-48.
- Yap A., Schmid F., Jiranek V. , Grbin P. and Bates D. (2008). Inactivation of Brettanomyces/ Dekkera in wine barrels by high power ultrasounds, *Wine Industry Journal of Australia* 23, 5.
- Yasui K. (2002). Influence of ultrasonic frequency on multibubble sonoluminescence. *The Journal of the Acoustical Society of America* 112, 1405-1413.
- Zhang H.Q., Barbosa-Cánovas G.V., Balasubramaniam V. M. (2011). *Non-thermal processing technologies for food*. J. Wiley and sons Ltd.
- Zheng L., Sun D.W. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes - A review. *Trends in Food Science & Technology* 17, 16-23.

PARTE PRIMA

INDAGINE SULLA CAPACITÀ ESTRAENTE DEGLI ULTRASUONI SUI COMPOSTI FENOLICI E SULLA RESA IN SUCCO

INTRODUZIONE

1. PREMESSA

Nel vino ottenuto da cultivar a bacca rossa, mediante diversi approcci di estrazione della sostanza colorante, i parametri di valutazione sono sempre più legati ai livelli quantitativi e qualitativi della matrice polifenolica.

Importando questa tecnologia innovativa nella filiera delle vinificazioni in rosso di masse importanti si potrebbe ipotizzare l'impiego con finalità estraenti.

Il fattore limitante l'incremento della qualità fenolica nelle vinificazioni di massa, infatti, è il tempo di estrazione che normalmente, per motivi legati alla gestione logistica dei volumi disponibili e dei carichi in entrata, viene ridotto al fine di rendere sostenibile il lavoro, con conseguenti perdite qualitative.

In tale contesto, una promozione delle cinetiche di estrazione e di stabilizzazione delle sostanze polifenoliche si rivelerebbe strategica soprattutto se accompagnata da un non decadimento qualitativo della produzione.

Evitando soluzioni biotecnologiche economicamente impegnative e non garanti del risultato, nel caso di enzimi macerativi, e di tecnologie troppo spinte quali la termomacerazione, un'applicazione interessante nella vinificazione di uve rosse potrebbe essere rappresentata dagli ultrasuoni. Questi quando si propagano all'interno di una massa solido/liquido, quale il mosto-uva in uscita dalla diraspapigiatrice, provocano una successione di onde di compressione e di espansione che possono favorire le cinetiche di estrazione e di reazione nei processi di polimerizzazione dei polifenoli.

Originando cavitazione, si renderebbero quindi responsabili della formazione di una serie di lesioni a livello di buccia che rappresentano dei canali preferenziali di lisciviazione dall'esterno della matrice polifenolica. Ciò permette una sensibile contrazione dei tempi di estrazione della materia colorante semplificando la gestione delle vinificazioni in rosso nelle realtà quantitative.

Nota pertanto la dinamica delle onde di pressione e la possibilità di formare cavitazione in seguito al trattamento di ultrasuoni di un mezzo liquido, si è voluto indagare la possibilità di sfruttare tali fenomeni come coadiuvanti nei processi di estrazione dalle bucce in quanto utili mezzi per la decompartmentazione cellulare.

Una possibile applicazione degli ultrasuoni alla filiera enologica potrebbe rappresentare un'importante innovazione tecnologica promuovendo quelle reazioni termodinamicamente possibili, ma cineticamente lente rispetto a quelle che sono le esigenze produttive.

Questo lavoro nasce, pertanto, con l'obiettivo di approfondire i possibili effetti che un trattamento ad ultrasuoni può indurre sulla materia prima e durante i processi di vinificazione, in particolar modo valutando, su piccola scala, l'effetto sulla cinetica di estrazione dei composti fenolici durante la macerazione delle uve rosse, sulla lisi del lievito, sulla stabilità proteica, e sulla possibile polimerizzazione dei composti fenolici in conservazione.

2. STRUTTURA E COMPONENTI CELLULARI DELLA BUCCIA D'UVA

Le uve rosse, materia prima per la vinificazione dei vini rossi, sono ricche di polifenoli, significativo gruppo di composti organici responsabili del colore, del gusto e delle proprietà di invecchiamento dei vini. La distribuzione dei fenoli estraibili dall'uva è di circa il 10% nella polpa, il 60-70% nei vinaccioli e il 28-35% nelle bucce (Shi *et al.*, 2003).

La buccia dell'uva rappresenta circa il 5-10% del peso secco totale della bacca ed è un insieme stratificato di tessuti longitudinali distinguibili in:

- cuticola, lo strato più esterno, composta da acidi grassi idrossilati e rivestita da cere idrofobiche;
- epidermide intermedia, costituita da uno o due strati regolari di cellule;
- ipoderma, che è lo strato più vicino alla polpa, composto da più strati di cellule che contengono la maggior parte dei composti fenolici della buccia dell'uva (Lecas e Brillouet, 1994).

La buccia costituisce fundamentalmente una barriera idrofobica proteggendo l'acino dalle lesioni fisiche e climatiche, dalla disidratazione, dalle infezioni fungine e dai raggi UV (Doco *et al.*, 2003). Inoltre, è caratterizzata da una serie di prodotti secondari fondamentali ai fini enologici, particolarmente rilevanti in maturazione, ossia composti fenolici e sostanze aromatiche.

Nella buccia, i polifenoli possono essere classificati come fenoli della parete cellulare, legati con interazioni idrofobiche e legami idrogeno ai polisaccaridi, e fenoli confinati nei vacuoli delle cellule vegetali o associati al nucleo cellulare.

I polifenoli contenuti nell'uva e nel vino possono essere generalmente classificati in tre gruppi: acidi fenolici (benzoici e idrossicinnamici), flavonoidi semplici (catechine, flavonoli ed antociani), e tannini e proantocianidine.

Le cellule epidermiche a maturità, inoltre, sono caratterizzate da importanti quantità di sostanze aromatiche e di precursori d'aroma (Fig. 9).

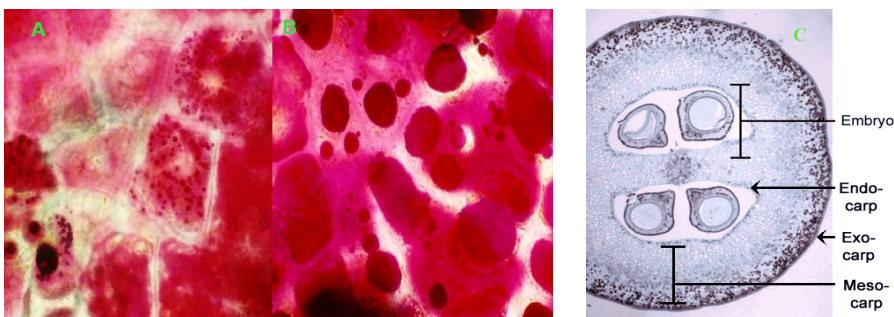


Figura 9: A) cellule epidermiche della bacca d'uva in maturazione. B) cellule epidermiche della bacca d'uva in surmaturazione. C) sezione trasversale di bacca con agglomerati vacuolari di antociani nelle cellule epidermiche (sito Davis University, berry embryo).

L'estrazione dei polifenoli dalle uve nel mosto e nel vino dipende in larga misura da come tali composti sono legati nella buccia degli acini. La degradazione dei polisaccaridi della parete cellulare è un passaggio fondamentale per migliorare il rilascio dei polifenoli dalle bucce, se questo avviene in fase di vinificazione. Cellulasi, emicellulasi, pectinasi ed altri enzimi capaci di catalizzare l'idrolisi dei legami dei polisaccaridi della parete cellulare possono essere impiegati per decomporre la struttura della parete cellulare.

Durante la vinificazione, solo una parte dei composti fenolici presenti nella buccia passa nel vino (circa il 40% degli antociani ed il 20% dei tannini); la buccia dell'uva costituisce infatti una barriera fisica per l'estrazione degli antociani, dei tannini e degli aromi presenti nelle cellule. La bassa resa di estrazione può essere dovuta all'elevata resistenza delle pareti cellulari della buccia e delle membrane citoplasmatiche al trasferimento dei costituenti (Pinelo *et al.*, 2006).

Nel processo di vinificazione in rosso, il trasferimento dei composti fenolici dalle uve rosse al mosto avviene principalmente durante la fase di macerazione, che per i vini rossi avviene direttamente sugli acini schiacciati (Salas *et al.*, 2003). Tuttavia, l'estrazione effettiva dalle bucce (e in parte dai vinaccioli) al mosto, durante la graduale fermentazione a vino, è determinata dalla tecnica di vinificazione.

Il contenuto di polifenoli della buccia varia da 285 a 550 mg di fenoli/kg di buccia d'uva, a seconda della varietà (Pinelo *et al.*, 2005).

Durante la maturazione dell'uva, i fattori ambientali e gli enzimi endogeni promuovono cambiamenti che interessano la composizione e la struttura degli zuccheri e dei fenoli contenuti negli acini d'uva. Alcuni lavori hanno dimostrato che i vini ottenuti da uve più mature, in generale, hanno un maggior contenuto di antociani, un rapporto antociani/flavan-3-oli inferiore, ed una maggior quantità di alcuni fenoli semplici quali acido gallico e siringico (Perez-Magariño e González-SanJosé, 2006). Anche se la composizione fenolica può variare fortemente in funzione della varietà e delle condizioni

di coltivazione, la buccia contiene la più alta quantità di tannini della bacca e questi tannini differiscono dalle altre frazioni dell'uva per l'elevato grado di polimerizzazione e la minore quantità di gallati presenti (Souquet *et al.*, 1996).

Catechina, epicatechina ed epicatechina gallato sono le principali unità costitutive dei tannini della buccia, anche se la gallo catechina e l'epigallocatechina sono presenti in quantità minori.

Gli antociani della buccia, responsabili del colore dell'uva e del vino, includono delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina 3-glucoside, 3-(6-acetil)-glucoside e 3-(6-p-cumaril)-glucoside, peonidina e malvidina 3-(6-caffeil)-glucoside e alcuni piruvati (Monagas *et al.*, 2006; Revilla *et al.*, 1999).

Quercetina e kampferolo glucosidi e glucuronidi, acido gallico e i suoi glucosidi, resveratrolo, acido caftarico e cutarico completano la composizione fenolica delle bucce (Lu e Foo, 1999).

2.1 TECNOLOGIA DELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO

L'estrazione del colore, nella tecnologia di produzione dei vini rossi, richiede un contatto più o meno prolungato del mosto-vino con le parti solide (macerazione), durante il quale possono agire i fattori chimico-fisici e tecnologici determinanti l'estrazione stessa.

Questa fase è la caratteristica discriminante della vinificazione in rosso.

Le uve raccolte manualmente o meccanicamente vengono avviate alla trasformazione. Le operazioni basilari che portano alla trasformazione della materia prima in prodotto finito sono: diraspatura, pigiatura, macerazione, svinatura-pressatura, fermentazione ed affinamento. La condotta razionale delle singole fasi di processo assicura le migliori caratteristiche al prodotto finito:

- 1) la diraspatura deve garantire il totale allontanamento dei raspi; la loro presenza in fase di macerazione porta ad estrazione di composti indesiderati, aumentando le caratteristiche astringenti e conferendo una sgradevole nota erbacea;
- 2) la pigiatura non deve provocare una eccessiva lacerazione delle bucce e dei raspi o la rottura dei vinaccioli, incrementando l'estrazione di tannini poco polimerizzati e di altri componenti negativi per il "bouquet" del vino;
- 3) la pressatura va condotta in maniera non troppo energica; anche questa fase concorre a determinare, oltre alla resa finale in mosto-vino, il contenuto in sostanze polifenoliche; una pressatura troppo energica determina inoltre un elevato tenore di fecce, con conseguenti difficoltà nelle successive operazioni di chiarifica e filtrazione.

Nonostante l'importanza di tali operazioni, la fase più critica risulta essere la macerazione. Dopo la fase di svinatura, il prodotto viene inviato a completare la fermentazione, se questa non si è esaurita in fase di macerazione, e successivamente viene sottoposto a stabilizzazione ed illimpidimento.

Oltre alla macerazione classica che si realizza contemporaneamente alla fermentazione, si può differenziare anche 1) una macerazione pre-fermentativa a caldo che si realizza in

termo vinificazione, accompagnata o da una fermentazione del mosto separato dalla vinaccia o da una macerazione classica; 2) una macerazione pre-fermentativa a freddo con l'obiettivo di aumentare la ricchezza aromatica e 3) una macerazione post-fermentativa per vini rossi di pregio.

2.1.1 Fattori che determinano l'estrazione dei polifenoli in macerazione

A determinare l'efficacia di estrazione di un processo macerativo, concorrono diversi fattori chimico-fisici e tecnologici, nonché gli aspetti fisiologici connessi con la maturità dell'uva; infatti, oltre a consentire un adeguato corredo antocianico e fenolico, una buona maturazione, porta ad una degradazione delle strutture cellulari che garantiscono la compartimentazione, favorendo così la diffusione di antociani e tannini nel mezzo estraente.

La conduzione della macerazione richiede la ricerca di un compromesso: deve essere un'estrazione frazionata in grado di apportare esclusivamente quei costituenti dell'uva che contribuiscono favorevolmente all'aroma ed al sapore del vino e che devono possibilmente essere estratti nella loro totalità.

Le sostanze negative per la qualità sono tanto più abbondanti nei tessuti dell'uva quanto più la qualità di questi è scarsa.

L'estrazione dei costituenti nel corso della macerazione, deve essere modulata in funzione della natura e della qualità dell'uva, ed dalla tipologia di vino che si vuole ottenere.

Per regolare il livello di estrazione nel corso della macerazione, l'enologo dispone di un certo numero di tecniche che agiscono sulla distruzione dei tessuti e favoriscono la dissoluzione dei composti fenolici, anche se ognuna di queste ha un effetto preferenziale sull'una o sull'altra delle famiglie di sostanze estratte. Infine l'estraibilità dei costituenti dai diversi organi varia in base a diversi fattori quali varietà, stato di maturazione, ecc. (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998)

2.1.2 Diffusibilità delle frazioni fenoliche

La macerazione è un'estrazione solido-liquido e, limitando l'osservazione ad antociani e tannini come sostanze polifenoliche determinanti per i vini rossi, si nota che questi composti hanno affinità diversa per i diversi solventi in particolare l'acqua e l'etanolo, con cui le bucce si trovano naturalmente in contatto durante la macerazione.

L'alcol agisce sulle permeasi delle membrane comportando la degradazione delle membrane vacuolari e cellulari, con formazione di orifizi che consentono la diffusione di molecole all'esterno (Amrani Joutei e Glories, 1994).

2.1.3 Dinamica di estrazione degli antociani

Nonostante l'effetto positivo dell'etanolo, gli antociani vengono estratti facilmente anche in soluzione acquosa e perciò già dalle prime fasi della macerazione, quando cioè il tenore in alcol del mezzo è nullo, non essendo ancora iniziata la fermentazione (Amrani Joutei, 1993).

Il quantitativo in antociani alla fine della macerazione è funzione, da un lato, dell'intensità dei processi estrattivi connessi al livello di degradazione delle strutture cellulari, e dall'altro a fenomeni di fissazione per adsorbimento sulle stesse vinacce e sulle cellule dei lieviti (Di Stefano *et al.*, 1994).

Gli antociani pertanto, aumentano in macerazione raggiungendo un massimo in corrispondenza del quinto-sesto giorno, per poi diminuire (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1970). Oltre ai fenomeni di fissazione, a determinare tale diminuzione contribuiscono anche la polimerizzazione con i flavani presenti nel mezzo, e l'attività ossidativa dello stesso.

2.1.4 Diffusibilità dei tannini

Contrariamente a quanto detto per gli antociani, i tannini vengono estratti più facilmente in soluzione idroalcolica; pertanto il massimo di estrazione per queste molecole si riscontra nelle fasi avanzate della macerazione.

La liberazione dei tannini dai loro siti di accumulo subcellulari è infatti legata alle dimensioni medie delle molecole e alla loro stessa localizzazione (Amrani Joutei e Glories, 1994); mentre gli antociani, date le loro ridotte dimensioni molecolari, diffondono facilmente nel mezzo anche in soluzione acquosa, per i tannini si rende necessaria una più profonda degradazione delle strutture cellulari, resa possibile appunto dall'etanolo. La sua azione però porta alla liberazione dei soli tannini liberi nel succo vacuolare e di quelli legati al tonoplasto; una frazione significativa di tali composti (e peraltro la più stabile e meno reattiva con le proteine) resta quindi legata alla parete cellulare.

Relativamente all'estrazione dei tannini della buccia e dei vinaccioli si deve ricordare che questi ultimi vengano liberati con maggior difficoltà rispetto ai primi, probabilmente per la sclerificazione e cutinizzazione della superficie dei vinaccioli stessi.

Secondo Amrani Joutei (1993), i vinaccioli, in tre giorni di estrazione, cedono il 40-50% di composti fenolici, contro il 60-80% liberato dalle bucce in diciotto ore.

L'estrazione di tannini astringenti dai vinaccioli risente peraltro notevolmente dell'azione dell'alcol e ciò potrebbe portare ad effetti indesiderati in caso di macerazioni prolungate.

2.1.5 Condizione della macerazione

L'estrazione delle sostanze fenoliche è, come noto, funzione della durata della macerazione: a seconda del momento in cui si interrompe il contatto con le vinacce si ottiene un vino diverso.

Oltre che sui tenori in polifenoli totali del vino, una macerazione più o meno lunga influisce sui rapporti tra le diverse frazioni fenoliche. Ad esempio una macerazione breve porterà a vini inadatti all'invecchiamento; la scarsa presenza di tannini non consentirà la stabilizzazione degli antociani mediante la formazione di pigmenti polimerici e il prodotto sarà soggetto ad imbrunimenti e perdita di colore nel tempo. Una durata eccessiva può invece portare all'estrazione di componenti astringenti dai vinaccioli e a perdita di sostanze coloranti per adsorbimento.

Anche la pratica del rimontaggio influisce notevolmente sul tenore in polifenoli del vino finito, sia per quanto riguarda il numero, sia per quanto riguarda la durata dei rimontaggi stessi; e possono modificare notevolmente le caratteristiche del prodotto ottenibile. Bisogna ricordare che i rimontaggi, come tutte le operazioni meccaniche, se eseguiti in maniera non corretta possono portare a una dilacerazione delle bucce, che incrementa le fecce presenti nella massa liquida.

2.1.6 Influenza dell'anidride solforosa

Per la produzione dei vini rossi l'anidride solforosa viene utilizzata allo scopo di gestire la fermentazione alcolica, la fermentazione malolattica e i processi di estrazione e stabilizzazione del colore. Nel corso della macerazione vengono sfruttate congiuntamente diverse attività dell'anidride solforosa che contribuiscono a migliorare l'estrazione e la stabilità del colore: lisciviazione, inibizione dell'attività enzimatica (polifenolossidasi), formazione di composti solforosa-antociani più solubili, lisi delle cellule della buccia.

A livello di membrana, l'additivo agisce solo sulle strutture proteiche e non sui lipidi; in tal modo si spiega come solo le molecole di piccole dimensioni possano diffondere, mentre i tannini più polimerizzati (presenti nel succo vacuolare o legati al tonoplasto) non sono in grado di passare attraverso i piccoli orifizi così formati.

Gli antociani legati all'anidride solforosa sono incolori; quelli combinati con altre sostanze fenoliche sono poco o per nulla sensibili all'effetto dell'anidride solforosa (Fregoni *et al.*, 2004). L'azione della solforosa è legata a quella dell'alcol, agendo essa sinergicamente con tale fattore.

L'impiego dell'additivo in dosi elevate in fase prefermentativa, determina l'incremento della produzione, da parte dei lieviti, di acetaldeide, portando alla formazione di SO₂ combinata. Quest'ultima non ha la stessa efficacia antisettica che presenta la SO₂ libera e per questo motivo si cerca di ridurre l'impiego di tale additivo in fase di macerazione. Il legame stabile con l'acetaldeide riduce infine l'effetto di questa sulla polimerizzazione dei polifenoli e quindi la formazione di pigmenti polimerizzati (Glories, 1974).

2.1.7 Influenza della temperatura

L'effetto della temperatura sulla dissoluzione dei polifenoli è noto da tempo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1970). È stato accertato che solo con temperature abbastanza elevate si può ottenere una dissoluzione significativa delle sostanze coloranti.

Nella vinificazione in rosso, la macerazione andrebbe condotta ad una temperatura dell'ordine dei 25 °C, in particolare per prodotti che richiedono tempi brevi di contatto solido-liquido; temperature più elevate, possono portare a fenomeni indesiderati, quali la perdita di frazioni aromatiche o la comparsa di odori anomali (Arfelli, 1989).

La temperatura influisce anche sull'attività fermentativa, in quanto, se si superano i 30 °C, si rileva una minore resa in alcol; inoltre i lieviti possono ridurre la loro attività e, quando si superano i 35 °C, si può arrivare all'arresto di fermentazione.

Infine, una temperatura elevata in macerazione porta ad un aumento del pH del mosto-vino influenzando l'equilibrio degli antociani in soluzione.

2.1.8 Utilizzo di enzimi pectolitici

Vista l'importanza della degradazione delle pareti cellulari nell'influenzare i fenomeni diffusivi che intervengono durante la macerazione, a partire dagli anni settanta ha trovato applicazione l'utilizzo di preparati enzimatici commerciali ad attività pectolitica, al fine di favorire tale degradazione e di ottenere così un'estrazione più completa ed ottimale.

Gli enzimi nella fase di macerazione vengono impiegati con lo scopo principale di favorire l'estrazione del colore e dei composti fenolici della vinaccia.

Un problema derivato dall'uso di enzimi è rappresentato dall'estrazione dei tannini anche da vinaccioli con conseguenze negative sulle caratteristiche astringenti del vino, soprattutto per contatto prolungato con i solidi; la presenza di etanolo accentua questo fenomeno, provocando la dissoluzione dello strato lipidico superficiale dei semi che limiterebbe la diffusione dei tannini.

2.2 TECNICHE DI ESTRAZIONE DEI COMPOSTI POLIFENOLICI

Le tecniche di estrazione tradizionali richiedono solitamente tempi lunghi di macerazione, proprio per il fatto che la maggior parte dei composti si trovano nelle bucce. L'estrazione richiede che i composti escano sia dalla membrana del vacuolo sia dalla cellula stessa. Per il rilascio di tali composti è importante che queste membrane vengano rotte piuttosto che semplicemente collassate, dal momento che in una membrana collassata i composti possono restare intrappolati.

Durante una tradizionale fermentazione sulle bucce, la permeabilità delle cellule e membrane viene aumentata dal contenuto di alcol, dall'anidride carbonica e solforosa,

oltre che dal calore sviluppato dalla fermentazione. Il rilascio di tali pigmenti può essere facilitato anche da altri trattamenti che provocano la distruzione delle membrane cellulari. Le condizioni di fermentazione influenzano l'estrazione delle sostanze fenoliche durante il processo di vinificazione: oltre alle variabili generali che interessano la resa di estrazione solido-liquida dei composti fenolici, diverse sono le variabili e le tecniche riportate che hanno influenza sulle concentrazioni fenoliche presenti nei vini. È noto che alcune pratiche di vinificazione, come il controllo della temperatura di fermentazione, del tempo di macerazione, tecniche prefermentative a basse temperature, variazione del rapporto succo/bucce, l'aggiunta di enzimi di macerazione o tecnologie innovative come l'utilizzo di campi elettrici pulsati, aumentano il contenuto fenolico dei vini e ne modificano la composizione (Sacchi *et al.*, 2005; López *et al.*, 2009). Alcune di queste tecniche si basano sulla disgregazione delle cellule dell'uva, promuovendo la rottura dei legami presenti a livello della parete cellulare e permettendo un aumento del rilascio dei composti fenolici. Per i tannini, inoltre, l'estrazione sembra essere ostacolata dalla limitata solubilità. Tali composti vengono estratti sia dalle bucce sia dai vinaccioli, e la loro estrazione aumenta all'aumentare del contenuto di alcol, dell'anidride solforosa, della temperatura e del tempo di contatto delle bucce (Berg e Akiyoshi, 1958; Singleton e Draper, 1964; Ribéreau-Gayon, 1970; Ozmianski *et al.*, 1986).

Diversi autori (Sun *et al.*, 2001; Sacchi, 2005; López *et al.*, 2008) hanno posto l'attenzione sulle tecniche in grado di indebolire le pareti cellulari e facilitare la diffusione dei composti fenolici dell'uva durante il processo di vinificazione.

Un procedimento di rottura cellulare alternativo è rappresentato dal sistema di ammostamento per decompressione istantanea (Sclat-System). Questo consiste nel sottoporre l'uva ad alta pressione (12-20 bar) di gas; questo si discioglie nel succo cellulare e quando la pressione esercitata viene tolta istantaneamente il gas sciolto che si sprigiona in tempi rapidissimi, fa 'esplodere' le cellule, il cui contenuto si riversa nella fase liquida (Castino *et al.*, 1990). La successiva pressatura non ha più il compito di rottura della struttura tissutale della bacca, ma solo quella di agevolare la separazione del succo dalle parti solide. Variando poi la pressione esercitata nello stadio di compressione, si può modulare gli effetti in base anche alla materia prima da trattare permettendo così di eseguire estrazioni differenziate delle sostanze presenti nelle bucce in funzione del tipo di prodotto che si vuole ottenere.

Il tipo di vinificazione può interessare significativamente la quantità di composti fenolici riscontrabile nel vino: vini prodotti per fermentazione delle bucce con pedicello presentano un contenuto di fenoli polimerici più alto di quelli ottenuti da fermentazioni senza pedicello. Prolungando poi i tempi di contatto aumenta sia il livello di fenoli polimerici che totali (Sun *et al.*, 2001). Studi condotti da Timberlake e Bridle (1976) sugli effetti della tecnologia sul colore di alcuni vini rossi stabiliscono che i vini ottenuti per termovinificazione (60 °C per 30 minuti) risultavano più colorati di quelli vinificati tradizionalmente, ma con contenuti inferiori di antociani e maggiori di composti

polimerici; vini ottenuti con macerazione carbonica presentavano, invece, colorazioni lievi. Il processo di termovinificazione è nato con l'obiettivo di migliorare l'estrazione dei composti fenolici. Il riscaldamento porta, infatti, ad una migliore solubilizzazione e diffusività delle componenti cellulari (Parenti *et al.*, 2004), tuttavia può causare la degradazione delle sostanze fenoliche ed aumentare la volatilità dei composti aromatici con conseguente perdita di qualità del vino.

Studi (Auw *et al.*, 1996) relativi all'effetto di alcuni trattamenti sulla composizione fenolica e sul colore di alcuni succhi e vini rossi, dimostrano che, rispetto ai vini ottenuti per pressatura a caldo, quelli ottenuti per pressatura immediata presentino i valori più bassi per tutte le classi di polifenoli analizzate, mentre i vini ottenuti per fermentazione delle bucce danno i valori più alti per quasi tutti i composti

Bourzeix *et al.* (1986) hanno confrontato gli effetti della macerazione carbonica (8 giorni a 30 °C), della fermentazione con e senza contatto con i pedicelli (6 giorni a 25-30°C per la prima, 30 minuti per la seconda) e dopo trattamento termico (75 °C), sulla composizione delle catechine e delle procianidine a basso peso molecolare in alcuni vini rossi. Per tutte le varietà di uva prese in considerazione, i vini ottenuti per fermentazione a contatto con i pedicelli presentavano i valori di catechine e procianidine più alti, seguiti da quelli ottenuti per macerazione carbonica, mentre quelli ottenuti per fermentazione senza contatto con trattamento termico presentavano i contenuti più bassi di tali composti. Risultati simili sono stati ottenuti anche da Ricardo-da-Silva *et al.* nel 1992.

Busse-Valverde *et al.* (2012) hanno valutato l'influenza dei tempi di macerazione (5, 10 e 20 giorni) sul contenuto di proantocianidine e sull'impatto sensoriale. I diversi tempi di macerazione influenzano qualitativamente e quantitativamente la composizione delle proantocianidine presenti nei vini, aumentando con il tempo di macerazione. I valori di proantocianidine presenti nell'uva alla raccolta possono non essere indicativi di quelli poi riscontrati effettivamente nei vini; questo perché oltre alla concentrazione delle proantocianidine, vi sono altri fattori quali il loro tipo, le interazioni tra le stesse e con altre molecole ed il loro adsorbimento sulla parete cellulare, che vanno ad influenzare la loro estrazione.

I fenoli più debolmente legati alla parete cellulare, e contenuti nei vacuoli, sono presumibilmente quelli più soggetti all'influenza di alcuni variabili quali temperatura, rapporto solido/solvente, tipo di solvente utilizzato, ecc, che sono in grado di modificare l'equilibrio e le condizioni di trasferimento di massa nell'estrazione solido-liquido.

La temperatura è una delle variabili più critiche che interessano il rilascio di polifenoli dalla buccia. Gli incrementi di temperatura di favoriscono l'estrazione, migliorando sia la solubilità del soluto che il coefficiente di diffusione. Di conseguenza, si osserva un aumento dei fenoli estratti a valori di temperatura più elevati.

Nonostante gli effetti positivi di temperature più alte sulle rese di estrazione, la temperatura non può essere aumentata indefinitamente: causa infatti instabilità dei composti fenolici, inoltre temperature superiori a 50 °C portano a denaturazione delle

membrane (Cacace e Mazza, 2003).

Anche il tipo di solvente rappresenta una delle variabili che influenza maggiormente il processo di estrazione: metanolo, etanolo ed acqua sono i solventi più utilizzati per l'estrazione di fenoli da bucce e vinacce. Tra questi solventi, il metanolo presenta la migliore capacità estrattiva nei confronti dei composti fenolici, seguito dall'etanolo e dall'acqua (Pinelo *et al.*, 2005).

Quando vengono impiegati alcoli come solventi di estrazione, si osserva un progressivo rilascio di fenoli dalle bucce in funzione del tempo di estrazione, mentre quando viene utilizzata l'acqua il tempo non è così significativo.

Vista la grande influenza di composti fenolici sulla qualità del vino rosso, sono state sviluppate diverse tecniche di vinificazione per influenzare l'estrazione di questi composti durante la vinificazione per la maggior parte con l'obiettivo di migliorare l'estrazione. Una buona parte di queste intervengono sui fattori fisici connessi al processo di estrazione, in particolare la temperatura e gli interventi meccanici di movimentazione del mosto (rimontaggi e délestage), e delle parti solide dell'acino (follature).

Le tecniche relative all'impiego della temperatura comunemente impiegate per favorire una migliore estrazione, in alternativa alla macerazione classica, sono:

- Macerazione a freddo e congelamento del mosto: durante la macerazione a freddo il mosto viene tenuto a bassa temperatura, di solito a 10-15 °C, per alcuni giorni prima della fermentazione. I risultati ottenuti sul Pinot Nero hanno confermato un interessante effetto della macerazione a freddo sulle caratteristiche aromatiche dei vini che presentavano note olfattive più gradevoli ed intense del testimone (Feuillat, 1997); non sempre però i vini sono risultati più ricchi in antociani e più colorati dei testimoni (Feuillat, 1997; Gerboux *et al.*, 2002), ciò probabilmente dipende dagli interventi attuati congiuntamente al raffreddamento del pigiato per la protezione degli antociani estratti dall'ossidazione enzimatica. Il congelamento del mosto prima della fermentazione ha potenzialmente un effetto molto più importante, portando alla rottura delle cellule della bacca e quindi delle membrane cellulari con liberazione degli antociani nel mosto (Sacchi *et al.*, 2005). L'utilizzo della neve carbonica in forma solida come agente criogenico, studiato da Couasnon (1999 a,b), porta a risultati migliori sia per quanto riguarda l'intensificazione del processo di estrazione degli antociani e dei polifenoli totali (effetto su disgregazione della parete cellulare delle bucce), sia per quanto riguarda la protezione degli antociani dalle perdite per ossidazione (effetto protettivo CO₂ gassosa che si forma per sublimazione della CO₂ solida aggiunta).
- Termo-vinificazione: consiste nel riscaldare le bucce a 60-70 °C per breve tempo, estraendo tali composti con il succo, pressando e raffreddando prima

della fermentazione. Il trattamento col calore danneggia le membrane cellulari dell'ipoderma, rilasciando gli antociani e denaturando anche le polifenolossidasi, prevenendo così l'imbrunimento.

- Macerazione post-fermentativa a caldo: il pigiato, terminata la fermentazione alcolica, viene conservato ad una temperatura intorno ai 42-45 °C per un tempo variabile dalle 24 alle 48 ore; prove sul Pinot Nero (Gerbeaux, 2002) hanno evidenziato interessanti aumenti nel tenore in antociani e polifenoli totali nei vini, a seguito del riscaldamento.
- Enzimi pectolitici: vengono utilizzati per degradare la lamella mediana presente tra le cellule della polpa, e le pareti cellulari della polpa e della buccia, che così rilasciano i pigmenti. L'impiego di questi enzimi ha portato ad un miglioramento sia della resa in succo e che del colore (Ducruet *et al.*, 1997).

Sono proprio i principi di estrazione più innovativi, l'ottimizzazione delle condizioni di estrazione, quali temperatura, rapporto solido/solvente, uso di fluidi supercritici ed i più recenti sistemi di estrazione cellulare, a rappresentare una promessa per migliorare il rilascio dei composti fenolici dalle bucce (Pinelo *et al.*, 2006).

Al fine di realizzare una maggiore specificità ed efficienza nel processo di estrazione dei polifenoli dalle bucce, è necessario combinare le conoscenze sulla localizzazione, sui legami di questi composti e sulle tecniche utilizzate per estrarli. La degradazione della parete cellulare dei polisaccaridi è un passo fondamentale per il rilascio dei fenoli dalle bucce, in particolare di quelli legati alla parete cellulare, ma anche quelli contenuti nei vacuoli cellulari.

Una tecnica innovativa, quale l'applicazione di ultrasuoni ad alta energia, potrebbe risultare adatta al rilascio dei polifenoli al fine di massimizzare la loro estrazione dall'uva riducendo i tempi di macerazione, ed ottimizzare le proprietà degli stessi nel vino.

Recentemente sono stati testati diversi pretrattamenti alternativi, come l'applicazione degli ultrasuoni e/o dei campi elettrici pulsati, con l'obiettivo di migliorare l'estrazione dei composti fenolici dall'uva dal pigiato, dalle bucce, e dai vinaccioli.

González *et al.* (2006) e Ghafoor *et al.* (2009) dimostrano che l'applicazione di ultrasuoni a 20-35 kHz su residui di uva a bacca rossa e su vinaccioli aumenta l'estrazione dei polifenoli. Inoltre, secondo Novak *et al.* (2008), gli ultrasuoni provocano l'estrazione dei flavonoidi dalle bucce evitando l'indesiderabile degradazione dei composti fenolici; secondo Cocito *et al.* (1995) provocavano l'estrazione dei composti fenolici e di altri composti bioattivi dal mosto, e, secondo Masuzawa *et al.* (2000), aumentano la quantità di composti fenolici nel vino rosso. Questi effetti sono dovuti alla rottura delle membrane cellulari ed alla riduzione delle dimensioni delle particelle per il collasso delle bolle di

cavitazione (Vinatoru, 1999).

Risale al 1983 un lavoro di Tevdoradze *et al.*, riportato in letteratura russa, nel quale viene sperimentata l'applicazione degli ultrasuoni nella produzione di un vino da tavola: il trattamento comporta una disgregazione del pigiato ed un aumento della permeabilità cellulare, permettendo così ad alcune delle sostanze di passare più facilmente nel vino (dopo il trattamento è stata riscontrato un aumento della concentrazione di fenoli variabile dal 3 al 9%). Questo trattamento viene ritenuto dagli autori veloce, semplice e vantaggioso, dal momento che va ad accelerare il processo tecnologico.

Gli ultrasuoni utilizzano fenomeni fisici e chimici fondamentalmente diversi da quelli applicati con l'estrazione convenzionale; offrono un netto vantaggio in termini di produttività, resa e selettività, riducendo così notevolmente i tempi di processo, migliorando la qualità, e diminuendo i rischi chimici e fisici. La cavitazione acustica provoca, come visto, la rottura delle pareti cellulari, facilita il trasferimento di massa e l'accesso del solvente al contenuto cellulare.

Tecniche di estrazione assistita con ultrasuoni trovano diverse applicazioni per l'estrazione di composti da piante al fine di accorciare i tempi, diminuire i consumi di solventi, aumentare la resa, e migliorare la qualità degli estratti. Tali tecniche, che risultano particolarmente appetibili per la loro semplicità e per i bassi costi di impianto, si basano sull'uso di energia derivante da ultrasuoni per facilitare il rilascio di composti da campioni solidi in un solvente scelto in base alla natura dei soluti da estrarre. Vengono solitamente impiegate per l'estrazione di composti organici (tra cui polifenoli, acidi organici e isoflavoni) da diverse matrici in modo che il tempo di estrazione si riduca a 3/10 minuti (Carrera, 2012).

In letteratura vengono citate applicazioni di estrazione assistita con ultrasuoni (UAE) nella determinazione dei composti fenolici in specifiche parti dell'uva. Ghassempour *et al.* (2008) comparano questa tecnica con quella di estrazione assistita con microonde nel recupero di antociani dalla buccia di uve rosse.

Novak *et al.* (2008) hanno applicato la UAE come metodo di estrazione per la determinazione dei flavonoidi nelle bucce di uve rosse utilizzando un bagno sonico: hanno così elaborato metodi rapidi di estrazione con tempi variabili tra i 15 e i 30 minuti per i diversi tipi di flavonoidi.

Anche i vinaccioli sono risultati campioni interessanti per il metodo UAE; Ghafoor *et al.* (2009) hanno sviluppato un metodo di estrazione utilizzando un bagno sonico nel recupero dei composti fenolici totali e degli antociani dai vinaccioli con trattamenti di 50 minuti.

L'estrazione assistita con ultrasuoni può pertanto risultare una valida alternativa alla macerazione classica per l'estrazione dei composti fenolici, dei tannini condensati, e degli antociani nelle uve rosse.

2.3 I VINACCIOLI

I vinaccioli hanno struttura e composizione completamente diversa dal resto della bacca: sono costituiti da una mandorla grassa circondata da un guscio legnoso e da una cuticola tannica. Questa struttura esterna modula la diffusione di sostanze dai vinaccioli al mosto durante la macerazione. I vinaccioli contengono glucidi (35%), sostanze lipidiche (15-20%), sostanze azotate (5%), sostanze minerali (2-4%); sono inoltre una fonte importante di composti fenolici nella vinificazione in rosso, contenendo infatti dal 20 al 55% dei polifenoli totali dell'acino, in funzione della varietà.

I vinaccioli raggiungono la loro dimensione definitiva prima dell'invasatura; nel corso della maturazione il tenore in tannini dei vinaccioli diminuisce, mentre aumenta il loro grado di polimerizzazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Essi apportano catechine e procianidine al vino rosso, ma il loro contenuto in flavanoli dipende dal grado di maturazione dell'uva e dalle tecniche di macerazione utilizzate (Cadot *et al.*, 2006); la maggior parte di questi flavanoli sono flavan-3-oli (catechine) e procianidine (tannini condensati).

A parte un rilascio di azoto ammoniacale nella parte finale della maturazione, i componenti dei vinaccioli giocano un ruolo tendenzialmente negativo per il fatto che i lipidi portano odori anomali e i tannini, se in quantità eccessiva, diventano troppo aggressivi ed astringenti. Viste comunque le caratteristiche strutturali e compositive, a meno di rottura dei vinaccioli in fase di ammostamento, l'estrazione di sostanze indesiderate inizia solo nella fase avanzata della fermentazione quando l'alcol prodotto può fungere da solvente.

I vinaccioli costituiscono circa il 15% dei rifiuti solidi dell'industria enologica e contengono il 60-70% dei composti fenolici totali estraibili dell'uva (Nawaz *et al.*, 2006). Negli ultimi anni, gli estratti di vinacciolo hanno suscitato notevole interesse, in quanto fonte economica di antiossidanti naturali impiegati nell'industria farmaceutica, cosmetica ed alimentare (Ariga, 2004)

I vinaccioli sono stati studiati per il loro contenuto in polifenoli, ponendo l'attenzione agli effetti benefici sulla salute umana. Ad esempio, l'estratto di vinaccioli presenta un elevato contenuto di proantocianidine (39-73%) (Ariga, 2004) le quali, è stato dimostrato, hanno azione preventiva contro malattie causate da radicali liberi e da specie reattive dell'ossigeno (Bagchi *et al.*, 2000), sono efficaci contro alcuni tumori della pelle (Katiyar Santosh, 2008), potenzialmente utili contro l'ipertensione (Sivaprakasapillai *et al.*, 2009), e prevengono malattie cardiovascolari (Du *et al.*, 2007). Tale estratto viene utilizzato come supplemento di antiossidanti nella dieta (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Nel settore enologico viene addizionato al vino per influenzare la struttura dei vini e le loro proprietà organolettiche (Parker *et al.*, 2007).

2.3.1 Estrazione di polifenoli dai vinaccioli

Attualmente, la stragrande maggioranza degli studi relativi all'estrazione dei polifenoli e di altri costituenti dai vinaccioli utilizzano tecniche con solvente (Spigno *et al.*, 2007), metodo che richiede spesso grandi volumi di solvente e tempi di estrazione prolungati, spesso alcune ore.

Un metodo più avanzato rispetto a quello tradizionale con solvente, prevede l'estrazione assistita con microonde e si basa sul riscaldamento dell'umidità presente all'interno delle cellule la quale evapora producendo elevate pressioni a livello della parete cellulare. Le rotture che si creano a livello di parete facilitano la lisciviazione dei costituenti nel solvente circostante e migliorano la resa in fitocostituenti. I vantaggi di questa tipologia estrattiva sono molti, inclusi i tempi di estrazione più brevi e i volumi dei solventi drasticamente ridotti (Li *et al.*, 2011).

Vi sono altre tecniche innovative impiegate per l'estrazione di nutraceutici dalle piante, tra le quali l'estrazione con fluidi supercritici e l'estrazione assistita con ultrasuoni. Quest'ultima rappresenta una alternativa economica vista la tipologia di impianto semplice ed efficiente.

La maggior estrazione di tali composti dai vinaccioli attraverso i trattamenti ad ultrasuoni è attribuita all'effetto prodotto dalla cavitazione acustica nel solvente al passaggio dell'onda ultrasonica.

Gli ultrasuoni provocano anche di un effetto meccanico che comporta una maggior penetrazione di solvente nella matrice del campione, aumentando la superficie di contatto tra la fase solida e quella liquida, con conseguente diffusione rapida del soluto dalla fase solida al solvente (Rostagno, 2003).

L'estrazione assistita con ultrasuoni può impedire la degradazione chimica di alcuni specifici composti a causa del ridotto coinvolgimento chimico, e ridurre il tempo di estrazione (Ghafoor *et al.*, 2009).

2.3.2 I tannini dei vinaccioli

I tannini sono sostanze polifenoliche, dal sapore amaro e astringente, contenute sia nella buccia sia nei vinaccioli, svolgono molte funzioni sia dal punto di vista sensoriale che chimico, interagendo con gran parte delle molecole presenti nel vino. Sono capaci di originare combinazioni stabili con le proteine e con altri polimeri vegetali, quali ad esempio i polisaccaridi. Nella lavorazione delle pelli reagiscono con le proteine responsabili del collaggio rendendo elastici e imputrescibili questi materiali; reagiscono con le glicoproteine della saliva precepitandole e determinando la sensazione di astringenza, con le colle proteiche nel collaggio dei vini e, con gli enzimi. È importante che le dimensioni di tali composti (1000 - 3000 Da) siano sufficientemente grandi da permettere combinazioni stabili con le proteine, ma allo stesso tempo sufficientemente

piccole da rendere possibile il loro avvicinamento ai siti reattivi di queste molecole e facilitarne la reazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

I tannini dei vinaccioli sono procianidine parzialmente legate all'acido gallico. Sono costituite da unità monomeriche di catechina ed epicatechina, ed epicatechina esterificata con acido gallico, legate tra di loro attraverso legami C4-C6 oppure C4-C8. Conferiscono sensazioni molto diverse fra loro in dipendenza della maturità degli acini. Nel caso di uve poco mature avremo sensazioni di durezza e rugosità; al contrario armonia e corpo. L'1% dei tannini ceduti dai semi inciderà per il 40% sui tannini totali del vino.

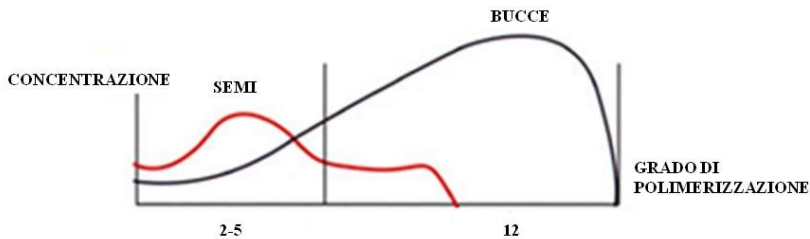


Figura 10: Concentrazione di tannini dei vinaccioli e delle bucce in relazione al grado di polimerizzazione (Fregoni, 2004).

Poiché caratterizzati da un peso molecolare medio più basso, i tannini dei semi sono più reattivi di quelli presenti nelle bucce (Fig. 10). È noto che le prodelfinidine e procianidine delle bucce diffondono nel mosto più rapidamente delle procianidine dei semi. Tannini e antociani possono polimerizzare tra di loro formando molecole che hanno caratteristiche colloidali e che interagiscono con proteine e polisaccaridi andando a influenzare soprattutto il colore, ma anche il gusto del vino. Se i tannini della buccia sono più elevati rispetto a quelli dei vinaccioli, il vino manca di struttura e non si ha stabilizzazione del colore, al contrario se i tannini dei vinaccioli sono presenti in concentrazione maggiore il vino risulterà astringente.

2.3.3 Sensazioni di astringenza e di amaro

I polifenoli hanno la proprietà di associarsi con le proteine salivari; i complessi tannino-proteina che si formano possono precipitare. Questo fenomeno si traduce con una sensazione di secchezza della bocca, talvolta sgradevole, chiamata astringenza (Bate-Smith, 1954). Dal momento che in bocca non esistono dei recettori specifici per l'astringenza tale sensazione non può essere definita come un gusto vero e proprio; mentre la sensazione di amaro, associata anche ai composti fenolici, fa parte dei cinque gusti fondamentali (Lea, 1992). Anche se i meccanismi non sono ancora noti, Lea suggerisce che i polifenoli amari attraversino i recettori di membrana della lingua per reagire con una proteina specifica. Per formare complessi relativamente stabili con le proteine, i polifenoli devono avere pesi molecolari relativamente elevati in modo da stabilire un numero

sufficiente di legami, d'altra parte, se il peso molecolare è troppo elevato, non sono in grado di legarsi al centro attivo della proteina per ragioni steriche, e di conseguenza i legami diventano più deboli.

I legami più stabili si formano con le procianidine oligomere, mentre l'aumento di peso molecolare delle procianidine per galloilazione aumenta la loro astringenza. Lea *et al.* (1978 e 1992), negli studi relativi alle proprietà organolettiche delle procianidine, hanno proposto due curve che riflettono l'ordine di grandezza dell'astringenza e dell'amaro in funzione del loro peso molecolare (Fig. 11).

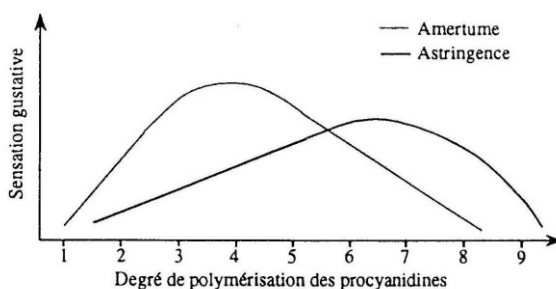


Figura 11: Relazione tra astringenza, amaro e peso molecolare (grado di polimerizzazione) delle procianidine (Lea, 1992).

La sensazione di amaro più importante si ha a livello delle procianidine tetramere, mentre l'astringenza aumenta fino alle procianidine eptamere per poi diminuire.

Sembra che le procianidine più condensate abbiano difficoltà ad attraversare la membrana lipidica del recettore per poter reagire con la proteina responsabile dell'amaro, e questo spiegherebbe la diminuzione di tale sensazione.

Nel caso del vino, durante l'affinamento e l'invecchiamento i polifenoli si ossidano e polimerizzano in modi diversi; questi fenomeni sono accompagnati dalle combinazioni con i polisaccaridi e altri polifenoli, come ad esempio con gli antociani (Glories, 1978).

La reattività dei tannini dipende dal tipo di polimero che si forma. L'invecchiamento comporta una diminuzione dell'amaro e, nei vini troppo invecchiati, i grossi polimeri che si formano, precipitano con possibile diminuzione anche dell'astringenza (De Freitas, 1995).

2.3.3.1 Valutazione della cinetica di formazione dei complessi tannino-proteina

Gli studi di De Freitas (1995) sui complessi tannino-proteina con proteine di peso molecolare diverso (sieroalbumina bovina - BSA, ovoalbumina, chimotripsinogeno A e ribonucleasi A), mediante nefelometria, hanno dimostrato che la cinetica è tanto più lenta quanto più piccola è la proteina. Infatti solo le proteine ad alto peso molecolare hanno una buona affinità nei confronti dei tannini. Si ritiene pertanto che la BSA sia adatta a seguire

la cinetica di precipitazione delle diverse procianidine (tale proteina viene scelta anche da altri autori, come riferimento nello studio di tali associazioni).

La cinetica di formazione dei complessi tannino-proteina viene monitorata in una miscela di procianidine oligomere da vinaccioli in presenza di BSA (Fig. 12). Nel grafico si distinguono essenzialmente due zone: la prima (A) nella quale la formazione di complessi insolubili tannino-proteina aumentano costantemente (durante i primi due minuti la reazione è lineare); la seconda (B) nella quale la formazione dei complessi cessa e mantiene un andamento costante. Poche ore dopo il complesso precipita e la torbidità della soluzione diminuisce molto lentamente.

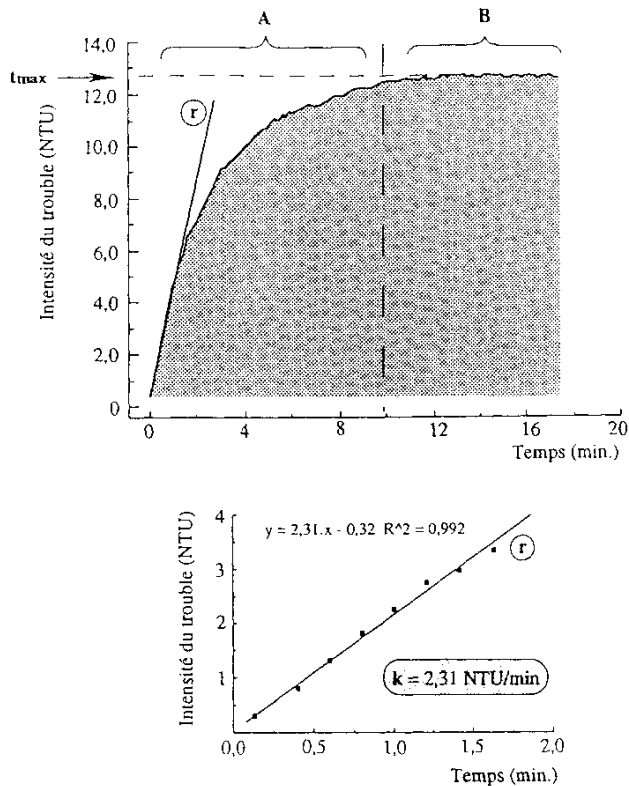


Figura 12: Evoluzione nel tempo della torbidità derivante dalle interazioni tra la BSA e le procianidine oligomere (di peso molecolare compreso tra 578 e 1038) (De Freitas, 1995).

La cinetica di formazione del torbido può esser spiegata con la saturazione dei siti di legame della BSA. La loro accessibilità dipende dalla struttura proteica e dalle procianidine. Pertanto, l'impedimento sterico derivante dalla complessità strutturale delle procianidine impedisce le connessioni con i centri reattivi della proteina. Non appena essi entrano in contatto, i siti più accessibili vengono occupati per primi e la proteina diventa meno idrofila. Questo causa la formazione della torbidità che aumenta finché vengono occupati tutti i siti, fino alla massima torbidità.

De Freitas, ritiene quindi la pendenza della retta (k) equivalente all'efficacia tannante, mentre la torbidità massima (t_{max}) corrispondente al potere tannante della procianidina nei confronti della BSA.

2.3.3.2 Evoluzione del 'potere tannante' e dell' 'efficacia tannante' delle procianidine in funzione del loro peso molecolare

L'evoluzione nefelometrica dell'intensità del torbido formatosi durante la reazione della BSA con le diverse procianidine valutate è riportata in Fig. 13. I valori di Pt ed Et sono stati determinati direttamente dato il valore costante del rapporto tra t_{max} e k e la quantità di procianidine. Con ciò sono stati in grado di stabilire le relazioni tra il potere tannante e l'efficacia tannante in funzione del peso molecolare delle procianidine oligomere. Risulta che i valori Pt ed Et aumentino linearmente in funzione del peso molecolare delle procianidine. Questo andamento deriva da un aumento regolare del numero di legami della molecola con la proteina. I vincoli conformazionali che si oppongono a questo andamento, non svolgono un ruolo determinante.

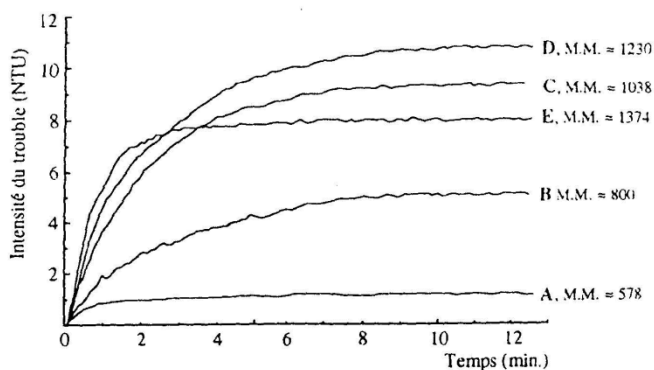


Figura 13: Andamento della torbidità formatasi per interazione tra la BSA e le procianidine oligomere, con diversi pesi molecolari (M.M)(De Freitas, 1995).

Al contrario, le procianidine presenti nella frazione E presentano un potere tannante più basso nei confronti della BSA rispetto a quelle della frazione precedente D (Fig. 12). Questo è probabilmente correlato alla complessità strutturale delle molecole.

Il potere tannante e l'efficacia tannate delle procianidine polimerizzate sono molto più importanti di quelli delle procianidine oligomere; tuttavia, a differenza di queste ultime il loro andamento non è lineare. L'efficacia tannante delle procianidine polimerizzate tende a diminuire a partire da pesi molecolari di 2500, mentre il potere tannante diminuisce a partire da pesi molecolari di 3000. Queste molecole di grandi dimensioni, non sono in grado di legarsi ai centri attivi della BSA ed i legami diventano più deboli.

Il modello presentato da De Freitas rappresenta un valido approccio per l'interpretazione delle interazioni tannino-proteina. La formazione di complessi insolubili tra i tannini e la

BSA nel tempo aumenta progressivamente fino a raggiungere un plateau. Per una stessa quantità di proteina, l'intensità massima della torbidità dipende in maniera lineare dalla concentrazione di procianidine e quindi dal loro grado di polimerizzazione. In questo modo vengono stimati i parametri relativi al potere tannante e all'efficacia tannante della soluzione, nei confronti della BSA.

A seconda del tipo di vino, i valori del potere tannante possono essere molto diversi. La natura del vitigno, del suolo, l'età del vino e le diverse tecniche di vinificazione e di estrazione sono i fattori determinanti che influenzano il potere tannante dei vini.

3 EFFETTO DEL TRATTAMENTO AD ULTRASUONI SULLA COMPONENTE POLIFENOLICA DELLE BUCCE E DEI VINACCIOLI E SULLA RESA IN SUCCO

3.1 SCOPO DEL LAVORO

Considerata l'importanza tecnologica dei tessuti di rivestimento della bacca, è auspicabile adottare in vinificazione tutti quei procedimenti atti ad aumentare la possibilità di caratterizzare maggiormente i vini, facilitando l'estrazione del colore e la dissoluzione degli aromi.

In quest'ottica si orienta la tecnologia innovativa oggetto di studio, mirando ad offrire la possibilità di estrarre in continuo dalle bucce composti rilevanti qualitativamente senza appesantire strutturalmente e/o logisticamente le prassi vinificatorie, sfruttando i fenomeni innescati dalla propagazione degli ultrasuoni in mezzo solido-liquido quale il mosto-uva.

In contesti in cui i carichi di uva all'ingresso sono concentrati, accelerare le cinetiche estrattive attraverso un processo fisico può risultare strategico.

Le prove di questa prima sezione riguardano, pertanto, la stima degli effetti della sonicazione nelle prime fasi del processo di vinificazione:

- 1) trattamento di pre-macerazione sul pigiato di uva rossa in modo da stimare l'impatto sul colore e sulla cinetica di estrazione dei composti fenolici, valutando la possibilità di ridurre i tempi di fermentazione;
- 2) trattamento di pre-pessatura di vini bianchi e rosati, con l'obiettivo di aumentare la resa in succo;
- 3) trattamento sui vinaccioli per valutare il livello di estraibilità dei polifenoli dalla matrice stessa.

3.2 EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SUL PIGIATO

3.2.1 Materiali e metodi

3.2.1.1 Apparecchiatura ad ultrasuoni

I trattamenti ad ultrasuoni di tutte le prove sperimentali sono stati effettuati utilizzando il sonicatore SONOPLUS modello HD2200 (BANDELIN elettronica, Berlino, Germania) (Fig. 14) con sonda ultrasonica costituita da un trasduttore piezoelettrico.

Il volume del campione, il diametro del recipiente di trattamento e l'amplitudine desiderata determinano la selezione del tipo di sonda. Nel nostro caso, il modello è adatto per il trattamento di volumi che variano da 20 a 1000 mL, utilizzando una recipiente con un

diametro minimo di 17 mm ed un intervallo di amplitudine compreso tra 153 e 170 micron. L'amplitudine può essere impostata come percentuale (10-100%). La potenza massima è 200W e la frequenza di processo è di 20 kHz.

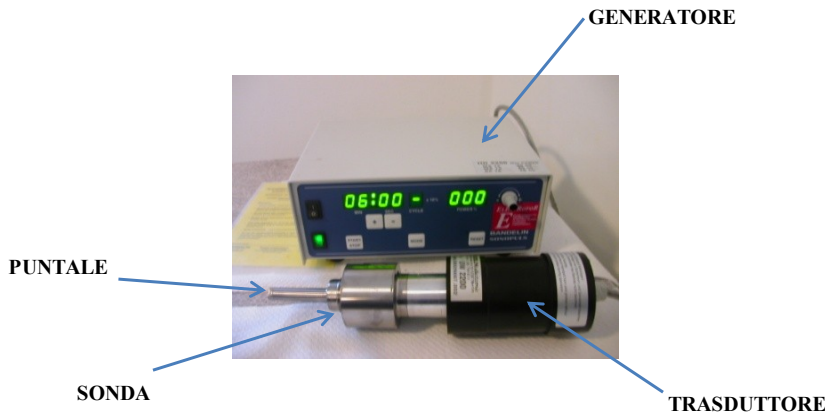


Figura 14: Modello SONOPLUS HD2200 – Componenti di base.

I componenti di base dell'apparecchio sono:

Generatore di impulsi elettrici (GM2200): trasforma tensione a bassa frequenza (50 Hz) in tensione ad alta frequenza (20 kHz). Presenta display numerico indicante l'amplitudine (%), la modalità di impulsi (in continuo o temporizzato) ed il tempo di sonicazione (fino a 99 min);

Trasduttore (UW2200): trasforma l'energia elettrica dal generatore in vibrazioni meccaniche di 20 kHz;

Sonda (HS 213G): amplifica la vibrazione prodotta;

Puntale (TT13): con diametro di 13 mm, realizzato in lega di titanio (Ti-AL6-V4) trasmette le onde meccaniche longitudinali nel campione.

I campioni sono stati trattati in becker di vetro Pyrex da 250 mL, è stato standardizzato il posizionamento della sonda al centro degli stessi, ad una distanza dal fondo compresa tra 2 e 5 cm in base al tipo di prove effettuate.

I diversi trattamenti sono stati condotti ad un'amplitudine pari al 30% (51 μm), 60% (102 μm) e 90% (153 μm) del valore massimo. Più alta è l'amplitudine, più intenso risulta il trattamento di sonicazione effettuato.

3.2.1.2 Disegno sperimentale

Le prove sperimentali, eseguite per valutare i possibili effetti degli ultrasuoni nella filiera enologica (uva/feccia/vino), sono state impostate secondo piani di lavoro variabili. Le prove preliminari si basano su una serie di trattamenti le cui condizioni vengono valutate in un ampio range di amplitudini, e descritte successivamente.

Per altre prove, invece, considerate tutte le ipotesi di trattamento (tempi e% di amplitudine), si utilizza il metodo della superficie di risposta (RSM: Response Surface Methodology) all'interno di un modello di disegno sperimentale composto centrale a facce centrate (CCF: Central Composite Face-Centered) al fine di ottimizzare il numero degli esperimenti e le condizioni operative, ed ottenere la massima informazione con il minor numero di campioni.

In genere il disegno sperimentale (DOE: Design of Experiment) consiste nella progettazione di una serie di prove in diverse condizioni eseguite con l'obiettivo di massimizzare le informazioni sulla risposta di uno o più parametri per ogni trattamento eseguito.

Scelte le variabili da studiare, dette fattori, si registra l'andamento della superficie generata dalla variabile scelta come indicatrice della risposta (Fig. 15).

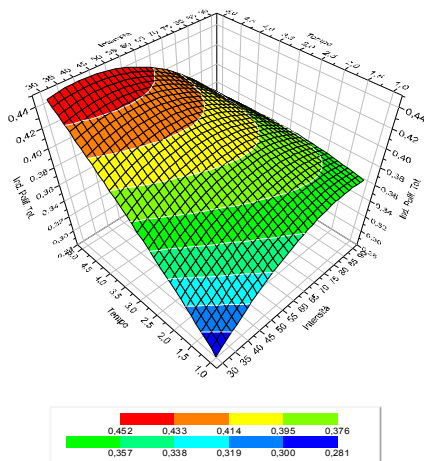


Figura 15: Esempio di superficie di risposta, ottenuta con RSM, in uno studio su due variabili.

Il disegno sperimentale seguito per le prove è stato elaborato con il software Modde 8.0.2 di Umetrics.

I parametri sperimentali di cui viene studiata la risposta sono il tempo di trattamento (t) e l'amplitudine (%); il disegno sperimentale (Tab. 2) ha previsto il trattamento randomizzato di 11 campioni con tre repliche del punto centrale.

I livelli delle variabili indipendenti quali percentuale di amplitudine (%) e tempo di sonicazione (min) sono stati selezionati in base ai risultati ottenuti nelle prove preliminari. Il livello di amplitudine varia tra il 30 ed il 90% ed il tempo di sonicazione tra 1 e 5 minuti; il campione di riferimento, non sottoposto a trattamento, è stato valutato separatamente.

Trattamento n°	Ordine trattamento	Amplitudine (%)	Tempo (min)
1	11	30	1
2	7	90	1
3	5	30	5
4	1	90	5
5	2	30	3
6	8	90	3
7	9	60	1
8	3	60	5
9	6	60	3
10	10	60	3
11	4	60	3

Tabella 2: Piano sperimentale elaborato col software Modde by Umetrics.

I risultati vengono *fittati* con il metodo multivariato di regressione lineare multipla PLS (Partial Least Squares) il quale stima simultaneamente la variazione di tutti i parametri in relazione alla variazione dei fattori, e quindi il modello in base alle risposte ottenute.

Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati *fittati* con un'equazione polinomiale di secondo grado.

La significatività statistica dei risultati è stata stimata mediante analisi della varianza, ed i coefficienti con livelli di significatività (p) inferiore al 5% sono stati considerati rilevanti (riportati in grassetto nelle tabelle). Per verificare la significatività o meno del modello si utilizzano i valori di F ed R^2 , mentre Q^2 , percentuale della variazione della risposta predetta dal modello, indica la bontà del modello nel predire i nuovi dati. Il valore di Q^2 deve essere superiore a 0,25, e più è alto, più il modello risulta valido.

Si ritiene buono, infine, un modello la cui la differenza tra i valori di R^2 e Q^2 non supera le 0,2 - 0,3 unità. La riproducibilità del metodo, invece, deve presentare un valore superiore a 0,5; un elevato valore di riproducibilità è correlato ad un basso valore di errore puro.

La validità del modello si determina per comparazione dei valori sperimentali con quelli previsti.

3.2.1.3 Prove in laboratorio

In laboratorio sono stati valutati gli effetti di un pre-trattamento ad ultrasuoni per migliorare l'estrazione dei polifenoli da un ampio numero di campioni (n. 40) di diverse varietà di uva a bacca rossa raccolte in fase di maturazione (Prova A) o all'epoca della vendemmia (Prova B) (Tab. 3).

a. Preparazione dei campioni

Per le prove eseguite in laboratorio, i campioni di uva (250 g), raccolti in modo rappresentativo, vengono privati del raspo, pigiati manualmente e sottoposti a trattamento con ultrasuoni. Si conserva anche un campione non trattato, come riferimento (Fig. 16).

Nel corso del trattamento, è stata monitorata la temperatura massima raggiunta nel campione.

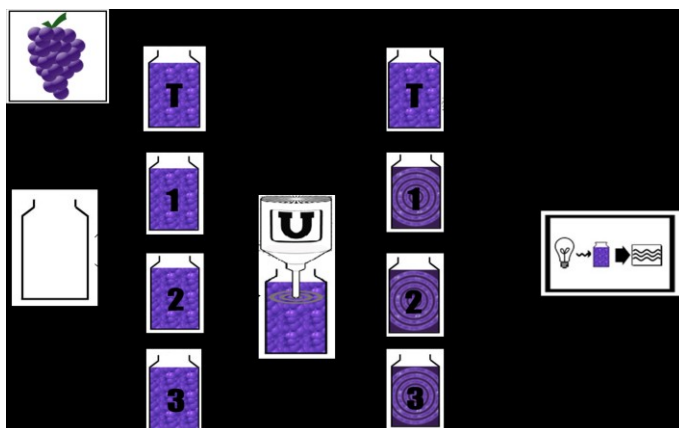


Figura 16: Schema della prova di trattamento ad US sul pigiato delle 40 varietà di uva rossa raccolte a maturità tecnologica confrontata con il rispettivo campione non trattato (T).

b. Condizioni di trattamento

Le condizioni di trattamento vengono impostate in modo selettivo in base alla tipologia di prove eseguita. Una prova preliminare è stata effettuata su un campione di uva cv. Syrah per tempi diversi (da 1 a 5 minuti) e con due percentuali di amplitudine diverse (60% e 90%, la prova al 30% è stata bypassata in quanto, da prove precedenti, brevi tempi hanno dato risultati poco significativi, mentre tempi lunghi risultavano equivalenti a tempi brevi al 60%); notando che i migliori risultati si potevano avere per amplitudini del 90%, si è deciso di condurre le prove sulle diverse varietà a questa amplitudine per tempi di trattamento di 3 e 5 minuti.

Prova	Campione	Quantità trattata	Tempi di trattamento	Amplitudine
A	Testimone		Ø	Ø
	1	250 g	1 min	60% e 90%
	2		2 min	
	3		3 min	
	4		4 min	
	5		5 min	
B	Testimone		Ø	Ø
	1	250 g	3 e 5 min	90%
	2			
	n			

Tabella 3: Modalità di trattamento per le prove di estrazione con US delle sostanze fenoliche da diverse varietà di uva rossa (n).

c. Determinazioni analitiche

Le determinazioni analitiche relative all'indice di polifenoli totali - DO 280 nm, all'intensità colorante, e al contenuto di antociani, sono state effettuate subito dopo la pigiatura (per il campione di riferimento), e subito dopo trattamento (per le prove), previa centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti.

Indice di polifenoli totali (DO 280 nm) (Ribéreau Gayon, 1970)

È correlato al contenuto di polifenoli totali; per i vini rossi la DO 280 nm viene determinata per via spettrofotometrica contro un bianco costituito da acqua (1 cm di cammino ottico), previa diluizione 1:50.

Antociani decolorabili (Ribéreau-Gayon e Stonestreet, 1965).

La determinazione degli antociani potenziali ed estraibili si determina secondo il metodo rapido per la valutazione degli antociani decolorabili.

Reattivi:

- NaHSO₃ (Carlo Erba, Milano, Italia) al 15%
- HCl al 37% (Carlo Erba, Milano, Italia), diluito 1:50
- Etanolo al 96% (Carlo Erba, Milano, Italia), acidificato allo 0,1% di HCl

In un beker, si aggiungono ad 1 mL di campione, 1 mL di etanolo acido e 20 mL di HCl 1:50; 10 mL di tale soluzione sono prelevati e addizionati a 4 mL di acqua distillata; una seconda aliquota di 10 mL è addizionata a 4 mL della soluzione di NaHSO₃.

Dopo 15 minuti, si legge la densità ottica a 520 nm contro acqua per entrambe le prove.

Gli antociani decolorabili sono espressi dalla seguente relazione:

$$\text{Antociani (mg/L)} = (\text{DO } 520_{(\text{H}_2\text{O})} - \text{DO } 520_{(\text{SO}_2)}) \times 875$$

Maturità fenolica (Glories, 1978)

Per poter valutare l'aumento percentuale dei composti potenzialmente estraibili dopo trattamento, rispetto a quelli estraibili nelle condizioni classiche, una parte dei campioni è posta in estrazione, secondo il protocollo per la determinazione della maturità fenolica con tampone tartarico e in metanolo acidificato, e dopo 4 ore viene centrifugata e sottoposta alle stesse analisi.

Una aliquota di 200 acini viene frullata per circa 2 minuti e, dalla massa ottenuta, vengono prelevate due aliquote da 25 g ciascuna: la prima viene addizionata di 25 mL di soluzione tampone a pH 3,2 (5 g/L di acido L(+)-tartarico (Carlo Erba, Milano, Italia) e tamponata con NaOH 4 M - Carlo Erba, Milano, Italia), la seconda viene addizionata di un pari volume di una soluzione di HCl 0,1 M (pH 1). I campioni così ottenuti, vengono omogeneizzati e lasciati a riposo per 4 ore. Trascorso tale intervallo, si procede alla centrifugazione dei due campioni (3000 rpm per 10 min), e sul surnatante si effettuano le analisi dei parametri sopra riportati.

3.2.1.4 Prove in cantina

a. Preparazione dei campioni e condizioni di trattamento

In cantina è stata condotta una prima prova di trattamento ad US (tempo fisso - 2min -% di amplitudine diversa - 20%, 40%, 60%, 80%) per valutare l'effetto immediato sul colore. Successivamente sono state effettuate delle microvinificazioni di campioni di pigiato di Cabernet Sauvignon precedentemente sottoposto a trattamento ad ultrasuoni (5 minuti, 90%) con svinatura sequenziale (dopo 2, 3 e 4 giorni) per valutare l'effetto degli stessi sulla cinetica di estrazione di polifenoli ed antociani nel corso della macerazione, in confronto al campione di riferimento svinato al quinto giorno di macerazione (Tab. 4) (Fig. 17).

I campioni trattati (1 e 2), appartenevano alla stessa varietà, ma presentavano un contenuto polifenolico diverso.

Prova	Campione	Quantità trattata	Tempi di trattamento	Amplitudine
Effetto su colore (trattamento diretto del pigiato)	Testimone		∅	∅
	1	200 g	2 min	20%
	2			40%
	3			60%
	4			80%
Prova	Campione	Quantità trattata	Condizioni trattamento	Tempo di macerazione
Microvinificazione	Testimone		∅	5 giorni
	1	800 g	5 min 90%	2 giorni
	2			3 giorni
	3			4 giorni

Tabella 4: Modalità di trattamento per le prove di estrazione degli antociani con US e per le prove di macerazione sequenziale.

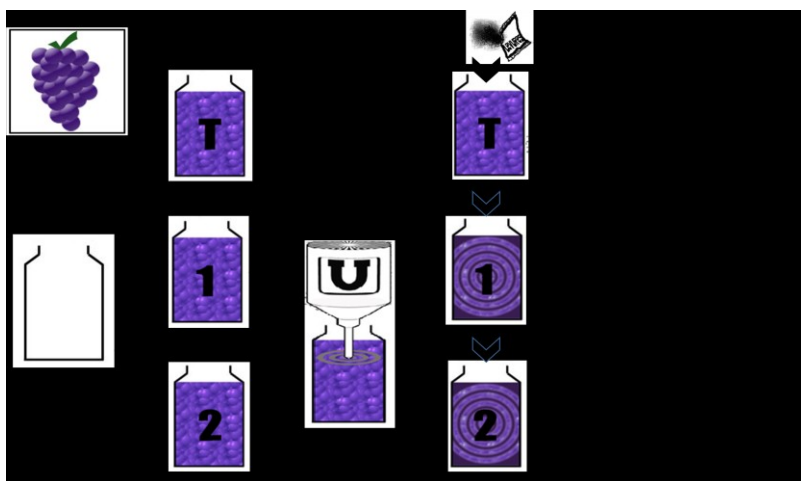


Figura 17: Schema della prova di confronto tra la macerazione classica (T) ed il campione di uve rosse sottoposto a trattamento con US prima della macerazione e svinato dopo 2, 3 e 4 giorni.

b. Determinazioni analitiche

Per la prima prova, dopo centrifugazione, si valutano gli antociani, la tonalità e l'intensità colorante.

Tonalità del colore (Sudraud, 1958)

È data dal rapporto DO 420/DO 520. Minore è la tonalità, maggiore è la componente rossa rispetto alla gialla; tonalità elevate, sono indice di una colorazione tendente all'aranciato.

Intensità colorante (Glories, 1984)

È data dalla somma tra DO 420 nm, DO 520 nm e DO 620 nm, tutte riferite ad un cammino ottico di 10 mm.

Sulle prove di microvinificazione, sono stati monitorati giornalmente il contenuto di antociani e l'indice di polifenoli totali. Sui campioni, dopo svinatura è stato valutato anche il contenuto di tannini totali e l'indice di pigmenti polimerizzati.

Tannini (proantocianidine) totali (Bate-Smith, 1954).

La metodica si basa sulla proprietà dei flavani (proantocianidine) di originare antocianidine per trattamento acido a caldo.

Reattivi:

- Soluzione di butanolo acido (500 mL di HCl 37% + 150 mg di $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ + 500 mL di n-butanolo) (Carlo Erba, Milano, Italia)

A 2 mL di campione diluito 1:50, si aggiungono 6 mL di soluzione di butanolo acido (provetta A). Metà di questa soluzione viene travasata in una seconda provetta in Pyrex con tappo a vite (provetta B), che viene posta in bagnomaria bollente (100 °C) per 30 minuti. Dopo raffreddamento della provetta B, si leggono le densità ottiche a 550 nm per entrambe le provette, contro acqua (10 mm di cammino ottico).

Tannini totali (g/L) = (DOB - DOA) x 0,1736 x 50

Indice dei pigmenti polimerizzati (Glories, 1978).

È un indice dello stato di aggregazione degli antociani con i tannini; i complessi formati infatti, risultano meno sensibili alla decolorazione ad opera dei solfiti, determinando l'aumento dell'indice stesso.

Reattivi:

- Potassio metabisolfito (Carlo Erba, Milano, Italia) al 20%
- Tampone tartarico pH 3,2 (5 g/L di acido L(+)-tartarico, portati a pH 3,2 con NaOH 4 M)

A 5 mL di campione si aggiungono, in un beker, 45 mL di tampone tartarico e 0,2 mL di potassio metabisolfito; in un secondo beker, a 5 mL di campione e 45 mL di tampone tartarico si aggiungono 0,2 mL di acqua distillata. Dopo 5 minuti si leggono le densità ottiche contro acqua, a 420 nm e 520 nm, per entrambe le prove.

$$\text{Indice Pig. Pol.} = \frac{DO420(SO_2) + DO520(SO_2)}{DO420(H_2O) + DO520(H_2O)} \cdot 100$$

3.2.2 Risultati e discussione

Il trattamento ad ultrasuoni, grazie alle onde di pressione ad alta frequenza ed al correlato fenomeno della cavitazione, potrebbe essere responsabile, in un mezzo solido-liquido quale il pigiato, della liberazione e dissoluzione accelerata della matrice fenolica contenuta a livello dei tessuti epidermici. Dalle prove effettuate si riscontra un aumento dell'indice dei polifenoli totali e degli antociani tanto più evidente tanto più aumenta il tempo di trattamento e la% di amplitudine (Tab. 5).

Prova A	T (°C)	DO 280nm	I.C.	Antociani (mg/Kg)	Prova A	T (°C)	DO 280nm	I.C.	Antociani (mg/Kg)
Tq	23	3,49	0,05	7	Tq	23	3,49	0,05	7
1' 60%	26	4,19	0,09	24	1' 90%	28,7	5,05	0,14	57
2' 60%	30,5	4,76	0,12	39	2' 90%	32,9	5,14	0,16	51
3' 60%	34,8	5,50	0,19	72	3' 90%	37,5	6,21	0,25	109
4' 60%	39,1	6,05	0,22	87	4' 90%	44,1	8,32	0,43	179
5' 60%	42,2	6,22	0,23	86	5' 90%	47,6	9,40	0,61	268

Tabella 5: DO 280nm, Intensità Colorante (I.C.) e Antociani (mg/Kg) per i campioni di pigiato di uve Syrah sottoposti, e non (Tq), a trattamento ad US (da 1 a 5 minuti e al 60% e 90% di amplitudine).

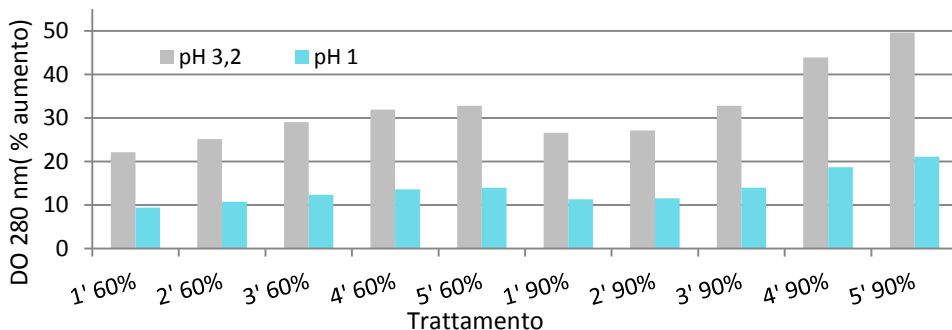


Figura 18: Aumento percentuale della DO 280 nm del campione sottoposto a trattamento con US rispetto al riferimento estratto a pH 3.2 e a pH 1.

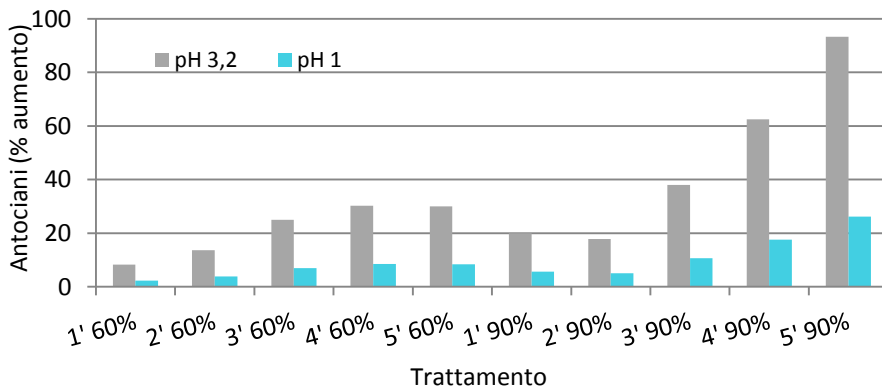


Figura 19: Aumento percentuale degli antociani (mg/Kg uva) del campione sottoposto a trattamento con US rispetto al riferimento estratto a pH 3.2 e a pH 1.

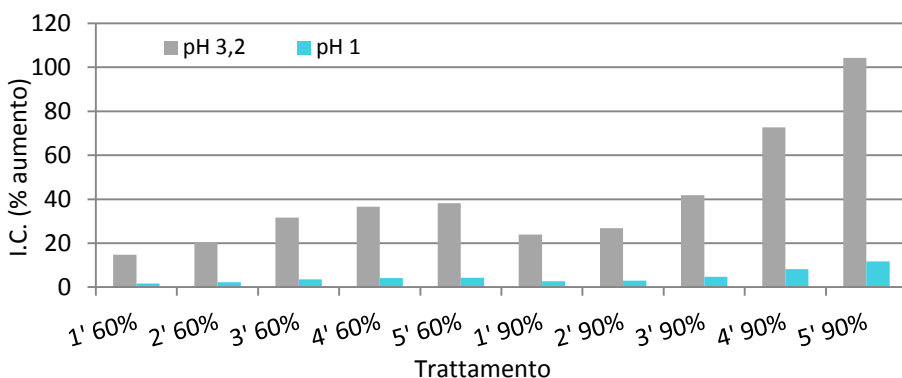


Figure 20: Aumento percentuale dell'intensità colorante del campione sottoposto a trattamento rispetto al riferimento estratto a pH 3.2 e a pH 1.

I grafici 18, 19 e 20 mostrano l'aumento percentuale di DO 280 nm, intensità colorante, ed antociani, rispetto al testimone, rilevato nei campioni estratti in tampone tartarico (pH 3,2) e in metanolo (Carlo Erba, Milano, Italia) acidificato all'1% con acido cloridrico (pH 1). È evidente come vi sia un aumento, proporzionale alle condizioni di trattamento, del 50% per l'indice di polifenoli totali e anche del 100% ed oltre di antociani e intensità colorante in alcuni dei campioni. I dati sono confermati anche dalle prove condotte su diverse varietà alla maturità tecnologica (Fig. 21 e 22).

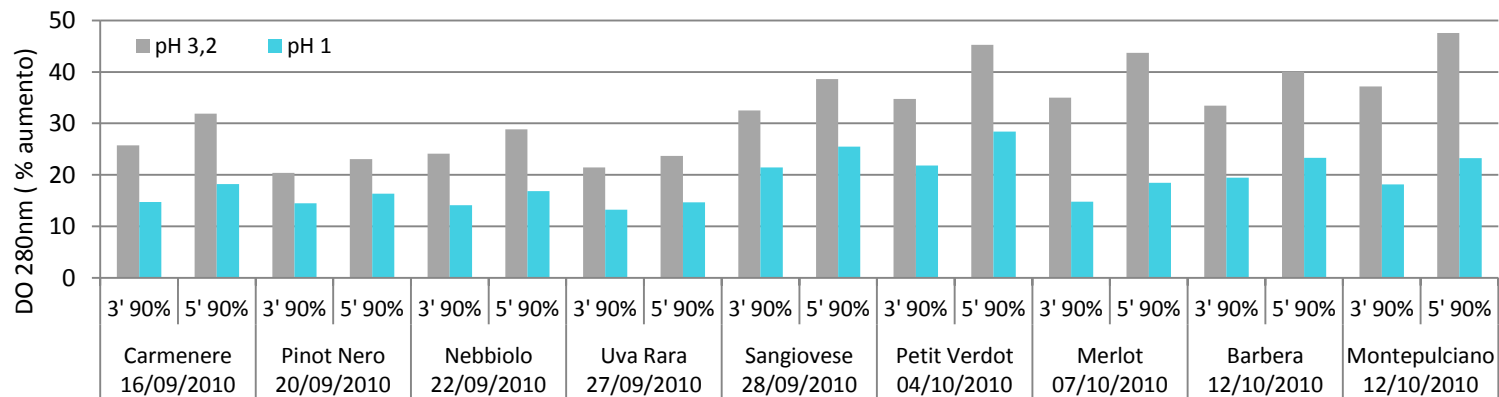


Figura 21: Aumento percentuale della DO 280 nm per alcune varietà di bacca rossa sottoposte a trattamento (90% per 3 e 5 minuti) rispetto al riferimento estratto a pH 3,2 e a pH 1.

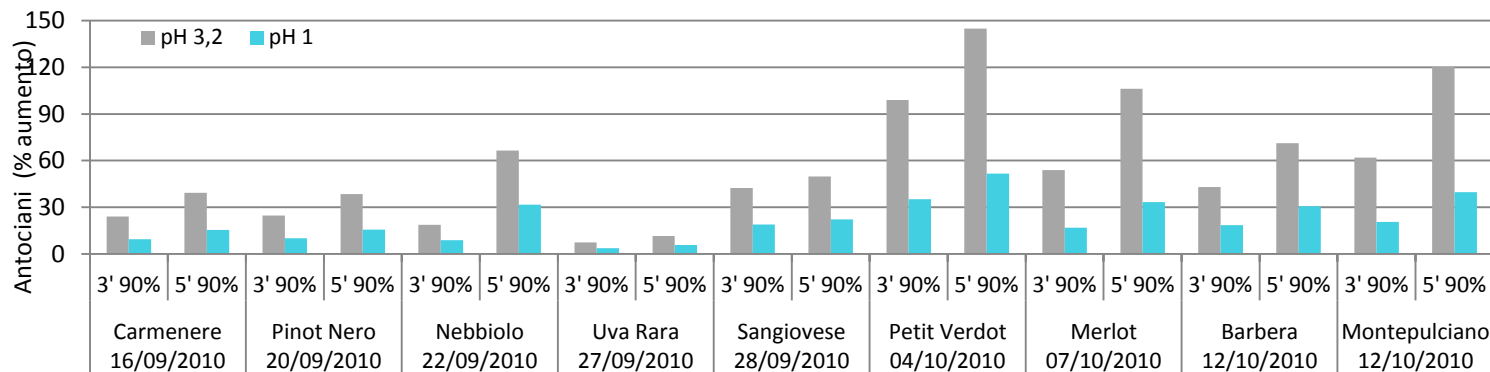


Figura 22. Aumento percentuale degli antociani (mg/Kg uva) per alcune varietà di bacca rossa sottoposte a trattamento (90% per 3 e 5 minuti) rispetto al riferimento estratto a pH 3,2 e a pH 1.

Si può notare come vi sia una risposta diversa per condizioni di trattamento analoghe, in termini percentuali, tra l'estrazione in polifenoli e in antociani; differenza legata alle diverse caratteristiche varietali (maturità cellulare, pectine, ecc).

La prova di trattamento, condotta in cantina per verificare l'effetto immediato sul colore, ha mostrato una forte interazione dei fenomeni di cavitazione sulle cellule della buccia, con un aumento dell'intensità colorante e della concentrazione in antociani. L'estrazione aumenta con la% di amplitudine con un coefficiente di correlazione di 0,9784 (Tab.6 e Fig. 23).

Condizioni Trattamento	Intensità Colorante	Tonalità	Antociani (mg/Kg)
Tq	2,77	1,52	23
2' 20%	6,13	1,59	42
2' 40%	7,50	1,58	60
2' 60%	9,01	1,49	69
2' 80%	9,44	1,52	81

Tabella 6: Variazione dell'intensità colorante, della tonalità e del contenuto in antociani (mg/Kg) per il campione trattato, e non (Tq), ad amplitudini diverse, stessi tempi (r^2 calcolato per antociani pari a 0,9784).

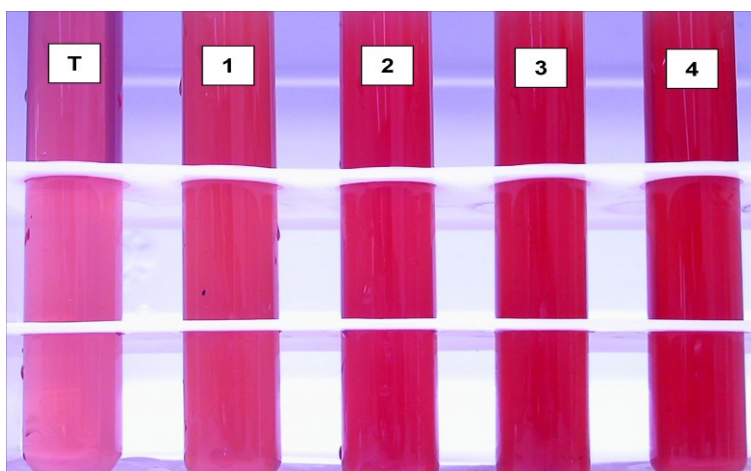


Figura 23: Effetto del trattamento ad US sul colore.

Infine, anche le prove di microvinificazione del pigiato, trattato con ultrasuoni e svinato rispettivamente dopo 2, 3 e 4 giorni, rispetto al riferimento che ha seguito la macerazione

classica e svinatura dopo 5 giorni, hanno dato risultati interessanti.

In generale, i campioni trattati presentavano, a inizio macerazione, un contenuto in polifenoli superiore rispetto al testimone, differenza che è stata riscontrata anche alla fine della macerazione e che risulta più evidente per l'indice di polifenoli totali che per gli antociani (Fig. 24).

Si può notare come la variabilità delle prove e l'effetto del trattamento ad ultrasuoni dipendano dalla qualità e dal contenuto di polifenoli della materia prima. In termini di tempo è comunque evidente l'anticipo, anche di 3 giorni di macerazione, sia per il contenuto di polifenoli che per quello di antociani, rispetto ai 5 giorni di macerazione classici (Tab. 7).

Il trattamento ad ultrasuoni presenta pertanto delle vantaggiose proprietà ausilio-estrattive che permettono di risparmiare tempo in fase di macerazione.

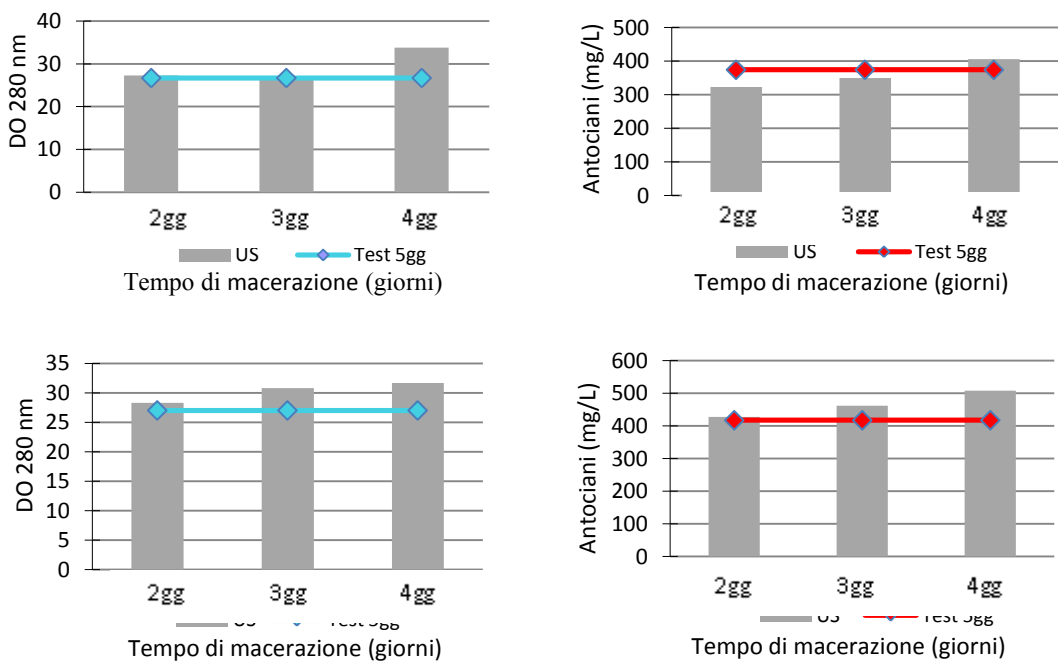


Figura 24: Confronto tra i polifenoli e gli antociani estratti dopo 2, 3 e 4 giorni di macerazione rispetto al testimone con 5 giorni di macerazione rispettivamente per i campioni 1 (in alto) e 2 (in basso)

Campione	Riduzione dei giorni di macerazione su 5gg	
	Polifenoli totali	Antociani
1	3gg	1gg
2	3gg	3gg

Tabella 7: Riduzione effettiva dei giorni di macerazione per i campioni 1 e 2 microvinificati dopo trattamento del pigiato con US.

Il campione 3, trattato con ultrasuoni con una macerazione di 4 giorni, mostra un valore di polifenoli totali più elevato rispetto al riferimento dovuto all'effetto di estrazione dei tannini. L'estrazione dei tannini potrebbe rappresentare pertanto un fattore positivo per migliorare la stabilità del colore.

È stata infine verificata l'eventuale polimerizzazione degli antociani che ha dato valori interessanti per il campione 2, che tuttavia non è certo sia imputabile ad un effetto diretto degli US (Tab. 8).

Campione	Tannini Totali (mg/L)	Indice Pigmenti Polimerizzati (%)
Tq	842	72
2	1120	77

Tab. 8: Confronto, alla svinatura, tra la concentrazione di tannini (mg/L) e l'indice di pigmenti polimerizzati (%) del testimone (Tq-5 giorni) e del campione 2 (4-giorni) trattato con US.

3.3 EFFETTO DEGLI ULTRASUONI SULLA RESA IN SUCCO

3.3.1 Materiali e metodi

a. Preparazione dei campioni e condizioni di trattamento

La prima prova (A) è stata eseguita su uve fresche (varietà Corvina e Corvinone) che sono state sottoposte a trattamenti ad ultrasuoni con amplitudine fissa e tempi diversi; la seconda prova (B), invece, è stata effettuata su uve passite (varietà Corvina) trattate variando l'amplitudine, e mantenendo il tempo costante, ed è stata confrontata con un campione trattato enzimaticamente con cellulasi (Fig. 25).

Per ogni prova (Tab. 9), l'uva è stata diraspata e pigiata manualmente ed il trattamento di sonicazione effettuato in un becker da 400 mL.

Prova	Campione	Quantità Trattata	Tempi di trattamento	Amplitudine/dosaggio
	Testimone		Ø	Ø
A	1	300g	3 min	
	2		6 min	40%
	3		9 min	
	Testimone		Ø	Ø
B	1	300g	6min	40%
	2			80%
	3ENZ		12 min	100µL

Tabella 9: Modalità di trattamento per le prove della valutazione della resa in succo per i campioni di uva fresca (A) e passita (B) trattati con US confrontati rispettivamente con il riferimento (Tq) e con il campione addizionato di enzima (ENZ, prova B).

La prova con enzima ha previsto l'aggiunta di un' enzima liquido (pectinasi/cellulasi), comunemente impiegato per l'estrazione del succo e per favorire la sedimentazione durante il travaso statico.

Subito dopo il trattamento, si è proceduto alla pressatura dei campioni per mezzo di una centrifuga da cucina, al fine di separare le parti solide (bucce, vinaccioli, pedicello), ed alla raccolta del succo di sgrondo e di pressa. Il rispettivo volume dei succhi è stato misurato e riassembleto. I succhi sono stati conservati durante la notte in frigorifero a 6-7 °C per favorire la decantazione statica a freddo, e successivamente si è misura il volume della feccia ottenuta.

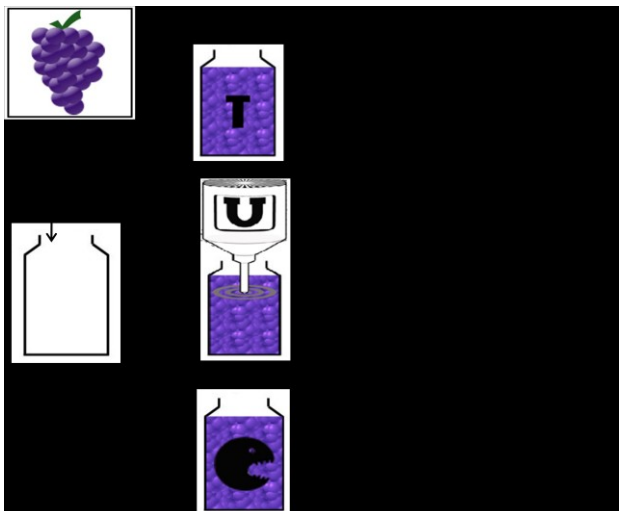


Figura 25: Schema della prova relativa alla resa in succo – confronto tra il campione di riferimento (T), il campione di pigiato sottoposto a trattamento con US e quello trattato enzimaticamente.

b. Determinazioni analitiche

I volumi di succo di sgrondo, di pressa e la feccia vengono stimati semplicemente misurandoli con un cilindro graduato da 100 e 200 mL.

3.3.2 Risultati e discussione

I risultati ottenuti mostrano che, qualunque sia la serie di prove, il trattamento ad ultrasuoni provoca un aumento della quantità totale del succo raccolto che varia tra il 17 e il 20% rispetto al controllo per la serie A e tra il 12 e 17% per la serie B.

Sul mosto fresco (Fig. 26), gli ultrasuoni aumentano la quantità di mosto e di succo totale ottenuto, rispetto al testimone. Si può notare come la durata del trattamento influenzi solo lievemente la quantità totale del succo raccolto. Tuttavia, la durata del trattamento sembra causare importanti differenze sui volumi di succo di sgrondo, che aumenta all'aumentare del tempo di trattamento. Il trattamento ad ultrasuoni comporta, infine, anche un aumento del volume delle fecce prodotte.

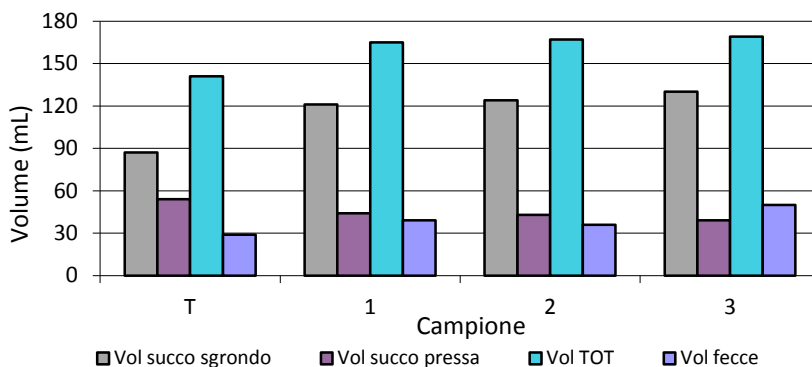


Figura 26: Confronto della resa in succo ottenuto durante la pressatura per i campioni di uva fresca trattati con US (1,2 e 3) ed il campione di riferimento (T).

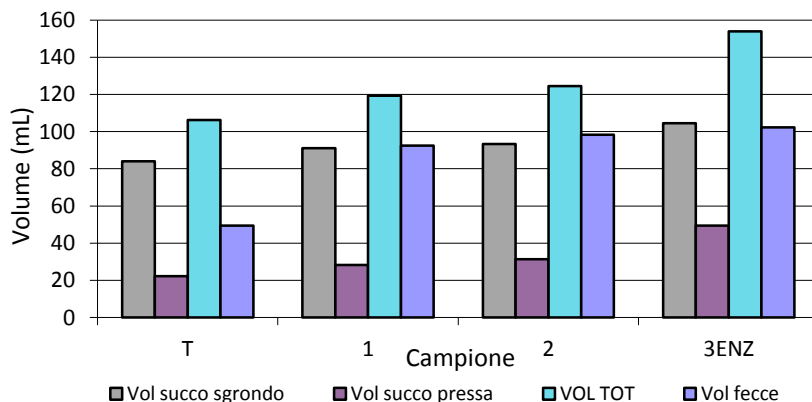


Figura 27: Confronto della resa in succo ottenuto durante la pressatura per i campioni di uva fresca passata trattati con US (1 e 2), il campione trattato enzimaticamente ed il riferimento (T).

Sull'uva passita (Fig. 27), la variazione dell'ampiezza del trattamento ha poca influenza sul volume di succo totale. Al contrario, il trattamento enzimatico mostra un'efficienza maggiore: è stato raccolto il 45% in più del succo rispetto al campione non aggiunto di enzima (testimone), ed il 24% in più rispetto al trattamento ad ultrasuoni più efficiente.

Da notare che, per la serie A, il succo di sgrondo risulta fondamentale per l'aumento del volume totale, mentre per la serie B non è così. In realtà, il succo di sgrondo ed il succo di pressa contribuiscono sostanzialmente nelle stesse proporzioni. Questa differenza può essere attribuita alla diversa natura dell'uva utilizzata per la serie A e B, elemento che influisce in modo anche sostanziale sulla percentuale di fecce delle due serie. L'uva passita dà un succo più zuccherino e più viscoso, che comporta un effetto importante sul fenomeno della cavitazione. La viscosità rallenta la formazione di microcavità aumentando la tensione superficiale del mezzo liquido e quindi la quantità di energia necessaria per l'insorgenza del fenomeno stesso.

3.4 EFFETTO DEL TRATTAMENTO AD ULTRASUONI SUI VINACCIOLI

3.4.1 Materiali e metodi

a. Preparazione dei campioni

Le prove per valutare il possibile effetto estrattivo degli ultrasuoni nei confronti dei composti polifenolici presenti nei vinaccioli sono state condotte sia su vinaccioli freschi, sia su vinaccioli provenienti da un oleificio prima della disoleazione (Tab. 10). I vinaccioli freschi, provenienti da serbatoi di macerazione, sono stati puliti dalle impurità, lavati più volte con acqua ed asciugati in stufa ad una temperatura di 40 °C, mentre i vinaccioli provenienti dall'oleificio erano già pronti per l'utilizzo.

Sono state effettuate alcune prove preliminari su:

- 20 g di vinaccioli freschi in 100 mL di soluzione simil-vino (preparata con 5 g/L di acido L-(+)-tartarico, 12% di etanolo con correzione del pH a 3,2 con NaOH 4M) (Carlo Erba, Milano, Italia);
- 45 g di vinaccioli provenienti dall'oleificio in 150 mL di soluzione simil-vino.

Successivamente, è stata effettuata una prova in triplo su 20 g di vinaccioli provenienti dall'oleificio in 200 mL di vino Bianco Friulano.

Prova	Campione	Quantità trattata	Mezzo di dispersione	Tempi/Amplitudine trattamento
A freschi	Testimone	20 g	sz. idroalcolica 12%, pH 3,2	Ø
	Trattato			Vedi piano sperimentale
B oleificio	Testimone	45 g	sz. idroalcolica 12%, pH 3,2	Ø
	Trattato			Vedi piano sperimentale
C oleificio	Testimone	20 g	vino bianco	Ø
	Trattato			Vedi piano sperimentale

Tabella 10: Condizioni sperimentali per le prove di estrazione con US dei composti fenolici dai vinaccioli in matrici diverse; A e B costituiscono una prova preliminare, C la prova effettiva i cui campioni sono stati replicati tre volte.

I campioni sono stati sottoposti a trattamento con ultrasuoni con lo scopo di valutare l'estrazione delle sostanze polifenoliche, in particolare dei tannini, dalla matrice solida dei vinaccioli.

I campioni sono stati trattati in becker di vetro Pirex da 250 mL, la punta in titanio è stata posizionata a 2 cm dal fondo del recipiente e per tutte le prove è stata rilevata la temperatura massima raggiunta a fine trattamento. Ai fini del confronto, è stato preparato anche un campione di riferimento, non sottoposto a trattamento, e conservato a temperatura ambiente per 1 ora.

b. Condizioni di trattamento

I trattamenti sono stati svolti secondo le combinazioni tempo di trattamento/amplitudine determinate del disegno sperimentale descritto precedentemente.

c. Determinazioni analitiche

Tra le metodiche analitiche utilizzate, sul surnatante dei campioni sottoposti a trattamento e del campione di riferimento, ottenuto dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti, oltre ai tannini totali ed all'indice dei polifenoli totali già riportati nella sezione precedente, sono state condotte anche le seguenti determinazioni:

Polifenoli totali

La metodica prevede l'utilizzo di ossidanti (acido fosfotungstico e fosfomolibdico) che reagiscono con i polifenoli grazie alle loro proprietà riducenti. La reazione conduce ad una colorazione blu la cui intensità è misurata per via spettrofotometrica.

Reattivi:

- Na₂CO₃ (Carlo Erba, Milano, Italia) al 15%
- Reattivo di Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)

In un matraccio tarato da 100 mL si pongono 1 mL di vino rosso opportunamente diluito (1/10 o 1/5 con acqua distillata), 5 mL di reattivo di Folin Ciocalteu e 40-50 mL di acqua distillata; dopo 5 minuti si aggiungono 20 mL di una soluzione di carbonato sodico anidro al 20% e si porta a volume con acqua distillata. Dopo 2 ore si procede alla misura dell'assorbanza a 750 nm contro un bianco preparato sostituendo il campione con acqua distillata. Il risultato, espresso in mg/L, si ricava mediante una retta di taratura ottenuta con soluzione di acido gallico (o moltiplicando per 900 e per l'eventuale numero di diluizioni).

Indice di etanolo (Glories, 1978)

Questo indice è rappresentativo della frazione di tannini legati a polisaccaridi e sali e, quindi, presenti nella frazione colloidale del vino.

A 1 mL di campione si aggiungono, in una provetta, 9 mL di etanolo al 96%; si legge l'assorbanza a 280 nm contro acqua, previa diluizione 1:10 (d₀).

In un secondo beker, 1 mL di campione e 9 mL di etanolo al 96% vengono centrifugati dopo 24 ore; si diluisce 1:10 e si legge la densità ottica a 280 nm contro acqua (d₂₄).

$$\text{Indice di Etanolo.} = \frac{d_0 - d_{24}}{d_0} \cdot 100$$

Indice di gelatina (Glories, 1978)

Tale determinazione è indicativa dell'astringenza del vino; più elevato è l'indice di gelatina, maggiore è la potenziale reattività dei tannini del vino nei confronti delle proteine salivari.

Reattivi:

- Soluzione di gelatina Polvere Oro (EverIntec, Pramaggiore, Venezia, Italia) 17,5 g/L.

In una provetta con tappo a vite, si aggiungono a 5 mL di campione, 0,5 mL di una soluzione di gelatina, si insuffla azoto nello spazio di testa, si tappa e si pone a 15 °C per 72 ore. Dopo tale periodo si centrifuga e si procede alla determinazione dei tannini totali previa diluizione 1:50; l'indice di gelatina si determina come segue:

$$\text{Indice di Gelatina.} = \frac{d_0 - d_{72}}{d_0} \cdot 100$$

Dove d₀ sono i tannini totali del vino, mentre d₇₂, sono i tannini totali determinati dopo trattamento con gelatina.

Torbidità

Rilevata attraverso nefelometro HACH modello 2100AN.

La torbidità deriva dalla presenza di particelle in sospensione che interrompono il raggio luminoso e diffondono una parte della luce in direzioni diverse da quella del raggio incidente (Ribéreau-Gayon, 2004). La deviazione è causata non solo dalla presenza di particelle opache, cioè non trasparenti alla luce, ma anche dalla non omogeneità ottica provocata da particelle che, pur essendo trasparenti, hanno un indice di rifrazione diverso da quello del liquido in cui sono sospese. La misura della luce riflessa è in relazione diretta con il numero delle particelle in sospensione e costituisce la base della turbidimetria (Tyndall, 1870).

La misura viene effettuata in continuo in modo da rilevare la formazione graduale del complesso tannino-proteina fino alla sua precipitazione.

Particle size

Il diametro delle particelle in sospensione viene determinato attraverso lo strumento NicompTM modello 380/ZLS (Zeta Potential/Particle Sizer – PSS NICOMP, Santa Barbara, California, USA) che sfrutta il principio della diffusione dinamica della luce (DLS) per dimensioni comprese fra 1 nm e 5 µm.

Il principio di funzionamento si basa sulla diffusione da parte delle particelle colpite da un raggio laser incidente. L'intensità di diffusione di una singola particella dipende dalla dimensione, dalla forma, dal peso molecolare e dalla differenza fra gli indici di rifrazione della particella stessa ed il liquido circostante. L'onda della luce incidente può essere considerata come composta da un campo elettrico alternato che, interagendo con gli elettroni delle particelle, li fa oscillare alla medesima frequenza e sono definiti "polarizzabili". Tale frequenza genera la formazione di un nuovo campo elettrico oscillante che irradia la luce diffusa in tutte le direzioni. La diffusione dinamica della luce laser (DLS) misura l'intensità della luce ad un determinato angolo. Essa varia con il tempo a causa dei movimenti Browniani, responsabili dei movimenti delle particelle. Il sistema è in grado di fornire la distribuzione del diametro delle particelle colloidali e determinare il diametro principale della particella espresso in nanometri. I risultati sono visualizzabili sotto forma di distribuzione Gaussiana o Nicomp. I campioni, in cuvette usa e getta, sono stati sottoposti ad una lettura di 5 minuti all'angolo di 90°.

Determinazione dell'attività antiossidante (Test DPPH•) (Brand-Williams *et al.*, 1995)

Il metodo si basa sulla decolorazione di un radicale organico relativamente stabile, il DPPH• (2,2-difenil-1-picridrazil radicale) se nel mezzo esistono dei composti attivi come radical-scavengers.

Si utilizza un volume pari a 3 mL di una soluzione di 6.1×10^{-5} M DPPH• (Sigma-Aldrich LLC. St. Louis, MO, USA) in metanolo (Carlo Erba, Milano, Italia). La reazione ha inizio con l'aggiunta di 10 µL di campione. La capacità antiossidante del mezzo si valuta in base al calo di assorbanza a 515 nm del reattivo (3 mL), considerando trascurabile l'aliquota di campione aggiunto al medesimo (10 µL), a una temperatura di 25 °C, sino a quando la reazione non raggiunge un plateau.

L'attività antiossidante è definita o come riduzione percentuale della concentrazione del DPPH• o come quantità di antiossidante necessario a ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH•.

Il test DPPH• valuta la capacità degli estratti in esame di agire da scavenger di radicali, utilizzando la reazione con il radicale stabile DPPH•. Tale radicale presenta in soluzione una colorazione viola con massimo di assorbimento a 515 nm; la soluzione vira al giallo quando questo radicale estrae un atomo di idrogeno da un antiossidante scavenger per formare la forma ridotta DPPH-H. Dai valori di assorbanza ottenuti per i vari sono state calcolate le percentuali di DPPH• residuo.

Potere tannante rispetto alla BSA (De Freitas, 1995)

Per mettere in evidenza certe differenze gustative, viene utilizzato un metodo nefelometrico basato sulla precipitazione della BSA dai tannini presenti.

A 2 mL di campione, diluito 50 volte con soluzione simil-vino, si aggiungono 150 µL di una soluzione acquosa di BSA (0,4 g/L) (Sigma-Aldrich LLC. St. Louis, MO, USA). La formazione del torbido viene monitorata per via nefelometrica; la curva risultante è analoga a quella riportata in Fig. 11. Il rapporto tra la torbidità massima e il volume di campione analizzato (0,04 mL), stabilisce il potere tannante caratteristico del campione.

3.4.2 Risultati e discussione

3.4.2.1 Effetto degli US sui vinaccioli freschi

Le prime indicazioni generali sulle capacità estrattive dei composti fenolici in seguito a trattamento ad ultrasuoni vengono fornite da una prova preliminare (A) effettuata su campioni di vinacciolo fresco sottoposti a trattamento come previsto dal disegno sperimentale.

I dati relativi ai polifenoli totali sono riportati nel grafico seguente (Fig. 28), dal quale si osserva un aumento dell'estrazione, rispetto al campione di riferimento, sia all'aumentare del tempo di trattamento che dell'amplitudine; aumento che però non si evidenzia nei campioni sottoposti a trattamenti molto brevi (1 minuto).

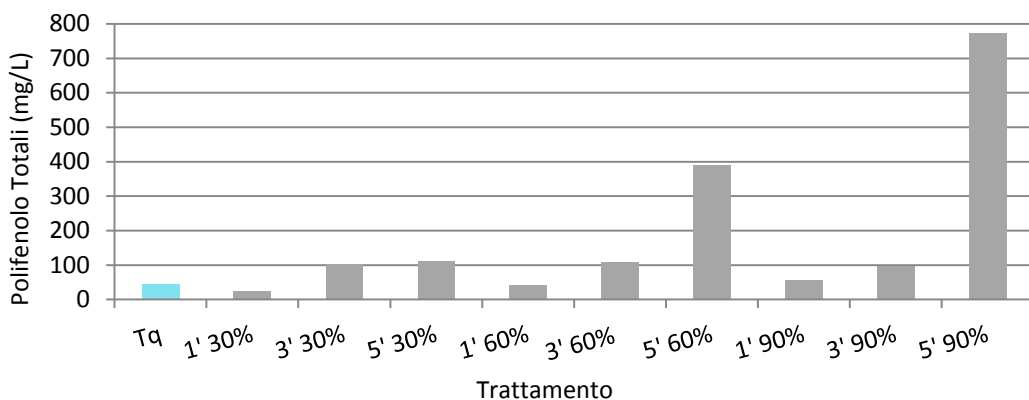


Figura 28: Contenuto dei polifenoli totali (mg/L) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

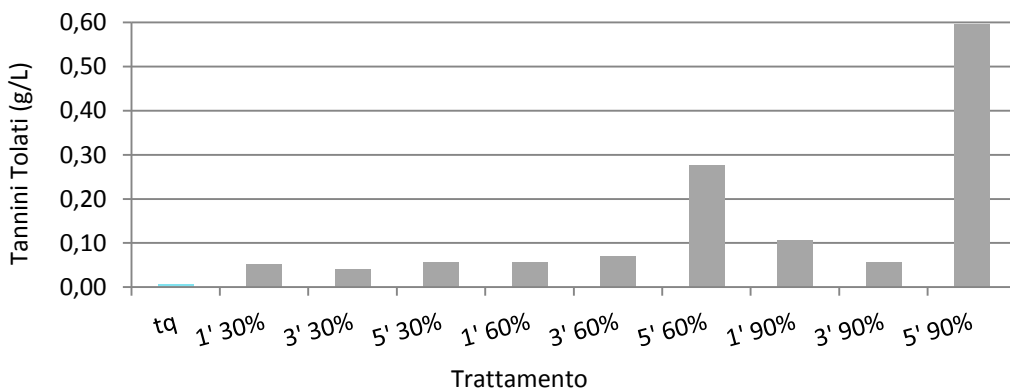


Figura 29: Contenuto in tannini totali (g/L) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

Per quanto riguarda i tannini totali, il trattamento ha comportato un effetto positivo sull'estrazione di tali composti per tutti i campioni (Fig. 29). Interessanti sono risultate, in particolar modo, le condizioni di trattamento con i tempi più lunghi (in particolare i trattamenti di 5 minuti al 60% e 90%).

L'indice di gelatina sembra invece esser interessato maggiormente per i campioni sottoposti a trattamenti con amplitudine del 30%, per i quali si è registrato un aumento del valore (Fig. 30) dando una risposta maggiore in termini di astringenza. Andamento analogo si riscontra nei campioni trattati al 90% anche se proporzionalmente più basso. Infine, il fatto che alcuni valori siano risultati negativi potrebbe essere legato ad una mancata risposta analitica; tali indici infatti sono stati misurati su una matrice diversa dal vino, sul quale sono stati messi a punto da Glories e per questo motivo, a volte, possono dare risultati di difficile interpretazione.

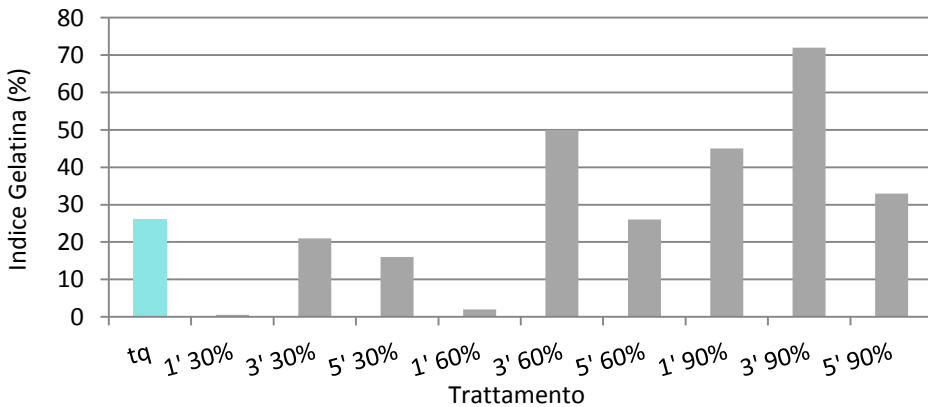


Figura 30: Valori dell'indice di gelatina (%) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

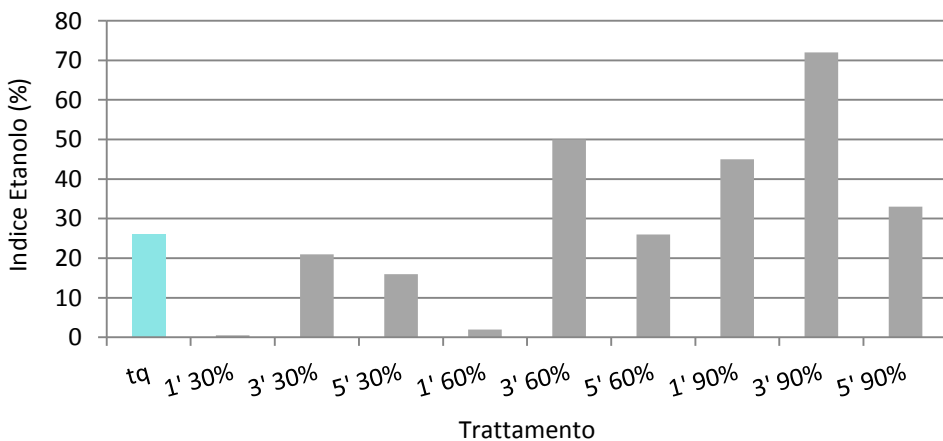


Figura 31: Valori dell'indice di etanolo (%) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

I dati relativi all'indice di etanolo sono risultati poco rappresentativi (Fig. 29), probabilmente per il fatto che le condizioni applicate non sono state tali da estrarre la frazione tannica legata ai polisaccaridi e quindi rilevarla nello stato colloidale o per il fatto di un mancato effetto degli ultrasuoni considerata l'eterogeneità della matrice trattata.

Alcuni dei parametri oggetto di indagine sono stati influenzati dai due fattori, livello di amplitudine e tempo del trattamento ad ultrasuoni, con effetti singoli o di interazione. L'analisi della varianza effettuata sui parametri analitici in relazione alle diverse condizioni amplitudine/tempo di trattamento ha evidenziato differenze significative relativamente al contenuto di polifenoli, di tannini totali, e dei tannini presenti allo stato colloidale (indice di etanolo) (Tab. 11). A prescindere dal livello di amplitudine (%) e dal tempo, invece, non sono state riscontrate differenze significative relativamente al livello di astringenza (indice di gelatina).

Il modello illustrato presenta, per i parametri visti, alti valori dei coefficienti di determinazione ($R^2 > 0,8$) indice della validità del metodo.

	Polifenoli Totali	Tannini Totali	Indice Gelatina	Indice Etanolo
F	8,04762	5,89145	0,097503	16,8741
p	0,020	0,037	0,988	0,004
R²	0,889474	0,854893	0,0888407	0,944053
R² Adj.	0,778947	0,709785	-0,822318	0,888106
Q²	0,0618036	0,0401737	-0,843785	0,38582
Validità modello	0,154489	0,391978	0,864547	0,934218
Riproducibilità	0,987348	0,956706	-0,2	0,8256

Tabella 11: Analisi della varianza dei parametri di regressione del modello predittivo per i diversi parametri. In grassetto sono riportate le differenze significative ($p \leq 0,05$).

Dai grafici seguenti (Fig. 32), infine, è possibile valutare l'effetto del livello di amplitudine e del tempo di sonicazione sui parametri risultati statisticamente significativi: modulando i due fattori, infatti, è possibile ottimizzare i trattamenti al fine di ottenere effetti analoghi.

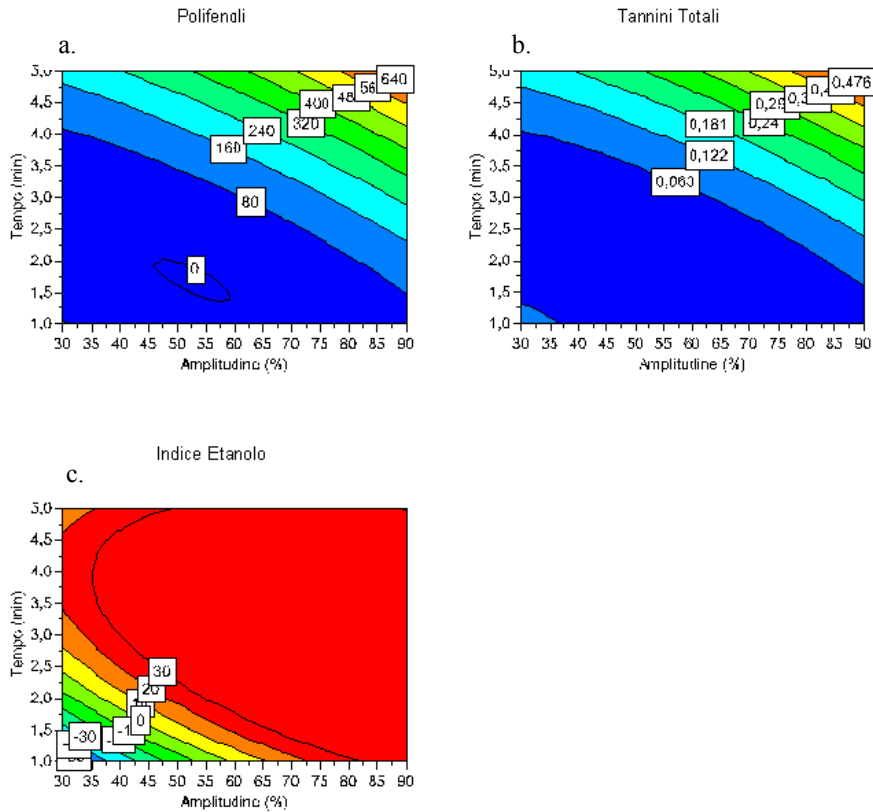


Figura 32: Grafici della superficie di risposta rappresentanti l'effetto dell'amplitudine (%) e del tempo di sonicazione (min) su polifenoli totali (a) tannini totali (b) e sull'indice di etanolo (c).

3.4.2.2 Effetto degli US sui vinaccioli provenienti da oleificio

La prova preliminare (B) è stata condotta sui vinaccioli provenienti dall'oleificio. A fine trattamento è stata misurata la temperatura massima raggiunta nel campione. Per tutti i campioni si nota un aumento dell'indice di polifenoli totali, più evidente per i trattamenti al 30% di amplitudine (Fig. 33).

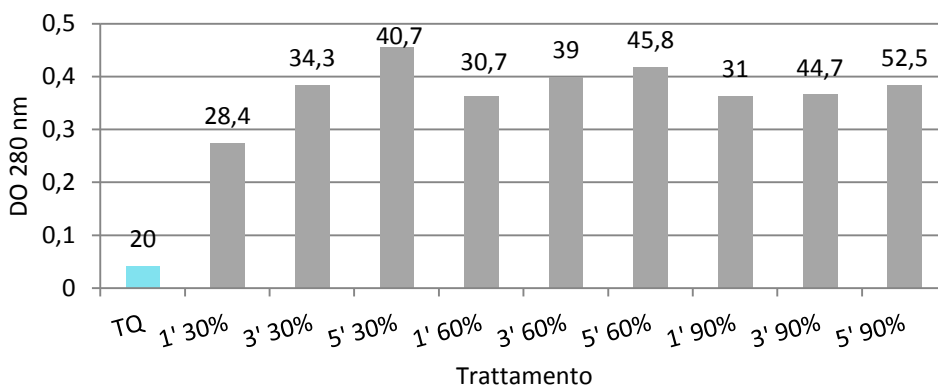


Figura 33: Valori dell'indice di polifenoli totali (DO 280 nm) dei campioni sottoposti ad US e del campione di riferimento (Tq), con le rispettive temperature massime rilevate (°C) riportate in etichetta dati.

Nei seguenti grafici (Fig. 34, 35, 36, 37, 38 e 39) si riportano i dati relativamente del contenuto in tannini totali, polifenoli totali, indice di etanolo, indice di gelatina, torbidità e particle size.

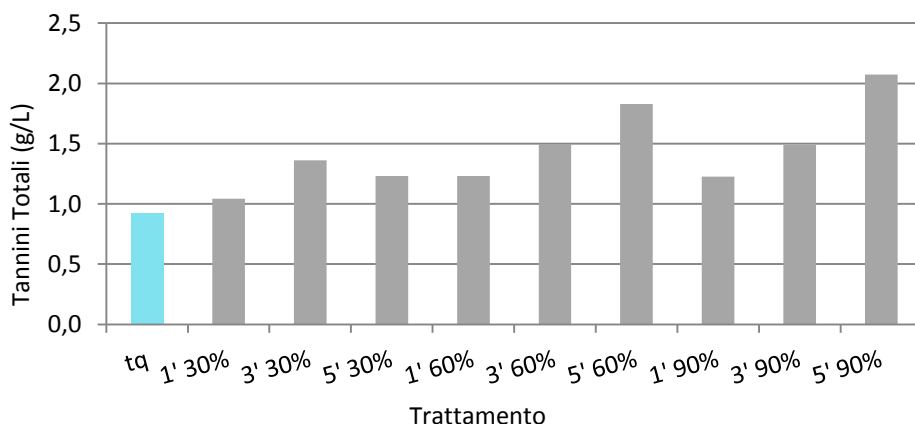


Figura 34: Contenuto in tannini totali (g/L) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

Relativamente alla concentrazione dei tannini totali estratti (Fig. 34) si osserva un andamento crescente sia all'aumentare dei tempi di trattamento che dell'amplitudine, come già visto nella prova A. Tutti i campioni trattati presentano un contenuto in tannini totali superiore al campione di riferimento, evidenziando pertanto l'effetto positivo degli ultrasuoni nei confronti dei fenomeni estrattivi di tali sostanze.

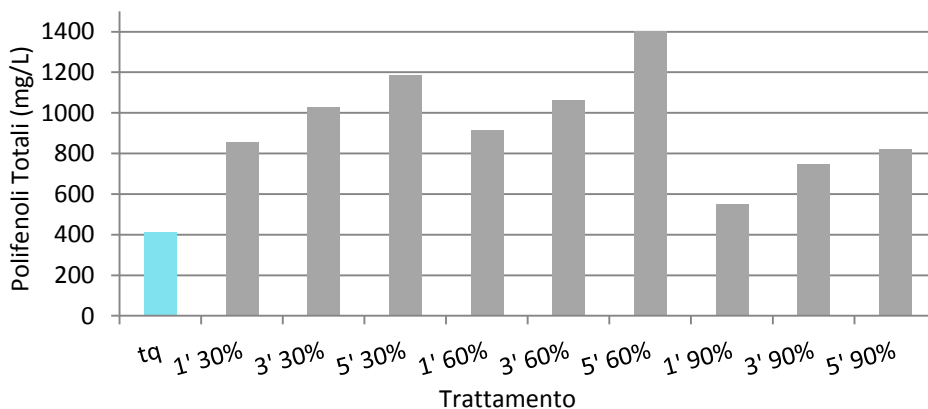


Figura 35: Contenuto dei polifenoli totali (mg/L) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

L'andamento del contenuto di polifenoli estratti dai campioni sottoposti a trattamento varia al variare del tempo: più lunghi sono i tempi di trattamento, maggiori sono le concentrazioni delle sostanze estratte (Fig. 35). Non vi sono, invece, relazioni con le diverse percentuali di amplitudine; si nota, infatti, che i trattamenti condotti al 30% di amplitudine hanno un effetto estrattivo maggiore rispetto ai campioni sottoposti ad un trattamento con amplitudine del 90%. Nel complesso, i risultati ottenuti confermano la cinetica già evidenziata nella prova precedente, anche se con andamento diverso: nei vinaccioli da oleificio questa risulta minore, probabilmente a causa dello stress delle condizioni di lavorazione a cui i vinaccioli sono stati precedentemente sottoposti.

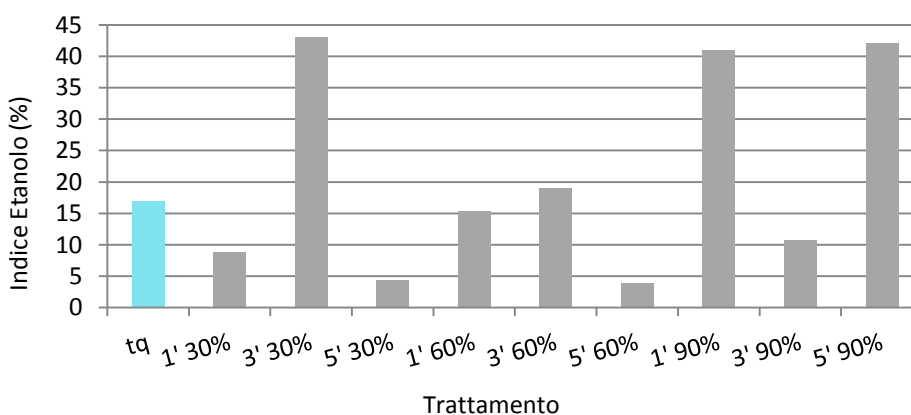


Figura 36: Valori dell'indice di etanolo (%) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

L'indice di etanolo (Fig. 36) ha mostrato valori in parte discordanti rispetto a quelli rilevati precedentemente; probabilmente per la diversa natura della materia prima. In

questo caso la presenza di tannini allo stato colloidale non è legata ad una estrazione correlata alle condizioni del trattamento ad ultrasuoni.

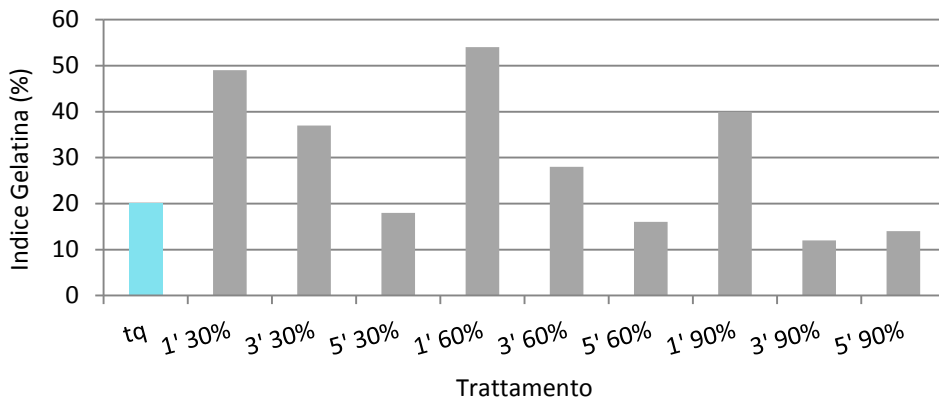


Figura 37: Valori dell'indice di gelatina (%) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (ta).

I valori dell'indice di gelatina (Fig. 37) più alti sono stati registrati per i trattamenti più brevi, diminuiscono infatti all'aumentare del tempo di trattamento e della percentuale di amplitudine come riscontrato per i trattamenti 5' 60%, 3' e 5' 90%. Questo indica che un trattamento breve potrebbe rappresentare condizione sufficiente per il rilascio dei tannini; dal momento che non si evidenziano effetti nei tempi più lunghi.

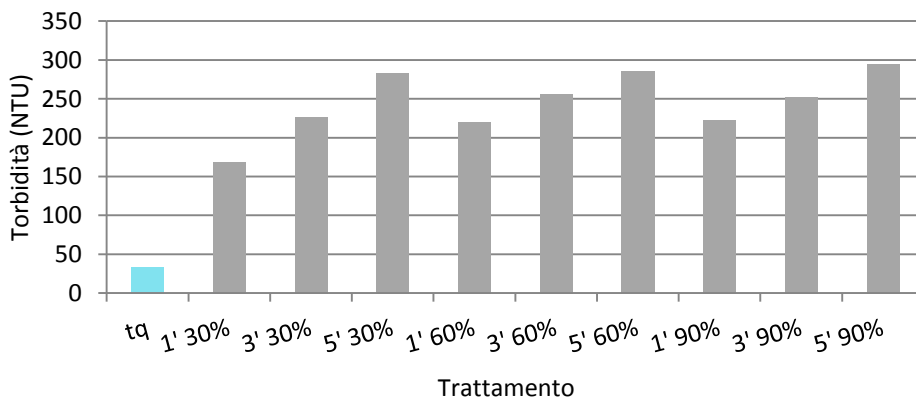


Figura 38: Torbidità (NTU) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (ta).

Per quanto riguarda la torbidità (Fig. 38), è stato riscontrato un aumento relativo ai campioni sottoposti alle condizioni di trattamento più intense. Come conseguenza del trattamento si è registrata inoltre una maggior concentrazione di particelle presenti in

sospensione. Gli US, provocando la disgregazione cellulare, permettono il rilascio nella matrice dei diversi composti; da questo può derivare un aumento della torbidità del mezzo stesso.

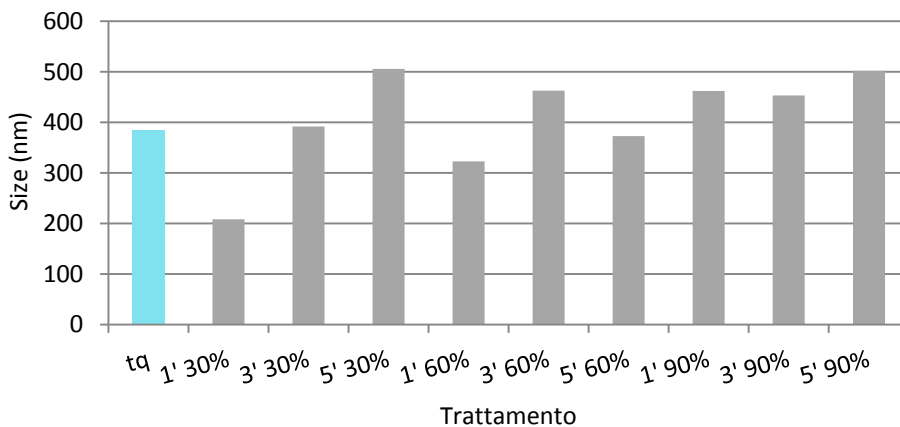


Figura 39: Diametro delle particelle in sospensione (nm) dei campioni sottoposti a trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

La variazione del diametro delle particelle è riportata in Fig. 39: all'aumentare del tempo di trattamento, aumenta il diametro delle particelle disperse probabilmente perché il rilascio in soluzione dei vari composti, dovuto dagli ultrasuoni, crea le condizioni per una maggiore o più facilitata aggregazione tra le stesse. A parità di tempo di trattamento, al variare dell'amplitudine si riscontra un aumento del diametro delle particelle, proporzionale per i campioni ad 1', con poche differenze nei campioni a 3', ed una situazione diversa per i trattamenti a 5', che presentano valori correlabili per le amplitudini del 30% ed 90%, ma più bassi per quelle del 60%.

L'analisi della varianza effettuata sui vari parametri analitici, in relazione alle diverse condizioni amplitudine/tempo di trattamento, ha evidenziato differenze significative relativamente al contenuto di polifenoli e tannini totali, all'indice di polifenoli totali, alla torbidità e all'astringenza (indice di gelatina) (Tab. 12). A prescindere dal livello di amplitudine (%) e dal tempo, invece, non sono state riscontrate differenze significative relativamente ai tannini presenti allo stato colloidale (indice di etanolo).

	Indice Polif. Totali	Tannini Totali	Polifenoli Totali	Indice Etanolo	Indice Gelatina	Torbidità
F	6,60027	9,52685	7,97468	0,273944	10,9856	40,5113
p	0,029	0,014	0,020	0,909	0,010	0,000
R²	0,868426	0,905005	0,888575	0,215036	0,916566	0,97591
R² Adj.	0,736851	0,81001	0,777151	-0,56992	0,833133	0,95182
Q²	0,419196	0,58336	0,346084	-0,06942	0,711488	0,527089
Validità modello	0,947756	0,705183	0,938438	0,802498	0,608154	0,199941
Riproducibilità	0,558289	0,896616	0,644676	-0,2	0,939618	0,99669

Tabella 12: Analisi della varianza dei parametri di regressione del modello predittivo per i diversi parametri. In grassetto sono riportate le differenze significative ($p \leq 0,05$).

Dai grafici seguenti (Fig. 40) è possibile stimare l'effetto del livello di amplitudine e del tempo di sonicazione sui parametri risultati statisticamente significativi. Per ogni parametro è possibile ottimizzare le condizioni per ottenere gli stessi risultati con risparmio di tempo/energia.

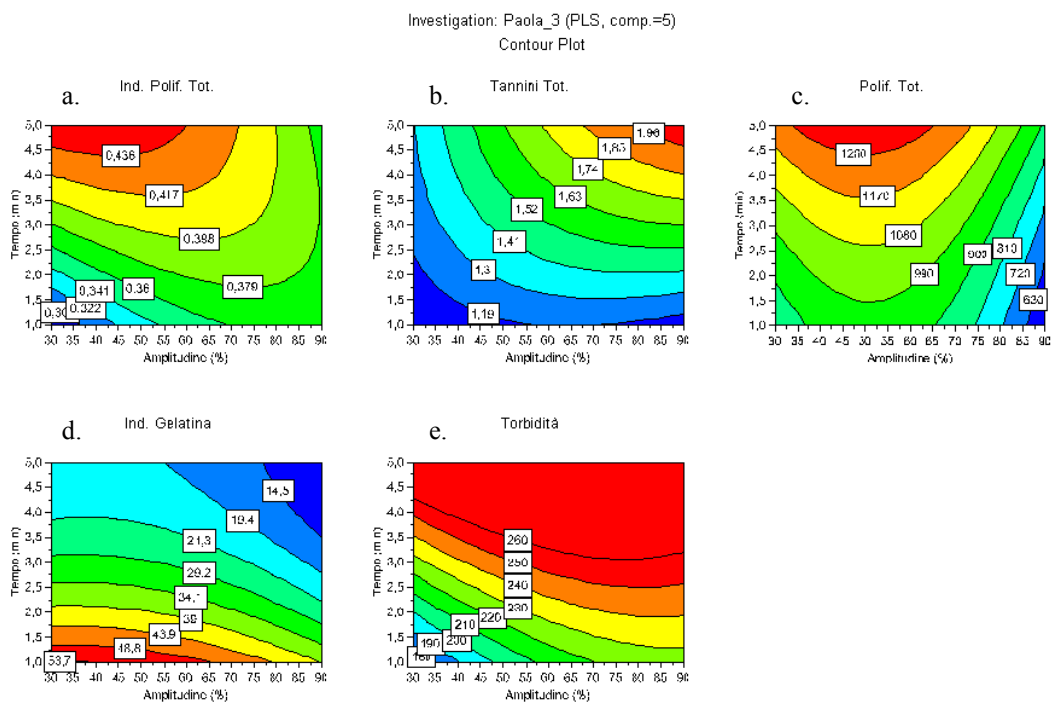


Figura 40: Grafici della superficie di risposta rappresentanti l'effetto dell'amplitudine (%) e del tempo di sonicazione (min) su indice di polifenoli totali (a) tannini totali (b), polifenoli totali (c), indice di gelatina (d) e torbidità (e).

3.4.2.3 Estrazione dei composti fenolici mediante US da vinaccioli da oleificio trattati in vino bianco

La terza prova (C) è stata effettuata su vinaccioli provenienti dall'oleificio in vino bianco Friulano. In questo caso i trattamenti sono stati effettuati in triplo e confrontati con un campione di riferimento conservato a temperatura di 20 °C. I risultati sono stati elaborati statisticamente mediante Analisi della Varianza (ANOVA) utilizzando il pacchetto STATISTICA per Windows, versione 7.0.

Condizioni di Trattamento	Temperatura (°C)
tq	20
1' 30%	27,7
3' 30%	38,2
5' 30%	46,8
1' 60%	30,7
3' 60%	43,6
5' 60%	54,3
1' 90%	34,7
3' 90%	53,8
5' 90%	63,6

Tabella 13: Media delle temperature massime (°C) rilevate nei campioni a fine trattamento.

I grafici seguenti riportano i valori medi dei parametri presi in considerazione.

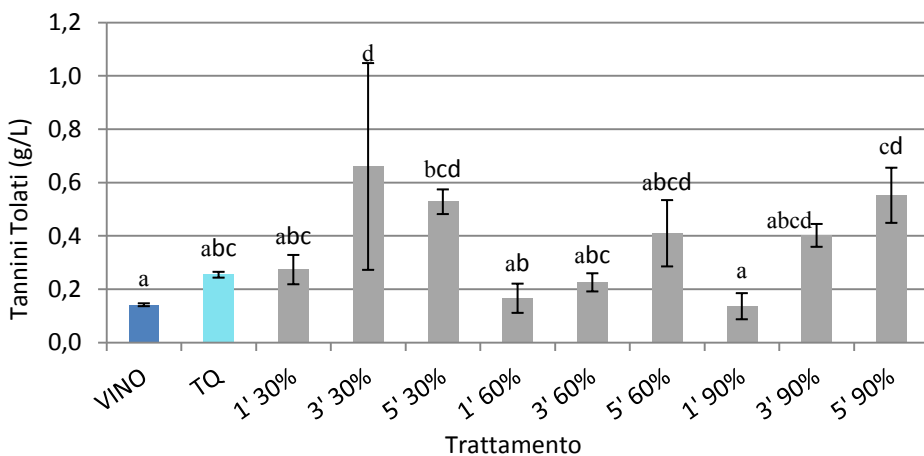


Figura 41: Media della concentrazione dei tannini totali (g/L) per i campioni sottoposti a trattamento ad US, per il campione di riferimento (TQ) e per il mezzo di dispersione (VINO). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0.05$.

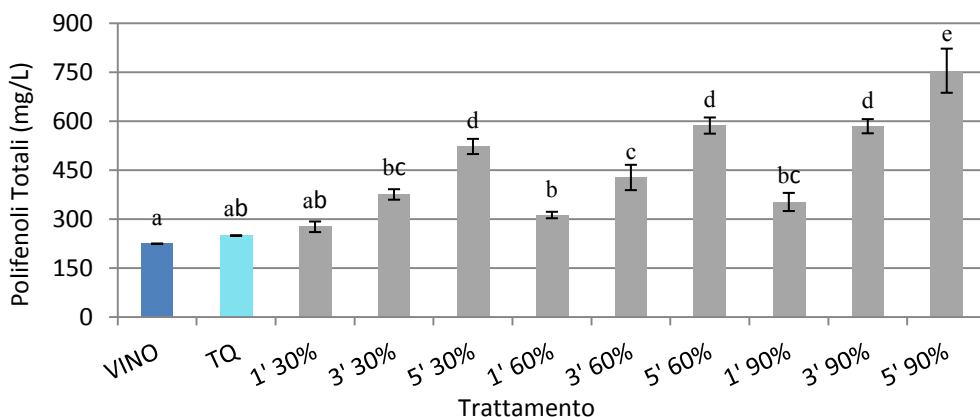


Figura 42: Media dei valori dei polifenoli totali (mg/L) rilevati sul vino, sul campione di riferimento (TQ) e sui campioni sottoposti a trattamento con US. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

I valori dei polifenoli totali (Fig. 42) confermano quanto visto dalle prove preliminari: è stato registrato un aumento del contenuto di polifenoli estratti al variare sia del tempo di trattamento che della percentuale di amplitudine applicata. Le estrazioni maggiori sono state riscontrate per i campioni sottoposti a trattamenti con i tempi e le amplitudini più elevate: sono risultati statisticamente significativi infatti i trattamenti di 5 minuti al 30%, di 3 e 5 minuti al 60% e al 90%.

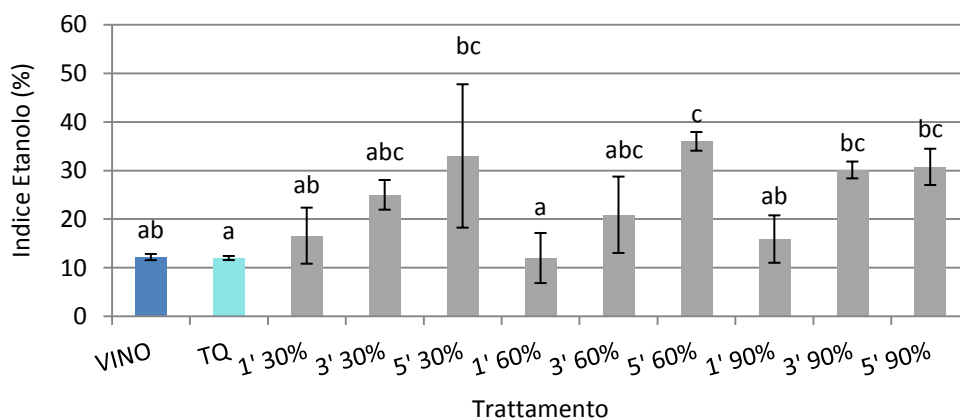


Figura 43: Media dei valori dell'indice di etanolo (%) rilevati sul vino, sul campione di riferimento (TQ) e sui campioni sottoposti a trattamento ad US. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'indice di etanolo (Fig. 43), quindi l'estrazione dei polisaccaridi, mostra un andamento crescente all'aumentare del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento.

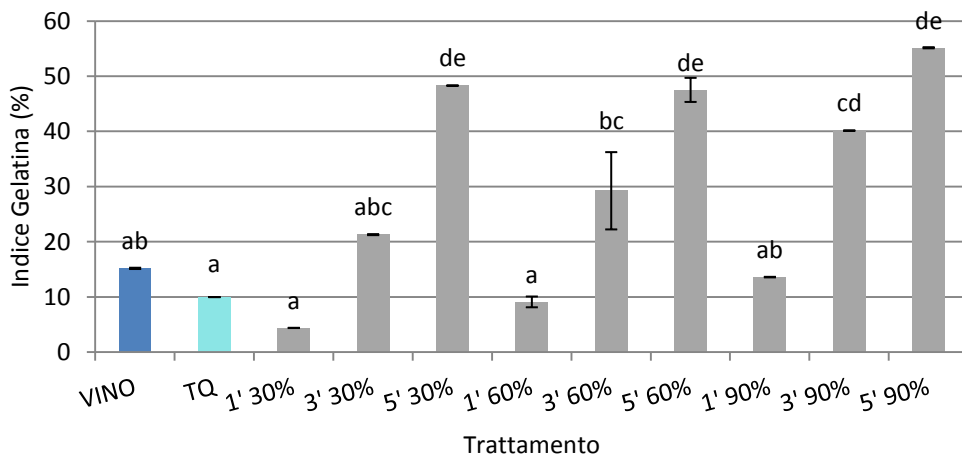


Figura 44: Media dei valori dell'indice di gelatina (%) rilevati sul vino, sul campione di riferimento e sui campioni sottoposti a trattamento ad US. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

I valori dell'indice di gelatina (Fig. 44) hanno mostrato un andamento significativo. Tali valori indicano che, con trattamenti più spinti, si ottiene un'estrazione maggiore e di conseguenza una maggiore percentuale di tannini astringenti.

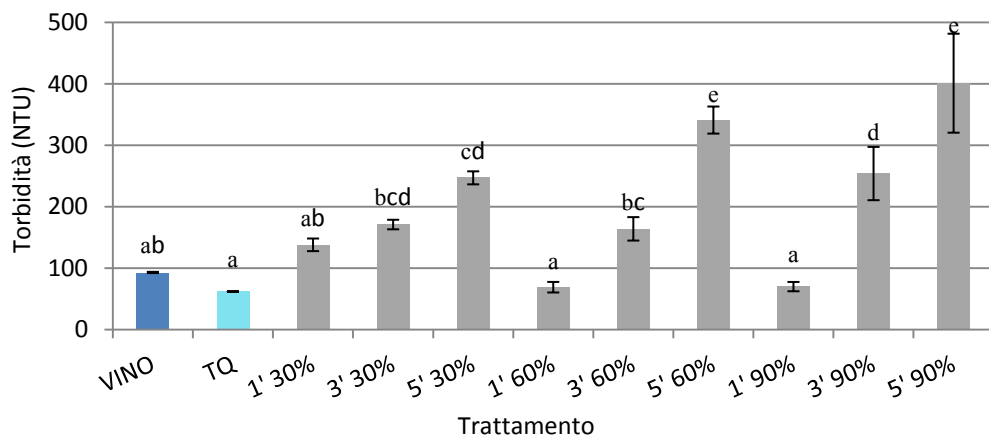


Figura 45: Media dei valori della torbidità (NTU) rilevati sul vino, sul campione di riferimento (TQ) e sui campioni sottoposti a trattamento ad US. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

I valori di torbidità (Fig. 45) aumentano all'aumentare dell'intensità e dei tempi di trattamento.

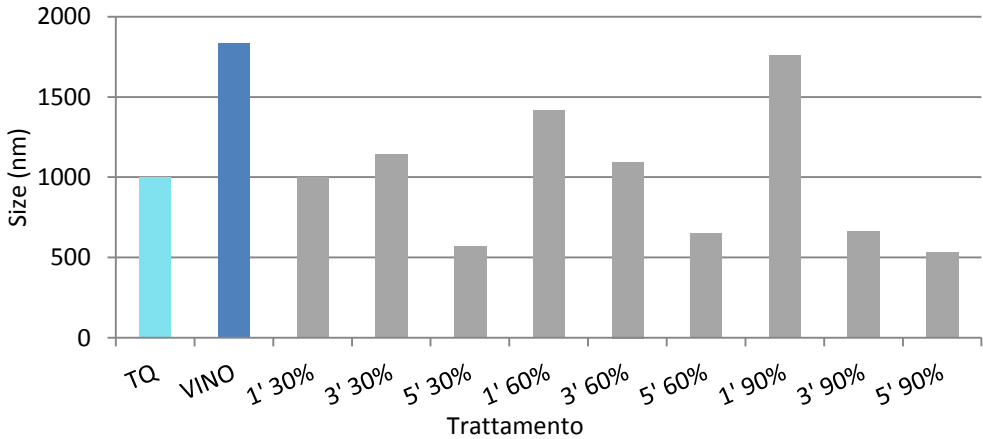


Figura 46: Diametri delle particelle disperse (nm) rilevati sul vino, sul campione di riferimento (TQ) e sui campioni sottoposti a trattamento ad US. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

In linea generale si nota una diminuzione del diametro delle particelle (Fig. 46), diversamente da quanto rilevato precedentemente nella prova di estrazione in similvino; diametro che aumenta all'aumentare della percentuale di amplitudine e dei tempi di trattamento. Tale variazione potrebbe essere dovuta ad un effetto di disgregazione cellulare della matrice solida e quindi alla dispersione nello stato colloidale di particelle di dimensioni minori.

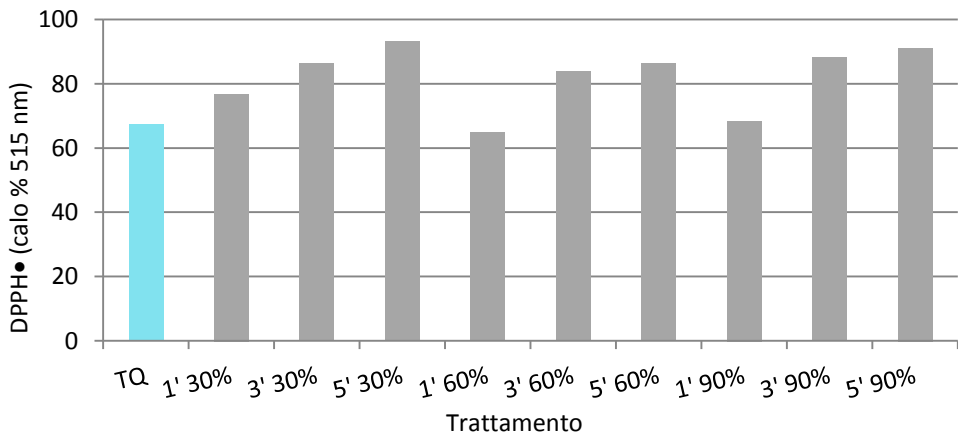


Figura 47: Potere antiossidante (calo% 515 nm) rilevato sul campione di riferimento (TQ) e sui campioni sottoposti a trattamento con US.

Rispetto al campione di riferimento si riscontra un aumento del potere antiossidante (Fig. 47) di tutti i campioni sottoposti a trattamento, ad eccezione dei campioni trattati 1 minuto al 60% e 90% di amplitudine che mantengono valori prossimi al campione di riferimento. L'andamento è proporzionale se considerate le tre diverse amplitudini.

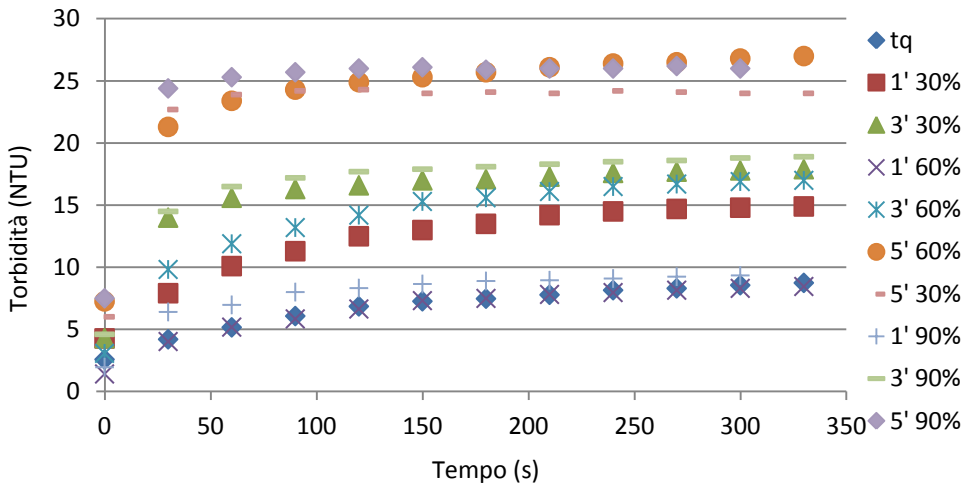


Figura 48: Evoluzione nel tempo della torbidità provocata dalle interazioni tra la BSA e le procianidine estratte dai vinaccioli mediante trattamento ad US e del campione di riferimento (tq).

Il modello illustrato da De Freitas rappresenta un valido approccio per l'interpretazione delle interazioni tannino-proteina. La formazione di complessi insolubili tra i tannini e la BSA nel tempo aumenta progressivamente fino a raggiungere un plateau.

Nei campioni sottoposti a trattamento, si nota un repentino aumento della torbidità, dovuto alla rapida formazione dei complessi tannino-proteina, nei primi 30 secondi, che si manifesta in maniera più evidente nei campioni sottoposti ai trattamenti di 5 minuti, indipendentemente dall'amplitudine. Questo induce a ipotizzare una maggiore affinità tra la BSA e le procianidine oligomere estratte probabilmente in seguito a trattamenti più lunghi. Dopo il minuto si raggiunge il plateau (Fig. 48). Il comportamento lineare è caratteristico delle procianidine oligomere (De Freitas, 1995).

I parametri relativi al potere tannante e all'efficacia tannante aumentano all'aumentare del tempo di trattamento: è pertanto probabile che il tempo di trattamento influenzi l'estrazione di procianidine con peso molecolare via via maggiore.

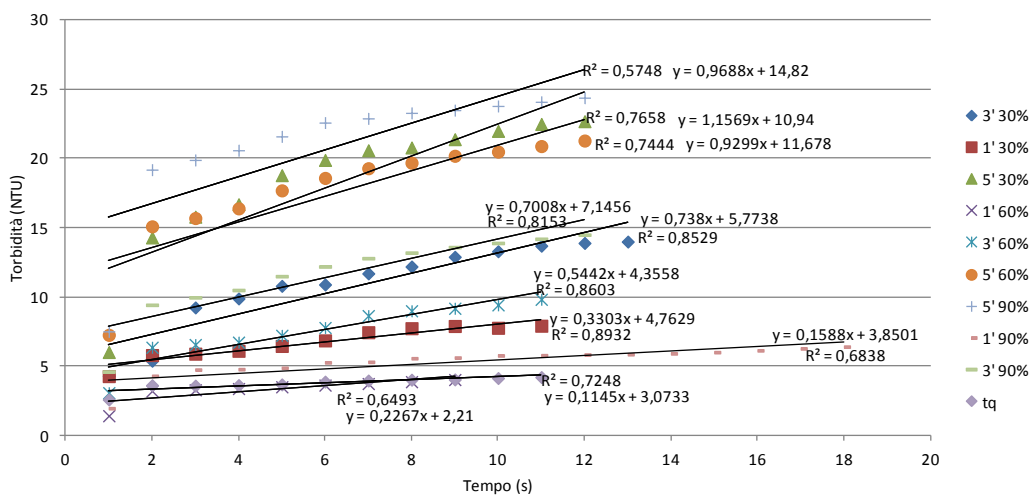


Figura 49: Evoluzione nel tempo della torbidità provocata dalle interazioni tra la BSA e le procianidine estratte dai vinaccioli mediante trattamento ad US e del campione di riferimento.

La Fig. 49 dà una visione più immediata dell'efficacia tannante, rappresentata dalla pendenza della retta. Il campione di riferimento presenta un k pari a 0,1145 NTU/s rispetto allo 0,9688 NTU/s dei campione trattato per 5 minuti alla massima amplitudine, che quindi presenta un efficacia tannate molto più importante.

4 CONCLUSIONI

Le prove condotte su diverse varietà di uva mostrano come, con pochi minuti di trattamento a diverse amplitudini, si possa conseguire un miglioramento dell'estrazione delle sostanze polifenoliche, e, in termini di tempo, una progressiva riduzione fino al 30% della durata rispetto alla macerazione classica. In termini pratici, questo rappresenta una ottimizzazione della tecnologia di macerazione e quindi una migliore gestione della vinificazione delle uve rosse. Sfruttando questa tecnologia, è ipotizzabile un pre-trattamento in continuo del pigiato di uve rosse, prima del caricamento del vinificatore.

La sonicazione delle uve fresche inoltre ha comportato un aumento del volume totale del succo dopo pressatura.

Anche i risultati delle prove di estrazione effettuate sui vinaccioli potrebbero infine trovare un riscontro applicativo. La sperimentazione ha provato l'efficacia estrattiva sia al variare delle condizioni operative, sia della materia prima oggetto di studio. Nel complesso si è registrata l'estrazione di quantità di sostanza polifenoliche via via crescenti all'aumentare della percentuale di amplitudine e del tempo di trattamento.

L'impiego degli ultrasuoni potrebbe rappresentare, in futuro, un ausilio tecnologico per la produzione industriale di tannini in condizioni che rispettino maggiormente l'integrità e favoriscano operazioni semplici, ripetibili, che riducano il fabbisogno energetico del processo e dei costi sia ambientali che economici.

5 BIBLIOGRAFIA

Amrani Joutei K. (1993). Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin: étude de leur extractibilité. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

Amrani Joutei K., Glories Y. (1994). Étude en conditions modélées de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 23, 25-37.

Arfelli G. (1989). La tecnica della vinificazione in rosso. *Vignevini* 3, 25-36.

Ariga T. (2004). The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors*, 21, 1-4, 197-201.

Auw J.M., Blanco V., O'Keefe S.F., Sims C.A. (1996) Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 3, 279-286.

Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148, 2-3, 187-197.

Bate-Smith E.-C. (1954). Leucoanthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanin formed from leucoanthocyanins in plant tissues. *Biochemical Journal*, 11, 1153-1156.

Berg H.W., Akiyoshi M. (1958). Further studies of the factors affecting the extraction of color and tannin from red grapes. *Journal of Food Science* 23, 5, 511-517.

Bourzeix M., Weyland D., Heredia N. (1986). A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other By-products of the vine. *Bulletin de l'OIV* 59, 1171-1254.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.

Busse-Valverde N., Bautista-Ortín A.B., Gómez-Plaza E., Fernández-Fernández J. I., Gil-Muñoz R. (2012). Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *European Food Research and Technology* 235, 1117-1123.

Cabredo-Pinillos S., Cedron-Fernandez T., Gonzalez-Briongos M., Puente-Pascual L., Saenz-Barrio C. (2006). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: optimization of the method. *Talanta* 69, 1123-1129.

Cacace J.E., Mazza G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolics from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59, 379-389.

Cadot Y., Miñana-Castelló M.T., Chevalier M. (2006). Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9206-9215

Carrera C., Ruiz-Rodríguez A., Palma M., Barroso C.G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta* 723, 100-104.

Castino M, Di Stefano R., Bosso A. (1990). Terpeni presenti in mosti di moscato ottenuti con ammostamento per decompressione istantanea (Sclat-System). *L'enotecnico* 26, 10, 61-65.

Chemat F., Zill-e-Huma, Khan M.K. (2011). Applications of ultrasounds in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochemistry* 18, 813-835.

Cocito C., Gaetano G., Delfini C. (1995). Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry* 52, 311-320.

Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics , high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 85-91.

Couasnon M.B (1999). Une nouvelle techniqueLa macération préfermentaire à froid - Extraction à la neige carbonique Ire partie. Résultats oenologiques. *Revue des oenologues* 26, 92, 26-30.

De Freitas V. (1995). Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et des propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

Di Stefano R., Borsa D., Gentilini N. (1994). Estrazione degli antociani dalle bucce dell'uva durante la fermentazione. *L'Enotecnico* 6, 75-83.

- Doco T., Williams P., Pauly M., O'Neill M.A., Pellerin P. (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 53, 253-261.
- Du Y., Guo H., Lou H. (2007). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5, 1695-1701.
- Ducruet J.A., Dong R.M., Canal-Llauberes, Glories Y. (1997). Influence des enzymes pectolytiques sélectionnées pour l'oenologie sur la qualité et la composition des vins rouges. *Revue Française de Oenologie*, 155, 16-19.
- El Darra N., Grimi N., Maroun R.G., Louka N., Vorobiev E. (2013). Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *European Food Research & Technology* 236, 47-56.
- Feuillat M. (1997). Vinification du Pinot Noir en Bourgogne par macération préfermentaire à froid, *Revue des Oenologues* 24, 29-31.
- Fregoni M., Fregoni C., Ferrarini R., Spagnoli F., 2004. *Chimica viticolo-enologica*. Edizioni Reda, Torino.
- Gerbaux V., Vuittenez B., Vincent B., L'Heveder A. (2002). Macerazione prefermentativa a freddo e macerazione finale a caldo su Pinot Nero in Borgogna, *Vinidea.net* 4, 1-5.
- Ghafoor K., Choi Y.H., Jeon J.Y., Jo I.H. (2009). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 11, 4988-4994
- Ghassempour A., Heydari R., Fakhari A.R., Rassouli A., Davies N., Aboul-Enein H.Y. (2008). Study of New Extraction Methods for Separation of Anthocyanins from Red Grape Skins: Analysis by HPLC and LC-MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31, 17, 2686-2703.
- Glories, Y. (1974). Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. I. Précipitation par l'aldéhyde formique et par l'acide chlorhydrique concentré. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 8, 57-78.
- Glories Y. (1978). Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

Glories Y. (1984). La couler des vins rouges, 1e partie. Les equilibres des anthocyanes et tannins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 195-217.

Katiyar Santosh K. (2008). Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular nutrition & food research* 52, 1, 71-76.

Lea A. G.H., Arnold G M. (1978). The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29,471-477.

Lea A. G.H. (1992). Flavor, Color, and Stability in Fruit Products: The Effect of Polyphenols. In *Plant Polyphenols*, Hemingway, R. W., Laks, P. E., Eds.; Plenum Press: New York, 827-847.

Lecas M., Brillouet J.M. (1994). Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry* 35, 1241-1243.

Li Y., Skouroumounis G.K., Elsey G.M., Taylor D.K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry* 129, 570-576.

López N., Puértolas E., Condón S., Álvarez I., Raso J. (2008). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 477-482.

López N., Puertolas E., Hernández-Orte P., Alvarez I., Raso J. (2009) Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *Food Science and Technology* 42, 1225-1231.

Lu Y., Foo L.Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry* 65, 1-8.

Masuzawa N., Ohdaira E., Ide M. (2000). Effects of ultrasonics irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics* 39, 2978-2979.

Monagas M., Garrido I., Bartolomé B., Gómez-Cordovés C. (2006). Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta* 463, 401-410.

Nawaz H., Shi J., Mittal G.S., Kakuda Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 48, 2, 176-181.

Novak I., Janeiro P., Seruga M., Oliveira-Brett A.M. (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta* 630, 2, 107-115.

Ozmianski J., Romeyer F.M., Sapis J.C. and Machenix J.J. (1986). Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 7-12.

Parenti A., Spugnoli P., Calamai L., Ferrari S., Gor, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research & Technology* 4, 360-366.

Parker M., Smith P.A., Birse M., Francis I.L., Kwiatkowski M.J., Lattey K.A. (2007). The effect of pre- and post-ferment additions of grape derived tannin on Shiraz wine sensory properties and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13, 1, 30-37.

Perez-Magarino S; Gonzalez-San Jose M.L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 96, 2, 197-208.

Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J., Nuñez M.J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different compounds of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2111-2117.

Pinelo M., Arnous A., Meyer A.S. (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* 17, 579-590.

Revilla I., Pérez-Magariño S., González-SanJosé M.L., Beltrán S. (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by HPLC e DAD e MS. *Journal of Chromatography A* 847, 83-90.

Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de la Société Chimique de France* 9, 2649-2652.

Ribéreau Gayon P. (1970). Les dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* 52, 627-631.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (1998). *Traité d'Oenologie. Chimie du vin, stabilisation et traitements*. Vol. II. Dunod, Paris.

Ricardo da Silva J. M., Belchior A.P., Spranger M.I., Bourzeix M. (1992a). Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. *Science des Aliments*, 12, 223–237

Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* 1012, 119–128.

Sacchi K.L., Bisson L.F., Adams D.O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 197-206.

Salas E., Fulcrand H., Meudec E., Cheynier V. (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7951-7961.

Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 7, 1094-1117.

Shi J., Yu J., Pohorly J., Young JC, Bryan M., Wu Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food Agriculture and Environment* 1, 2, 42-47.

Singleton V.L., Draper D.E. (1964). The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 15, 34–40.

Sivaprakasapillai B., Edirisinghe I., Randolph J., Steinberg F., Kappagoda T. (2009). Effect of grape seed extract on blood pressure in subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 58, 12, 1743-1746.

Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43, 509-512.

Spigno G., Tramelli L., De Faveri D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81, 1, 200-208.

Sudraud P. (1958). Intérpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annales of Technology and Agriculture* 7, 203-208.

Sun B.S., Spranger M.I., Roque-do-Vale F., Leandro M.C., Belchior P. (2001). Effect of different winemaking technology on phenolic composition in Tinta Miuda red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5809-5816.

Tevdoradze D.M. (1983). Ultrasonic treatment of Kachetian-type table wine. *Vinodelije i vinogradarstvo SSSR* 1, 22-23.

Timberlake C.F., Bridle P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 27, 3, 97-105.

Tyndall J. (1870). Notes of a course of nine lectures on light. Kessinger Publishin

Vinatoru M. (1999). Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and the constituents. *Advances in Sonochemistry* 5, 216.

PARTE SECONDA

INDAGINE SUGLI EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SULLE FECCE FINI E SULLA STABILITÀ PROTEICA DEI VINI BIANCHI

1 PREMESSA BIBLIOGRAFICA

1.1 STABILITÀ PROTEICA

1.1.1 Le proteine in enologia

Lo studio della componente proteica presente nell'uva e nel vino è da sempre un argomento di forte attualità, in quanto la comprensione di importanti aspetti legati sia alla biologia della vite sia alla tecnologia enologica possono essere spiegati solo attraverso lo studio della natura e delle proprietà delle proteine coinvolte. Molte delle scoperte fatte su questo argomento sono sicuramente dovute al forte progresso delle tecniche analitiche messe a punto per l'analisi delle proteine negli ultimi anni (Curioni *et al.*, 2008).

Le proteine dei vini sono composti che potenzialmente possono dare instabilità chimico-fisica al sistema in funzione delle condizioni del vino e delle loro caratteristiche strutturali. Se il sistema rimane inalterato, le proteine permangono in soluzione stabile, ma se interviene almeno un fattore di instabilità, il vino si intorbida. In particolare, la sequenza degli amminoacidi e la disposizione sterica della proteina comportano notevole reattività e differenziazione della struttura molecolare delle diverse molecole (Celotti, 2005).

Le proteine sono costituenti strutturali e funzionali essenziali del mondo vivente; macromolecole di peso molecolare superiore a 10.000 Da, formate da una sequenza definita di amminoacidi che ne determina la struttura tridimensionale. In funzione del pH, esse possiedono carica positiva o negativa. Dal momento che le proteine vengono precipitate dai tannini, nei vini rossi praticamente non ne sono presenti allo stato libero, al contrario dei vini bianchi e rosati, i quali presentano tenori di tali sostanze che possono raggiungere valori di qualche centinaio di mg/L, e che provengono essenzialmente dall'uva (Ribéreau-Gayon, 1998). Il contenuto di proteine nei vini bianchi, pur non essendo elevato (15 - 300 mg/L), ha importanti conseguenze sia tecnologiche sia qualitative in quanto potrebbe provocare torbidità. Questa particolare frazione di proteine derivate dall'uva resiste alla degradazione e all'adsorbimento durante la fermentazione e l'affinamento, permanendo nel vino finito se non rimossa dal trattamento con bentonite, ed è soggetta a precipitazione in seguito a denaturazione e a formazione di deposito nel vino in bottiglia.

Oltre che per la loro importanza nella stabilità dei vini bianchi, le proteine sembrano essere coinvolte anche in altri aspetti della qualità di un vino; possono, ad esempio,

interagire con i composti aromatici, influenzare la percezione del corpo del vino in bocca, e condizionare la formazione e la stabilità della schiuma nei vini spumanti (Feuillat *et al.*, 1995). Così come la presenza di peptidi può ripercuotersi sulla qualità del vino. Generalmente, questi composti sono dotati di diverse proprietà biologiche (antiossidanti, antimicrobiche, antiipertensive) e chimico-fisiche (surfattanti), ma sono stati finora poco considerati, soprattutto a causa delle difficoltà che si riscontrano per isolarli dai vini (Moreno-Arribas *et al.*, 2002, Curioni *et al.*, 2008).

1.1.2 L'origine delle proteine presenti nel vino

Le proteine del vino sono state oggetto di studio a partire dagli anni '50, anni di inizio della caratterizzazione di tali composti. Bayly e Berg (1967), in seguito alla fermentazione di una soluzione modello, stabiliscono che il contributo del lievito in termini di proteine sia trascurabile. Lee (1986) indica che la maggior fonte di proteine presenti nel vino finito è l'uva e che il tenore totale viene influenzato dalla varietà, dal grado di maturità, e dal clima. Hsu *et al.*, (1987 a; 1987 b) giungono ad una conclusione analoga, anche se ipotizzano che le cellule di lievito possano secernere proteine durante la fermentazione. Dai risultati dei loro lavori su Gewürztraminer e Riesling stabiliscono che le proteine che contribuiscono all'instabilità proteica dei vini sono analoghe a quelle dei mosti, identificate come frazioni proteiche aventi un peso molecolare compreso tra 12,5 e i 30 kDa, con punto isoelettrico (pI) compreso fra 4,1 e 5,8, ed alcune di esse glicosilate. Studi più recenti, Ferreira *et al.* (2000) e Dambrouck *et al.* (2003), confermano, attraverso l'utilizzo delle tecniche immunologiche più moderne, che le proteine presenti nel vino derivino soprattutto dall'uva. Un'altra ipotesi viene proposta da Yokotsuka *et al.* (1991) che analizzando il profilo proteico delle uve di *Vitis vinifera* var. *orientalis* cv. Koshu, e del vino ottenuto dalle stesse uve, al contrario di altri autori, individuano nel vino otto frazioni proteiche non presenti nel succo d'uva e suppongono possano provenire dal lievito.

Ribéreau-Gayon *et al.* (1998 b) riportano che tutti i composti di natura proteica intervengano in misura più o meno intensa nella definizione dell'instabilità dei vini; altri autori invece (Moretti e Berg, 1965), hanno attribuito a specifiche frazioni la causa dell'intorbidamento e sono pervenuti alla conclusione che sia responsabile di questa alterazione solo una parte delle proteine presenti, piuttosto che il contenuto proteico totale. Waters *et al.* (1991, 1992) individuano invece tre principali frazioni proteiche nell'ambito delle proteine termoinstabili isolate da vini ottenuti da *Vitis vinifera* cv. Muscat Gordo Blanco, di massa molecolare variabile tra 24, 32 e 63 kDa. A concentrazione equivalente, tutte le frazioni danno origine a torbidità in seguito a trattamento a caldo, in particolar modo la frazione con peso molecolare 24 kDa da origine al 50% di torbidità in più rispetto alle altre. Al contrario, la frazione di 63 kDa, che risulta essere la più termostabile, è costituita da polisaccaridi.

Queste informazioni portano a ricercare i fattori protettivi nei confronti dei fenomeni responsabili dell'instabilità proteica (Waters *et al.*, 1993). L'analisi della composizione in amminoacidi delle proteine da 24 e 32 kDa dimostra una certa omologia nei confronti rispettivamente di taumatina e chitinasi, ed un elevato grado di similitudine con altre *PR-proteins* (Waters *et al.*, 1996). Ad ulteriore conferma, Tattersall *et al.* (1997) caratterizzano una proteina da 24 kDa (*Vitis vinifera* thaumatin-like protein 1 - VvTL1) ed osservano che è codificata all'interno di una famiglia multigenica presente nel genoma di vite, e che è altamente espressa a partire dall'accumulo di zucchero negli acini d'uva durante la maturazione. È stato anche osservato che l'espressione dei geni codificanti la chitinasi in *Vitis vinifera* cv. Shiraz negli acini d'uva aumenta nel periodo successivo all'invasatura (Robinson *et al.*, 1997). La sintesi e l'accumulo di proteine nelle bacche pertanto procede rapidamente dopo l'invasatura, e parallelamente all'accumulo degli zuccheri (Tattersall *et al.*, 1997). Ciò nonostante, le proteine presenti nel vino non corrispondono che ad una frazione rappresentativa delle proteine presenti nella polpa dell'acino a maturità, poiché molte di queste vengono perse durante la vinificazione (Ferreira *et al.*, 2000). La fermentazione è la causa primaria della differenza nella composizione in proteine tra succo d'uva e vino. Le concentrazioni inferiori, normalmente riscontrabili in un vino, sono principalmente dovute a fenomeni di proteolisi o denaturazione a cui sono soggette le proteine dell'uva durante la fermentazione causati rispettivamente da proteasi e cambiamenti del pH. Infatti, le proteine presenti nel vino al termine della fermentazione sono altamente resistenti all'azione delle proteasi e ai bassi valori di pH, tipici di queste bevande (Waters *et al.*, 1992). Inoltre, è stato stimato che circa la metà del contenuto totale in proteine presenti nel vino è legata ai composti fenolici dell'uva, e durante la vinificazione una parte della frazione solubile precipita per interazione con tannini (Somers e Ziemelis, 1973).

1.1.3 Le proteine presenti negli acini d'uva

Gli acini d'uva contengono un'ampia varietà di proteine, anche se in quantità ridotta rispetto ad altri frutti. La maggior quantità viene sintetizzata dopo l'invasatura, e si accumula durante la maturazione in concomitanza con l'aumento nelle bacche della concentrazione in zuccheri (Tattersall *et al.*, 1997). Con lo sviluppo degli studi di proteomica, sono state identificate le diverse proteine sia nella polpa - cv. Gamay (Sarry *et al.*, 2004) sia nella buccia degli acini - cv. Cabernet sauvignon (Deytieux *et al.*, 2007). Molte delle proteine identificate sono coinvolte nel metabolismo energetico (34%), nelle risposte a stress abiotici e biotici (19%), e nel metabolismo primario (13%) (Sarry *et al.*, 2004).

Più recentemente sono state analizzate mediante approccio proteomico anche le proteine della buccia a tre diversi stadi di sviluppo con il risultato che, alla raccolta, le proteine dominanti sono quelle coinvolte nei meccanismi di difesa, molte delle quali sovraesposte a maturità (Deytieux *et al.*, 2007).

In aggiunta agli enzimi metabolici, un'altra consistente frazione di proteine è costituita dalle cosiddette Pathogenesis-related (PR) proteins (famiglia PR3) e Thaumatin-like proteins (TLP) (famiglia PR5) presenti in concentrazione diversa a seconda delle cultivar (Waters *et al.*, 1996). Varie forme di chitinasi sono presenti in diversi tessuti di *V. vinifera*, ma la maggior attività enzimatica è localizzata nella buccia dell'acino (Derckel *et al.*, 1996). Queste proteine sono coinvolte nei meccanismi di difesa contro gli attacchi da funghi patogeni, essendo in grado di idrolizzare la chitina, costituente strutturale della parete cellulare dei funghi. Nonostante la presenza di diverse isoforme di chitinasi, derivanti dall'espressione di più geni o dalla degradazione di alcune proteine, l'isoforma più importante sembra essere una chitinasi di classe IV, contenente un dominio legante la chitina altamente espressa durante la maturazione della bacca (Robinson *et al.*, 1997). L'altra classe di proteine è costituita dalle Thaumatin-like proteins (TLP) con peso molecolare di circa 24 kDa.

Le Pathogenesis-related (PR) proteins vengono sintetizzate in seguito ad attacco patogeno, ma anche di stimoli ambientali di natura chimica e/o fisica. Di conseguenza, fattori ambientali e/o patologici prevalenti durante lo sviluppo del grappolo, e la maturazione possono determinare espressioni e concentrazioni diverse di TLP e chitinasi nell'acino, con conseguente variabilità nella composizione e nella concentrazione in proteine (Monteiro *et al.*, 2003). In ogni caso, per quanto riguarda le proteine dell'uva, né lo stress idrico (Pocock *et al.*, 2000) né danni fisici derivanti dalla vendemmia meccanica (Pocock *et al.*, 1998) sembrano essere coinvolti nel determinare differenti livelli di espressione di proteine PR negli acini.

1.1.4 Le proteine presenti nei mosti e nei vini

È ben noto che le proteine del mosto siano causa di instabilità nei vini bianchi. Gli intorbidamenti o depositi dovuti alla loro precipitazione, nota come "casse proteica", appaiono in bottiglia in seguito a conservazione a temperatura elevata o in seguito ad arricchimento del vino in tannini del tappo, e, insieme alle precipitazioni tartariche, sono responsabili dei principali inconvenienti a carico della limpidezza dei vini bianchi in bottiglia (Paetzold *et al.*, 1990).

Non tutte le proteine del mosto hanno la stessa termostabilità. L'aumento dei tenori in azoto peptidico durante la fermentazione alcolica, e il successivo affinamento sui lieviti, è dovuto alla liberazione da parte di questi ultimi di peptidi considerati termostabili per l'autolisi delle cellule. Al contrario, le proteine termosensibili provenienti dal succo d'uva presentano generalmente tenori costanti nel corso della fermentazione, non vengono infatti assimilate dai lieviti in quanto resistenti alle proteasi di questi microrganismi (Feuillat, 1974).

Il tenore in proteine dei mosti dipende dalla varietà, dal grado di maturazione dell'uva, e dalle operazioni prefermentative. Come dimostrato da Paetzold (1990), le molecole responsabili dell'instabilità proteica dei vini bianchi di *Sémillon*, *Sauvignon* e *Muscadelle*

sono essenzialmente delle glicoproteine con peso molecolare compreso tra 30.000 e 18.000 Da. Per questi vitigni, il tenore in proteine termicamente instabili dei mosti aumenta durante la maturazione dell'uva. Nel caso del Sauvignon e del Sémillon, a maturità, la macerazione pellicolare provoca, in confronto alla pressatura immediata, aumenti importanti dei tenori in proteine termicamente instabili, il cui contenuto raddoppia nel caso dei mosti Sauvignon e aumenta del 50% nel caso dei mosti Semillon. La stessa tecnica sembra avere meno influenza sul tenore in proteine dei mosti di Muscadelle. La diffusione di tali proteine nel mosto avviene entro le prime dieci ore di macerazione. Anche il solfitaggio del pigiato, a basse dosi, favorisce l'estrazione delle proteine dalle parti solide durante la macerazione.

Un'ulteriore esperienza ha messo in evidenza come i succhi provenienti dalla pressatura immediata delle uve diraspate sono nettamente più ricchi in proteine di quelli ottenuti per pressatura immediata delle uve intere. Si spiegherebbe così l'aumento, nel corso degli ultimi decenni delle dosi di bentonite necessarie alla stabilizzazione. L'evoluzione delle tecniche vitivinicole, in particolare la raccolta delle uve a uno stato di maturità più elevato, la raccolta meccanica, la macerazione pellicolare, la modifica delle tecniche di pressatura, hanno causato un arricchimento dei vini in proteine, e al contempo un aumento delle dosi di bentonite necessarie alla loro stabilizzazione (Ribéreau-Gayon, 1998).

Delle numerose proteine presenti negli acini d'uva, solo una piccola parte permane nel vino dopo il processo di vinificazione. Il basso valore di pH del mosto in fermentazione, la concentrazione in alcol, e la presenza di attività proteolitica sono causa di denaturazione e degradazione delle proteine stesse, per cui solo la frazione resistente a questi fattori è presente nel vino (Curioni *et al.*, 2008). Per queste ragioni, il vino contiene solo un numero limitato di proteine dell'uva (per vini bianchi da 15 a 300 mg/L) e piccole quantità di proteine derivanti da microrganismi, in particolar modo dai lieviti responsabili della fermentazione (Kwon, 2004). La maggior parte delle proteine presenti nei vini deriva dall'uva (Ferreira *et al.*, 2000) e tra queste, le uniche dotate delle caratteristiche necessarie a sopravvivere al processo di fermentazione sono le proteine PR, in particolare le chitinasi e le TLP, la cui natura e funzione ne determina la resistenza intrinseca alla denaturazione e alla proteolisi (Waters *et al.*, 1992; Falconer *et al.*, 2010). La maggior parte delle conoscenze acquisite sulle proteine presenti nei vini deriva da studi eseguiti su vini bianchi, a causa della notevole importanza tecnologica, mentre è generalmente riconosciuto che nei vini rossi esse siano rimosse per interazione con i composti fenolici. In ogni caso, alcuni autori hanno trovato quantità apprezzabili di proteine (40-80 mg/L) anche nei vini rossi (Yokotsuka *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2011).

Il contenuto in proteine dei vini può variare significativamente, essendo condizionato dalla concentrazione iniziale presente nel succo d'uva, e dalla tecnica di vinificazione adottata. In letteratura sono riportati contenuti in proteine dei vini che vanno da meno di 1 mg/L a valori maggiori di 1 g/L, sebbene queste variazioni siano essenzialmente dovute al metodo analitico utilizzato per quantificarle (Vincenzi *et al.*, 2005), e la presenza di proteine con

peso molecolare compreso tra 9 e 62 kDa e con differenti punti isoelettrici (pI 3-9) (Hsu *et al.*, 1987a). Oltre a queste, è stata riscontrata la presenza di proteoglicani a maggior peso molecolare e ad alto contenuto in mannosio, rilasciate dai lieviti coinvolti nella fermentazione (Gonçalves, 2002). In ogni caso, la componente proteica maggiore ha peso molecolare compreso tra 20 e 30 kDa e punto isoelettrico nel range 4-6, essendo costituita da chitinasi e TLP provenienti dagli acini d'uva (Waters *et al.*, 1996). Anche l'invertasi dell'uva (PM 62-64 kDa) è considerata una delle più abbondanti proteine presenti nel vino (dal 9 al 14% del contenuto totale di proteine presenti) (Dambrouck *et al.*, 2005). Nonostante la presenza di un ridotto numero di bande rilevabili mediante SDS-PAGE, i metodi di separazione basati sulla carica elettrica permettono di individuare, per ogni peso molecolare, diversi polipeptidi, indicando l'esistenza di una micro-eterogeneità probabilmente dovuta a fenomeni di limitata proteolisi o da modificazioni chimiche che si verificano durante il processo di vinificazione a carico della struttura delle proteine, derivanti tutte, o la maggior parte, da un precursore comune la cui sequenza N-terminale mostra un alto livello di omologia con le proteine PR (Monteiro *et al.*, 2001). Tuttavia, questa ipotesi è stata recentemente rivista dallo stesso Monteiro *et al.* (2007), il quale ha riscontrato che le proteine PR sono sintetizzate in un'ampia varietà di forme a partire dai primi stadi di sviluppo del grappolo, e non a partire da uno o pochi precursori comuni.

Inoltre, vini ottenuti da diverse varietà di uva o soggetti a differenti procedure di vinificazione sono essenzialmente composti da gruppi identici di proteine PR (Ferreira *et al.*, 2000). Paradossalmente, le proteine responsabili dell'instabilità nei vini sono quelle stabili nelle condizioni di fermentazione del mosto. La stabilità delle proteine PR a pH acido e la loro elevata resistenza all'attacco proteolitico indica che il processo di vinificazione funziona come una sorta di procedura selettiva di estrazione dagli acini di uva, che rilasciano gli acidi contenuti nei vacuoli e gli enzimi idrolitici che causano la precipitazione di gran parte della frazione proteica. Questa combinazione di bassi valori di pH con l'attività proteolitica fa sì che solo le proteine resistenti a queste condizioni, come le PR-proteins, sopravvivano al processo di vinificazione diventando un problema nel vino (Ferreira *et al.*, 2002). In ogni caso, si visto che alcuni processi proteolitici a carico delle proteine del vino possono avvenire durante la vinificazione e la produzione di Champagne ad opera di una proteasi acida (Manteau *et al.*, 2003), con possibilità in questo modo di prevenire la formazione di flocculi in bottiglia.

L'attività di ricerca volta a determinare il peso molecolare è sempre proceduta di pari passo con l'analisi del punto isoelettrico delle proteine nel vino. Il punto isoelettrico di una proteina è il pH a cui essa ha carica netta pari a zero, ed è importante in quanto indica che, al pH del vino, le proteine hanno carica positiva. Questa caratteristica ne permette la rimozione mediante bentonite, uno scambiatore di cationi, e potrebbe avere importanza nei fenomeni di interazione tra la proteina e qualsiasi altro fattore di origine diversa che da luogo alla casse proteica (Waters *et al.*, 2005). La maggior parte delle proteine presenti nel vino è caratterizzata da un basso punto isoelettrico (pI 4,1-5,8) (Hsu *et al.*, 1987a). Il loro

frazionamento, sulla base di questo parametro, ha portato all'identificazione di cinque diversi gruppi, tutti coinvolti nei meccanismi di casse proteica in seguito a trattamento a caldo. Tuttavia, si è visto che la formazione di particelle flocculanti differisce tra i cinque gruppi, portando alla conclusione che altri componenti del vino, come i composti fenolici, devono essere presi in considerazione per comprendere a pieno il meccanismo della casse proteica (Dawes *et al.*, 1994).

1.1.5 La maturazione dell'uva e le proteine del vino

Nella vite, la sintesi di proteine PR avviene principalmente a livello della buccia degli acini (Pocock *et al.*, 1998), aumenta sensibilmente dopo l'invaiaura per poi proseguire durante la maturazione della bacca (Tattersall *et al.*, 1997). In tutte le cultivar di *Vitis vinifera* considerate, le chitinasi e le Thaumatin-like proteins rappresentano la principale componente di proteine solubili dell'uva. La predominanza di questo tipo di proteine è evidente in tutte le fasi seguenti l'invaiaura, e poiché la concentrazione di proteine estraibili dagli acini incrementa continuamente durante la maturazione, si può presupporre che il potenziale di instabilità del vino ottenibile aumenti di pari passo (Pocock *et al.*, 1998-2000).

Le proteine PR mostrano attività antifungina *in vitro* contro i funghi patogeni più comuni della vite, *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis viticola*, *Elsinoe ampelina* e *Trichoderma harzianum* (Monteiro *et al.*, 2003) e la loro espressione nei frutti dopo l'invaiaura rappresenta un meccanismo di difesa preventivo (Jayasankar *et al.*, 2003).

L'aumento di espressione di alcuni geni PR ed accresciute concentrazioni di proteine PR sono state osservate in foglie e acini di vite infettati con patogeni (Robert *et al.*, 2002). Uno studio recente ha dimostrato che infezioni ad opera di *Uncinula necator* sul grappolo di Chardonnay sono causa dell'aumento dei livelli di una Thaumatin-like protein minore (VvTL2) nel vino. Alti livelli di infezione dei grappoli, superiori al 30%, hanno un impatto significativo sull'instabilità delle proteine del vino in seguito a trattamento a caldo (Girbau *et al.*, 2004).

Contrariamente alle aspettative, Marchal *et al.* (2002) osservano che il succo ottenuto da acini infettati con *Botrytis cinerea* presenta livelli di proteine ridotti, ipotizzando che la responsabilità deve essere attribuita agli enzimi proteolitici del fungo stesso. Secondo questo studio, quindi, questi enzimi avrebbero la potenzialità di sostituire il trattamento con bentonite per portare in condizioni di stabilità il vino.

Di grande interesse è, inoltre, l'effetto esercitato dalla vendemmia meccanica sulla sintesi di queste proteine. Le vendemmie meccaniche, comportando l'eliminazione dei raspi, possono essere considerate come uno dei fattori più importanti di instabilità proteica dei vini bianchi di certe varietà (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Paetzold *et al.* (1990) osservano che dall'uva raccolta meccanicamente si ottengono mosti con un contenuto maggiore in proteine rispetto a quelli ottenuti con la vendemmia manuale, probabilmente per l'assenza del rachide durante la pigiatura, e quindi, per carenza di composti

polifenolici in grado di complessare le proteine e causarne la precipitazione durante le prime fasi di lavorazione. Allo stesso modo, Dubourdieu e Canal-Llaubères (1990) dimostrano che vini ottenuti da macerazioni di diciotto ore di uva diraspata contengono più proteine di quelli ottenuti da pressatura istantanea delle uve intere. In seguito, Pocock *et al.* (1998) stimano l'impatto della vendemmia meccanica sulla sintesi di proteine PR in uva e vino: la vendemmia meccanica in associazione con il trasporto prolungato degli acini si traduce nella presenza di concentrazioni maggiori di proteine PR nel succo d'uva e nel vino dopo fermentazione, con conseguente necessità di raddoppiare le dosi di bentonite richieste per la prevenzione della casse proteica rispetto a quanto necessario in caso di vendemmia manuale. Questi aumenti di concentrazione non sarebbero dovuti a una risposta fisiologica alle ferite degli acini, quanto piuttosto ad una maggior estrazione delle proteine dalla buccia.

È stato anche indagato l'effetto dello stress idrico sulla sintesi delle proteine PR (Pocock *et al.*, 2000) in *Vitis vinifera* cv. Shyraz. La mancanza di irrigazione ha dato chiari segnali di stress idrico, ma non ha condotto a livelli elevati di proteine PR negli acini. In ogni caso, la concentrazione di queste ultime è risultata maggiore nei mosti ottenuti da piante sottoposte a stress piuttosto che da quelle irrigate dal momento che gli acini si presentavano più piccoli e i soluti più concentrati. I problemi di casse proteica sono maggiori, infatti, negli anni caratterizzati da ridotta disponibilità idrica in seguito a cambiamenti nella dimensione degli acini, piuttosto che per una risposta fisiologica diretta della pianta a condizioni di stress.

1.2 LA CASSE PROTEICA

1.2.1 Le proteine responsabili della torbidità nei vini

La presenza di proteine nel vino è sicuramente un pre-requisito per la formazione di precipitato, ed è ormai generalmente accettato che maggiore è il contenuto in proteine totali più è elevata la tendenza all'instabilità (Mesquita *et al.*, 2001). Tuttavia, non è possibile prevedere la potenzialità di un vino ad essere soggetto a casse proteica in funzione del suo contenuto totale in proteine. Due sono le ipotesi elaborate per spiegare l'insolubilizzazione delle proteine nel vino: (1) ogni proteina risponde diversamente in termini di sensibilità alla denaturazione mediata dall'aumento di temperatura dando, pertanto, un contributo diverso alla formazione di torbidità nel vino (2) sebbene sia proteina-dipendente, lo sviluppo di torbidità nel vino è controllato da fattori di origine non proteica (Ferreira *et al.*, 2002).

Diversi studi hanno riportato che alcune frazioni proteiche sono sensibili al calore mentre altre contribuiscono meno all'instabilità del vino (Paetzold *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1991-1992).

Il peso molecolare e le proprietà isoelettriche sono caratteristiche fondamentali delle proteine studiate, in riferimento alla loro solubilità limitata. Alcuni studi sostengono che

proteine caratterizzate da peso molecolare e punto isoelettrico inferiore compongono le frazioni responsabili del fenomeno di instabilità (Hsu *et al.*, 1987a, 1987b). Le recenti osservazioni, per cui i vini sono fondamentalmente composti da gruppi identici di polipeptidi, identificati come proteine PR (Ferreira *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 1996), e per cui le proteine responsabili della casse proteica sono apparentemente simili in vini ottenuti da diverse varietà di uva (Dawes *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1987a; Paetzold *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1992), avvalorano l'ipotesi che la formazione di torbidi è controllata da fattori di origine non proteica. È quindi necessario prendere in considerazione l'interazione con altri composti presenti nel vino per comprendere i meccanismi di instabilità proteica. Yokotsuka *et al.* (1995) furono i primi a dimostrare che le proteine isolate da mosto d'uva non producevano torbidità visibile in assenza di particolari composti del vino. L'insolubilità delle proteine non sarebbe, quindi, dovuta a caratteristiche proprie delle stesse molecole proteiche, ma a fattori di natura non proteica come procianidine, al pH del vino ed alla presenza di polisaccaridi.

1.2.2 Fattori di origine non proteica coinvolti nel fenomeno della casse proteica

Mesquita *et al.* (2001) hanno dimostrato che l'instabilità alle proteine è indotta da bassi valori di pH ed alte concentrazioni di polisaccaridi: un aumento del valore di pH o la riduzione del contenuto in polisaccaridi si traducono in una riduzione della precipitazione delle proteine ad alta temperatura, mentre al contrario variazioni nel contenuto in alcol non sembrano avere alcun effetto (Batista *et al.*, 2009). Polisaccaridi e polifenoli sono componenti essenziali dei vini, contribuiscono alle proprietà organolettiche e condizionano i fenomeni di chiarificazione e stabilizzazione dei vini; possono pertanto intervenire nella formazione di torbidità e modificare l'efficacia dei trattamenti di chiarifica.

I polifenoli, al contrario dei polisaccaridi, al pH del vino presentano una scarsa carica negativa, le forze elettrostatiche e ioniche non sono determinanti per la loro reattività fisico-chimica. Siebert *et al.* (1996) hanno ipotizzato che l'interazione tra le proteine e i polifenoli sia di natura idrofobica: in particolare, la proteina sarebbe dotata di un certo numero di siti di legame specifici per i polifenoli, molti dei quali sarebbero maggiormente esposti in caso di denaturazione, come accade durante il riscaldamento del vino.

È stato, inoltre, dimostrato che le procianidine sono coinvolte nella formazione di depositi proteici nel vino, avendone trovata presenza (0,02 - 4,9% w/w) in questi ultimi (Waters *et al.*, 1995a).

I polisaccaridi presenti nel vino, derivati sia dall'uva che dai lieviti coinvolti nella fermentazione, hanno numerosi effetti sulla formazione di precipitati di natura proteica. Alcuni di questi (mannoproteine dei lieviti e arabinogalattani e ramnagalatturonani dell'uva), al pH del vino, hanno carica negativa e conseguentemente possono stabilire

interazioni elettrostatiche e ioniche con altri composti carichi positivamente come le proteine, che si traducono nella formazione di composti sia solubili sia insolubili in un processo che è strettamente dipendente dalla loro carica elettrica e dalla struttura dei loro gruppi funzionali. Alcuni polisaccaridi, mannoproteine derivate dalle pareti cellulari dei lieviti, sono indicati come fattori protettivi (HPFs) nei confronti delle precipitazioni proteiche. L'effetto protettivo è stato studiato da Moine-Ledoux *et al.* (1997), i quali verificano che il vino bianco affinato sulle fecce di lievito presenta minor sensibilità alla precipitazione proteica e necessita di dosi inferiori di bentonite rispetto ad un vino non affinato sulle fecce.

Le proteine interagiscono con i polisaccaridi e/o i tannini polimerici formando complessi macromolecolari, i cui rapporti tra le tre componenti variano durante l'affinamento, in misura maggiore nei vini rossi rispetto ai bianchi. In questo modo, possono ridurre la sensazione amara e l'astringenza dei polifenoli formando complessi insolubili proteine-tannini-polisaccaridi (Fukui *et al.*, 2003).

1.2.3 Il meccanismo della casse proteica

Le proteine possono dare instabilità per caratteri costitutivi della molecola o condizioni del mezzo. Le proteine dei vini sono sensibili sia al calore sia al freddo. Si può ottenere una precipitazione già per una lunga permanenza a 30 °C, mentre a temperature attorno ai 70 °C le proteine possono essere portate irreversibilmente alla coagulazione in circa 20 minuti e quindi essere allontanate dal vino (Ledoux *et al.*, 1992); nel caso di un riscaldamento rapido la torbidità non si evidenzia che dopo il successivo raffreddamento (Moine Ledoux, 1996).

A temperature attorno agli 0 °C invece, si possono osservare intorbidamenti che possono scomparire per un ritorno alla temperatura normale: il comportamento al freddo si presenta quindi reversibile.

Il meccanismo della casse proteica dei vini è riconducibile a quanto avviene nella flocculazione di un colloide idrofilo (Moine-Ledoux, 1996); le particelle colloidali, sono dotate cioè di una carica superficiale, che diventa un fattore di stabilità, evitando la flocculazione e favorendone la solvatazione da parte dell'acqua, che viene a costituire uno strato di idratazione superficiale; la casse proteica si verifica quando si vengono a perdere questi due fattori: la carica, e l'idratazione (Fig. 50).

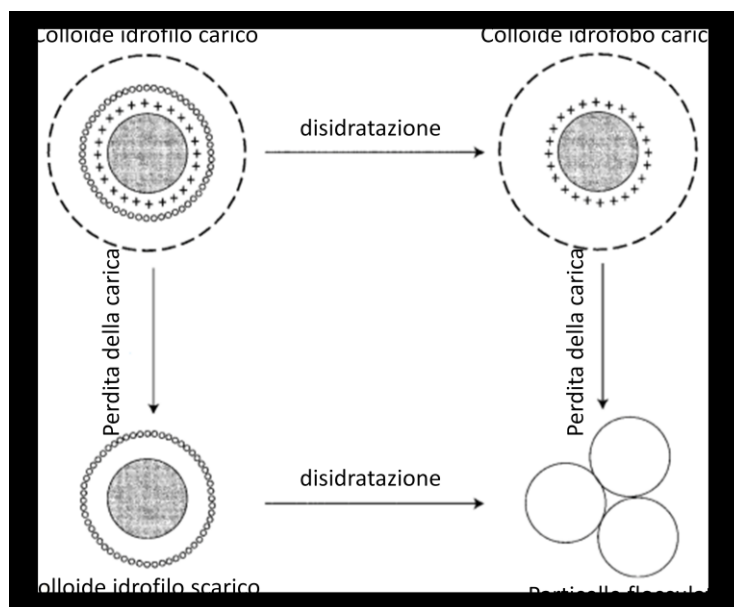


Figura 50: Schema della flocculazione di un colloide idrofilo a seguito della eliminazione dei due fattori di stabilità: carica elettrica e idratazione (Ribèreau-Gayon, 1976).

Sulla base di queste considerazioni, il trattamento termico, non ha come effetto la coagulazione diretta delle proteine, ma ne determina la disidratazione ed il passaggio da colloidale idrofilo a idrofobo; questo floccula per azione dei cationi e dei tannini, anch'essi rilevabili nei depositi formati (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998 b).

Secondo Dawes *et al.* (1994), il pI condiziona la consistenza del torbido formatosi in seguito a riscaldamento del vino; in particolare le frazioni proteiche con pI inferiore a 7, formano depositi compatti, quelle con pI compreso fra 5,94 e 4,65 flocculano, mentre quelle con pI inferiore a 4,65, portano alla formazione di torbidità in sospensione (Comuzzo, 2003).

Un'altra particolare caratteristica delle proteine dei vini è la loro reattività con i tannini, questo determina una stabilizzazione naturale nei vini rossi, mentre in quelli bianchi, come già descritto, le proteine possono rappresentare un rischio di instabilità futura, in funzione delle condizioni di conservazione del vino.

La reattività con i tannini è anche funzione delle caratteristiche strutturali delle proteine, le particelle colloidali che si formano per interazione con i tannini hanno dimensioni variabili tra qualche decina di nm e 600-800 nm di diametro colloidale. In presenza di tannini si forma un complesso tannino-proteina, assimilabile ad un colloidale idrofobo con carica negativa, che floccula per interazione con i cationi presenti nel mezzo. In modo simile, il riscaldamento di un vino bianco a 70-80 °C può portare alla precipitazione della quasi totalità delle proteine. Se il vino è riscaldato rapidamente, il precipitato appare solo durante il raffreddamento. Il riscaldamento non ha per effetto quello di precipitare o

coagulare direttamente le proteine del vino o del mosto, ma di trasformarle in una forma solubile a caldo, che diventa insolubile e floccula a temperatura più bassa. Il riscaldamento denatura le proteine per eliminazione di acqua, esse poi flocculano per interazione con i tannini e i cationi che in parte sono trascinati nel deposito. In genere, la precipitazione delle proteine necessita la presenza di alcol, di tannini o il riscaldamento. Il ruolo di questi tre fattori è quello di denaturare le proteine, trasformandole da colloidi idrofili stabili a colloidi idrofobi privi di carica e, pertanto, precipitabili (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Secondo una più recente teoria sul comportamento colloidale dei tannini (Saucier, 1997), l'idratazione dei colloidi idrofili è trascurabile. L'associazione delle molecole dei tannini in particelle determina un considerevole aumento delle forze di Van der Waals tra tannini e proteine e provoca fenomeni di adsorbimento non specifici (Fig. 51). La presenza di cationi, in particolare il ferro, favoriscono l'associazione dei tannini in particelle colloidali. In presenza di polisaccaridi può venire ostacolata la formazione di aggregati tra le particelle dei tannini.

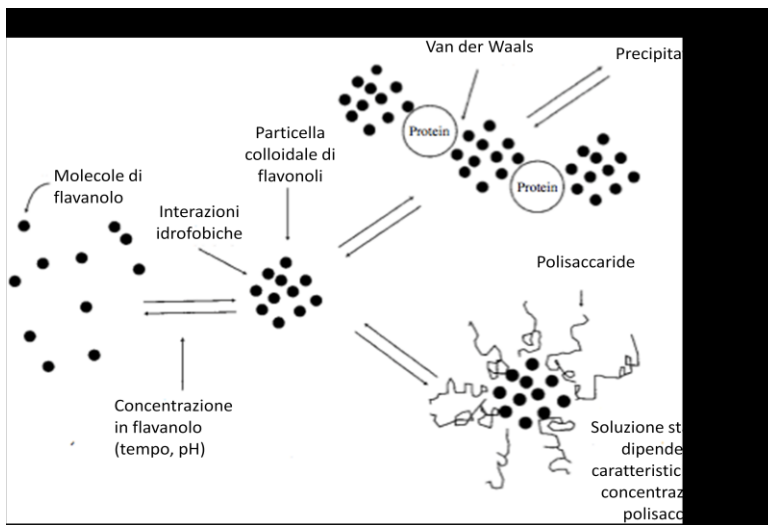


Figura 51: Proprietà colloidali dei flavonoli (Saucier, 1997).

In un recente studio di un deposito naturale in vino Sauvignon, Esteruelas *et al.* (2009) sono arrivati alla conclusione che le proteine rappresentano solo una piccola porzione del precipitato proteico (10%), costituito anche da composti fenolici (7%) e polisaccaridi (4%). Le proteine con un peso molecolare variabile tra 18 e 26 kDa costituiscono la maggior parte di questa frazione, ma viene segnalata anche la presenza di molecole di 14, 41, 53 e 69 kDa. Per la prima volta, è stata inoltre descritta la presenza di β -1,3-glucanasi e ripening-related protein Grip22.

1.2.4 Controllo enologico dell'instabilità proteica con bentonite

Ad oggi, il trattamento con bentonite è la tecnica chiarificante più comunemente utilizzata nel settore enologico per rimuovere le proteine coinvolte nei fenomeni di precipitazione e intorbidamento dei vini. La bentonite è un silicato di alluminio idrato, composto principalmente da montmorillonite; in sospensione nell'acqua o nel vino forma una dispersione colloidale le cui particelle, cariche negativamente, hanno la proprietà di fissare le proteine cariche positivamente al pH del vino. La bentonite assorbe in primo luogo le proteine i cui punti isoelettrici sono elevati (5.8-8.0) e di peso molecolare intermedio (PM 32-45 kDa), mentre l'eliminazione di proteine con punti isoelettrici inferiori richiede dosi di bentonite più elevate (Hsu *et al.*, 1987b; Paetzold *et al.*, 1990). Contrariamente a queste indicazioni, uno studio eseguito da Dawes *et al.* (1994) ha portato alla conclusione che non esiste la selettività di azione delle bentoniti in funzione del punto isoelettrico e che il trattamento ha come risultato la rimozione di tutte le differenti frazioni di proteine. Le bentoniti contengono cationi scambiabili. Le più utilizzate nel settore enologico sono le bentoniti sodiche perché rigonfiano sensibilmente in acqua e possiedono una capacità di adsorbimento delle proteine nettamente superiore. Utilizzate a dosi elevate possono, tuttavia, influenzare negativamente i caratteri sensoriali dei vini bianchi, in quanto, essendo scambiatori di cationi, l'adsorbimento non è specifico per le proteine, ma vengono rimosse anche altre specie cariche o aggregati, tra cui le molecole aromatiche (Voilley *et al.*, 1990). In aggiunta a questo aspetto negativo, dal 5 al 20% del volume di vino trattato può essere perso come fecce. Marchal *et al.* (2002) hanno inoltre dimostrato che la modalità di preparazione della bentonite ha fondamentale importanza, più della dose utilizzata per la chiarifica dei vini.

1.2.5 Tecniche alternative alla bentonite per la rimozione delle proteine

Allo scopo di ottenere la totale stabilizzazione del prodotto, sono state introdotte tecnologie alternative in sostituzione alla bentonite senza, tuttavia, riscuotere grande successo.

L'ultrafiltrazione tangenziale su membrane con taglio molecolare pari a 50.000 Da non consente di eliminare le proteine instabili, in quanto sono necessari tagli molecolari dell'ordine di 10.000 Da: in seguito a filtrazione, frequentemente rimangono nel vino da 3 a 20 mg/L di proteine, dando occasionalmente luogo a fenomeni di instabilità proteica, nonostante sia stata osservata una riduzione dell'80-95% della bentonite necessaria per il trattamento di chiarifica (Hsu *et al.*, 1987a-1987b). L'uso di tali membrane, inoltre, induce un impoverimento delle qualità colloidali ed aromatiche dei vini, probabilmente a causa dell'eliminazione delle macromolecole.

L'aggiunta di tannini enologici provoca una eliminazione parziale delle proteine, ma le proteine del vino così trattato risultano più sensibili al calore di quelle del vino non

trattato. Ulteriori studi sono stati eseguiti mediante l'uso di composti fenolici immobilizzati (Weetall, 1984).

L'effetto della iperossigenazione nei riguardi delle proteine dei mosti risulta insufficiente a indurre la stabilità nei vini, inoltre questo trattamento risulta negativo per l'aroma varietale di vini come, ad esempio, quelli derivati dalla cv. Sauvignon.

L'uso di enzimi proteolitici sembra essere il mezzo più appropriato per eliminare selettivamente le proteine del vino, tuttavia è stata dimostrata la loro inefficacia alle normali temperature del processo di vinificazione (Waters *et al.*, 1992 - 1995b), in coerenza con la forte resistenza alla proteolisi delle proteine PR. Lo studio della struttura delle TLP ha dimostrato che queste proteine sono compatte e globulari in natura, con pochi loops esposti accessibili alle proteasi (Tattersall *et al.*, 2001). Sarebbe quindi possibile ricorrere a modificazioni della tecnica di vinificazione per indurre la denaturazione delle proteine e permettere l'azione delle proteasi come metodo per prevenire la casse proteica.

Uno studio sull'applicazione della flash-pastorizzazione (Pocock *et al.*, 2003) ha dimostrato che un trattamento per riscaldamento a breve tempo riduce la quantità di bentonite necessaria del 50-70%, senza interferire con il profilo sensoriale del vino. Inoltre, l'aggiunta di enzimi proteolitici durante questa breve esposizione al calore, per indurre la denaturazione delle proteine, riduceva la quantità di bentonite necessaria del 30-60%, sempre senza alterare le qualità organolettiche del vino.

I lavori più recenti (Lucchetta *et al.*, 2013), infine, prendono in considerazione l'utilizzo del biossido di zirconio (zirconia) che è stato dimostrato essere capace di assorbire le proteine instabili presenti nei vini bianchi. Nello studio vengono confrontati gli effetti sul vino (Reisling, Sauvignon Blanc e Semillon) ottenuti per fermentazione delle uve in presenza di 25 g/L di zirconia. I tre vini sono risultati completamente stabili al calore. Resta da verificare l'eventuale residuo di zirconia nel vino finito.

1.3 I COLLOIDI DEL LIEVITO

Il lievito è l'agente della fermentazione alcolica responsabile della trasformazione del mosto d'uva in vino. È noto che i polisaccaridi del lievito, le mannoproteine in particolare, esercitano sui vini un'azione stabilizzante; il loro rilascio nel mezzo avviene sia nel corso della fermentazione alcolica, sia durante la successiva autolisi delle cellule. In enologia si riscontra l'utilizzo di tecnologie tradizionali (*élevage sur lies*) ed innovative volte a favorirne la liberazione (Comuzzo, 2003).

1.3.1 La parete cellulare del lievito

La parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 52) costituisce il 15–25% del peso secco della cellula (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998 a) e risulta costituita per l'80-90% da

polisaccaridi. Tra questi i glucani, che costituiscono il 60% del peso secco della cellula, svolgono la funzione strutturale e sono classificabili in tre frazioni:

- (1→3)- β -glucano: insolubile in acqua, alcali ed acido acetico, conferisce rigidità alla parete cellulare ed è associato alla chitina; ha un grado di polimerizzazione pari a 1500 e struttura lineare (fibrosa) con poche ramificazioni in β -(1→6).
- (1→3)- β -glucano: insolubile in acqua, solubile negli alcali, ha struttura amorfa, conferisce elasticità alla parete e funge da ancoraggio per le mannoproteine; è poco ramificato e presenta, in corrispondenza delle ramificazioni stesse, un ridotto numero di legami β -(1→6).
- (1→6)- β -glucano: liberato dal glucano, insolubile in alcali per estrazione con acido acetico; è amorfo, solubile in acqua, con un grado di polimerizzazione pari a 140, ed è fortemente ramificato in β -(1→3).

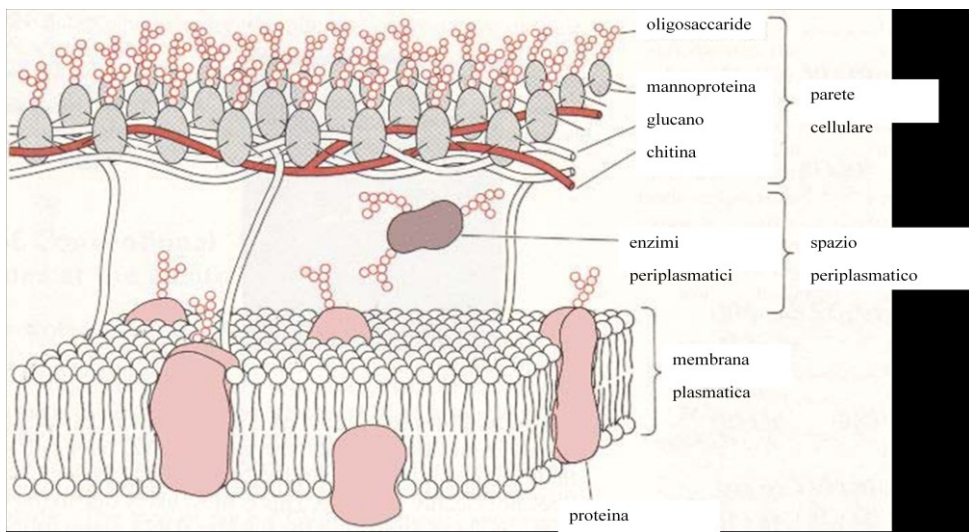


Figura 52: Rappresentazione schematica della struttura della parete cellulare del lievito (modificata da <http://grup.bio.unipd.it/biomol2/biomolcellula/SECmutants.html>).

L'1-2% del peso secco della parete è poi costituito dalla chitina (Feiuillat, 2003), polimero costituito da residui di N-acetilglucosammina legati in β -(1-4); questa si concentra prevalentemente in corrispondenza delle cicatrici nelle zone di gemmazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998a).

Dal punto di vista funzionale, le componenti più importanti della parete cellulare dei lieviti sono le mannoproteine, che ne costituiscono il 25-50% ed hanno un peso molecolare compreso tra i 20 ed i 450 kDa (Moine-Ledoux, 2001); queste sono glicoproteine, costituite da mannani legati covalentemente ad una frazione proteica, che rappresenta soltanto il 15% circa della molecola (Lubbers, 1993). Klis (1994) descrive quattro tipi di glicosilazione, anche se non si ritrovano necessariamente tutti e quattro.

La frazione non polisaccaridica della parete cellulare è rappresentata dalle proteine (10-15%), costituite prevalentemente da enzimi (invertasi, eso- ed endo- β -glucanasi), lipidi (1-10%), che Ribéreau-Gayon *et al.* (1998 a) suppongono essere essenzialmente lipidi di membrana, ed infine minerali, fosforo e calcio in particolare (Freysinet, 1988, in Lubbers, 1993, op. cit.).

1.3.2 La liberazione di macromolecole durante l'autolisi del lievito

Il contenuto in colloidali del vino differisce da quello del mosto, infatti, durante il processo fermentativo vi è la scomparsa della maggior parte delle pectine e la comparsa di polimeri del mannosio, liberati dai lieviti nel corso della fermentazione (Usseglio-Tomasset e Castino, 1975b). Il lievito sintetizza nel citoplasma le mannoproteine (Lubbers, 1993) che, se non utilizzate completamente per la costituzione della parete cellulare, vengono secrete all'esterno della cellula (Laubères *et al.*, 1987). Secondo Dupin *et al.* (2000), poiché le mannoproteine sembrano esser liberate prevalentemente in corrispondenza dei siti di gemmazione, la liberazione di queste macromolecole sembra connessa alla maturazione della cellula ed alla gemmazione.

Tale liberazione continua anche dopo la fermentazione alcolica: la biomassa di lievito va incontro ad un processo autolitico. Ribéreau-Gayon *et al.* (1998a) descrivono infatti un'attività delle β -glucanasi associate alla parete cellulare anche alcuni mesi dopo la morte della cellula; questi enzimi catalizzano la degradazione del glucano parietale cui le mannoproteine sono ancorate, consentendo la liberazione di composti glucomannoproteici, degradati ulteriormente ad opera di eso- β -glucanasi ed α -mannosidasi (Charpentier e Feuillat, 1993). Se il prodotto fermentato permane a contatto con le cellule lisate, l'arricchimento del mezzo in mannoproteine continua quindi anche dopo la fermentazione (Laubères *et al.*, 1987).

Nel corso del processo autolitico avvengono, ad opera delle attività enzimatiche, modificazioni strutturali a carico della parete delle cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (e *Saccharomyces bayanus*); modificazioni legate non solo ad una diminuzione del glucano parietale, ma anche ad un'attività proteasica (proteasi A citoplasmatica e proteasi associate alla parete stessa) che comporta la degradazione della frazione proteica dei peptidomannani associati alla parete, aventi funzione protettiva nei confronti dei glucani parietali (Charpentier *et al.*, 1986). Ne consegue un aumento della concentrazione nel mezzo di sostanze azotate ed aminoacidi liberi (Feuillat e Charpentier, 1982; Leroy *et al.*, 1990).

Ferrari e Feuillat (1988) riscontrano anche un aumento del contenuto in acidi grassi, responsabili della formazione di esteri o composti carbonilici influenzanti l'aroma del vino. Un'altra classe di composti in grado di condizionare le caratteristiche sensoriali del prodotto è costituita da derivati degli acidi nucleici, quali nucleotidi e nucleosidi, liberati nel mezzo in seguito ad attività ribonucleasica (Leroy *et al.*, 1990) ed in grado di fungere da esaltatori di sapidità (Nagodawithana, 1992).

L'entità della liberazione di polisaccaridi da parte del lievito risulta dipendente dal ceppo fermentante, dalla temperatura, dall'agitazione del mezzo e dalla durata del contatto con le fecce (Ribéreau-Gayon, 1998a).

1.3.3 Tecniche tradizionali e innovative per favorire la lisi del lievito

L'affinamento sulle fecce - 'élevage sur lies' – è la pratica tradizionale di arricchimento del vino in sostanze colloidali; essa consiste nella sosta del vino sulle fecce di fermentazione per favorire l'autolisi enzimatica delle cellule di lievito e la cessione al mezzo di macromolecole, soprattutto polisaccaridi e proteine (Feuillat *et al.*, 1989).

Vista la complessità dei fenomeni coinvolti durante tale sosta, l'evoluzione del prodotto può essere condizionata fortemente dall'intervento del tecnico; in particolare risulta fondamentale la frequenza con cui la massa viene sottoposta a rimescolamento (*batonnage*) in modo da favorire la distribuzione di lievito su tutta la massa (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2001), facilitando così il rilascio di colloidi parietali e mantenendo l'equilibrio ossido riduttivo del mezzo. Il tempo richiesto da tale processo è di alcuni mesi, ma può protrarsi fino ad alcuni anni in caso di produzioni particolari come lo Champagne, che prevede un lungo affinamento in presenza delle fecce di seconda fermentazione alcolica (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2001).

Le fecce utilizzate per l'*élevage sur lies* possono essere costituite dalla massa presente al termine della fermentazione primaria, oppure possono essere separate e sostituite da un'aggiunta esogena di fecce residue di altre fermentazioni.

La lentezza del fenomeno di lisi cellulare rende l'affinamento sulle fecce una pratica costosa. Nei tempi lunghi, richiesti dall'autolisi naturale, inoltre, possono insorgere fenomeni indesiderati, come ad esempio la formazione di composti solforati responsabili di off-flavours.

Per velocizzare il processo è possibile effettuare un'aggiunta di preparati commerciali di (1→3)- β -glucanasi esogene, che provocano la degradazione della parete del lievito e riducono i tempi di permanenza sulle fecce (Feuillat, 2003) o di derivati dal lievito (autolisato o solo mannoproteine più o meno purificate), le cui cellule vengono preventivamente sottoposte ad un processo di lisi permettendo così di ridurre notevolmente i tempi necessari all'arricchimento in colloidali del mezzo (Comuzzo, 2003).

1.3.4 Fecce e mannoproteine

Le fecce, secondo il regolamento CEE n° 337/7, vengono definite come “il residuo che si forma, dopo la fermentazione, sul fondo di recipienti contenenti vino durante la conservazione o dopo trattamenti autorizzati, come ad esempio il residuo derivante dalla filtrazione o centrifugazione di questo prodotto”.

Nonostante la composizione delle fecce sia variabile, esse sono costituite principalmente da microrganismi (soprattutto lieviti) e, in parte minore, da sali tartarici e residui organici.

L'autolisi del lievito durante l'affinamento del vino provoca la rottura delle pareti cellulari, il rilascio dei costituenti intracellulari, degli enzimi idrolitici e l'idrolisi di biopolimeri intracellulari in composti di basso peso molecolare; pertanto, l'autolisi dei lieviti è di fondamentale importanza sia per quanto riguarda la composizione delle fecce che nell'influenzare l'affinamento del vino (Pérez-Serradilla e Luque de Castro, 2008).

Le mannoproteine vengono rilasciate dal lievito sia durante la fermentazione che per azione enzimatica (ad opera di endo- β -(1,3) ed endo- β -(1,6)-glucanasi) durante l'affinamento sulle fecce per autolisi.

Le mannoproteine, che costituiscono il 35-40% della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae* e di peso molecolare compreso tra 20 ed oltre 450 kDa, sono glicoproteine, spesso altamente glicosilate localizzate nello strato più esterno della parete cellulare del lievito, dove sono collegati ad una matrice amorfa di β -1,3-glucano attraverso legami covalenti. Le mannoproteine conferiscono alla parete cellulare del lievito le sue proprietà attive e svolgono un ruolo significativo nel controllo della porosità della parete, così da regolare la fuoriuscita delle proteine dallo spazio periplasmatico e l'ingresso delle macromolecole dall'ambiente.

Nel range di pH del vino, le mannoproteine presentano carica negativa e, di conseguenza, possono stabilire interazioni elettrostatiche e ioniche con gli altri componenti e dare origine a complessi solubili o insolubili (Ferran, 2011).

Nel genere *Saccharomyces* la frazione glicanica delle mannoproteine non è costituita solo da oligosaccaridi neutri, ma anche da oligosaccaridi acidi contenenti mannosilfosfato i quali conferiscono una carica netta negativa. È ipotizzabile che le mannoproteine di lieviti non-*Saccharomyces* abbiano una struttura diversa e possano, pertanto, avere proprietà funzionali diverse (Caridi, 2006).

Le mannoproteine sono costituite da componenti parzialmente solubili in acqua, rilasciate dall'azione di β -1,3-glucanasi durante e, soprattutto, dopo la fermentazione alcolica.

Il tempo di contatto, la temperatura e l'agitazione (movimentazione/*bâtonnage*) della biomassa di lievito promuovono il rilascio enzimatico. La produzione ed il rilascio di mannoproteine dipende anche dal ceppo di lievito e dalle condizioni nutrizionali (Rosi *et al.*, 1999). Vi è, inoltre, anche una relazione diretta tra la chiarifica del mosto e le macromolecole di lievito presenti nel vino: più il mosto viene chiarificato, meno macromolecole vengono prodotte dal lievito.

Considerato l'interesse del rilascio di polisaccaridi da parte del lievito, in bibliografia si ritrovano già diversi lavori di selezione dei ceppi di lievito che producono una maggiore quantità di mannoproteine (Gonzales-Ramos *et al.*, 2008).

Nei vini, la concentrazione di mannoproteine è di circa 100-150 mg/L.

I polisaccaridi giocano un ruolo importante nei fenomeni di stabilizzazione/destabilizzazione colloidale; sembra che le mannoproteine impediscano l'aggregazione dei tannini e loro precipitazione (Poncet-Legrand *et al.*, 2000) e proteggano

il vino dalla precipitazione proteica (Moine-Ledoux e Dubourdieu, 1998, Waters *et al.*, 2005).

Gonçalves *et al.* (2002), caratterizzando le mannoproteine presenti nel vino, ne hanno riscontrata una con peso molecolare elevato: si tratta di un mannano con un contenuto di proteina del 10%, e considerato che, la mannoproteina a basso peso molecolare identificata presenta un contenuto in proteine solo del 2,5% e l'87,5% di mannosio, la percentuale del mannano restante è costituita da glucosio ed altri zuccheri residui.

Le fecce, dal punto di vista enologico, svolgono le seguenti funzioni:

- inibiscono la cristallizzazione dei sali di tartrato;
- impediscono l'aggregazione delle micelle proteiche (stabilità proteica);
- rafforzano i composti aromatici;
- rimuovono le sostanze indesiderabili per adsorbimento (ocratossina A, fungicidi, fenoli volatili, pesticidi);
- aumentano lo sviluppo dei batteri malolattici;
- combinandosi con i composti fenolici, migliorano la stabilità del colore e diminuiscono l'astringenza del vino;
- arricchiscono il vino durante l'affinamento;
- interagiscono col lievito flor.

Anche se l'affinamento sulle fecce contribuisce alla qualità dei vini, essa ha anche un impatto sul contenuto di ammine biogene, soprattutto della putrescina, dal momento che le fecce contengono aminoacidi, microrganismi decarbossilasi positivi ed enzimi decarbossilasi che, in circostanze favorevoli, possono portare alla formazione di ammine biogene con impatto sulla salute umana (mal di testa, nausea, iper- o ipotensione, palpitazione e shock anafilattico) (Pérez-Serradilla e Luque de Castro, 2008).

2 SCOPO DEL LAVORO

Per aumentare il contenuto di polisaccaridi nel vino al fine di modificare le proprietà organolettiche e rendere i vini più strutturati, si può agire seguendo due strade: degradare le cellule dell'uva con enzimi pectolitici o cercare di estrarli dalle cellule di lievito. Una tecnica innovativa, che faciliterebbe questa seconda possibilità, potrebbe essere rappresentata dall'applicazione di ultrasuoni ad alta intensità, i quali provocando la rottura della parete cellulare e la decompartmentazione cellulare potrebbero favorire ed accelerare il rilascio di colloidali protettori (polisaccaridi e proteine – ad esempio mannoproteine) e conseguentemente stabilizzare il vino.

Questa seconda parte del lavoro, pertanto, vuole focalizzare l'attenzione sullo studio degli effetti del trattamento ad ultrasuoni al fine di verificare l'effettiva possibilità di accelerare il rilascio delle macromolecole e comparare tali effetti con la pratica tradizionale di affinamento del vino sur lies e con trattamento enzimatico, usato solitamente per accelerare la lisi del lievito.

Lo scopo del lavoro è stato quello di:

- Valutare l'eventuale effetto litico procurato dagli ultrasuoni sulle fecce fini nei confronti delle strutture cellulari dei lieviti, con il rilascio nel mezzo di frazioni di diversa natura al fine di rendere più veloci le cinetiche di affinamento dei vini sulle fecce fini.
- Trovare la condizione di trattamento - tempo ed% di amplitudine - che provoca i maggiori effetti sul rilascio di colloidali dalle fecce.
- Confrontare questa nuova tecnologia con le pratiche abituali - autolisi naturale (affinamento sulle fecce) e lisi enzimatica del lievito – valutando il possibile vantaggio in termini di effetti diversi o di risparmio di tempo.
- Effettuare il trattamento ad ultrasuoni su fecce diverse per capire se gli effetti più comuni possono essere analoghi.
- Valutare gli effetti della applicazione diretta degli ultrasuoni su vini instabili, per verificare stimare se portano ad una migliore stabilità del prodotto o se ne facilitano l'affinamento.
- Valutare l'effetto dell'aggiunta di fecce trattate con ultrasuoni ad un vino instabile per stimare la possibile azione protettiva nei confronti dell'instabilità proteica e determinare la quantità di feccia necessaria alla stabilizzazione.

3 MATERIALI E METODI

Per la strumentazione utilizzata ed il disegno sperimentale applicato per le prove si rimanda alla descrizione presentata in ‘Materiali e Metodi’ della sezione di lavoro precedente.

3.1 TRATTAMENTI SULLE FECCE

a. Effetto litico provocato dal trattamento ad ultrasuoni sulle fecce fini

Le prove per valutare l’eventuale effetto litico provocato dagli ultrasuoni sulle strutture cellulari dei lieviti sono state effettuate su campioni di feccia fine fresca di Chardonnay (250 mL) raccolta presso la Cantina Rauscedo a tre mesi dalla vinificazione (Tab. 19)

Subito dopo il trattamento, effettuato come previsto dal disegno sperimentale, sul campione di riferimento e sul trattato centrifugati (3000 rpm per 15 minuti) e microfiltrati (0,8 e 0,45 μm Mini-Sart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany), sono stati valutati rispettivamente i colloidi solubili (Usseglio-Tommaset e Castino, 1975) e le proteine solubili (metodo Lowry come riportato da Regenstein e Regenstein - 1984, prima e dopo trattamento del campione con polivinilpirrolidone PVPP – Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA) (Tab. 20).

Un’indagine più accurata per la valutazione della variazione nella composizione della frazione colloidale è stata, inoltre, svolta mediante cromatografia liquida ad alta pressione su gel ad esclusione molecolare. I campioni sono stati analizzati dopo filtrazione del centrifugato a 0,45 μm (Mini-Sart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany). Ai fini analitici sono stati utilizzati due rivelatori: uno spettrofotometrico (λ 280 nm) per la valutazione della frazione fenolica e proteica, l’altro a indice di rifrazione per l’analisi della frazione colloidale glucidica.

Sui campioni sono stati considerati anche altri parametri, quali il diametro medio delle particelle (Submicron Particle Sizer – NICOMP) del surnatante tal quale e filtrato a 0,8 μm (Mini-Sart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) e la misura della carica elettrica superficiale eseguita mediante misuratore di carica superficiale Particle Charge Detector (MÜTEK).

Prova	Campione	Quantità trattata	Tempi/Amplitudine trattamento
Feccia fine fresca	Testimone	250 mL	Ø
	Trattato		Vedi piano sperimentale

Tabella 19: Condizioni sperimentali per le prove di valutazione dell’effetto litico degli US sulla feccia fine fresca. Il trattamento è stato condotto secondo le condizioni previste dal piano sperimentale.

Campione	Determinazione analitica
Surnatante	Carica elettrica superficiale Torbidità Test stabilità proteica Diametro medio delle particelle
Campione filtrato a 0,8 µm	Colloidi solubili Proteine solubili Carica elettrica superficiale Diametro medio delle particelle
Campione filtrato a 0,45 µm	Quantificazione proteine HPLC - gel permeation

Tabella 20: Schema riassuntivo delle determinazioni analitiche effettuate sui campioni, sottoposti a trattamento ad US, e non, dopo centrifugazione e/o filtrazione.

b. Confronto effetti trattamento ad ultrasuoni con lisi naturale e/o indotta (trattamento enzimatico)

Per la prova di confronto è stata utilizzata la stessa feccia della prova precedente (a), sulla quale sono stati valutati sia gli effetti immediati che quelli a lungo termine del trattamento ad ultrasuoni. Per la prova a lungo termine, le fecce sono state prelevate ed analizzate subito dopo trattamento e dopo 10 giorni, 3 mesi e 7 mesi dal trattamento di sonicazione; il campionamento ha previsto anche il prelievo del campione di riferimento e di quello trattato enzimaticamente (40 mg/L di enzima con attività β -glucanasica - Glucanex®, Novozymes Corp., Switzerland). Per ciascuna prova (riferimento, enzima, US) sono state preparate tre bottiglie (750 ml) saturate con azoto, conservate a 16 °C per 7 mesi ed agitate almeno una volta alla settimana.

Le condizioni scelte prevedevano un trattamento di 3 minuti al 90% di amplitudine in quanto, da prove preliminari, si è verificato che questa è la condizione che comporta il maggior rilascio di colloid.

Ad ogni campionamento sono stati prelevati e centrifugati 100 mL di campione e monitorati gli stessi parametri analitici valutati per la prova precedente (Tab. 19).

Gli effetti a breve termine (0, 10 e 20 giorni) sono stati valutati su una replica della prova con le fecce B le cui caratteristiche sono descritte in seguito. In questo caso, sono state scelte due diverse condizioni di trattamento: 3 minuti al 90% e 5 minuti al 60% su un campione di 250 mL. È stata aggiunta una β -glucanasi commerciale alla concentrazione di 50 mg/L. Tutti i trattamenti sono stati effettuati in triplo (Tab. 21).

Prova	Campione	Quantità trattata	Tempi/Amplitudine trattamento	Tempo monitoraggio
Confronto nel breve e lungo periodo	Testimone	750 mL	∅	t ₀ , 10 giorni, 3 e 7 mesi
	Trattato US Feccia + Enzima		∅	
Effetto nel breve periodo	Testimone	250 mL	∅	t ₀ , 10 e 20 giorni
	Trattato US Feccia + Enzima		∅	

Tabella 21: Condizioni sperimentali per le prove di valutazione nel breve e lungo periodo dell'effetto litico degli US sulla feccia fine fresca confrontata con il campione sottoposto a lisi naturale (Testimone) e a quello aggiunto di enzima.

c. Effetto del trattamento ad ultrasuoni su tre diverse fecce

Per confrontare gli effetti su tre diversi tipi di fecce di vino bianco sono state scelte le condizioni di trattamento più intense: 3 e 5 minuti al 60% e 90% di amplitudine su 250 mL di campione (Tab. 22).

Le fecce A e B sono state raccolte in aziende della DOC Colli Orientali del Friuli, mentre la feccia C nella DOC Friuli Grave.

Feccia A: proveniente dal serbatoio di primo travaso, varietà del vitigno cv. Friulano, ceppo lievito commerciale Zymaflore X5 (Laffort); termine fermentazione 11 settembre. Grossolana e con aspetto non omogeneo.

Feccia B: feccia fine, di aspetto liquido ed aromatica, proveniente da due botti in rovere sottoposta a bâtonnage ogni due giorni; i vini sono stati trasferiti nelle barriques a fine fermentazione ed il travaso successivo è stato effettuato a fine novembre. Una delle botti conteneva cv. Friulano (fine fermentazione 30/9/2011, inoculato con *Sacch. cerevisiae* Top15 - Enartis) mentre l'altra cv. Pinot Bianco (fine fermentazione 16/10/2011, inoculato sia con *Torulaspora delbrueckii* Zymaphlore alfa che con *S. cerevisiae* VL1 - Laffort).

Feccia C: densa e viscosa, ha comportato difficoltà nel rimescolamento.

Sulle tre fecce sono stati monitorati tre parametri: i colloidali solubili totali, le proteine solubili e totali (metodo KDS-BCA) ed i polisaccaridi totali (metodo del fenolo).

Prova	Campione	Quantità trattata	Tempi/Amplitudine trattamento
	Testimone Feccia A, B, C		Ø
Feccia fine fresca	Trattato Feccia A	250 mL	3 min 60% e 90%
	Trattato Feccia B		5 min 60% e 90%
	Trattato Feccia C		

Tabella 22: Condizioni sperimentali per le prove di valutazione dell'effetto litico degli US su tre diverse fecce fini confrontate con i rispettivi campioni non trattati (Testimone).

d. Aggiunta di fecce trattate con ultrasuoni al vino instabile

Le fecce trattate con ultrasuoni, con contenuto noto di proteine e polisaccaridi, sono state centrifugate ed aggiunte al vino instabile in modo da ottenere una concentrazione di glicoproteine comprese tra 50 e 300 mg/L.

Per le prove sono stati utilizzati due vini instabili a fine fermentazione: un Sauvignon blanc proveniente dalla DOC Colli Orientali del Friuli ed un Sauvignon blanc della DOC Friuli Grave.

Prima e dopo (48 ore) l'aggiunta, sono stati eseguiti i test di stabilità proteica e determinato il contenuto di proteine e polisaccaridi in modo da verificare quali colloidali rimangono solubili.

3.2 TRATTAMENTO AD ULTRASUONI SU VINO BIANCO

L'effetto diretto degli ultrasuoni è stato valutato anche su un vino grezzo a fine fermentazione.

Tre diversi vini, prelevati ad inizio ottobre, sono stati sottoposti a tutti i trattamenti descritti nel disegno sperimentale. I vini provenivano da cantine della DOC Friuli: Pinot Grigio (Cantina Rauscedo), Pinot Grigio (Cooperativa Casarsa) e Pinot Grigio (I Magredi). Il trattamento è stato applicato ad un volume di campione pari a 150 mL e sono stati effettuati i test di stabilità proteica e la misura del diametro delle particelle. Considerata l'elevata torbidità del vino di partenza, nei risultati viene indicato se il campione è stato sottoposto preventivamente a centrifugazione, filtrazione o diluizione.

3.3 ANALISI STATISTICA

I risultati ottenuti, quando sufficienti, sono stati sottoposti all'Analisi della Varianza (ANOVA), mediante il modulo di base STATISTICA per Windows, versione 7.0, al fine di stabilire eventuali differenze significative.

3.4 CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE COLLOIDALE E MACROMOLECOLARE

3.4.1 Quantificazione dei colloidali solubili

I colloidali glucidici dei mosti e dei vini precipitano in seguito all'aggiunta di cinque volumi di etanolo; la determinazione si effettua mediante pesata del deposito recuperato (Usseglio-Tomasset e Castino, 1975).

In provettoni da 100 mL si dosano nell'ordine 15 mL del surnatante delle fecce trattate con ultrasuoni, e non, filtrato a 0,8 µm (Mini-Sart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany), 1 mL di HCl (Carlo Erba, Milano, Italia) 1:1 e 75 mL di etanolo al 96% (Carlo Erba, Milano, Italia). L'acido concentrato, abbassando il pH, impedisce la precipitazione dei tartrati, mentre l'eccesso di etanolo causa la precipitazione della sostanza colloidale del vino.

I provettoni tappati si conservano in frigorifero a 4 °C per 24 ore al fine di favorire la flocculazione dei colloidali ed ottenere un deposito compatto.

Trascorso il tempo necessario, le sospensioni vengono filtrate sottovuoto utilizzando membrane filtranti di acetato di cellulosa del diametro di 47 mm, con una porosità di 0,45 µm (Albert, Barcellona, Spagna). Tutti i filtri vengono preventivamente pesati con una bilancia analitica per la registrazione delle tare (T, peso in grammi). Ultimata la filtrazione, i filtri sono posti ad essiccare in stufa a 50 °C per 12 ore ed una volta raffreddati vengono nuovamente pesati (C, peso in grammi). I colloidali totali sono dati dalla seguente relazione:

$$\text{Colloidali Totali (mg/L)} = [(C - T)/15] \times 1000 \times 1000$$

3.4.2 Diametro medio delle particelle colloidali

I campioni vengono analizzati previa centrifugazione a 3000 rpm per 10 min e filtrazione a 0,8 µm (Mini-Sart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) per 5 minuti, con angolo di diffrazione pari a 90° ed indice di rifrazione della fase colloidale dispersa pari a 1,33 (Celotti *et al.*, 2003); lo strumento (*Submicron Particle Sizer modello Autodilute 370 - NICOMP*), funziona per diffrazione della luce laser, e consente di tracciare una distribuzione (Gaussiana o Nicomp) dei diametri delle particelle colloidali, determinandone il diametro medio, espresso in nm.

3.4.3 Carica elettrica superficiale delle particelle colloidali

È una titolazione potenziometrica del campione (10 mL), centrifugato a 3000 rpm per 10 min e filtrato a 0,8 µm (Mini-Sart, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany), diluito 1:10 con soluzione similvino (5 g/L acido L(+)- tartarico, 12% v/v etanolo in acqua distillata, correzione del pH a 3.5 con NaOH 4N - Carlo Erba, Milano, Italia), con un polielettrolita cationico, eseguita mediante misuratore di carica superficiale - *Particle Charge Detector modello PCD 03* (MÜTEK) (Fig. 53), interfacciato con titolatore

automatico modello MICRO TT 2050 (CRISON); l'apparecchio fornisce il valore in mV del potenziale di flusso del campione e la carica superficiale delle particelle colloidali in meq/L dati dal volume di polielettrolita consumato fino a neutralizzazione ($mV=0$) e dalla sua normalità (N/1000).

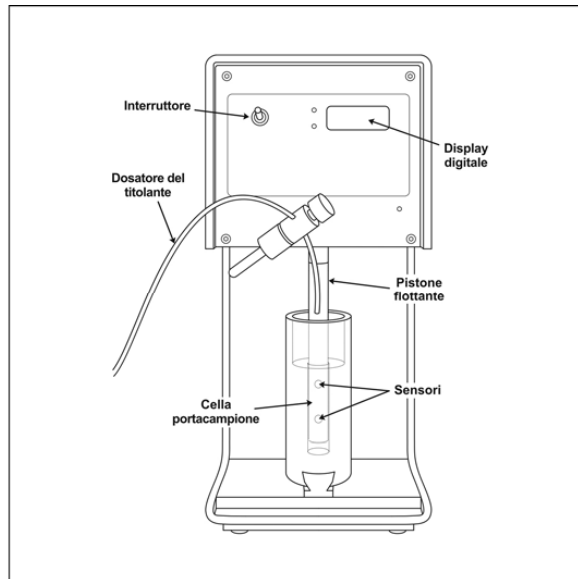


Figura 53: Schema del misuratore di carica superficiale (mod. PCD 03 – MÜTEK).

3.4.4 Quantificazione della frazione proteica

Le proteine solubili sono valutate seguendo due metodiche: il metodo Lowry ed una determinazione più precisa che prevede il recupero delle proteine col metodo KDS e loro quantificazione colorimetrica con BCA (Vincenzi *et al*, 2005.).

a. Metodo LOWRY

La frazione proteica solubile è stata determinata secondo la metodica di Lowry, come riportata da Regenstein e Regenstein (1984) e consiste in una reazione colorimetrica misurata per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 750 nm. Il metodo si basa sia sulla reazione del Biureto (dove i legami peptidici delle proteine reagiscono con il rame in condizioni alcaline producendo Cu^+ , il quale reagisce con il reattivo di Folin) e la reazione di Folin-Ciocalteu.

La reazione dà un colore blu intenso che, in parte, dipende dal contenuto di tirosina e triptofano.

Il metodo è sensibile fino a concentrazioni di circa 0,01 mg di proteina/mL, e la sua applicazione risulta ottimale su soluzioni con concentrazioni nel range 0,01-1,0 mg/mL di proteina.

Reagenti utilizzati:

- a. Na_2CO_3 al 2% in NaOH 0,1 N (Carlo Erba, Milano, Italia);
- b. $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ all'1% (Carlo Erba, Milano, Italia);
- c. Sodio tartrato al 2% (Carlo Erba, Milano, Italia);
- d. Reattivo di Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)

Giornalmente si prepara il mix di reagenti, unendo nell'ordine 1 mL di soluzione (b), 1 mL di soluzione (c), e 100 mL di soluzione (a); in una cuvetta in vetro (cammino ottico 10 mm) vengono addizionati a 2 mL di tale soluzione 0,4 mL di campione opportunamente diluito (la quantità di proteina deve essere compresa fra 5 e 50 μg); dopo 10 min vengono aggiunti 0,2 mL di reagente (d) e quindi, dopo un'attesa di 30 min, si procede alla lettura dell'assorbanza a 750 nm, contro un bianco preparato sostituendo il campione con acqua distillata.

I risultati (riferiti alle proteine solubili liberate da 1 g di polvere) sono espressi in rapporto ad una retta di calibrazione ottenuta con sieralbumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA).

b. Metodo KDS-BCA

Il metodo prevede la denaturazione delle proteine con sodio-dodecil-solfato (SDS) e la loro successiva precipitazione tramite l'aggiunta di un sale (KCl).

La precipitazione frazionata delle proteine e glicoproteine, descritta da Vincenzi *et al.*, 2005, si ottiene aggiungendo 10 μL di SDS 10% (Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA) ad 1 mL di vino o a 0,5 mL del surnatante ottenuto dopo centrifugazione e filtrazione della feccia trattata e non a 0,45 μm . Dopo aver riscaldato i campioni a 100°C per 5 minuti, si aggiungono 250 μL di KCl 1 M (Carlo Erba, Milano, Italia) e si lascia incubare per 2 ore in agitazione a temperatura ambiente. I complessi di KDS e proteina si separano e vengono recuperati per centrifugazione a 12000 g (13400 rpm, centrifuga Mikro 20 Hettig Zentrifugen) per 15 minuti a 4 °C.

Il pellet viene lavato tre volte con KCl 1 M ed infine essiccato a 40 °C per una notte.

Il pellet secco viene poi risolubilizzato in acqua distillata. Il contenuto di proteine è stato determinato secondo il metodo dell'acido Bicinconinico (BCA) descritto da Smith, 1985 come segue: a 50 μL di campione si aggiunge 1 ml di reattivo (1:50 della soluzione A:B, MicroBCA Protein Assay Kit, Pierce) e incubato a 37 °C per 30 minuti.

La curva di calibrazione viene preparata con gli standard di BSA (Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA) alle concentrazioni di 62,5 - 125 - 250 - 500 e 1000 mcg/mL ed il bianco con acqua distillata al posto del campione. Le letture spettrofotometriche vengono eseguite a 562 nm con cuvette di volume ridotto (1,5 ml). Per reazione colorimetrica i campioni virano dal verde al viola. I risultati vengono espressi come mg/L equivalenti di BSA.

3.4.5 Caratterizzazione delle proteine e glicoproteine

a. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con denaturante - SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Dopo la quantificazione delle proteine con il metodo BCA, a 40 μL di surnatante sono stati aggiunti 20 μL di TRIS HCl 62,5 mM (pH 6,8), contenente 5% (p/v) di 2-mercaptoetanololo, 1,3% (p/v) di SDS e il 10% (p/v) di glicerolo (tutti i reagenti Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA). I campioni sono stati riscaldati a 100 °C per 5 minuti e poi caricati in un gel di separazione al 14% di poliacrilammide.

La separazione è stata effettuata in una cella elettroforetica Mini-PROTEAN III™ (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA) a 25 mA (per ogni gel) per la durata di 2 ore.

I due gel sono stati poi colorati in modo indipendente con due differenti modalità: le frazioni proteiche non glicosilate sono state rivelate mediante Blu di Coomassie, mentre per le glicoproteine si è utilizzato il reattivo di Schiff (entrambi i reattivi Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA).

Per la prima tecnica di colorazione il gel è stato immerso per tutta la notte in una soluzione -colorante, preparata con 0,08% (p/v) Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250), 1,6% (p/v) acido fosforico, 20% (v/v) etanololo e 8% (v/v) ammonio solfato.

Il giorno dopo i gel sono stati sottoposti a lavaggi con una soluzione acquosa fino alla visualizzazione delle bande.

La valutazione dei pesi molecolari delle frazioni separate è stata realizzata mediante una miscela standard di proteine a peso molecolare noto (SDS-PAGE standard, broad range, 200 μL , BioRad Laboratories Inc.), caricata in ogni gel, previa opportuno trattamento di denaturazione, condotto secondo le indicazioni fornite dal produttore; le proteine costituenti tale standard sono riportate in Tab. 23.

Protein Molecular Weights (daltons)				
Protein	Molecular Weight	Broad Range	Low Range	High Range
Myosin	200,000	X		X
β -galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000	X	X	
Trypsin inhibitor	21,500	X	X	
Lysozyme	14,400	X	X	
Aprotinin	6,500	X		

Tabella 23: Standard di peso molecolare utilizzati per l'analisi elettroforetica (catalogo BioRad).

Per le glicoproteine, sono stati caricati su gel al 14% di poliacrilammide come descritto sopra, 10 μL di campione del surnatante di feccia ottenuto dopo centrifugazione e filtrazione a 0,45 μm .

Le glicoproteine sono state colorate con il metodo dell'Acido Periodico e base di Schiff (PAS).

I gel sono stati incubati per 30 minuti in una soluzione fissativa (7% di acido acetico e 40% EtOH) e quindi lavati tre volte con una soluzione di acido acetico al 3% per 10 minuti; sono stati incubati una seconda volta per 1 ora in una soluzione di acido periodico 1% ed acido acetico al 3% e lavati tre volte in acqua distillata per 10 min. Infine i gel sono stati lasciati 1 h in incubazione con il reattivo di Schiff (Vetrotecnica, Padova, Italia).

La caratterizzazione delle bande non è stata possibile in quanto le proteine con alte percentuali di carboidrati non si legano in modo efficiente all'SDS. È stata fatta una caratterizzazione in termini di quantità comparata rispetto al pozzetto.

b. Cromatografia liquida ad alta pressione su gel ad esclusione molecolare (HPLC –gel permeazione)

Un'indagine più accurata per la valutazione e differenziazione delle componenti proteiche glicosilate e di quelle non glicosilate e della variazione nella composizione colloidale delle fecce, dopo il trattamento ad ultrasuoni e rispetto all'idrolisi enzimatica, è stata svolta mediante cromatografia liquida ad alta pressione su gel ad esclusione molecolare.

I campioni sono stati analizzati, in triplo, dopo filtrazione del centrifugato a 0,45 μm . Ai fini analitici sono stati utilizzati due rivelatori: uno spettrofotometrico ($\lambda = 280 \text{ nm}$) (modello 2550 VARIAN) per la valutazione della frazione fenolica e proteica, l'altro a indice di rifrazione (RI 350 modello VARIAN) per l'analisi della frazione colloidale glucidica.

Le colonne utilizzate e le condizioni cromatografiche applicate sono indicate in Tabella 24 e 25.

COLONNA	Fase stazionaria: TSK-GEL G2000SWXL (TOSOH BIOSEP) Dimensioni: 30 cm x 7,8 mm d.i. Particle size : 5 μm Porosità: 125 Å Range di separazione: 5-150 kDa (riferito alle proteine globulari)
PRE-COLONNA	Fase stazionaria: TSK-GEL G2000SWXL (TOSOH BIOSEP) Dimensioni: 4 cm x 6,0 mm d.i.

Tabella 24 Colonna e pre-colonna utilizzate per il frazionamento su gel (HPLC – gel permeazione) della frazione colloidale.

Pompa	Modello: 2510 (VARIAN)
Rivelatori	Rivelatore 1: spettrofotometrico (UV); modello: 2550 (VARIAN) $\lambda = 280 \text{ nm}$ Rivelatore 2: indice di rifrazione (IR); modello: 350 RI (VARIAN)
Integratore	Sistema computerizzato CHROM - CARD per Windows, versione 1.19 (1997)
Eluente	Tampone tartarico-alcolico, 10% etanolo v/v, pH 3,5
Condizioni	Isocratica
Cromatografiche	Flusso: 0,6 mL/min
Iniezione	Valvola di iniezione manuale modello 7125 NS (RHEODYNE) Volume di iniezione: 50 μL

Tabella 25: Strumentazioni e condizioni operative utilizzate per il frazionamento su gel (HPLC – gel permeazione) della frazione colloidale.

Per calcolare il peso molecolare relativo ai picchi, gli standard di proteine impiegati per la retta di taratura ed i corrispondenti volumi di eluizione sono riportati nella seguente tabella (Tabella 26):

Standard Proteine	Volume Eluizione (mL)	Tempo di Ritenzione (min)	PM (kDa)
BSA	7,878	13,13	66
Ovoalbumina	8,676	14,46	44,3
B-Lactoglobulina	9,192	15,32	36
Pepsina	9,63	16,05	35
Tripsina	10,692	17,82	23,3
Lisozima	13,392	22,32	14,3

Tabella 26: Standard di proteine utilizzati per retta di taratura.

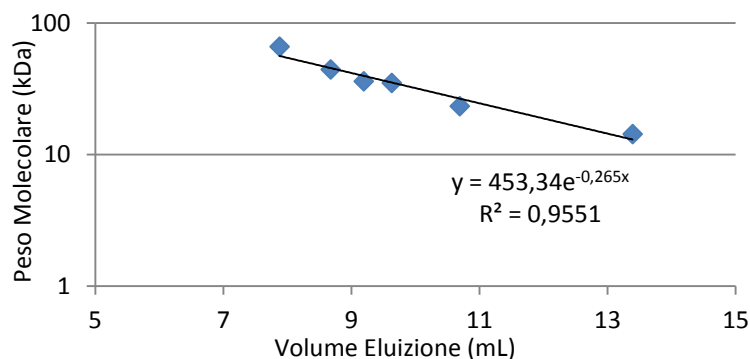


Figura 54: Retta di taratura della colonna TSK gel G2000SWXL.

Per la colonna G2000SWXL si è effettuata una calibrazione (Fig. 54) mediante gli standard indicati, eluiti con una soluzione di NaCl 0,3 M in tampone fosfato (0,05 M, pH 7,0) (Carlo Erba, Milano, Italia), in condizioni isocratiche e con un flusso di 0,6 mL al minuto. La rivelazione è stata condotta con rivelatore spettrofotometrico UV ad una lunghezza d'onda di 220 nm (secondo le indicazioni riportate dal produttore).

3.4.6 Quantificazione dei polisaccaridi

La quantificazione dei polisaccaridi è stata effettuata secondo il metodo del fenolo-solforico descritto da Dubois *et al.* (1956). Anche se sono stati descritti metodi più complessi per una precisa quantificazione delle glicoproteine (idrolisi acida abbinata alla gascromatografia, concanavalina A, metodi enzimatici), questo sembra il metodo di analisi più semplice ed adeguato considerato anche il profilo dei campioni della feccia visualizzato in HPLC ed avendo come obiettivo quello di ottimizzare il trattamento che dà i risultati migliori comparato all'autolisi assistita con β -glucanasi e a quella naturale.

I polisaccaridi vengono precipitati con etanolo al 96% (Carlo Erba, Milano, Italia) aggiungendo 400 μ L a 100 μ L di campione e lasciati per una notte. Il giorno dopo, si procede con la centrifugazione a 1800 g (5000 rpm) per 20 minuti. I pellet vengono quindi lavati tre volte con etanolo e lasciati evaporare. Infine vengono risolubilizzati ad 1 mL in acqua distillata (1:10).

A 200 μ L di campione diluito sono stati aggiunti 200 μ L di fenolo (Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, MO, USA) (soluzione preparata al 5% (p/v) in acqua distillata) e quindi 1 mL di acido solforico concentrato (Carlo Erba, Milano, Italia). I tubi sono stati lasciati riposare 10 minuti (per raffreddarli) quindi agitati e lasciati a riposo per altri 10 minuti. Una volta che si sviluppa la colorazione arancio-oro questa rimane costante.

Le misure colorimetriche dei campioni e del bianco, preparato con acqua al posto del campione, sono state lette per via spettrofotometrica a 490 nm in cuvetta al quarzo di

volume ridotto (1 mL). Le curve di calibrazione sono state preparate sia con standard di glucosio che di mannosio in un intervallo di concentrazione 12,5 - 200 mg/L.

3.4.7 Test di stabilità proteica

3.4.7.1 Torbidità

Le misure di torbidità sono state condotte utilizzando un nefelometro (Eutech Instruments Turbidimeter modello TN-100), che misura la limpidezza di un liquido, come luce diffusa in una data direzione, in NTU (unità di torbidità nefelometrica) ed è in grado di apprezzare valori di 0,01 NTU.

La torbidità dei campioni è stata letta dopo trattamento ad ultrasuoni o dopo centrifugazione nel caso delle prove a lungo termine.

3.4.7.2 Determinazione della stabilità proteica mediante PROTOCHECK

Il metodo, elaborato da Celotti (2004), prevede la reazione delle proteine potenzialmente instabili presenti nel vino con un polielettrolita anionico organico; il livello di torbidità che si forma dipende dalla stabilità proteica.

Viene effettuata una prima lettura sul vino tal quale (T1) e successivamente si aggiunge, alla soluzione di polielettrolita, il vino in rapporto 2:1, quindi, subito dopo agitazione viene letta la nuova torbidità (T2).

Il campione non necessita di filtrazione, a meno che non abbia un valore iniziale di torbidità superiore a 200 NTU.

Le letture vanno ripetute fino a stabilità del risultato ottenuto nei successivi 3-4 minuti, se il dato tende a diminuire è necessario considerare il valore più alto.

Il valore ProtoCheck va calcolato come differenziale di torbidità $(T2 - T1/1,5)$, dove 1,5 è il fattore di diluizione.

Il campione si considera stabile quando il valore ProtoCheck è pari a zero.

3.4.7.3 Determinazione della stabilità proteica mediante TEST A CALDO

Diversi sono i test a caldo utilizzabili, si basano sul fatto che le proteine instabili vengono denaturate e precipitano quando riscaldate. Per le prove è stato seguito il metodo descritto da Dubourdieu *et al.* (1988) secondo il quale i campioni vengono lasciati ad 80 °C per 30 minuti. Dopo riscaldamento i campioni vengono fatti raffreddare a temperatura ambiente prima di effettuare la lettura della torbidità.

Il risultato deriva dalla differenza tra la torbidità iniziale e quella dopo riscaldamento; il vino viene considerato stabile quando la differenza è inferiore o uguale a 2 NTU.

3.4.7.4 Determinazione della stabilità proteica mediante TEST A FREDDO con aggiunta di tannino

Il test a freddo viene eseguito su 10 mL di campione, a cui è stata misurata la torbidità iniziale T1. Al campione vengono aggiunti 0,5 mL di una soluzione idroalcolica al 5% di

tannino ellagico (EverIntec, Pramaggiore, Venezia, Italia) dopo agitazione si legge il valore di torbidità T2. È necessario, inoltre, misurare il grado di torbidità della soluzione al 5% di tannino utilizzata (T3). Il risultato del test a freddo sarà dato dall'espressione:

$$[T2 - (T1 + T3/21)]$$

dove 21 indica il fattore di diluizione del tannino.

Con questo test viene considerato instabile un vino con una differenza di torbidità pari a 20 -30 NTU, ma talvolta valori inferiori sono già indice di instabilità.

3.5 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.5.1 STUDIO DEGLI EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SULLE FECCE FINI

3.5.1.1 Rilascio di colloidali dopo trattamento ad ultrasuoni

a. Effetto litico provocato dal trattamento ad ultrasuoni sulle fecce fini

Le prove sono state condotte seguendo il disegno sperimentale descritto nella sezione ‘Materiali e Metodi’ della Parte 1.

I risultati commentati in questa sezione dovrebbero dare un’indicazione di quelle che sono le condizioni di trattamento più interessanti sulla base dei loro effetti.

Gli ultrasuoni, attraverso il loro effetto di disgregazione cellulare, facilitano la liberazione in soluzione di alcune macromolecole e la loro separazione per centrifugazione: il trattamento sulle fecce fini si è dimostrato efficace considerato l’aumento dei colloidali solubili, rispetto al campione di riferimento, che dipende sia dal tempo che dalla percentuale di amplitudine (anche se in misura minore per quest’ultima) (Fig. 55); estrazione che è risultata significativa anche per tempi brevi e percentuali intermedie come si riscontra dalla curva di superficie di risposta (Fig. 56). Tale aumento potrebbe assumere un valore significativo anche dal punto di vista tecnologico nel caso in cui vengano sottoposti ad ultrasuoni vini in affinamento sulle fecce.

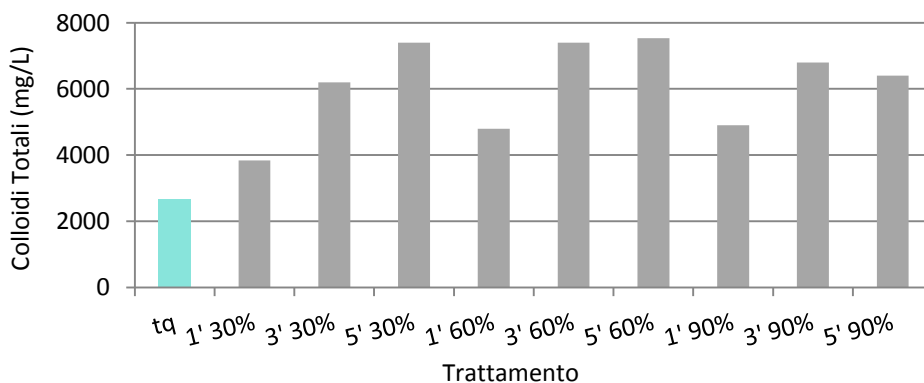


Figura 55: Effetto del trattamento ad US sull'estrazione dei colloidali solubili dalle fecce fini rispetto al campione di riferimento (tq).

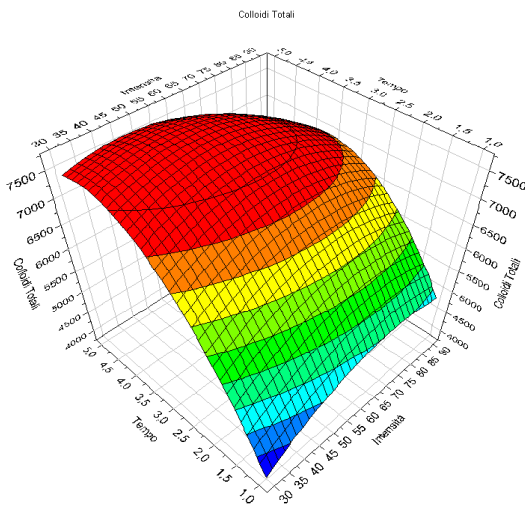


Figura 56: Superficie di risposta dei colloidi solubili totali estratti durante trattamento ad US in funzione del tempo e della percentuale di amplitudine del trattamento.

Per capire la natura delle sostanze che vengono influenzate dal trattamento, sono state valutate le fecce risultanti dal punto di vista della carica elettrica e del contenuto proteico come proteine presenti nei colloidi solubili e secondo i test di stabilità.

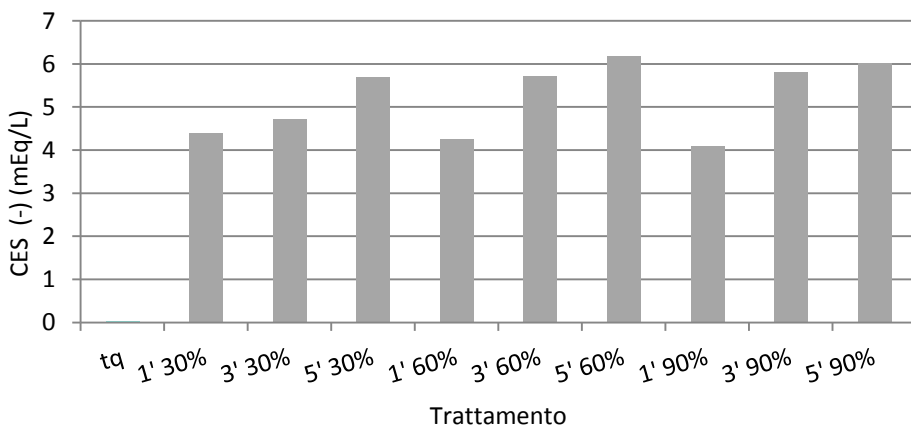


Figura 57: Carica elettrica superficiale (-)(mEq/L) dei campioni sottoposti a trattamento ad US rispetto al campione di riferimento (tq).

Durante il trattamento di sonicazione è stato riscontrato un aumento dei valori della carica elettrica negativa superficiale, rispetto al campione non trattato, per tutte le condizioni di trattamento con un impatto maggiore dei tempi lunghi e dell'alta percentuale di amplitudine (60% e 90%) (Fig. 57). Questo aumento della carica elettrica negativa superficiale, può suggerire, considerata la natura della parete cellulare dei lieviti, un

rilascio di polisaccaridi e/o della componente fenolica, ma anche una possibile rottura delle catene polipeptidiche proteiche, con liberazione ed aumento dei loro gruppi funzionali di carica elettrica negativa.

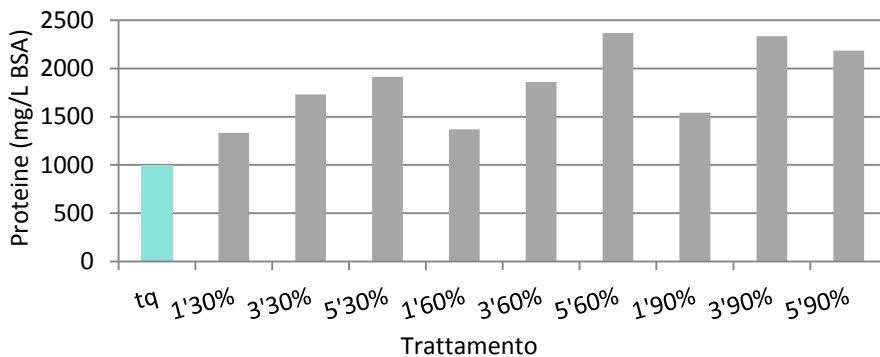


Figura 58: Media delle proteine quantificate con il metodo Lowry sul surnatante dei campioni trattati con US e sul riferimento (tq).

Il contenuto proteico misurato sul surnatante delle fecce trattate è risultato superiore al contenuto dei colloidi totali, probabilmente per le possibili interferenze dovute alle sostanze fenoliche. Dal momento che l'interferenza è comune a tutti i campioni, si ritiene che i risultati siano comunque validi ai fini del confronto analitico.

Come si nota dai risultati, il contenuto proteico aumenta con il tempo di sonicazione, piuttosto che per l'intensità (Fig. 58). L'incremento in proteine conferma l'effetto distruttivo degli ultrasuoni sulle strutture cellulari dei lieviti, ed è quindi possibile che comportino ulteriori conseguenze, positive o negative, significative sulle altre componenti cellulari (Fig. 59).

Anche il test di stabilità proteica ProtoCheck ha rilevato un aumento dell'instabilità correlata all'intensità ed al tempo di trattamento. Gli alti valori di ProtoCheck potrebbero essere dovuti all'instabilità del sistema causata dalla rottura delle proteine conseguente al trattamento di sonicazione.

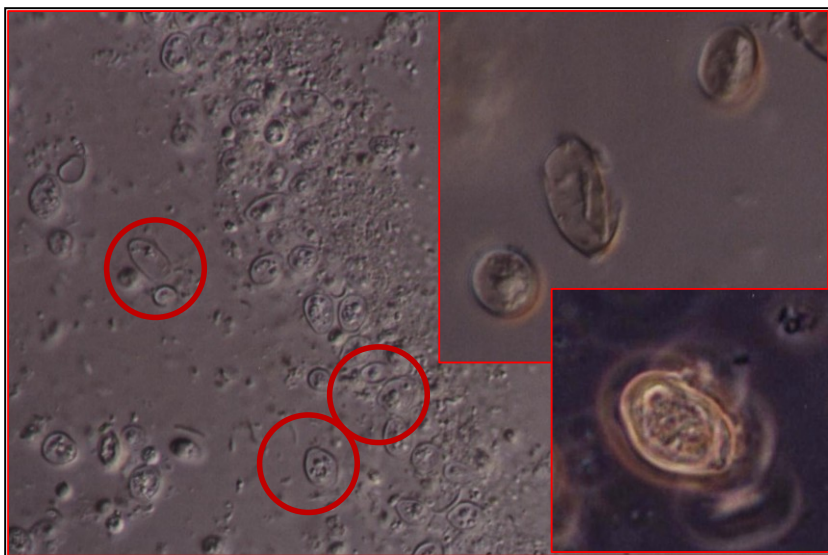


Figura 59: Immagine rilevata al microscopio ottico (1000x) del campione di feccia dopo trattamento; è possibile notare la rottura delle membrane e pareti cellulari provocata dagli US e la fuoriuscita del particolato cellulare.

Le valutazioni effettuate sulla variazione della frazione colloidale attraverso HPLC-*gel permeation* con i due tipi di detector stimano le diverse frazioni di polisaccaridi e proteine e confermano le considerazioni precedentemente riportate.

Dall'analisi del tracciato ottenuto all'indice di rifrazione si evidenziano principalmente tre frazioni di PM pari a 86,6 kDa, 16,7 kDa e 15,4 kDa, mentre l'analisi del tracciato ottenuto nell'UV (280 nm) ha reso possibile la rivelazione di un numero maggiore di frazioni (imputabili a sostanze di natura proteica e fenolica). Il picco risultato più interessante è stato quello corrispondente alla frazione di PM pari a 16,7 kDa, presente in entrambi i tracciati ed ipotizzabile in una frazione prevalentemente di natura glicoproteica (Fig. 60-sx). Questo potrebbe essere in accordo con il tipo di sostanze rilasciate dalle fecce.

Allo scopo di investigare ulteriormente la natura delle frazioni eliminando le possibili interferenze (ad es. da polifenoli) stati aggiunti ai campioni tre diversi chiarificanti (Fig. 60-dx). Relativamente alle frazioni individuate dal detector IR, si nota che solo la gelatina ha reagito con i residui di zucchero, mentre PVPP e carbone non hanno mostrato interferenze di natura fenolica. Le frazioni rilevate col rivelatore UV, invece, hanno reagito con tutti e tre gli agenti e sono state interessate in maniera maggiore dal carbone che dal PVPP. Tuttavia, il profilo del cromatogramma è risultato simile, confermando che la frazione circa di 16,7 kDa potrebbe essere una glicoproteina.

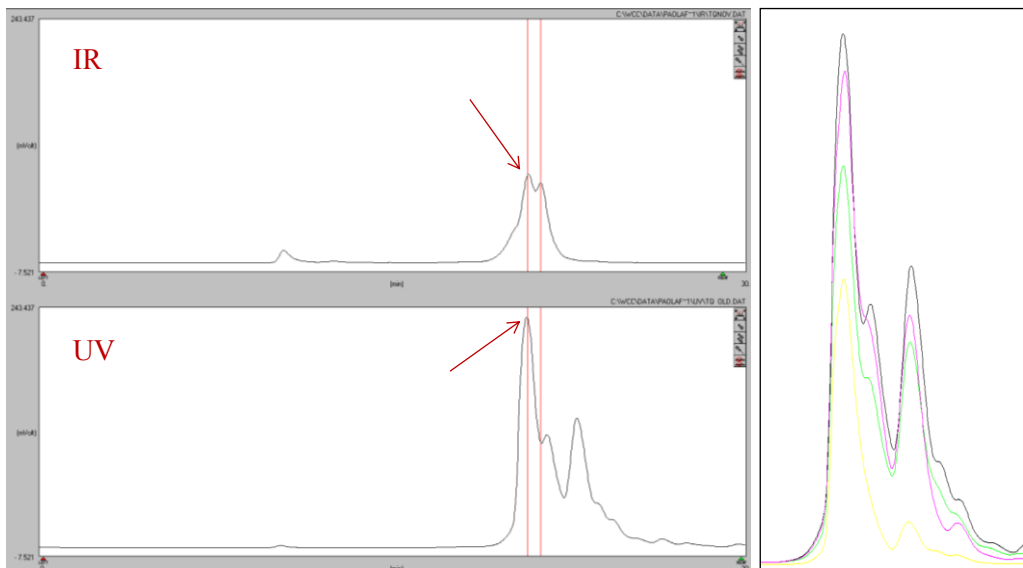


Figura 60(sx): Individuazione mediante HPLC-gel permeation delle frazioni colloidali sia per il detector IR (alto) che per quello UV (basso) per il campione di riferimento. La frazione a 16,7 kDa (tr 20.7 min) viene rilevata da entrambi i detector.

Figura 60 (dx): Analisi HPLC-gel permeation: variazione del tracciato UV (λ 280 nm) del campione di riferimento (tracciato nero), in seguito a trattamento con PVPP (rosa), gelatina (verde) e carbone (giallo), al momento della preparazione dei campioni.

Il trattamento ad ultrasuoni determina, quindi, in conseguenza dell'effetto della cavitazione sulle cellule di lievito presenti nella feccia fine, un arricchimento selettivo nel mezzo in frazioni colloidali che sono presumibilmente di natura glicoproteica (Ferraretto *et al.*, 2013).

Anche le frazioni rilevate all'IR subiscono un aumento, sono quindi ipotizzabili incrementi anche a carico dei polisaccaridi (Fig. 61 e 62).

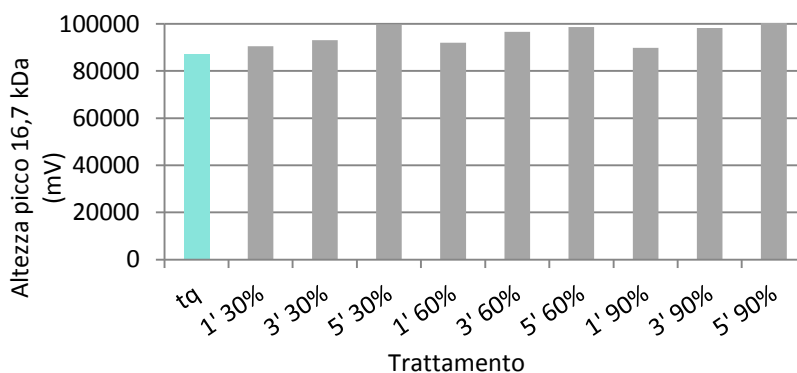


Figura 61 Variazione dell'altezza del picco della frazione di massa 16,7kDa rilevata all'IR in seguito a trattamento ad US confrontata con il campione di riferimento (tq).

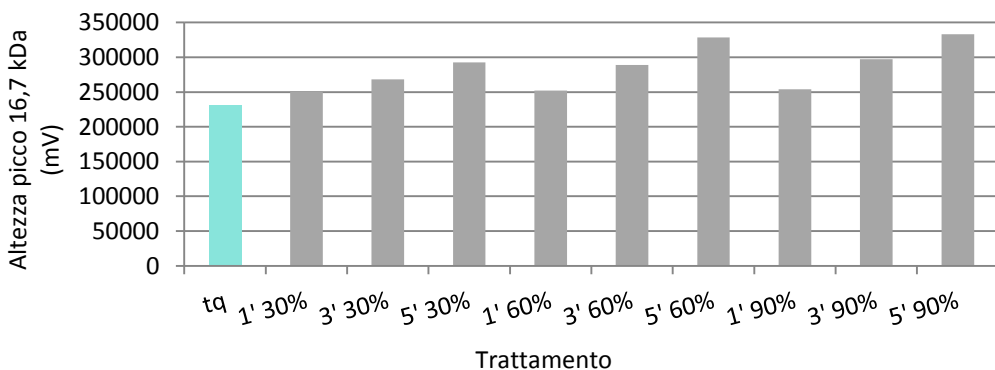


Figura 62: *Variatione dell'altezza del picco della frazione di massa 16,7kDa rilevata all'IR e all'UV in seguito a trattamento ad US confrontata con il campione di riferimento (tq).*

Dai risultati ottenuti sui campioni sottoposti a trattamento ad ultrasuoni:

- È interessante notare come le frazioni della glicoproteina che apparivano in entrambi i rivelatori, aumentino con il trattamento e più per il fattore tempo che per l'intensità; questo incide in particolar modo sulla componente proteica, mentre la parte polisaccaridica della molecola resta pressoché invariata.
- Nel rivelatore UV vengono identificate una nuova frazione ad elevato peso molecolare (106,40 kDa) ed una frazione a basso peso molecolare (9,6 kDa) senza alcuna correlazione tra l'aumento della frazione ed il tempo di trattamento o l'intensità. La frazione a circa 12 kDa è risultata simile tra i diversi trattamenti.
- Il rivelatore IR indica che la frazione a circa 86,6 kDa aumenta sia con l'amplitudine che con il tempo di trattamento; in particolare per trattamenti di cinque minuti vi è un aumento proporzionale per la% di amplitudine e per trattamenti al 90% di amplitudine vi è un aumento dovuto al tempo (Fig. 63).

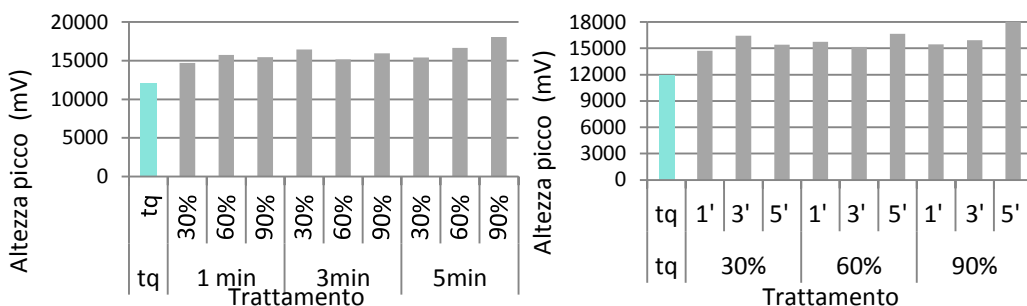


Figura 63: *Effetto del trattamento ad US sulla frazione a 86,6 kDa rilevata dal detector IR. I risultati sono rappresentati in funzione del fattore tempo (sx) e della percentuale di amplitudine (dx).*

Una tecnica più accurata come quella dell'HPLC-*gel permeation* ha consentito la valutazione del rilascio delle sostanze colloidali, che è risultata essere in linea con la determinazione dei colloidali solubili. Quest'ultima diventa pertanto un indice significativo dell'effetto della cavitazione sulle cellule di lievito e quindi dell'efficacia di trattamento (Ferraretto *et al.*, 2011).

I risultati sperimentali ottenuti come funzione del livello di amplitudine (%) e del tempo di trattamento (min), sono riportati in Tab. 27.

Exp No.	Run order	Temperatura (°C)	Amplitudine (%)	Tempo (min)	Colloidi Totali (mg/L)	Proteine (mg/L BSA)	Altezza picco IR (16.5kDa)	(-) CES (mq/L)	Size Ø (nm)
1	11	23.7	30	1	3840	12202	92464	4.39	865
2	7	23.2	90	1	4907	11101	94748	4.10	799
3	5	33.1	30	5	7400	15400	98788	5.69	367
4	1	42.4	90	5	6400	14623	112314	6.02	605
5	2	24.2	30	3	6200	11968	96741	4.7	613
6	8	39.5	90	3	6800	12494	98658	5.80	513
7	9	25.0	60	1	4800	11706	94291	4.24	798
8	3	38.6	60	5	7533	12936	103678	6.18	546
9	6	33.1	60	3	7440	13097	97809	5.65	395
10	10	32.7	60	3	7280	11864	100493	5.74	496
11	4	32.0	60	3	7480	11927	99691	5.70	332
Tq					2667	10475	88657	0.039	1140

Tabella 27: Matrice e risultati del disegno sperimentale per la prova relativa alla valutazione dell'effetto litico degli US sulla feccia fine.

Tempo e ampiezza hanno effetti significativamente positivi sulla resa del processo: l'applicazione degli ultrasuoni sulle fecce accelera l'arricchimento del mezzo riducendo, pertanto, il tempo di affinamento a pochi mesi.

Infine, per quanto riguarda i diametri delle particelle, i valori registrati confermano che il trattamento ad ultrasuoni provoca una riduzione di tali valori come riportato in Mason *et al.* (1996) e Patist e Bates (2008), con un impatto minimo per i tempi brevi, indipendentemente dalla percentuale di amplitudine.

I parametri statistici del modello della superficie di risposta sono riportati nella Tab. 16. Il modello ha mostrato elevati coefficienti di correlazione per tutti i parametri considerati, tranne che per il tenore in proteine. Tale modello si è dimostrato efficace per lo studio dell'estrazione dalle fecce in funzione del livello di amplitudine e del tempo di sonicazione. Il coefficiente di determinazione per i parametri predetti ha mostrato una buona correlazione con i dati sperimentali con livello di confidenza del 95%.

Coefficiente	Colloidi Totali	Proteine	Altezza Picco IR 16,5 kDa	(-) CES	Ø Particelle
F	336,467	4,33459	11,7391	64,3699	10,9615
P	0,000	0,090	0,017	0,001	0,019
R²	0,997629	0,845159	0,938178	0,987742	0,942299
R² Adj.	0,994664	0,65161	0,860901	0,972418	0,870172
Q²	0,865605	0,331127	0,679921	0,849586	0,599272
Validità modello	0,855729	0,758821	0,615231	0,295293	0,917044
Riproducibilità	0,994003	0,734097	0,940171	0,996695	0,813579

Tabella 27: Analisi della varianza dei parametri di regressione del modello predittivo per i diversi parametri. In grassetto sono riportate le differenze significative ($p \leq 0,05$).

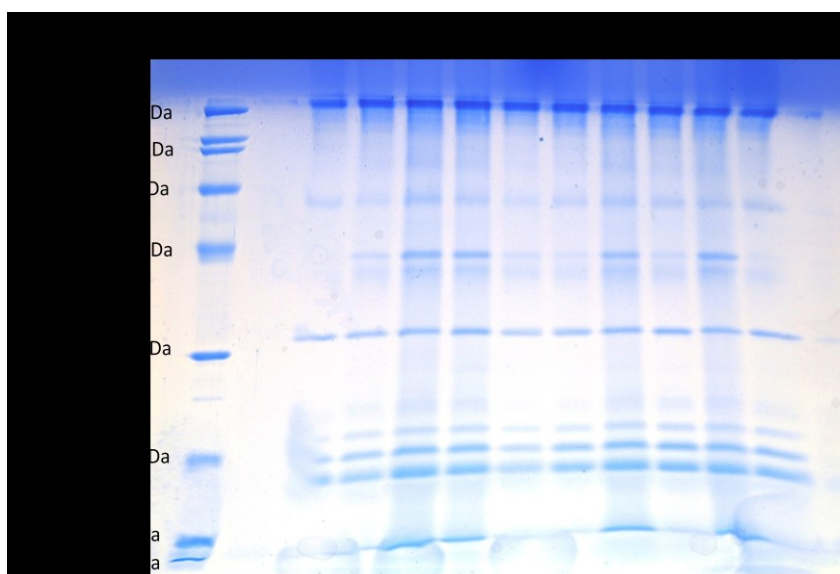


Figura 64: Tracciato ottenuto in SDS-PAGE dei campioni di fecce fini del piano sperimentale trattati con US e del campione di riferimento. L'ordine dei campioni nei pozzetti corrisponde a quello riportato in materiali e metodi. Volume del campione: 40 μ L, la prima colonna contiene gli standard di proteine a PM noto

Come si può vedere dal tracciato ottenuto in SDS-PAGE (Fig. 64), le bande più intense e lo striscio di fondo corrispondono ai campioni trattati per 5 minuti al 60% di amplitudine (linea 3), 3 minuti al 60% (linea 4 e 10) e 3 minuti al 90% di amplitudine (linea 8). Il trattamento più intenso (5 minuti al 90% di amplitudine) non compare nel gel ma si presume presentasse bande simili a quelle evidenziate.

Riassumendo, in base alle varie determinazioni analitiche, i trattamenti ad ultrasuoni che danno gli effetti più importanti sono quelli condotti per 5 minuti al 60% di amplitudine e quelli di 3 e 5 minuti al 90% di amplitudine (la temperatura massima registrata per il

campione sottoposto a trattamento più intenso è stata di 47,6 °C; tale temperatura potrebbe non influenzare la qualità finale del prodotto considerati i brevi tempi di trattamento ed il fatto che sono state trattate solo le fecce liquide e non l'intera massa del vino) (Cacciola *et al.*, 2013).

b. Monitoraggio nel tempo

Per valutare l'effetto del trattamento ad ultrasuoni rispetto alla lisi naturale o indotta è stato scelto il trattamento di 3 minuti (che provoca un minore aumento della temperatura del campione) al 90% di amplitudine. Le prove sono state condotte sulla stessa feccia fine utilizzata per la prova precedente.

Sono state preparate tre bottiglie da 750 mL per ogni prova - trattamento ad ultrasuoni, trattamento con β -glucanasi (40 mg/L) e controllo autolisi naturale - e conservate a temperatura di cantina per più di sette mesi. Le analisi sono state eseguite al momento iniziale, dopo 10 giorni, dopo un mese, dopo tre mesi ed infine dopo sette mesi.

Vengono considerati, dapprima, gli effetti nel tempo sulle fecce trattate con ultrasuoni, in seguito, tali risultati saranno confrontati con i campioni trattati enzimaticamente e con quelli sottoposti ad autolisi naturale.

US 3' 90%	Proteine Lowry (mg/L BSA)	Colloidi (mg/L)	(-) CES (mEq/L)	Ø Size (nm)	Torbidità (NTU)
t0	8077	1291	1,18	429	235
10 giorni	8653	1170	1,92	306	228
30 giorni	9222	1574	2,52	449	245
3 mesi	19326	3399	3,48	819	142
7 mesi	20225	10721	7,29	364	97

Tabella 28: Effetto degli US sulle fecce fini a t0 e dopo 10 e 30 giorni, 3 e 7 mesi dal trattamento.

Per quanto riguarda i colloidi totali vi è una evoluzione nel tempo che raddoppia dopo tre mesi dal trattamento e raddoppia ulteriormente dopo sette mesi. I colloidi totali e le proteine (metodo Lowry) sono aumentati nel corso del tempo. I risultati del metodo Lowry, anche in questo caso, appaiono più alti rispetto alla quantità totale dei colloidi, ma restano comunque dati validi ai fini del confronto.

La carica elettrica superficiale negativa aumenta nel tempo e tale carica potrebbe derivare o dai polisaccaridi o dalla liberazione di gruppi funzionali con carica negativa derivanti dalla rottura delle proteine.

La torbidità diminuisce nel tempo (Tab. 28), ma questo parametro non è correlato con la dimensione delle particelle e non si traduce in risultati migliori nelle prove di stabilità proteica (Testa a caldo e ProtoCheck).

I risultati dell'HPLC-gel permeation sono riportati nella seguente tabella (Tab 29):

IR	kDa	mV	kDa	Mv	kDa	mV	kDa	mV
t0	92,01	4114	16,39	71543	15,04	56705		
10gg	87,82	3749	16,26	63369				
30gg	87,48	6332	16,46	83245	15,10	83385		
7m	84,40	17999	16,12	122540			11,22	8584
UV	kDa	mV	kDa	mV	kDa	mV	kDa	mV
t0	17,55	60600	16,52	45328	12,75	50441	10,77	31765
10gg	16,97	98706	14,75	49270	12,02	65166		
30gg	17,36	246260	13,42	129201	12,46	131093	9,92	46876
7m	16,31	551849			11,45	466946	7,09	14708
				UV	kDa	mV	kDa	mV
				7m	5,54	12147	4,08	3623

Tabella 29: Frazioni rilevate all'HPLC ed altezza massima dei picchi rivelati dai detector IR ed UV dei campioni di fecce fini a t0 e dopo 10 e 30 giorni, 3 e 7 mesi dal trattamento.

Relativamente alle frazioni dei polisaccaridi rilevate, due di queste (87 e 16 kDa) appaiono in tutti i trattamenti nel corso del tempo: il peso molecolare tende a diminuire, mentre aumenta il valore dell'altezza del picco. Vi è una frazione di 15 kDa che viene visualizzata nel campione di riferimento ed anche dopo un mese, ma non negli altri campionamenti; infine una frazione inferiore a 11 kDa che appare invece solo dopo sette mesi.

Tra le frazioni rilevate a 280 nm (UV), ed ipotizzate di natura proteica, si distinguono quelle di circa 17, 14 e 12 kDa che aumentano nei mesi. Nel tempo, appaiono anche frazioni di peso molecolare inferiore (circa 7, 5 e 4 kDa) con altezze dei picchi minori.

Sono stati presi in considerazione, inoltre, anche i dati della replica dei trattamenti di confronto; i risultati a 10 e 20 giorni includono anche un trattamento di 5 minuti al 60% di amplitudine e sono riportati nella seguente tabella (Tab. 19). In questo caso, sono stati utilizzati due metodi di quantificazione delle proteine ed è stata valutata anche il contenuto di polisaccaridi espresso come mg/L equivalenti di glucosio e mannosio.

US	Colloidi (mg/L)		Proteine Lowry (mg/L BSA)		Proteine KDS-BCA (mg/L BSA)		Polisaccaridi (mg/L Glucosio)		Polisaccaridi (mg/L Mannosio)	
	3'90%	5'60%	3'90%	5'60%	3'90%	5'60%	3'90%	5'60%	3'90%	5'60%
t0	2302	2580	4869	4479	56	68	1856	1514	1376	1117
10 gg	3079	3540	7348	8688	83	65	730	943	348	450
20 gg	3550	3030	5324	5725	140	134	1159	1295	553	618

Tabella 30: Effetti nel breve periodo (t0, 10 e 20 giorni) dei due trattamenti ad US (3 min 90% e 5 min 60%) sulle fecce fini.

I colloidi totali aumentano nel tempo per il trattamento di 3 minuti al 90% dell'amplitudine mentre per quello di 5 minuti al 60% aumentano nei primi 10 giorni per poi diminuire a 20, restando comunque più alti del valore iniziale.

Relativamente al contenuto in proteine, il metodo Lowry - come già visto - non fornisce valori coerenti, ma mostra un aumento a 10 giorni ed una riduzione a 20 giorni, anche se le quantità sono più elevate rispetto al t0. La quantificazione delle proteine descritta da Vincenzi *et al.* (2005) dà risultati che aumentano costantemente nel tempo. La quantificazione dei polisaccaridi, effettuata utilizzando sia glucosio che mannosio come standard, mostra una notevole riduzione a 10 giorni ed un lieve aumento a 20 giorni, comunque sempre inferiore rispetto al contenuto rilevato al tempo iniziale. Dal momento che i colloidi totali ed il contenuto proteico aumentano, la diminuzione dei polisaccaridi potrebbe essere il risultato di una precipitazione tra colloidi di carica opposta.

3.5.1.2 Confronto tra fecce trattate con ultrasuoni, con enzimi ed autolisi naturale

I tre trattamenti sono stati confrontati sulla base delle analisi effettuate sui campioni nei tempi indicati. Sono state svolte le seguenti analisi: colloidi totali, tenore in proteine (metodo Lowry) e HPLC-gel permeation, carica elettrica superficiale, diametro delle particelle, torbidità e stabilità proteica. Non è stato possibile effettuare analisi cromatografica HPLC sui campioni raccolti il terzo mese.

Questo studio si è posto l'obiettivo di identificare le condizioni operative di trattamento delle fecce fini in modo da ridurre i tempi classici (mesi) della lisi naturale e/o eliminare l'aggiunta di enzimi β -glucanasi esogeni.

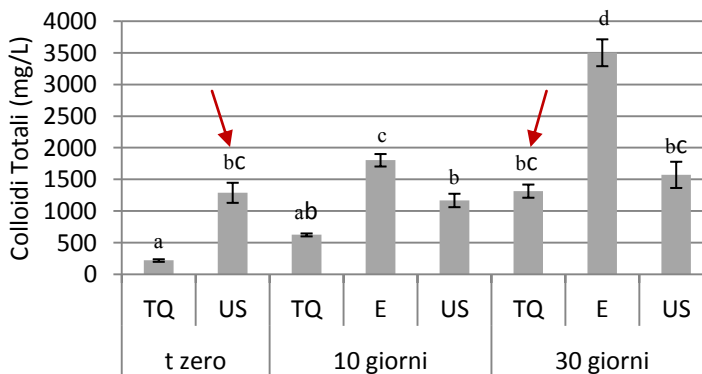


Figura 65: Confronto del contenuto di colloidi totali del campione dopo trattamento con ultrasuoni (US), aggiunto di enzima (E) e del riferimento (TQ) nel breve periodo (t0, 10 e 30 giorni). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

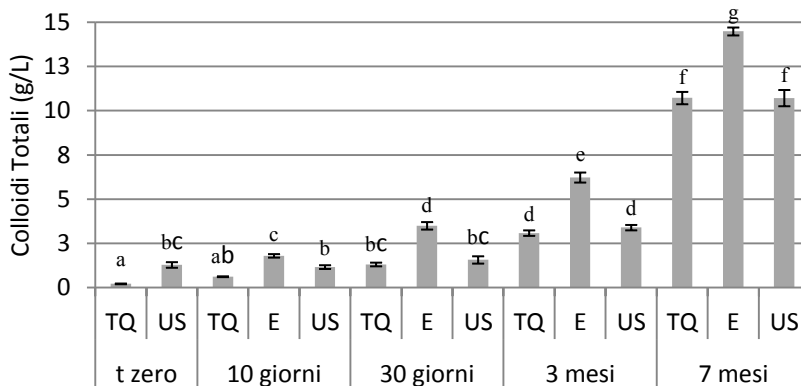


Figura 66: Confronto del contenuto di colloid totali del campione dopo trattamento con US, aggiunto di enzima e del riferimento (TQ) nel lungo periodo (t0, 10 e 30 giorni, 3 e 7 mesi). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

I colloid totali aumentano per tutti i trattamenti, ma i valori più alti si registrano per le prove trattate enzimaticamente. Valutando gli effetti immediati, le analisi effettuate subito dopo il trattamento ad ultrasuoni (t0) mostrano un notevole aumento rispetto al campione di riferimento (TQ). I colloid rilasciati dopo 30 giorni nei campioni non sottoposti a trattamento sono risultati paragonabili a quelli ottenuti in soli 10 giorni dal trattamento ad ultrasuoni (Fig. 65).

L'analisi della varianza ha stabilito che le differenze statistiche maggiormente significative tra i tre trattamenti sono quelle legate al fattore tempo; i colloid rilasciati naturalmente dalle fecce dopo 1, 3 e 7 mesi sono risultati pari a quelli presenti nei campioni trattati con ultrasuoni. L'interesse pertanto rimane solo sugli effetti immediati del trattamento ad ultrasuoni.

La torbidità diminuisce con il tempo di trattamento ad ultrasuoni ed è correlata con la misura del diametro delle particelle; inoltre, risulta più bassa rispetto a quella del campione sottoposto ad autolisi naturale e a quello trattato enzimaticamente, ma questo non si traduce in migliori risultati nei test di stabilità proteica, forse per le possibili interferenze delle glicoproteine col test ProtoCheck.

Le proteine solubili determinate col metodo Lowry aumentano nel tempo, dopo il trattamento, per tutte le serie di campioni, ma non vi sono differenze significative tra i vari campioni prelevati allo stesso momento; è risultato diverso da tutti gli altri campioni il riferimento al tempo iniziale e i campioni analizzati a 10 e 30 giorni da quelli a 3 e 7 mesi. (Fig. 67).

Le fecce trattate con ultrasuoni hanno mostrato un aumento immediato rispetto al controllo che, però, è rimasto invariato a 10 e 30 giorni dal trattamento; non si sono riscontrati, pertanto, vantaggi dovuti al trattamento ad ultrasuoni rispetto all'autolisi.

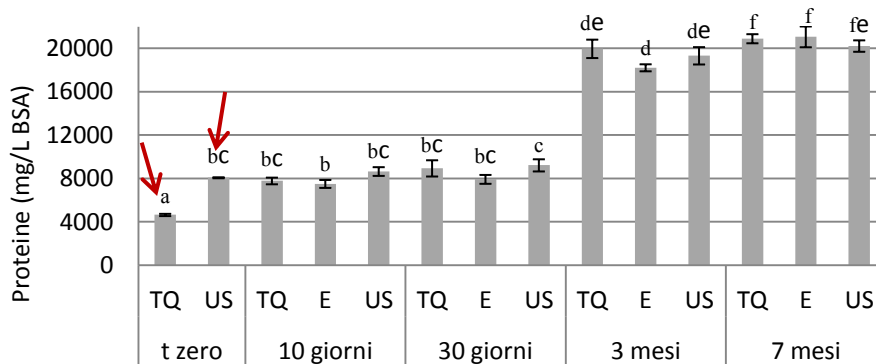


Figura 67: Proteine solubili (mg/L BSA) nel tempo, determinate con il metodo Lowry, per i tre trattamenti a confronto: TQ: riferimento, E: enzima, US: ultrasuoni. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Quando la carica elettrica superficiale negativa aumenta contemporaneamente al contenuto di proteine si può supporre che parte della quantificazione stimata con il metodo Lowry potrebbe essere dovuta all'interferenza delle sostanze fenoliche. Tuttavia, ci si potrebbe aspettare che la carica elettrica superficiale negativa sia dovuta al rilascio di polisaccaridi del lievito.

I valori della carica elettrica superficiale evidenziano gli effetti del trattamento ad ultrasuoni nel breve periodo, mentre nel lungo periodo prevalgono i fattori tempo e trattamento enzimatico (Fig. 68).

In questo studio sulla frazione colloidale, le informazioni sulla carica elettrica sono interessanti se correlate alle interazioni con le altre frazioni colloidali del vino che possono causare precipitazione o stabilità colloidale.

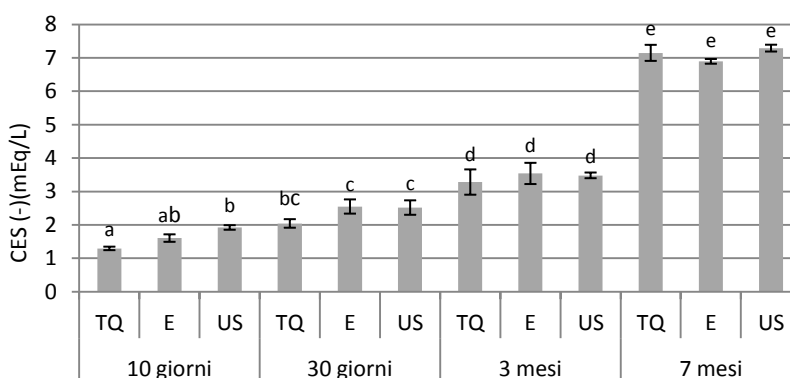


Figura 68: Carica elettrica superficiale (mEq/L) dei campioni della prova di confronto rilevata nel tempo per i tre trattamenti a confronto: riferimento (TQ), enzima (E), ultrasuoni (US). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'analisi cromatografica ha rilevato nei diversi trattamenti, per entrambi i detector, le stesse frazioni già descritte precedentemente nella valutazione effettuata nel tempo. In questa sezione, vengono valutate le differenze tra le tre diverse prove. È interessante notare come la frazione di 86,24 kDa, non individuata al t0, presenti differenze dovute al trattamento: quella derivante dal trattamento ad ultrasuoni presenta un'altezza del picco maggiore rispetto a quella del controllo al tempo iniziale e dopo 10 giorni, ma inferiore a quella trattata enzimaticamente a 10 giorni (Fig. 69). Al tale frazione non è stata individuata nel campione di riferimento. Questo potrebbe esser dovuto al fatto che in 10 giorni, in tali condizioni, l'attività dell'enzima aggiunto ha un forte impatto.

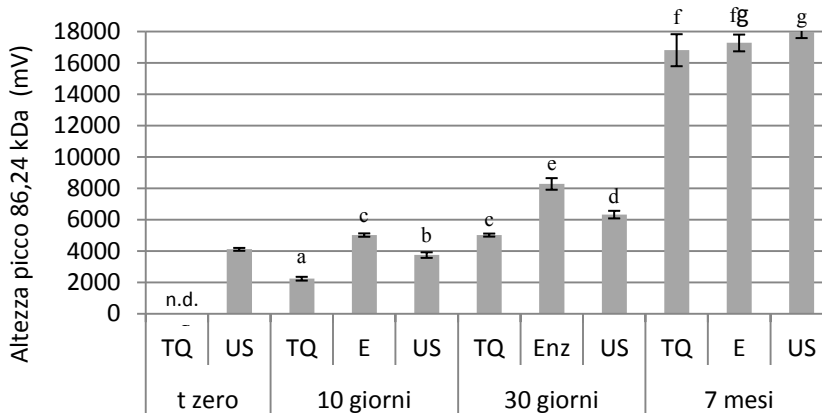


Figura 69: Frazione polisaccaridica di peso molecolare intorno 86.24 kDa individuata all'IR. L'altezza del picco viene utilizzata per valutare le differenze tra i trattamenti: controllo (TQ), enzima (E) ed ultrasuoni (US) nel tempo. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0.05$.

Riassumendo, le differenze tra i trattamenti si notano nel breve periodo, ma i risultati sono analoghi a quelli del lungo periodo.

Poiché l'interesse di questa nuova tecnologia è quello di accelerare gli effetti positivi dell'invecchiamento sulle fecce riducendo il tempo richiesto dalle pratiche abituali, sono state replicate le prove di confronto per capire gli effetti nel breve periodo (10 e 20 giorni dopo il trattamento), ponendo l'attenzione sulla natura dei colloidali. Sono state valutate le proteine con un metodo più selettivo (metodo KDS-BCA) ed il contenuto di polisaccaridi col metodo del fenolo.

Questo metodo più selettivo mostra chiaramente le differenze tra il campione di riferimento ed il campione trattato enzimaticamente: in quest'ultimo il contenuto in proteine diminuisce nel tempo, mentre aumenta in entrambi i campioni trattati con ultrasuoni a 20 giorni (Fig. 70).

Tali risultati non sono in accordo con quelli ottenuti negli stessi campioni col metodo Lowry.

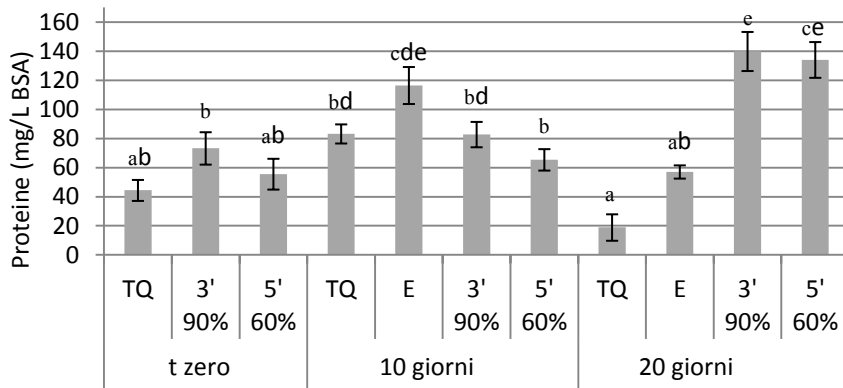


Figura 70: Proteine, determinate per precipitazione con KDS e quantificate con BCA (Vincenzi et al, 2005.), dei campioni sottoposti ai diversi trattamenti: riferimento (TQ), enzima (E) ed ultrasuoni (US) (3 min e 5 min 90% e il 60%) a tempi diversi dopo il trattamento (t0, 10 e 20 giorni). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'ANOVA per il fattore tempo dimostra che non vi sono differenze tra le analisi effettuate a 10 e 20 giorni dal trattamento.

L'ANOVA tra i trattamenti mostra che i risultati del campione di riferimento sono statisticamente diversi dagli altri. Non ci sono differenze tra le fecce trattate enzimaticamente ed il trattamento ad ultrasuoni di 5 minuti al 60% di amplitudine, ma vi sono differenze tra il trattamento enzimatico e quello ad ultrasuoni di 3 minuti al 90% di amplitudine. Il trattamento con ultrasuoni di 3 minuti al 90% di amplitudine è l'unico che presenta, dopo 20 giorni, il maggior aumento del contenuto di proteine.

Il contenuto di polisaccaridi (Fig. 71) espresso in equivalenti di glucosio risulta il più influenzato sia dai trattamenti che dal tempo rispetto a quello espresso in equivalenti di mannosio. Il contenuto iniziale diminuisce dopo 10 giorni, ma aumenta di nuovo dopo 20 giorni. Servirebbero ulteriori approfondimenti per capire se i polisaccaridi totali a tempi diversi rappresentano o meno composti diversi.

Le analisi effettuate subito dopo il trattamento danno un contenuto in zuccheri superiore per le fecce trattate con ultrasuoni rispetto alle fecce di riferimento, ma col tempo la situazione si inverte.

Dopo 10 giorni il controllo rimane il più alto ed invariato, a 20 giorni vi è un aumento per tutti i trattamenti con un maggior impatto per le fecce trattate enzimaticamente e quelle trattate con ultrasuoni per 5 minuti al 90% di amplitudine.

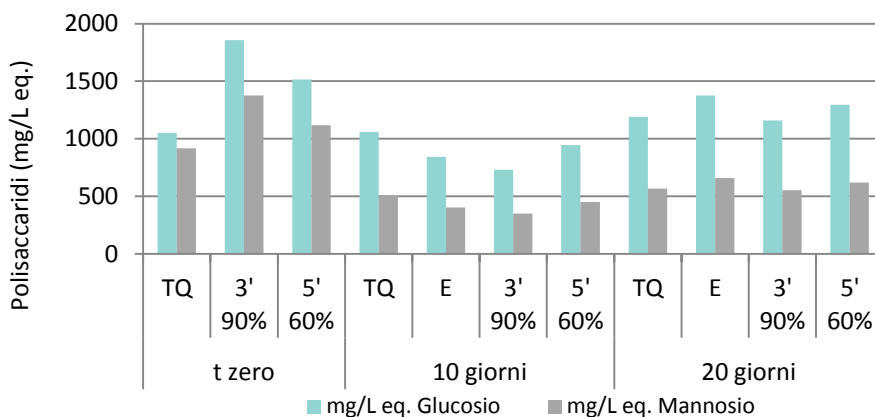


Figura 71: Contenuto dei polisaccaridi determinati col metodo del fenolo-solfonico (Dubois et al., 1956) dei campioni sottoposti ai diversi trattamenti: riferimento (TQ), enzima (E) ed ultrasuoni (US) (3 min e 5 min 90% e il 60%) a tempi diversi dopo il trattamento (t0, 10 e 20 giorni).

Sui campioni rappresentativi dei tre trattamenti prelevati al momento iniziale, dopo 10 giorni, 30 giorni e 3 mesi, è stata eseguita la separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e successiva colorazione con Blu di Coomassie (Fig. 72) (per la visualizzazione delle frazioni proteiche non glicosilate) e reattivo di Schiff (Fig. 73) (per le glicoproteine).

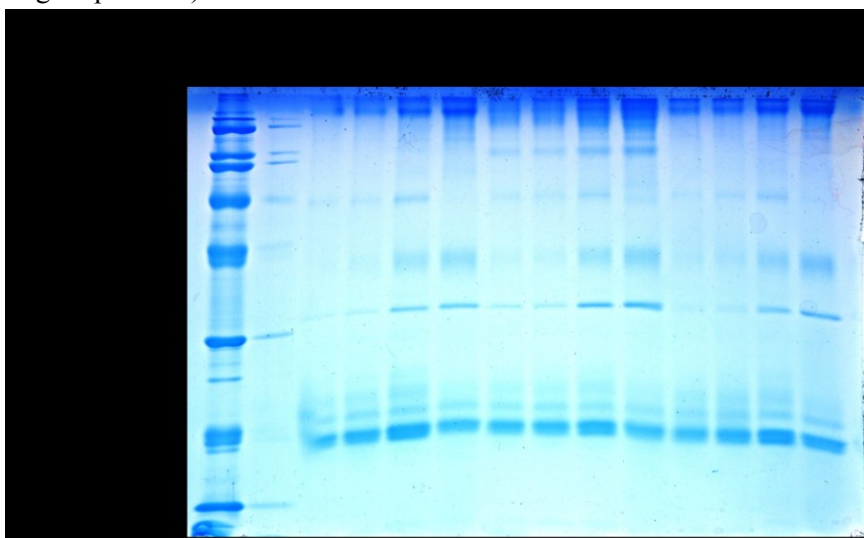


Figura 72: Tracciato ottenuto in SDS-PAGE per le frazioni proteiche non glicosilate dei campioni della prova di confronto: riferimento (TQ), trattamento enzimatico (E) e trattamento con ultrasuoni (US) nel tempo (t0, 10 giorni, 1 e 3 mesi).

La corrispondenza tra le proteine che si trovano nel vino ed il peso molecolare delle bande è, a partire dal basso, la seguente (Fig. 72):

- Banda 3 (21,5 kDa) Thaumatin-like proteins (22 kDa);
- Banda 4 (31 kDa), in accordo con quanto riportato in letteratura, potrebbe corrispondere alla frazione di 31,8 kDa di invertasi parietale del *Sacch. cerevisiae* (più intensa nelle fecce trattate enzimaticamente);
- Banda 5 (45 kDa) corrispondente alla β -glucanasi;
- Banda 6 (66 kDa) corrispondente all'invertasi vacuolare che appare ad un mese dal trattamento e scompare dopo tre mesi;
- Banda 7 (97.7 kDa) e 8 (116 kDa) appaiono solo nei campioni di feccia trattati enzimaticamente;
- Banda 9 (200 kDa) e le bande a più alto peso molecolare aumentano nel tempo per tutti i trattamenti, ma in misura maggiore nelle fecce trattate enzimaticamente.

Le glucanasi rilasciate dal lievito durante l'autolisi naturale appare dopo un mese sulle fecce non trattate, leggermente più intensa in quelle trattate con ultrasuoni e di intensità più alta per quelle trattate con enzima.

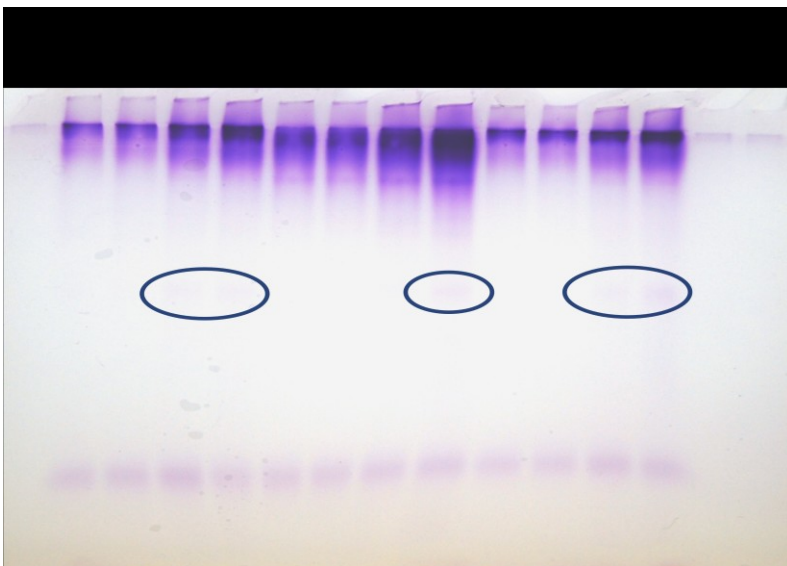


Figura 73: Tracciato ottenuto in SDS-PAGE per le glicoproteine dei campioni della prova di confronto: riferimento (TQ), trattamento enzimatico (E) e trattamento con US nel tempo (t_0 , 10 giorni, 1 e 3 mesi).

Non sono state osservate differenze evidenti tra il controllo e le fecce trattate con ultrasuoni, ma pare che la banda delle glicoproteine ad alto peso molecolare abbia una densità maggiore al tempo iniziale e dopo 10 giorni dal trattamento rispetto al controllo (Fig. 73).

Le fecce trattate con enzima presentano un elevato profilo polisaccaridico. Vi è una frazione di dimensioni più piccole che appare dopo un mese nella feccia controllo ed in quella trattata con ultrasuoni e dopo 3 mesi in quella trattata enzimaticamente (Fig. 73). Anche la prova di confronto, replicata, è stata analizzato mediante SDS-PAGE considerando i campioni al tempo iniziale (t_0), dopo 10 giorni e 20 giorni dal trattamento. In questo caso sono state utilizzare fecce fresche diverse fresche raccolte a novembre 2011.

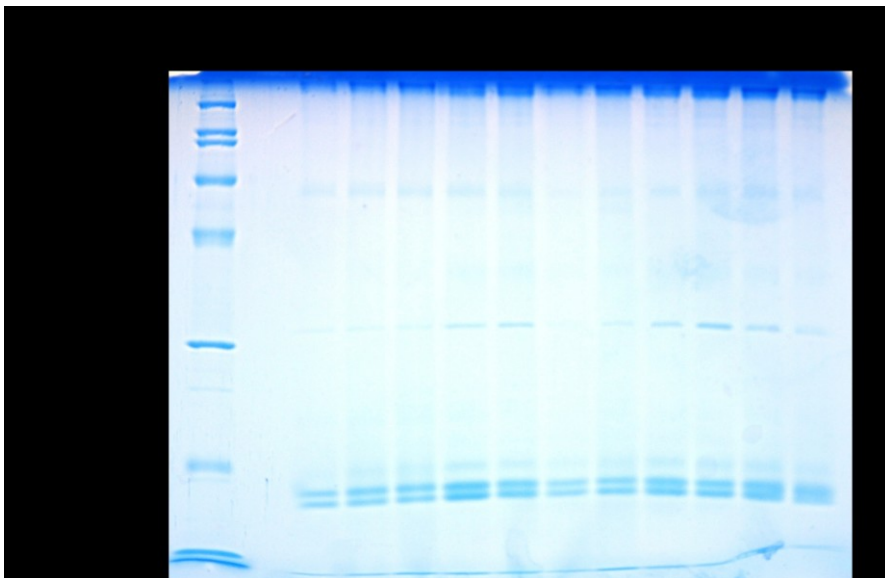


Figura 74: Tracciato ottenuto in SDS-PAGE per le frazioni proteiche non glicosilate dei campioni della prova di confronto (riferimento - T, trattamento enzimatico - E e trattamento con US), replicata, nel breve periodo (t_0 , 10 e 20 giorni).

Le bande in questo gel non sono molto fitte, tuttavia si possono distinguere le Thaumatin-like proteins a circa 20 kDa, il frammento di invertasi a circa 32 kDa e l'invertasi vacuolare vicina ai 66 kDa. I composti ad alto peso molecolare restano nel pozzetto, nel punto di partenza si può notare una banda più netta (Fig. 74). Le differenze tra i trattamenti possono essere commentate in riferimento alla banda a 32 kDa, che è più visibile per le fecce trattate enzimaticamente sia dopo 10 che dopo 20 giorni, rispetto al controllo ed alla feccia trattata con ultrasuoni.

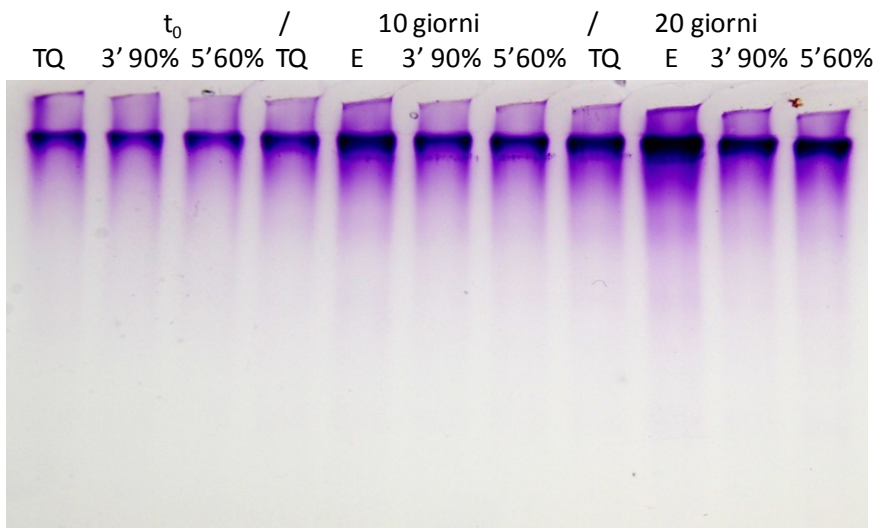


Figura 75: Tracciato ottenuto in SDS-PAGE per glicoproteine dei campioni della prova di confronto (riferimento - T, trattamento enzimatico - E e trattamento con US), replicata, nel breve periodo (t₀, 10 e 20 giorni).

In questo caso, le fecce trattate con enzima presentano di nuovo il contenuto più elevato di polisaccaridi. Le fecce trattate con ultrasuoni non mostrano differenze evidenti rispetto al controllo (Fig. 75).

3.5.1.3 Confronto tra tre diversi tipi di feccia

Per poter confrontare gli effetti sulle diverse fecce, i risultati vengono espressi come aumento percentuale rispetto al campione di riferimento per ogni tipo di feccia.

Le analisi effettuate sono relative a colloidali totali, proteine e polisaccaridi.

Le fecce, descritte in materiali e metodi, sono costituite da una feccia A grossolana, una feccia B, fine, parzialmente fermentata in botte e una feccia C di cui si hanno poche informazioni, ma che sembra ricca in glucani data l'elevata viscosità e difficoltà ad esser centrifugata.

I valori del contenuto in polisaccaridi sono risultati simili, sia quelli espressi in glucosio che in mannosio (Fig. 76 e 77). Per le fecce B e C si è registrato un aumento del contenuto in polisaccaridi dal trattamento meno intenso a quello più intenso (3' 60%, 3' 90% e 5' 60%), mentre per il trattamento di 5 minuti al 90% di amplitudine si sono registrati i valori più bassi.

Per la feccia A, al contrario, si nota uno scarso rilascio di zuccheri dopo il trattamento. Dal momento che si tratta di fecce pesanti, questo potrebbe chiarire perché solo il trattamento più intenso sia riuscito a migliorare i valori rispetto al controllo. Inoltre, il trattamento di 3 minuti al 90% di amplitudine ha dato valori anche più bassi del controllo probabilmente dovuto alle le caratteristiche della matrice trattata.

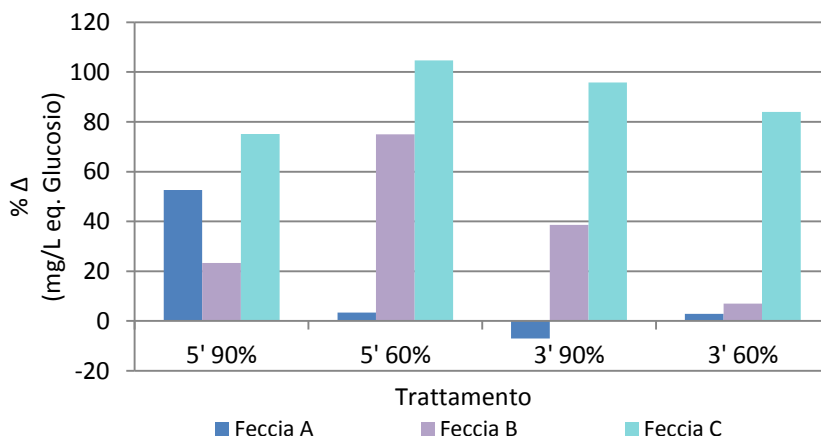


Figura 76: Aumento percentuale del contenuto di polisaccaridi, delle tre diverse fecce (A, B e C) trattate con US per 3 e 5 min al 60% e 90%, rispetto al riferimento, determinate col metodo del fenolo-solfonico ed espresso come mg/L equivalenti di glucosio.

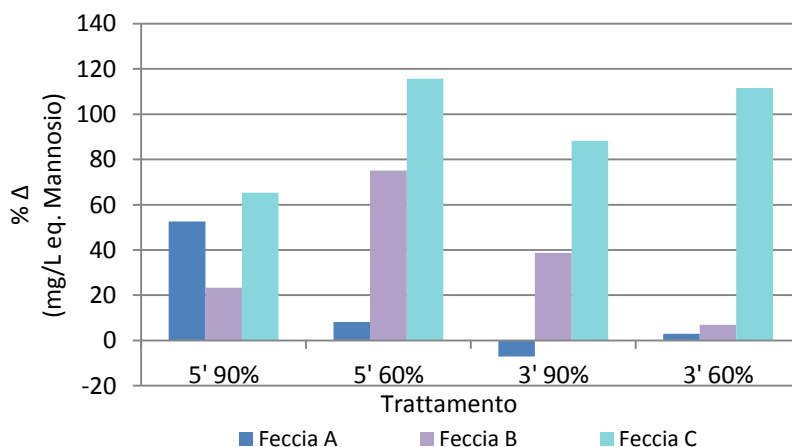


Figura 77: Aumento percentuale del contenuto di polisaccaridi delle tre diverse fecce (A, B e C) trattate con US rispetto al riferimento, determinate col metodo del fenolo-solfonico ed espresso come mg/L equivalenti di mannosio.

Relativamente al contenuto in proteine, esso aumenta con l'intensità del trattamento per la feccia A, mentre per la feccia B il valori restano invariati ed il trattamento di 3 minuti al 60% risulta equivalente a quello di 5 minuti al 90% (Fig. 78). Tali differenze potrebbero dipendere dal diverso tipo di feccia o dalla presenza di altri composti che interagiscono con le proteine facendole precipitare dal momento che le analisi sono state eseguite sul surnatante.

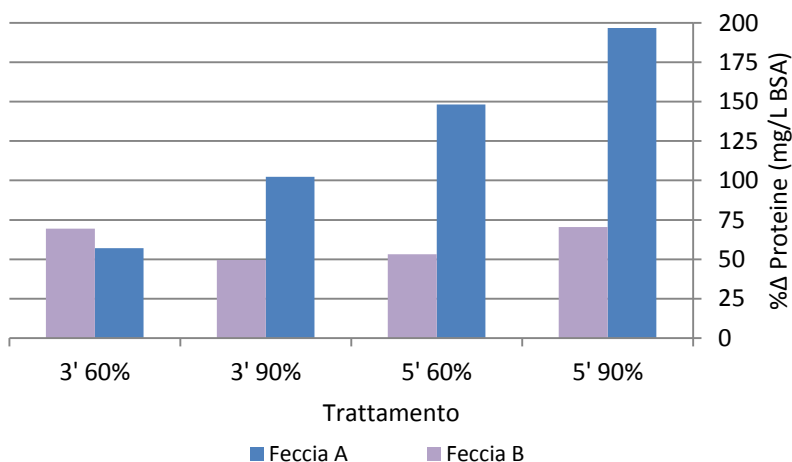


Figura 78: Aumento percentuale del contenuto di proteine (metodo KDS-BCA) rispetto al riferimento per le due diverse fecce (A e B).

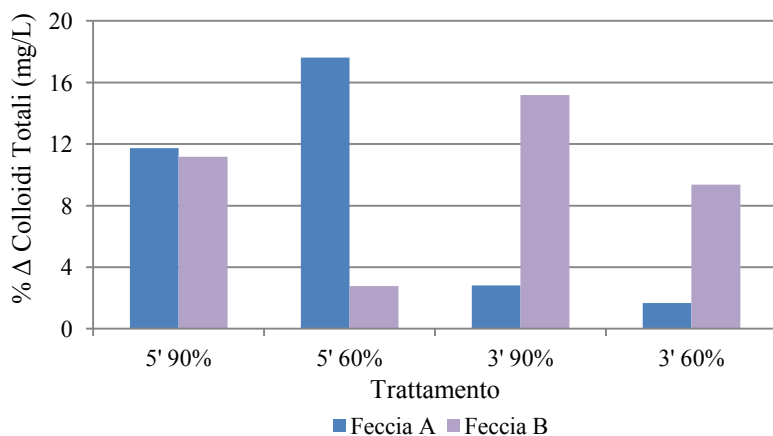


Figura 79: Variazione percentuale del contenuto di colloid totali rispetto al riferimento per le due diverse fecce (A e B).

Per i colloid totali risulta difficile giungere ad una conclusione generale, sia relativamente ai trattamenti che alle fecce: solo il trattamento di 5 minuti al 90% dà effetti importanti per entrambe le fecce (Fig. 79).

Può sembrare scontato, ma gli effetti degli ultrasuoni sulle fecce dipendono dal tipo di feccia e dalla loro composizione e non è pertanto possibile trarre una conclusione generale dalle analisi comparative.

3.5.1.4 Impiego di fecce trattate con ultrasuoni per la stabilizzazione del vino

Dopo aver trattato le diverse fecce, è stato deciso di aggiungere della feccia B a due vini instabili per valutare la sua attività (stabilizzante) nel prevenire l'intorbidamento provocato dalle proteine instabili. Dal contenuto in proteine e polisaccaridi presenti, sono state calcolate le aggiunte in modo tale da raggiungere le quantità abituali di mannoproteine (100 - 200 mg/L) e, dopo i primi risultati, il range è stato ampliato da 50 a 300 mg/L espressi come equivalenti di glucosio.

Nella seguente tabella (Tab. 30) vengono riassunte le caratteristiche dei due vini Sauvignon utilizzati per la prova.

	Δ NTU		Proteine	Polisaccaridi	
	ProtoCheck	Test a caldo	mg/L BSA	mg/L Glu	mg/L Man
Vino A	17	12	234	787	638
Vino B	3	9	161	968	430

Tabella 30: Valori iniziali dei test di stabilità proteica e del contenuto in proteine e glicoproteine dei vini utilizzati per valutare l'effetto stabilizzante delle fecce trattate con US.

I valori dei polisaccaridi sono risultati molto elevati; secondo Usseglio-Tomasset (1975), infatti, la frazione colloidale polisaccaridica dei vini generalmente varia da 300 a 500 mg/L.

Il surnatante delle fecce, sottoposte a diversi trattamenti con ultrasuoni (3' 90%, 5' 60% e 5' 90%), ottenuto dopo centrifugazione, è stato quindi aggiunto al vino. È stata valutata la stabilità proteica dei diversi campioni dopo 48 ore dall'aggiunta.

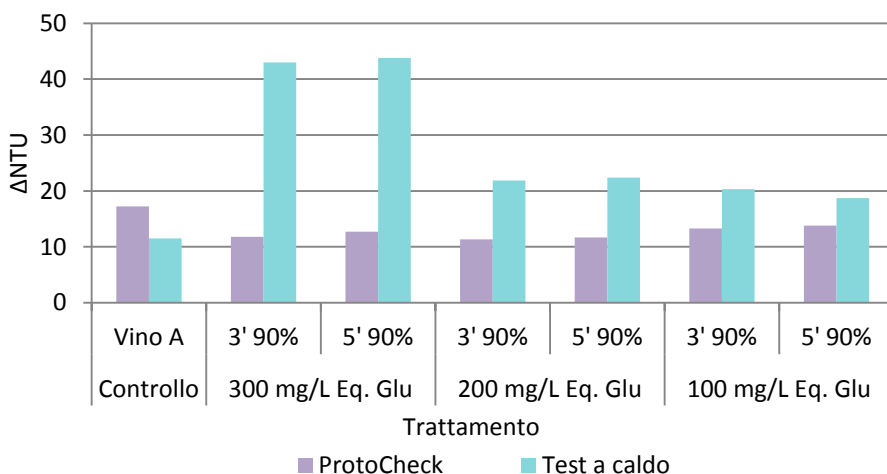


Figura 80: Test di stabilità proteica sul vino A 48 ore dopo l'aggiunta delle fecce trattate a 3 e 5 minuti al 90% di amplitudine.

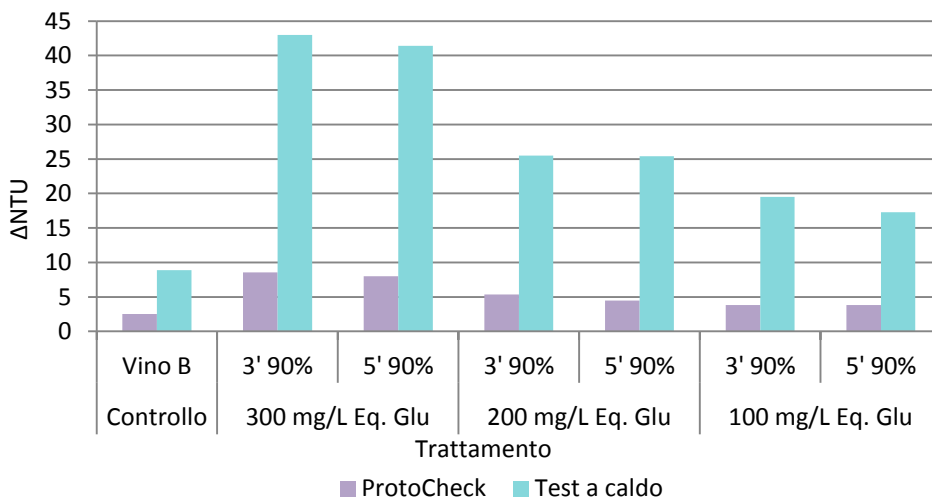


Figura 80 e 81: Test di stabilità proteica sul vino B 48 ore dopo l'aggiunta delle fecce trattate a 3 e 5 minuti al 90% di amplitudine.

Come si può vedere dai grafici (Fig. 80 e 81), entrambi i vini aggiunti della stessa concentrazione (300/200/100 mg/L equivalenti di glucosio di fecce) del surnatante della feccia, trattata con ultrasuoni per 3' 90% e 5' 90%, non hanno dato differenze relativamente alla stabilità proteica. L'aggiunta di 300 mg/L è risultata troppo elevata ed ha causato una maggiore instabilità.

Per il vino A il test effettuato col ProtoCheck ha dato buoni risultati, mentre nel test a caldo si sono registrati risultati sempre superiori al riferimento con nessun miglioramento conseguente all'aggiunta. Per il vino B invece il ProtoCheck ha dato una risposta più alta soprattutto nei campioni aggiunti di 300 mg/L.

Infine, ai vini è stato aggiunto anche del surnatante proveniente dalle fecce di riferimento e da quelle trattate enzimaticamente (dopo 10 giorni) al fine di valutare quando il trattamento ad ultrasuoni (condotto a 3 min al 90% di amplitudine) potrebbe costituire un vantaggio o meno.

Campione Vino A	Quantità aggiunta (mg/L eq. glucosio)	ProtoCheck	Test a caldo
TQ	100	8	24
E	100	10	16
US	100	11	12
TQ	50	11	11
E	50	11	17
US	50	5	14

Tabella 31: Confronto tra l'aggiunta di feccia trattata con US, enzimaticamente (E) ed il riferimento (TQ) e i loro effetti sulla stabilità proteica per il vino A.

Come riportato in Tab. 31, alla concentrazione di 100 mg/L equivalenti di glucosio, le fecce trattate con ultrasuoni hanno dato i migliori risultati nel test a caldo, anche se il valore più stabile per il controllo era fornito dal test effettuato col ProtoCheck. Ad una concentrazione più bassa, le fecce trattate con ultrasuoni danno i migliori risultati al ProtoCheck, anche se i valori del test a caldo delle fecce di riferimento sono più bassi. Pertanto, i vantaggi delle fecce trattate con ultrasuoni rispetto a quelle di riferimento, aggiunte al vino, non sono così chiari.

Per evitare la torbidità dovuta all'aggiunta delle fecce al vino, le fecce trattate con ultrasuoni sono state riscaldate a 80 °C per 1 ora, raffreddate in ghiaccio e, quindi, centrifugate. L'analisi del contenuto di polisaccaridi, dopo il riscaldamento, ha mostrato una riduzione della concentrazione dovuta alla precipitazione dei colloidali instabili al calore (Tab. 32).

Campione	mg/L Glu	mg/L Man
TQ	919	757
TQ (80°C 1h)	665	548
E	308	254
E (80°C 1h)	371	305
5' 90%	1518	1250
5' 90% (80°C 1h)	1075	885

Tabella 22: Differenze nel contenuto in polisaccaridi delle fecce derivanti dai diversi trattamenti ad US, dopo riscaldamento a 80 °C per un'ora, in modo da favorire la precipitazione dei composti instabili ed ottenere una torbidità più bassa dopo le aggiunte.

Per i campioni addizionati di feccia riscaldata, i migliori valori di ProtoCheck sono stati ottenuti per la concentrazione di 200 mg/L eq. Glu. per il vino A e di 100 mg/L eq. Glu. per il vino B, aggiunto delle fecce trattate con ultrasuoni; valori inferiori rispetto al riferimento che pertanto sembra diano stabilità al prodotto.

Per quanto riguarda il test a caldo, i risultati tra i trattamenti sono simili (Tab 33).

Campione Vino A	ProtoCheck	Test a caldo	Campione Vino B	ProtoCheck	Test a caldo
TQ 100	6	13	TQ 50	1	8
E 100	6	12	E 50	2	7
US 50	6	13	US 50	2	7
US 100	6	13	US 100	1	9
US 200	3	13			

Tabella 23: Test di stabilità proteica dei vini aggiunti di fecce riscaldate (trattate con US, enzima (E) e del riferimento (TQ)) alle concentrazioni di polisaccaridi espressi come mg/L eq. Glu.

Secondo Fusi *et al.* (2010), esiste una correlazione tra il rapporto di proteine rispetto alle glicoproteine nel vino e la stabilità proteica (misurata con il test di caldo lungo) e questo potrebbe essere utilizzato come strumento predittivo. I risultati ottenuti con le prove effettuate però non confermano questa correlazione.

3.5.2 Effetti diretti degli ultrasuoni sul vino instabile

La prova è stata effettuata su vini bianchi grezzi, prelevati a fine fermentazione e sottoposti a trattamento ad ultrasuoni come previsto dal disegno sperimentale. Sono stati testati tre diversi vini (stessa cv Pinot Grigio), provenienti da tre aziende diverse.

Inizialmente, avendo come obiettivo l'applicazione di questa nuova tecnologia direttamente in vasca con una preparazione del campione minima, sono stati svolti i test di stabilità proteica subito dopo la sonicazione. La torbidità iniziale però troppo elevata non ha permesso di stimare le differenze tra i trattamenti. Per ovviare a tale problema, e lavorare a livelli di torbidità inferiore, i campioni sono stati filtrati, diluiti, lasciati sedimentare spontaneamente per 72 ore e quindi centrifugati.

Per il primo vino oggetto di studio torbidità e misura del diametro delle particelle dei campioni dopo sedimentazione (24 ore) non sono risultate correlate né col tempo né con l'intensità del trattamento.

La torbidità finale nei vini trattati con ultrasuoni è risultata più alta di quella del campione di riferimento, mentre il diametro delle particelle è rimasto invariato.

Sorprendentemente, il Protocheck ha dato valori più bassi rispetto al riferimento, nel limite di stabilità, tranne che per i trattamenti di 3 e 5 minuti al 60% di amplitudine (Fig. 82).

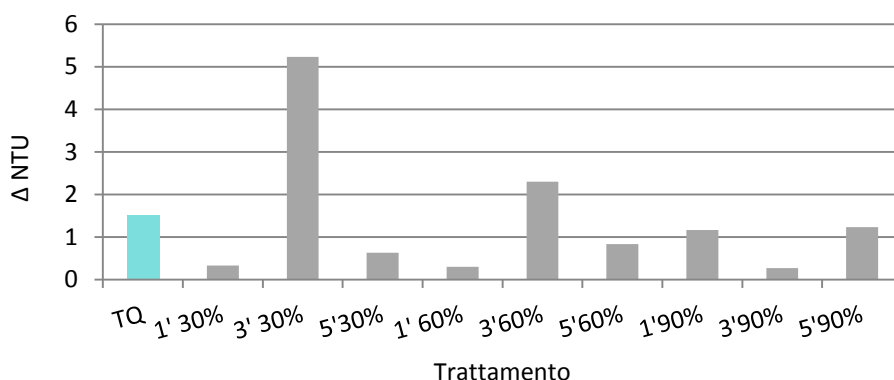


Figura 82: Test di stabilità proteica Protocheck sul vino A dopo sedimentazione spontanea (24h).

Il secondo vino, dopo trattamento, è stato diluito con soluzione simil-vino e filtrato prima delle analisi. Dopo sedimentazione spontanea, l'aumento di torbidità è generalmente correlato con il tempo e l'intensità del trattamento (Fig. 83). Dopo filtrazione grossolana, invece, i valori di torbidità sono risultati molto alti e per i trattamenti al 90% di amplitudine è stata registrata una tendenza opposta (Fig. 84).

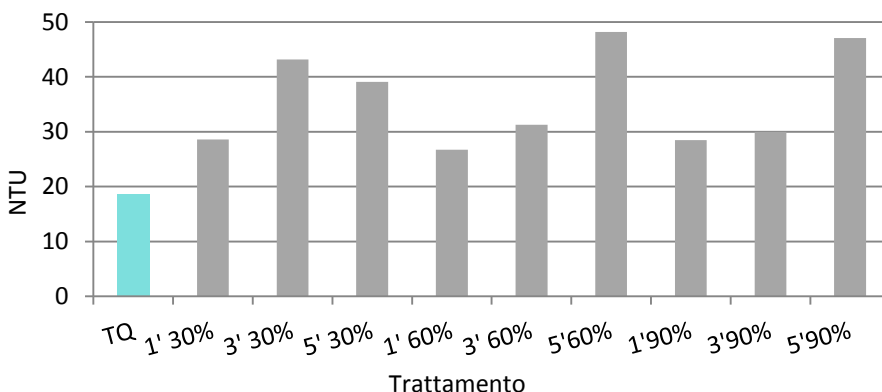


Figura 83: Torbidità dei campioni di vino B, trattati con US secondo le condizioni del piano sperimentale, e del campione di riferimento (TQ) dopo sedimentazione.

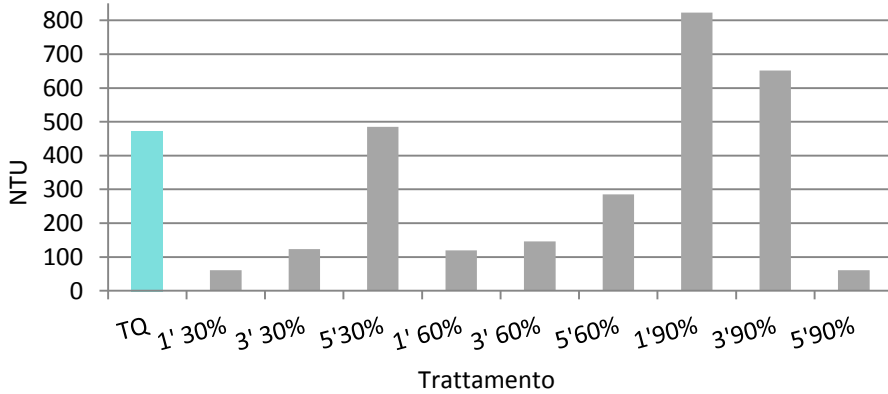


Figura 84: Torbidità dei campioni di vino B, trattati con US secondo le condizioni del piano sperimentale, e del campione di riferimento (TQ) dopo filtrazione.

I test di stabilità proteica hanno dato valori più bassi, rispetto al campione di riferimento, per il trattamento ultrasuoni di 5 minuti al 60% (Fig. 85 e 86), nonostante tale trattamento abbia fornito i valori più alti di torbidità.

Il test a caldo ed il ProtoCheck, eseguiti dopo il trattamento sul vino filtrato, hanno dato comunque i risultati migliori rispetto al riferimento per i trattamenti di 1 e 5 minuti al 90% e quest'ultimo è stato considerato stabile.

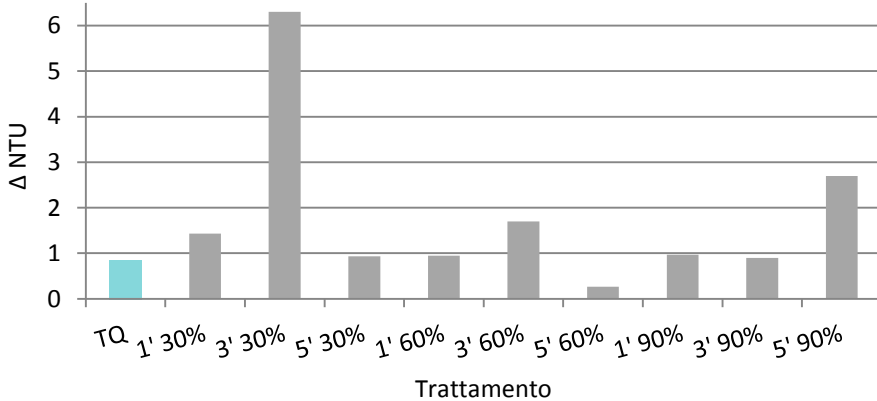


Figura 85: Test di stabilità proteica Protocheck dei campioni di vino B trattati con US, secondo le condizioni del piano sperimentale, e del campione di riferimento (TQ) dopo sedimentazione.

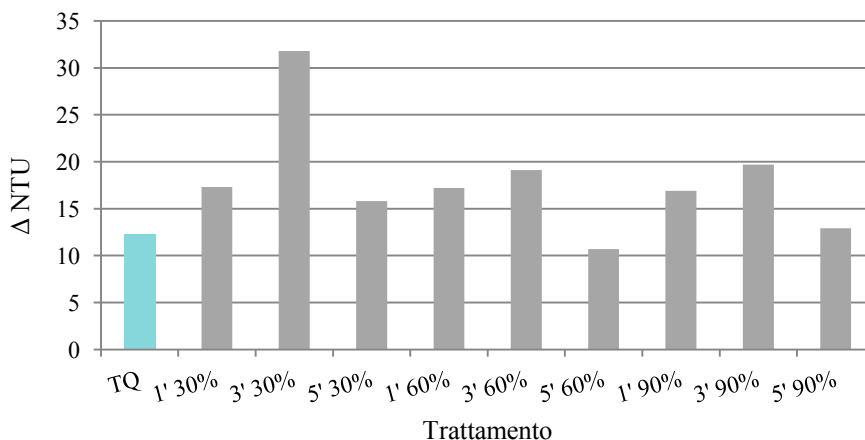


Figura 86: Test a caldo (30 min 80 °C) dei campioni di vino B trattati con US, secondo le condizioni del piano sperimentale, e del campione di riferimento (TQ) dopo sedimentazione.

Il vino C presentava una torbidità iniziale tale da non necessitare di ulteriori chiarifiche; le prove sono state eseguite subito dopo il trattamento, senza alcuna preparazione del campione. Per questo vino, tutti i trattamenti ad ultrasuoni sono stati replicati tre volte.

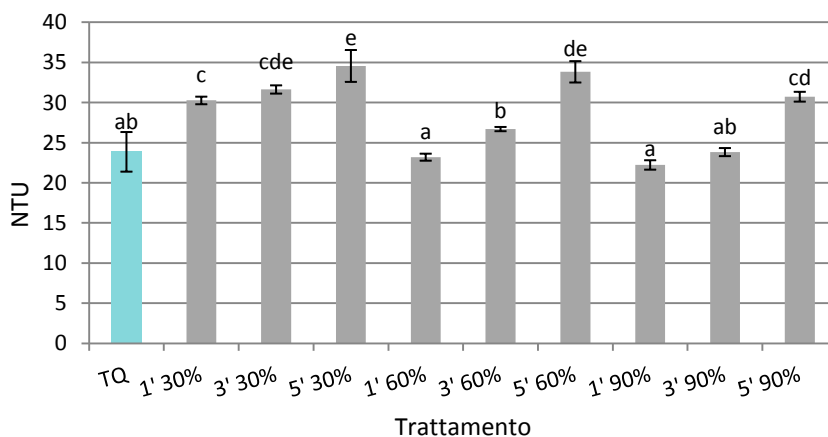


Figura 87: Torbidità dei campioni di vino C trattati con US, secondo le condizioni del piano sperimentale, e replicati tre volte, e del campione di riferimento (TQ). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'aumento di torbidità, rispetto al riferimento, è correlata con il tempo e con l'intensità del trattamento (Fig. 87). Tutti i trattamenti condotti al 30% dell'amplitudine sono risultati diversi dal campione non sottoposto a trattamento, mentre per le altre amplitudini solo i trattamenti di 5 minuti sono risultati statisticamente diversi dal riferimento.

I risultati dei test di stabilità proteica hanno evidenziato la stessa tendenza della torbidità con valori crescenti di ProtoCheck per tempi e amplitudini maggiori, quindi il trattamento a tali condizioni non risulta avere effetto stabilizzante. Anche il test a caldo ha fornito valori inferiori diversi e più alti per i trattamenti di 1 e 3 minuti al 90% di amplitudine.

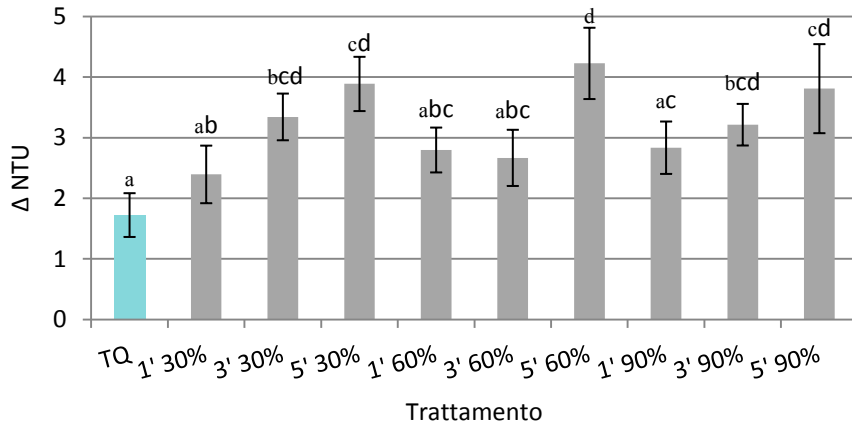


Figura 88: Test di stabilità proteica (ProtoCheck) dei campioni di vino C trattati con US, secondo le condizioni del piano sperimentale, e replicati tre volte, e del campione di riferimento (TQ). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

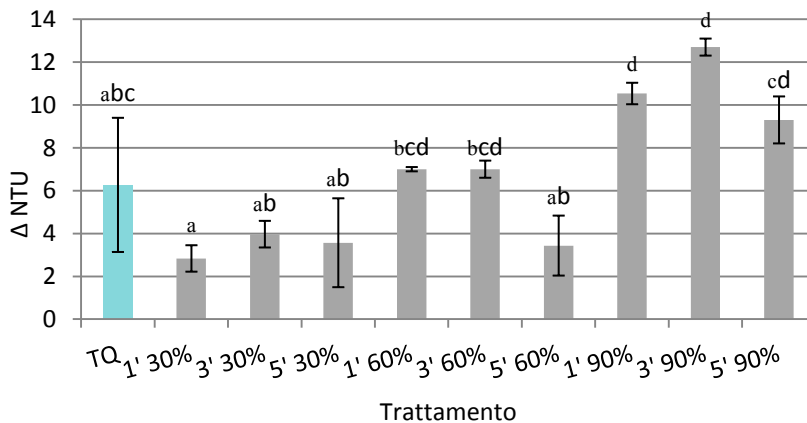


Figura 89: Test di stabilità proteica (Test a caldo) dei campioni di vino C trattati con US, secondo le condizioni del piano sperimentale, e replicati tre volte, e del campione di riferimento (TQ). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Il ProtoCheck ha dato risultati superiori a quelli del riferimento per i trattamenti di 5 minuti a tutte le amplitudini considerate. Anche i trattamenti di 3 minuti al 30% e di 3 minuti al 90% sono risultati statisticamente diversi dal campione di riferimento (Fig. 88).

I trattamenti che hanno fornito valori più bassi del riferimento per il test a caldo, invece, non erano statisticamente diversi da esso. Differenze significative rispetto al controllo sono state rilevate solo per i trattamenti di 1 e 3 minuti al 90%, i quali hanno portato ai peggiori valori di stabilità (Fig. 89).

Relativamente alla misura del diametro delle particelle del vino C, si è notato un aumento sia delle particelle di piccole dimensioni che di quelle di dimensioni maggiori. La percentuale di particelle con diametro più piccolo è aumentata per i trattamenti di 5 minuti al 30%, di 3 minuti al 60% e di 3 minuti al 90% (Fig. 90).

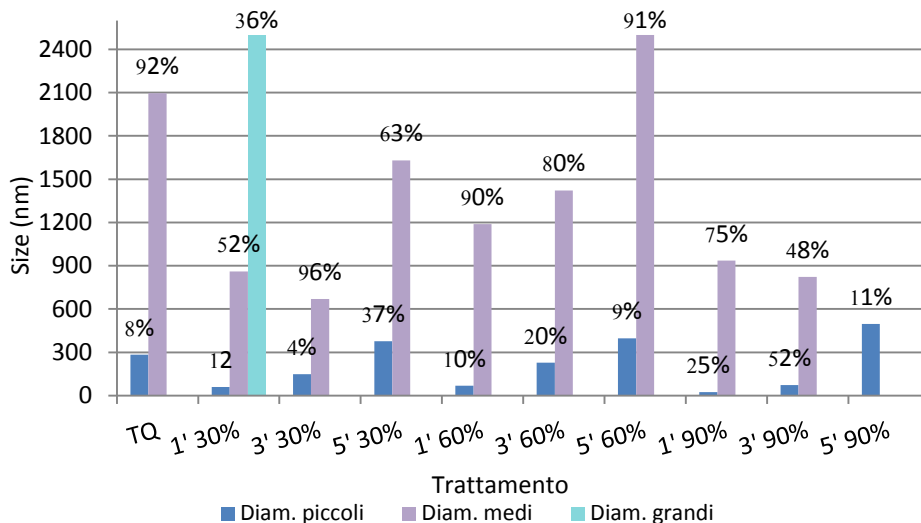


Figura 90: Diametro delle particelle delle frazioni rilevate sui campioni del vino C trattati con US secondo il piano sperimentale (solo la prova di 3 minuti al 30% è stata svolta in triplo).

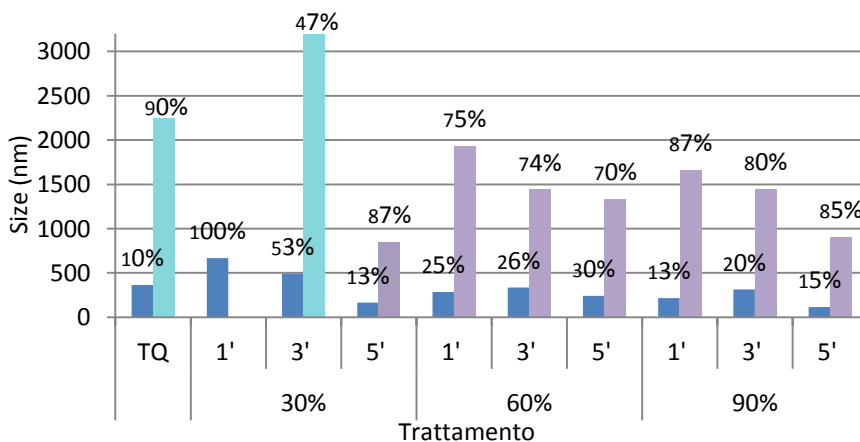


Figura 91: Media del diametro delle distribuzioni delle particelle rilevate nel vino trattato con US per tutte e tre le combinazioni tempo/% di amplitudine eseguite in triplo (stessa legenda del grafico precedente).

Sono state riscontrate differenze tra le dimensioni delle particelle rilevate nel piano sperimentale e nella prova in triplo (Fig. 90 e 91), anche se l'unico parametro diverso è rappresentato dall'ordine di trattamento che nel piano sperimentale è randomizzato. Per i trattamenti effettuati in triplo, si è notata una riduzione del diametro delle particelle più grandi per i trattamenti al 60% ed al 90% ed una diminuzione del diametro per la frazione particellare di piccola dimensione per i trattamenti al 30% di amplitudine.

Un parametro che non è ancora stato analizzato è la temperatura massima raggiunta dal campione a fine sonicazione. Dal grafico (Fig. 92) si può notare come l'aumento di temperatura sia correlato al tempo di trattamento: più elevato è il tempo, maggiore la temperatura massima rilevata nel campione.

Dal momento che le temperature massime raggiunte si aggirano attorno ai 50 °C ed i tempi di trattamento sono comunque limitati a pochi minuti, si ritiene che l'effetto della temperatura sia ininfluenza sulla qualità finale dei campioni e che pertanto l'effetto degli ultrasuoni sia reale e non mascherata da un possibile effetto dovuto alla temperatura.

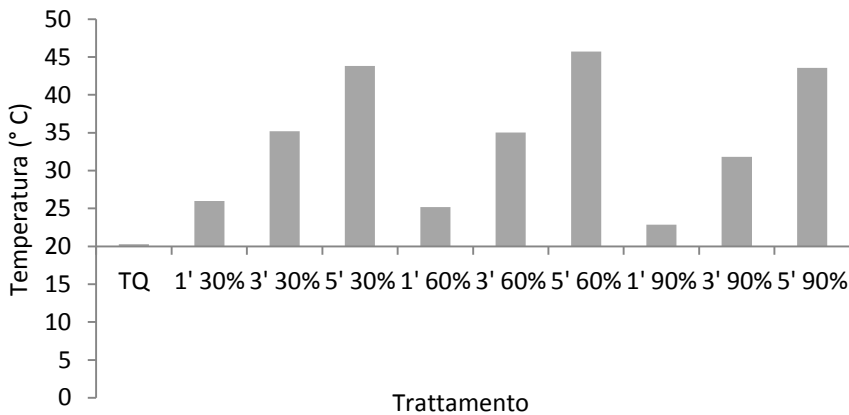


Figura 92: Aumento della temperatura per effetto del trattamento ad US misurata nei campioni di vino subito dopo la sonicazione e confrontata con il campione di riferimento (TQ).

Infine, per valutare gli effetti anche in una situazione maggiormente instabile, è stata aggiunta una proteina animale al vino (100 mg/L di gelatina suina polvere oro). L'aumento della torbidità risulta essere sempre correlato al tempo e all'intensità del trattamento, il diametro delle particelle ha subito una riduzione (tranne che per il trattamento di 1 minuto al 90%) (Fig. 93), mentre il test di stabilità proteica ProtoCheck ha dato risultati peggiori rispetto al riferimento.

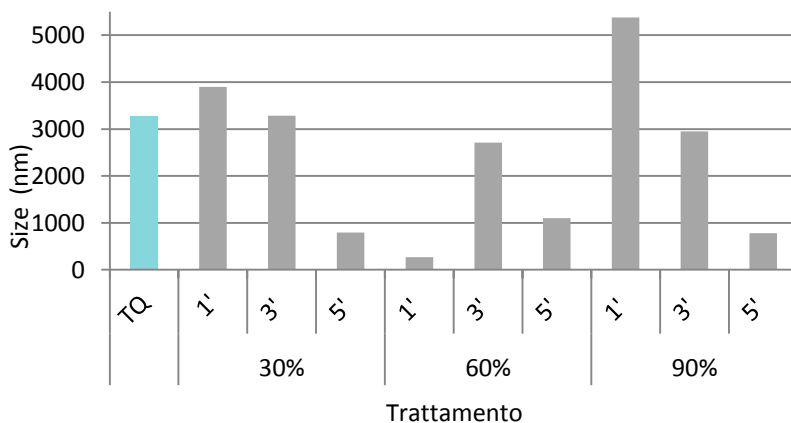


Figura 93: Diametro delle particelle dei campioni di vino aggiunti di gelatina, dopo il trattamento secondo le condizioni previste dal piano sperimentale, e del campione di riferimento (TQ).

I test di stabilità proteica, eseguiti nelle condizioni più instabili, hanno dato risultati opposti tra ProtoCheck e test con tannino a freddo, come si può osservare nella seguente grafico (Fig. 94). Per il ProtoCheck solo i trattamenti al 90% di amplitudine sono risultati diversi dal campione di riferimento, più instabile. Con test di tannino freddo (Fig. 95), invece, solo i trattamenti di 3 e 5 minuti al 90% sono risultati diversi dal riferimento, portando ad un miglioramento della stabilità. È normale che i risultati dei test di stabilità diano risultati opposti e pertanto non possano essere sempre confrontabili (Celotti, 2005).

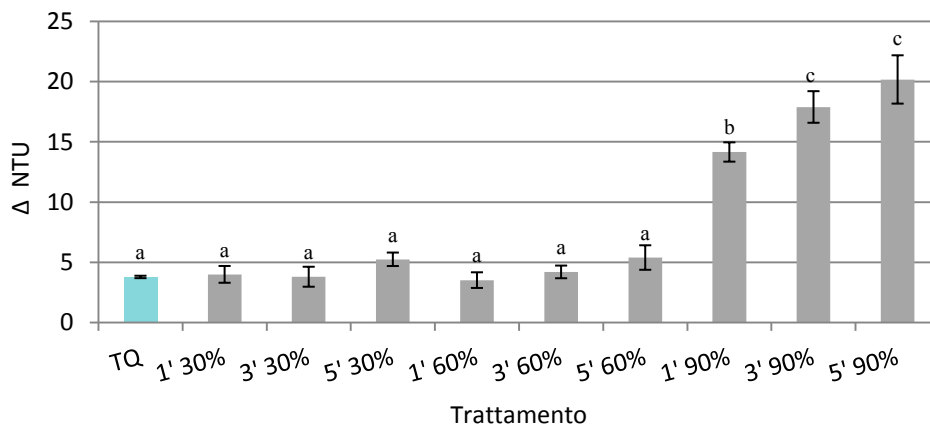


Figura 94 Test di stabilità proteica ProtoCheck eseguito sul vino bianco, aggiunto di gelatina animale, in seguito a trattamento con US come previsto dal piano sperimentale, e sul campione di riferimento (TQ). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

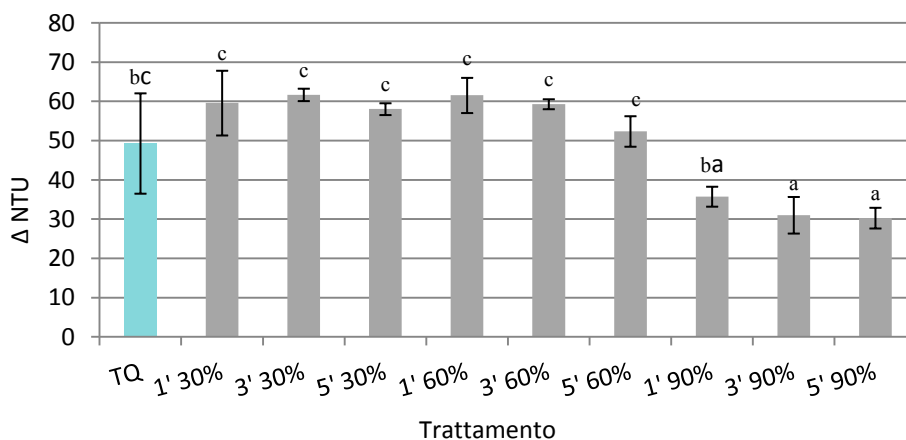


Figura 95: Test di stabilità proteica (Test con tannino a freddo) eseguiti sul vino bianco, aggiunto di gelatina animale, in seguito a trattamento con US come previsto dal piano sperimentale, e sul campione di riferimento (TQ). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0.05$.

Dai test effettuati sui tre diversi vini non è possibile trarre conclusioni generali, anche se della stessa cultivar e provenienti dalla stessa zona di produzione. In ogni caso, è possibile affermare che la stabilità proteica non migliora per effetto del trattamento diretto sui vini grezzi. Un effetto positivo è, però, rappresentato dalla riduzione della dimensione delle particelle presenti in dispersione colloidale.

4 CONCLUSIONI

Dai risultati sperimentali ottenuti è possibile stabilire le seguenti osservazioni.

Nel trattamento ad ultrasuoni, nell'ambito delle prove svolte sulle fecce, ha avuto un impatto maggiore il tempo piuttosto che l'intensità del trattamento. I trattamenti che hanno dato gli effetti più importanti sono risultati quelli di 5 minuti al 60% di amplitudine e quelli di 3 e 5 minuti al 90%.

Relativamente alle prove svolte secondo il piano sperimentale, i parametri che aumentano, correlati col tempo e con l'intensità del trattamento, sono rappresentati dai colloidi totali, dalla carica elettrica superficiale negativa, dal contenuto di proteine presente nei colloidi precipitati conseguente all'aumento dei colloidi rilasciati dal lievito. Tuttavia, la stabilità proteica verificata col ProtoCheck non ha dato risultati migliori di quelli del campione di riferimento.

Mediante analisi *HPLC - gel permeation* è stata rilevata una frazione comune sia dal rivelatore UV e che da quello RI, si presume pertanto si tratti di una molecola di natura glicoproteica che aumenta con l'intensità del trattamento.

Il contenuto dei colloidi totali e la carica elettrica superficiale negativa aumentano in seguito a trattamento ad ultrasuoni e, dal punto di vista statistico, il campione trattato con ultrasuoni è risultato diverso da quello di riferimento e da quello trattato enzimaticamente, subito dopo il trattamento e dopo 10 giorni. È possibile affermare, quindi, che questa nuova tecnologia può risultare vantaggiosa se si considera il breve termine; la sua applicazione potrebbe portare ad una riduzione dei tempi di affinamento.

I risultati mostrano l'effetto importante degli ultrasuoni sull'estrazione rapida di macromolecole dalle fecce, utili per l'evoluzione colloidale ed aromatica dei vini. Il risultato è ancora più significativo se si considera che, con pochi minuti di trattamento, si possono ottenere risultati comparabili con l'affinamento tradizionale sulle fecce con o senza l'aggiunta di enzimi.

L'applicazione degli ultrasuoni su tre diverse fecce, ed il confronto degli effetti al fine di trarre una conclusione globale, non ha portato a considerazioni univoche. Non è stato, infatti, possibile trovare una tendenza generale dei loro effetti sulle fecce.

L'aggiunta di fecce, trattate con ultrasuoni, al vino ha dato risultati migliori quando la stabilità proteica è stata valutata col ProtoCheck, mentre i valori col test a caldo sono risultati più alti. Inoltre, alla stessa quantità di polisaccaridi aggiunti, le fecce di riferimento e quelle trattate con enzima hanno dato risultati analoghi.

Gli effetti diretti degli ultrasuoni su tre vini grezzi sono difficilmente definibili; è stato riscontrato un aumento della torbidità e variazione della dimensione delle particelle che provocano destabilizzazione.

Poiché gli effetti differiscono a seconda della matrice che viene trattata, questa tecnologia offre flessibilità nella sua applicazione.

Il trattamento effettuato direttamente sul vino instabile, dopo fermentazione, potrebbe accelerare l'instabilità del sistema e facilitare il successivo trattamento di chiarifica. La variazione delle dimensioni delle particelle, se dovuta ad aggregazioni e a formazione di nuovi equilibri colloidali, potrebbe risultare utile se applicata dopo l'aggiunta del coadiuvante negli step finali del processo di vinificazione.

Per quanto riguarda il trattamento delle fecce, l'applicazione degli ultrasuoni potrebbe essere effettuata sia sul vino *sur lies* che sulle fecce separate e riaggiate successivamente al vino dopo il trattamento.

5 BIBLIOGRAFIA

- Batista L., Monteiro S., Loureiro V.B., Teixeira A.R., Ferreira R.B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry* 112, 169-177.
- Bayly F.C., Berg H.W. (1967). Grape and wine proteins of white wine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 18, 18-32.
- Cacciola V., Ferran Batlló I., Ferraretto P., Vincenzi S., Celotti E. (2013) Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology* 236, 2, 311-317.
- Caridi A. (2006). *Enological functions of parietal yeast mannoproteins*. Antonie Van Leeuwenhoek 89, 3-4, 417-22.
- Celotti E., Ferrarini R., Battistutta F., Zironi R. (2003). *Importance de la taille et de la charge électrique superficielle des fractions colloïdales des vins rouges*. Proceedings of the VIIIth International Oenology Symposium, Arcachon 19-21 June 2003, 525-527.
- Celotti E. (2004). *Method to evaluate the instability of Proteins in an Acid pH Drink*. Patent, UD2004A000162, Università degli Studi di Udine, PCT 05764076.5.
- Celotti E. (2005). Nuovo metodo per la valutazione dell'instabilità proteica dei vini. *www.infowine.com – Rivista internet di Viticoltura e Enologia* 6, 2.
- Charpentier C., Nguyen Van Long T., Bonaly R., Feuillat M. (1986). Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, 405-413.
- Charpentier C., Feuillat M. (1993). Yeast autolysis. In: *Wine microbiology and biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 225-242.
- Comuzzo P. (2003). Effetto di derivati industriali di lievito sulla stabilità colloidale e sulla percezione aromatica dei vini. *Tesi di Dottorato*, Università degli Studi di Udine.
- Curioni A., Vincenzi S., Flamini R. (2008). Proteins and Peptides in Grape & Wine. Chapter VIII. In *Hiphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*, Ed. John Wiley & Sons.

Dambrouck T., Marchal R., Marchal-Delahaut L., Parmentier M., Maujean A., Jeandet P. (2003). Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 2727-2732.

Dambrouck T., Marchal R., Cilindre C., Parmentier M. Jeandet P. (2005). Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. Relationship with wine foamability. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 8782-8789.

Dawes H., Boyes S., Keene J., Heatterbell D. (1994). Protein instability of wines: influence of protein isoelectric point. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 3, 319-326.

Derckel J.P., Legendre L., Audran J.C., Haye B., Lambert B. (1996). Chitinase of the grapevine (*Vitis vinifera*) : five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* 119, 31-37.

Deytieux C., Geny L., Lapaillerie D., Claverol S., Bonneau M., Donéche B. (2007). Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany* 58, 1851-1862.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28, 3, 350-356.

Dubourdieu D., Serrano, M., Vannier, A.C., Ribéreau-Gayon, P. (1988). Étude comparée des tests de stabilité protéique. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 22, 261-273.

Dubourdieu D., Canal-Llaubères R.M. (1990). Influence of some colloids (polysaccharides and proteins) on the clarification and stabilization of wines. *Proceedings of Seventh Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, SA*, pp. 180-185.

Dupin I.V.S., McKinnon B.M., Ryan C., Boulay M., Markides A.J., Jones G.P, Williams P.J., Waters E.J. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 3098-3105.

Esteruelas M., Poinssaut P., Sieczkowski N., Manteau S., Fort M.F., Canals J.M., Zamora F. (2009). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry* 113, 28-35.

Falconer R.J., Marangon M., Van Sluyter S.C., Neilson K., Chan C., Waters E.J. (2010). Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase and invertase isolated from sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58, 975-980.

Ferran-Batlò I. (2011). Winemaking applications of ultrasounds: study on wine lees and protein stability. *Tesi Vinifera Euromaster*, Università di Padova, Udine e Verona.

Ferraretto P., Rolle P., Celotti E. (2011) Applicazione degli ultrasuoni come tecnica innovativa per ottimizzare l'estrazione dei composti fenolici e favorire la lisi del lievito. *www.infowine.com – Rivista internet di Viticoltura ed Enologia* 9, 3.

Ferraretto P., Cacciola V., Ferran Batlló I., Celotti E. (2013) Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Ital. J. Food Sci.* 25: 160-168.

Ferrari G., Feuillat M. (1988). L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. I. Etude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis* 27, 183-197.

Ferreira R.B., Monteiro S., Piçarra-Pereira M.A., Tanganho M.C., Loureiro V.B., Teixeira A.R. (2000). Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 1, 22-28.

Ferreira R.B., Piçarra-Pereira M.A., Monteiro S., Loureiro V.B., Teixeira A.R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology* 12, 230-239.

Feuillat M. (1974). Contribution à l'étude des composés azotés du moût de raisin et du vin. *Thèse de Doctorat*, Université de Dijon.

Feuillat M., Charpentier C. (1982). Autolysis of yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture* 33, 6-13.

Feuillat M., Freissinet M., Charpentier C. (1989). L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Evolution des macromolécules: polysaccharides et protéines. *Vitis* 28, 161-176.

Feuillat M., Charpentier C., von Bonn E. (1995). Characterization of proteins in white wines: application to Chardonnay wines. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologique* 78, 9-14.

Feuillat M. (2003). Yeast macromolecules: origin, composition, and their enological interest. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 211-213.

Fornairon-Bonnefond C., Camarasa C., Moutounet M., Salmon J.-M. (2001). Etat de connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 35, 57-78.

Fusi M., Mainente F., Rizzi C., Zoccatelli G., Simonato B. (2010) Wine hazing: a predictive assay based on protein and glycoprotein independent recovery and quantification, *Food Control* 21, 830-834.

Fukui M., Yokotsuka K. (2003). Content and origin of protein in white and red wines: changes during fermentation and maturation. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 3, 178-188.

Girbau T., Stummer B.E., Pockock K.F., Baldock G.A., Scott E.S., Waters E.J. (2004). The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the level of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10, 125-133.

Gonzales-Ramos D., Cebollero E., Gonzales R. (2008). A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoprotein stabilizes wine against protein haze. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5533-5540.

Gonçalves F., Heyraud A., Pinho M.N. and Rinaudo M. (2002). Characterisation of white wine mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6097-6101.

Hsu J.C., Heatherbell D.A., Flores J.H., Watson B.T. (1987a). Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 1, 6-10.

Hsu J.C., Heatherbell D.A. (1987b). Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 11-16.

Jayasankar S., Li Z., Gray D.J. (2003). Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after *in vitro* selection and its role in anthracnose resistance. *Functional Plant Biology* 30, 1105-1115.

Klis F.M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851-869.

Kwon S.W. (2004). Profiling of soluble proteins in wine by nano-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7258-7263.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laubères R.M., Dubourdieu D., Villetaz J.C. (1987). Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 41, 277-286.

Ledoux V., Dulau L., Dubourdieu D. (1992). Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 26, 239-251.

Lee T.H (1986). Protein instability: Nature, characterization and removal by bentonite. In: *Physical Stability of Wine – Proceedings of a seminar held on 10 October 1985 at Reynella, South Australia*. The Australian Wine Research Institute: Urrbrae, SA, pp. 23-39.

Leroy M.J., Charpentier M., Duteurtre B., Feuillat M., Charpentier C. (1990). Yeast autolysis during Champagne aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 21-28.

Lubbers S. (1993). Caractérisation de macromolécules d'origine levurienne du vin. Etude des interactions avec des substances d'arôme. Application a la stabilisation tartrique des vin. *Thèse de Doctorat*, Université de Bourgogne.

Lucchetta M, Pocock K.F., Waters J.E., Marangon M. (2013). Use of Zirconium Dioxide during Fermentation as an Alternative to Protein Fining with Bentonite for White Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 64, 3, 400-404.

Manteau S., Lambert S., Jeandet P., Legendre L. (2003) Changes in chitinase and thaumatin-like pathogenesis-related proteins of grape berries during the Champagne winemaking process. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 267-272.

Marchal R., Weingartner S., Voisin C., Jeandet P., Chatelain F. (2002). Utilisation de modèles mathématiques pour optimiser les doses de bentonite gonflée et non gonflée lors du collage des vins blancs. Partie I : clarification et stabilisation colloïdale. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 3, 169-176.

- Mason T.J., Paniwnyk L., Lorimer J.P. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3, 253-260.
- Mesquita P. R., Piçarra-Pereira M. A., Monteiro S., Loureiro V. B., Teixeira A. R., Ferreira R.B. (2001). Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 324-330.
- Moine-Ledoux V. (1996). Recherches sur le rôle des mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilisation protéique et tartrique des vins. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- Moine-Ledoux V., Dubourdiou D. (1997) Molecular interpretation of the improvement of protein stability in white wines during their ageing on the lees. *Rev. Oen. Tech. Vit. Oen.* 86:11-14.
- Moine Ledoux V., Dubourdiou D. (1998). Interprétation moléculaire de l'amélioration de la stabilité protéique des vins blancs au cours de leur élevage sur lies. *Revue des Oenologues* 86, 11-14
- Moine Ledoux V. (2001). Dall'università di Bordeaux le più recenti acquisizioni sui polisaccaridi del vino. *L'Enologo* 11, 51-60.
- Monteiro S., Piçarra-Pereira M.A., Mesquita P.R., Loureiro B., Teixeira A.R., Ferreira R.B. (2001). The wide diversity of structurally similar wine proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 3999-4010.
- Monteiro S., Piçarra-Pereira M.A., Teixeira A.R., Loureiro V.B., Ferreira R.B. (2003). Environmental condition during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4046-4053.
- Monteiro S., Piçarra-Pereira M.A., Loureiro V.B., Teixeira A.R., Ferreira R.B. (2007). The diversity of pathogenesis-related proteins decreases during grape maturation. *Phytochemistry* 68, 416-425.
- Moreno-Arribas M.V., Pueyo E., Polo M.C. (2002). Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Analytica Chimica Acta* 458, 63-75.
- Moretti R.H., Berg H.W. (1965). Variability among wines to protein clouding. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 69-78.

Nagodawithana T. (1992). Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technology* 46, 138-144.

Paetzold M., Dulau L., Dubourdiou D. (1990). Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 24, 1, 13-28.

Patist A., Bates D. (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.

Pérez-Serradilla J.A., Luque de Castro M.D. (2008). Role of lees in wine production: a review, *Food Chemistry* 111, 447-456.

Pocock K.F., Hayasaka Y., Peng Z., Williams P.J., Waters E.J. (1998). The effect of mechanical harvesting and long-distance transport on the concentration of haze-forming proteins in grape juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4, 23-29.

Pocock K.F., Hayasaka Y., McCarthy G., Waters E.J. (2000). Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1637-1643.

Pocock K.F., Høj P.B., Adams K.S., Kwiatkowski M.J., Waters E.J. (2003). Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 56-63.

Poncet-Legrand C., Doco P., Williams T., Vernhet A. (2000). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3098–3105.

Regenstein J.M., Regenstein C.E (1984). *Food protein chemistry*. Schweigert B.S., e Hawthorn J. (Eds.). Academic Press, New York.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P (1976). *Science et techniques du vin, tome III, Vinifications-Transformations du Vin*. Ed. Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou, D., Doneche, B., Lonraud, A. (1998a) *Traité d'Oenologie. Microbiologie du vin, vinifications*. Paris: Dunod. Vol. I.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (1998b) *Traité d'Oenologie. Chimie du vin, stabilisation et traitements*. Paris: Dunod. Vol. II.

Robert N., Roche K., Lebeau Y., Breda C., Boulay M., Esnault R., Buffard D. (2002). Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* 162, 389-400.

Robinson S.P., Jacobs A.K., Dry I.B. (1997). A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology* 114, 3, 771-778.

Rosi I., Gheri A., Domizio P. and Fia G. (1999). Production des macromolécules pariétales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Revue des oenologues* 94, 18-20.

Sarry E.J., Sommerer N., sauvage F.X., Bergoin A., Rossignol M., Albagnac G., Romieu C. (2004). Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* 4, 201-215.

Saucier C., 1997. Les tannins du vin: etude de leur stabilité colloïdale. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

Siebert K.J., Troukhanova N.V., Lynn P.Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 80-85.

Smith M.R., Penner M.H., Bennett S.E, and Bakalinsky A.T. (2011). Quantitative colorimetric assay for total protein applied to the red wine pinot noir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6871-6876.

Somers T.C., Ziemelis G. (1973). Direct determination of wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 24, 47-50.

Tattersall D.B., Van Heeswijck R., Høj P.B. (1997). Identification and characterization of a fruit- specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology* 114, 3, 759-769.

Tattersall D.B., Pocock K.F., Hayasaka Y., Adams K., van Heeswijck R., Waters E.J., Høj P.B. (2001). Pathogenesis related proteins – Their accumulation in grapes during berry growth and their involvement in white wine heat-instability. Current knowledge and future

perspective in relation to winemaking practices. *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, Ed. K.A. Roubelakis-Angelakis, pp. 183-201.

Usseglio-Tomasset L. and Castino M. (1975) I colloidi solubili di natura glucidica dei mosti e dei vini. Parte I. *Rivista di Viticoltura ed Enologia* 28, 374-391.

Usseglio-Tomasset L., Castino M. (1975 b). I colloidi solubili di natura glucidica dei mosti e dei vini. Parte III. *Rivista di Viticoltura ed Enologia* 28, 401-412.

Vincenzi S., Polesani M., Curioni A. (2005). Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 246-254.

Vincenzi S., Mosconi S., Zoccatelli G., Dalla Pellegrina C., Veneri G., Chignola R., Peruffo A., Curioni A. and Rizzi C. (2005). Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 2, 182-187.

Voilley A., Lamer C., Dubois P., Feuillat M. (1990). Influence of macromolecules and treatments on the behavior of aroma compounds in a model wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38, 248-251.

Waters E.J., Wallace W., Williams P.J. (1991). Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 123-127.

Waters E.J., Wallace W., Williams P.J. (1992). Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 1514-1519.

Waters E.J., Wallace W., Tate M.E., Williams P.J. (1993). Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41, 724-730.

Waters E.J., Peng Z., Pocock K.F., Williams P.J. (1995a). Proteins in white wine, I: Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, 86-93.

Waters E.J., Peng Z., Pocock K.F., Williams P.J. (1995b). Proteins in white wine, II: Their resistance to proteolysis is not due to either phenolic association or glycosylation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, 94-99.

Waters E.J., Shirley N.J., Williams P.J. (1996). Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 3-5.

Waters E.J., Alexander G., Muhlack R., Pocock K.F., Colby C., O'Neill B.K., Hoi P.B., Jones P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 215-225.

Weetall H., Zelko J.T., Bailey L.F. (1984). A new method for the stabilization of white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 35, 212-215.

Yokotsuka K., Ebihara T., Sato T. (1991). Comparison of soluble proteins in juice and wine from Kosu grapes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 248-253.

Yokotsuka K., Nozaki K., Takayanagi T. (1994). Characterization of soluble glycoproteins in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 410-416.

Yokotsuka K., Singleton V.L. (1995). Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: turbidity, particle size, and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 3, 329-338.

PARTE TERZA

EFFETTO DEGLI ULTRASUONI SULLA COMPONENTE FENOLICA DEI VINI ROSSI

1 LA STABILITÀ DEL COLORE DEI VINI ROSSI

1.1 STABILITÀ DEGLI ANTOCIANI

Le antocianidine sono pigmenti rossi largamente diffusi in natura, in diverse specie vegetali; nel genere *Vitis* ne sono state identificate cinque, solo le monoglucosidiche, e i relativi derivati acilati con l'acido p-cumarico, caffeico e acetico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b).

Nel vino, l'equilibrio degli antociani è funzione del pH (Galvin, 1993) ed in funzione dell'acidità del mezzo si distinguono le diverse forme in cui possono essere presenti (Fig. 96).

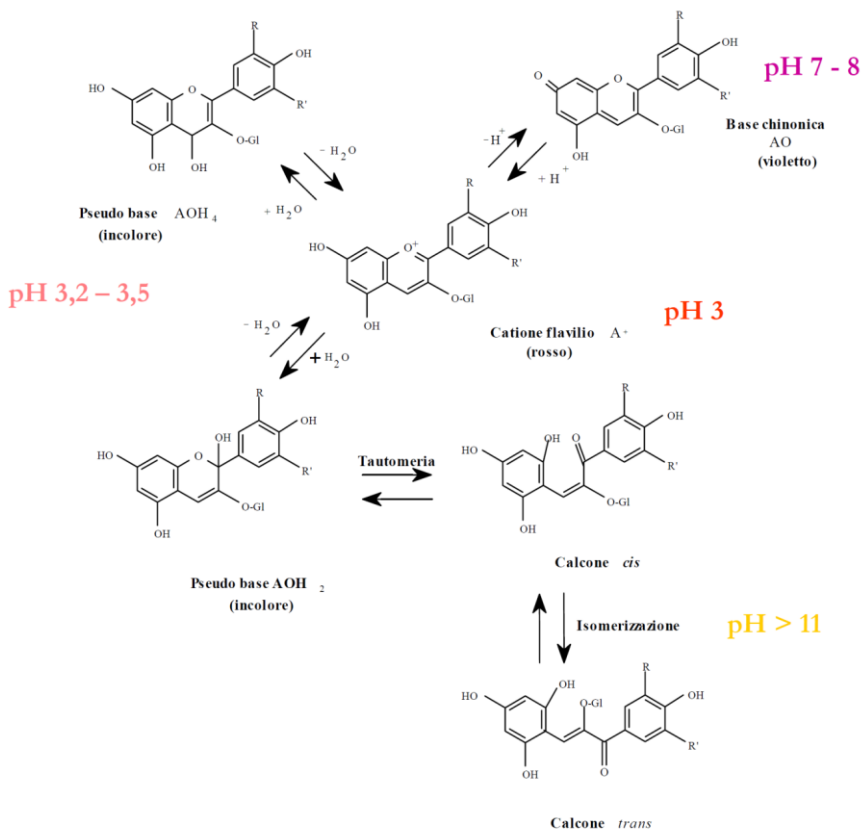


Figura 96: Equilibri degli antociani in funzione del pH (Comuzzo, 2003).

La massima intensità del colore rosso si riscontra a pH inferiore a 3, ed è dovuta alla presenza del sistema coniugato ed alla carica positiva delocalizzata sulla molecola (forma A^+). Al pH del vino (3,2 - 3,5), si evidenzia un'attenuazione del rosso, dovuta alla maggior influenza delle pseudobasi incolore (AOH) e ad una perdita della coniugazione; infine, a pH 7 - 8, si assiste ad un viraggio verso il blu-violetto per comparsa delle basi anidre (AO). Un ulteriore aumento del pH porta ad una ionizzazione delle funzioni fenoliche degli anelli benzenici, con comparsa di fenati blu (pH 11); infine, se il pH sale a valori superiori a 11, si assiste alla comparsa dei calconi gialli.

Glories (1984a), lavorando su una miscela di antociani estratti da bucce di Cabernet Sauvignon, ha determinato le percentuali delle varie forme presenti a diversi pH compresi fra 3 e 4: a pH 3, solo il 42% degli antociani si trova in forma colorata (catione flavilio o base anidra), a pH 4 la percentuale scende al 20%.

Durante la conservazione del vino, gli antociani possono andare incontro a fenomeni di degradazione (Fig. 97); Galvin (1993) distingue due meccanismi: la degradazione termica, e la degradazione ossidativa, mediate rispettivamente da temperatura ed ossigeno.

Per la degradazione termica, sono state ipotizzate due vie: una è attiva sulla forma AOH_2 (anche glicosilata) e porta alla formazione di acidi fenolici passando attraverso la molecola del calcone; l'altra interessa le forme AOH_4 e A^+ e porta alla formazione di diidroflavonoli e catechine; quest'ultima reazione non avviene sulle forme glicosilate, le quali richiedono un'idrolisi preliminare.

Il fenomeno, comunque, è tanto maggiore quanto più basso è il pH e quanto più alta è la concentrazione in antociani; la temperatura elevata accelera il tutto.

La degradazione ossidativa è stata osservata da Galvin (1993) in mezzo sintetico e conduce ad una polimerizzazione via o-chinoni e semichinoni, ma può portare anche a rottura dell'eterociclo e alla formazione di acidi benzoici.

In realtà, la distinzione tra le due vie (termica e ossidativa) non appare così netta; è probabile che il meccanismo di degradazione sia legato ad un effetto sinergico di temperatura, ossigeno e altri fattori, quali luce e catalizzatori (Cu^{2+} ; Fe^{3+}); il fenomeno, infatti, si presenta già ad una temperatura di conservazione del vino superiore a 20 °C e si osserva in misura maggiore in ambiente ossidante (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b). Il risultato è una diminuzione irreversibile del colore, e lo spostamento dello stesso verso una tonalità arancione.

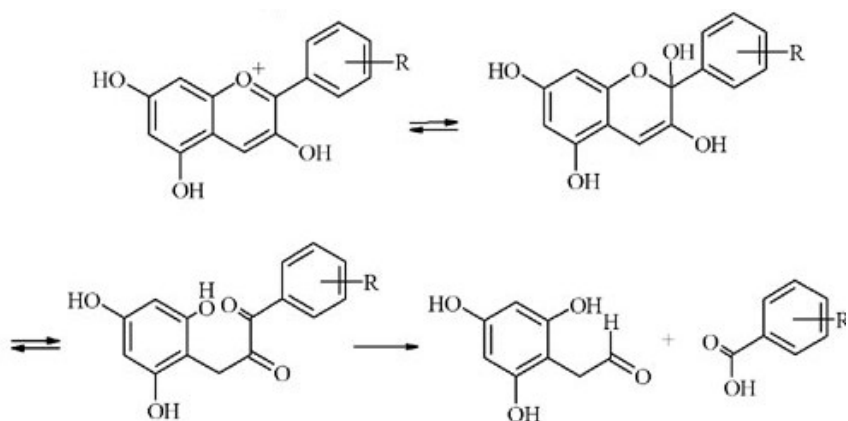


Figura 97: Reazione di degradazione delle antocianine (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998 b).

1.2 STABILITÀ DEI TANNINI

I tannini dell'uva sono polimeri dei flavani e prendono il nome di proantocianidine, in quanto danno origine ad antocianidine per trattamento acido a caldo (Bate-Smith, 1954). Si tratta di composti che vanno dal dimero al decamero (peso molecolare compreso tra 500 e 3.000 Da), che presentano alcune proprietà comuni, come la capacità di precipitare gli alcoli, la gelatina e le altre proteine, e di formare precipitati blu o neri in presenza di sali ferrici (Comuzzo, 2003).

La presenza di queste sostanze è legata alle caratteristiche cromatiche e sensoriali dei vini rossi, come il color mattone dei vini invecchiati o le sensazioni astringenti e amare. Con l'invecchiamento, in particolare, si assiste a reazioni di polimerizzazione dei tannini, che così diventano meno reattivi nei confronti delle proteine, con la conseguente perdita delle note astringenti (Glories, 1978).

In tale evoluzione, la temperatura di conservazione gioca un ruolo determinante, poichè se la temperatura stessa è elevata le cinetiche ad essa legate sono più rapide (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998 b).

La degradazione dei flavani è riconducibile essenzialmente a meccanismi di natura ossidativa, legati all'azione dell'ossigeno sull'anello laterale delle molecole (anello B); ciò determina la formazione di perossidi, chinoni e radicali liberi, che continuano la catena ossidativa (De Freitas, 1995).

Tali fenomeni si rendono particolarmente evidenti nei vini bianchi, per i quali la tinta vira dal paglierino al giallo ambrato. Anche nei rossi, tuttavia, la polimerizzazione ossidativa dei tannini è all'origine della formazione di composti bruni; le conseguenze di tale fenomeno, vanno a determinare profonde modificazioni delle note sensoriali e cromatiche, con la comparsa di tonalità aranciate, fino alla precipitazione dei polimeri chinonici formati (*casse* ossidasica) (Comuzzo, 2003).

I meccanismi della stabilità fenolica dei vini rossi sono legati a diverse reazioni che decorrono nel corso delle varie fasi della filiera produttiva. Quando tannini ed antociani sono presenti contemporaneamente in soluzione, la loro degradazione risulta sensibilmente inferiore. I meccanismi coinvolti in tale stabilizzazione, responsabili delle caratteristiche cromatiche del prodotto, sono: copigmentazione, polimerizzazione diretta e polimerizzazione mediata (dall'acetaldeide). Questi fenomeni risultano strettamente correlati non solo tra loro, ma anche con le caratteristiche del mezzo e delle specie chimiche coinvolte.

1.3 I MECCANISMI DI STABILIZZAZIONE DEL COLORE

Nel vino contenente antociani e tannini si osserva in presenza di ossigeno ed in funzione del tempo, una condensazione dei due pigmenti che porta a combinazioni tannini-antociani (T-A) di colore rosso più intenso rispetto a quello degli antociani liberi, e più stabili di questi nei confronti del pH e dell'anidride solforosa (Fig. 98).

Tale reazione può avvenire per via diretta, in virtù del fatto che le molecole coinvolte possono originare specie cariche, oppure, attraverso l'intervento dell'acetaldeide (etanale), a sua volta originata dall'ossidazione dell'etanolo in seguito a catalisi metallica, oppure attraverso l'intervento di perossidi originati dall'ossidazione dei flavani.

Da ciò deriva una maggior stabilità della frazione colorante, in quanto gli antociani combinati sono meno sensibili all'ossidazione e alla decolorazione ad opera dei solfiti.

In tale stabilizzazione, la temperatura gioca un ruolo molto importante: se troppo elevata fa sì che i tannini polimerizzino tra di loro senza inglobare le antocianine. È bene, quindi, differenziare la gestione della temperatura, aumentandola solo nelle fasi finali di affinamento, quando i pigmenti sono già presenti in uno stato di combinazione tale da garantirne la protezione; nelle prime fasi di affinamento, la temperatura va infatti moderata per ridurre la degradazione termica degli antociani. Sulla stabilizzazione del colore agiscono anche i polisaccaridi.

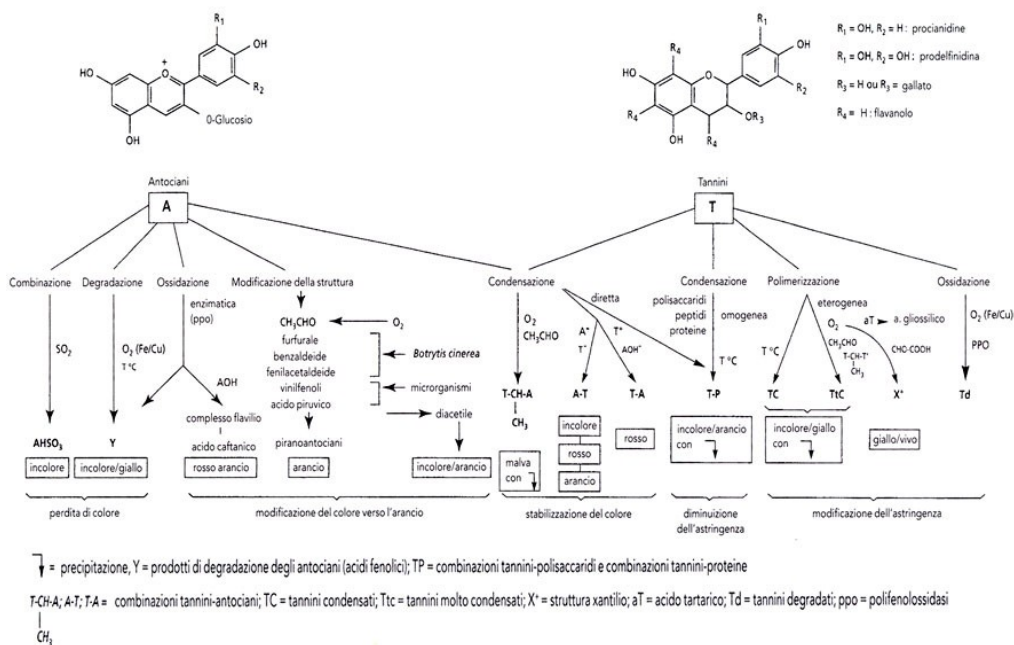


Figura 98: Evoluzione dei composti fenolici (A=antociani, T=tannini) durante la conservazione del vino rosso (Ribéreau-Gayon et al., 1998 b).

1.3.1 La copigmentazione

La copigmentazione è un fenomeno molto diffuso in natura dovuto alle interazioni tra antociani ed altre molecole organiche, dette copigmenti, che si ritiene stabilizzino il colore del vino (Osawa, 1982), determinandone un'intensità nettamente superiore a quella che ci si aspetterebbe dalla concentrazione della sola antocianina pura (Boulton, 2001); nell'uva i copigmenti caratteristici sono per lo più tannini solubili, procianidine, e flavonoli.

I meccanismi della stabilizzazione sono riconducibili a motivi sterici, con modificazioni che rendono la molecola meno suscettibile all'attacco da parte di reattivi nucleofili. Anche la presenza del gruppo acilico (antocianine acilate) esercita un effetto simile a quello del copigmento; in questo caso si parla di copigmentazione intramolecolare (Malien-Aubert et al., 2002).

La copigmentazione, dovuta a reazioni deboli (legami idrogeno e interazione idrofobiche) tra gli antociani e altri composti fenolici non colorati, determina un incremento dell'intensità colorante delle antocianine in soluzione (Boulton 2001), e porta ad uno spostamento dello spettro di assorbimento verso lunghezze d'onda più elevate, che si traducono in gradazioni tendenti al violetto (Amrani Joutei, 1993; Galvin, 1993; Osawa, 1982); il fenomeno è funzione del pH e del rapporto fra antociani e copigmenti. Secondo Amrani Joutei (1993), questi aspetti, insieme alla concentrazione e alla natura degli antociani presenti, determinano le differenti sfumature di rosso osservate a livello vacuolare mediante analisi microscopica.

Dal punto di vista molecolare, Osawa (1982) riporta come l'interazione si realizzi tramite legami idrogeno che coinvolgono prevalentemente la forma AO (base anidra) delle antocianine.

1.3.2 La polimerizzazione diretta

Glories (1978), osservando come l'aggiunta delle cinque antocianine dell'uva ad una soluzione modello di proantocianidine rallentava la perdita di colore, quando esposta a luce e ossigeno, ipotizza un possibile effetto stabilizzante dovuto all'interazione fra tannini e antociani.

I meccanismi di tale interazione sono riconducibili alle caratteristiche di reattività delle specie chimiche coinvolte.

In ambiente acido, i flavani possono dare origine ad un carbocatione sul C₄; questo può reagire con le posizioni 6 o 8 delle antocianine in forma di pseudobase (AOH), o eventualmente di calcone; anche il catione flavilio (A⁺) può reagire in posizione 4, con i carboni 6 e 8 di una molecola di flavano più o meno polimerizzato, portando ad un derivato non colorato (flavene) per ossidazione si colora; l'ossigeno è pertanto fondamentale per il decorso della reazione (Galvin, 1993).

La stabilità del colore dipende, quindi, dal rapporto antociani - tannini; è massima per un rapporto di 1:10, mentre cala per valori maggiori o minori (Glories, 1978). Se sono presenti pochi tannini, gli antociani vengono facilmente degradati; se, invece, i tannini sono presenti in dosi elevate, tendono a polimerizzare prevalentemente fra loro, senza inglobare pigmenti.

In ogni caso, la stabilizzazione è legata a motivi sterici: i complessi tannini-antociani spostano l'equilibrio di questi ultimi verso le forme A⁺ e AO (colorate), riducendone l'ossidazione e la reattività all'addizione nucleofila, ovvero all'idratazione e alla decolorazione ad opera dell'SO₂ (Brouillard, 1982; Glories, 1984a).

1.3.3 La polimerizzazione mediata – l'intervento dell'acetaldeide

Le aldeidi sono reattivi specifici per l'anello floroglucinolico (anello A) dei flavonoidi (Glories, 1974).

L'acetaldeide nel vino, è presente come prodotto secondario della fermentazione alcolica; in ambiente acido essa può essere protonata diventando così reattiva alla sostituzione elettrofila aromatica in posizione 6 e 8 da parte dei flavani; in tal modo, si vengono a formare dei ponti etanale fra residui flavanici di molecole diverse.

La dissoluzione di ossigeno nel mezzo (travasi, microossigenazione) incrementa la polimerizzazione mediata; l'acetaldeide, pertanto, si formerebbe dall'ossidazione dell'etanolo in seguito a catalisi per azione dei metalli (Glories, 1974), o per l'intervento di perossidi originati dall'ossidazione dei flavani (Galvin, 1993).

L'interazione con l'etanale aumenta l'intensità colorante delle soluzioni di antociani e la sposta verso il color malva. Anche in questo caso è importante il rapporto tannini/antociani: la stabilizzazione dei vini rossi giovani è buona se tale rapporto è pari a 4, mentre, se minore, il colore evolve limitatamente (Galvin, 1993).

Boulton (2001) stabilisce che una percentuale del colore dei vini rossi giovani, variabile tra il 30 ed il 50%, sia da ricondurre alla copigmentazione; essa, tuttavia, viene meno nel corso dell'affinamento: l'etanolo presenta un effetto destabilizzante nei confronti dei complessi antociani-tannini determinanti la copigmentazione stessa, portandoli alla dissociazione, questi risultano, infatti, diversi dai complessi antociani-tannini identificati nei vini affinati (Boulton, 2001; Galvin, 1993).

Altri autori (Mirabel *et al.*, 1999, Malien-Aubert *et al.*, 2002), invece, sostengono che la copigmentazione potrebbe facilitare reazioni di condensazione fra antociani e copigmenti, visto la ravvicinata presenza delle due specie chimiche all'interno degli aggregati.

Infine, il fatto che i composti colloidali influenzino la stabilità e le caratteristiche chimico-fisiche della frazione fenolica, rende ancora più complessa la definizione degli equilibri coinvolti nella struttura della materia colorante dei vini rossi.

2 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa terza sezione è stato quello di valutare l'impatto degli US sulla matrice fenolica dei vini rossi, in particolare su antociani e tannini, considerata l'importanza che questi hanno sul colore, sulla stabilità, e sul profilo sensoriale.

Nel vino ottenuto da cultivar a bacca rossa, mediante diversi approcci di estrazione della sostanza colorante, i parametri di valutazione sono sempre più legati ai livelli quantitativi e qualitativi della matrice polifenolica. In questo ambito, un fattore economicamente e logisticamente limitante è rappresentato dalle lente cinetiche di polimerizzazione dei polifenoli.

In questo studio si indagano gli eventuali effetti stabilizzanti degli ultrasuoni nei confronti dei polimeri tannino-antociano, potenzialmente in grado di promuovere l'affinamento rapido del patrimonio polifenolico, riducendo i tempi tra la produzione e la commercializzazione dei vini rossi.

Le vibrazioni di pressione prodotte durante il trattamento, potrebbero diffondere nel vino energia utile a promuovere la condensazione tannino-tannino e tannino-antociano.

3 VALUTAZIONE SULLA COMPONENTE POLIFENOLICA DEI VINI ROSSI

3.1 MATERIALI E METODI – INDAGINE SUI VINI ROSSI

3.1.1 Campioni e condizioni di trattamento

La prima serie di prove, impostata secondo il disegno sperimentale descritto nelle sezioni precedenti, è stata svolta su tre diversi vini rossi giovani; per ogni campione sono stati sottoposti a trattamento 200 mL di vino.

I vini trattati sono stati i seguenti:

Serie 1: vino rosso da tavola 2010, provenienza Veneto

Serie 2: vino rosso da tavola Cabernet Sauvignon 2010, provenienza Friuli Venezia Giulia

Serie 3: vino rosso Raboso DOC 2010, provenienza Veneto

Infine è stato sottoposto a trattamento un quarto campione di vino Merlot 2011, provenienza Veneto, destinato alla degustazione.

3.1.2 Determinazioni analitiche

Oltre alle metodiche di analisi giù descritte nella ‘Sezione Materiali e Metodi’ della ‘Parte Prima’, sono stati determinati anche l’Indice di Acido Cloridrico e le catechine.

Indice di HCl (Glories, 1978)

I tannini molto polimerizzati precipitano in acido cloridrico concentrato con conseguente calo della densità ottica a 280 nm (Glories, 1978).

In un beker, a 10 mL di campione si aggiungono 5 mL di acqua distillata e 15 mL di HCl al 37% (Carlo Erba, Milano, Italia), si diluisce 25 volte e si legge l’assorbanza a 280 nm, contro acqua (d0).

In un secondo beker, 10 mL di campione, 5 mL di acqua distillata e 15 mL di HCl al 37% sono sottoposti, dopo 7 ore, a centrifugazione (4000 rpm per 10 minuti), e sul surnatante, diluito 25 volte, si legge l’assorbanza a 280 nm contro acqua (d7).

L’indice di HCl, dopo 7 e 24 ore, è dato dalla seguente relazione:

$$\text{Indice di HCl (\%)} = \frac{d0 - d7}{d0} \cdot 100$$

$$\text{Indice di HCl (\%)} = \frac{d0 - d24}{d0} \cdot 100$$

I risultati vengono espressi come percentuale: per i vini giovani l’indice varia dal 10 al 20%, per quelli invecchiati è dell’ordine del 20%, per i vini vecchi supera il 50%.

Catechine (Zironi et al., 1992)

Si sfrutta la capacità della *p*-dimetilamminocinnamaldeide (DAC) di creare un complesso con le catechine, che registra un massimo di assorbanza a 640 nm. La misura dell'assorbanza è correlata alla quantità di catechine presenti nel mezzo.

Reattivi:

- Soluzione di *p*-dimetilamminocinnamaldeide (DAC), preparata con 1g di DAC (Sigma Aldrich LLC, St.Louis, MO, USA), 750 mL di metanolo (Carlo Erba, Milano, Italia), e 250 mL di HCl al 37% (Carlo Erba, Milano, Italia); la soluzione, una volta raffreddata, viene portata al volume finale di 1 L con HCl al 37% e conservata a + 4 °C per massimo 3-4 giorni.
- Etanolo al 10% (Carlo Erba, Milano, Italia).

Ad 1 mL di campione, diluito 1:25, si aggiungono 5 mL di soluzione di DAC, e, dopo 5 minuti, si misura l'assorbanza a 640 nm contro un bianco preparato sostituendo il campione con 1 mL di etanolo al 10%. Si valutano le catechine in mg/L, in riferimento alla densità ottica e ad una retta di taratura ottenuta con (+)-catechina in etanolo al 10%.

3.1.3 Analisi sensoriale

Le analisi condotte in laboratorio hanno fornito indicazioni più interessanti dal punto di vista gustativo/olfattivo piuttosto che relativamente alla componente colore, pertanto è stata fatta una degustazione del vino Merlot 2011 trattato con ultrasuoni a confronto del campione di riferimento non sottoposto a trattamento. Per l'analisi sensoriale è stata utilizzata una scheda di valutazione quali-quantitativa (Tab.24). I vini sono stati valutati da un panel di tecnici del settore.

ANALISI SENSORIALE											
ASSAGGIATORE											
CAMPIONE											
VISTA	GIUDIZIO										
Saturazione colore	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Eventuali note
Limpidezza	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Riflessi violacei	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Riflessi granati	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
OLFATTO	GIUDIZIO										
Intensità	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Eventuali note
Floreale	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Fruttato	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Speziato	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Vegetale	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Qualità	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
GUSTO	GIUDIZIO										
Struttura	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Eventuali note
Volume	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Acidità	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Amaro	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	_____
Astringenza	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Abrasiva										
	Adesiva										
Armonia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Persistenza	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Retroolfatto	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
GIUDIZIO COMPLESSIVO											
Valutazione	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Eventuali note

Tabella 34: Scheda di degustazione utilizzata nella seduta di analisi sensoriale.

3.1.4 Analisi statistica

I risultati ottenuti dall'ultima serie di analisi, sono stati sottoposti all'Analisi della Varianza (ANOVA), mediante il modulo di base STATISTICA per Windows, versione 7.0, al fine di stabilire eventuali differenze significative.

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.2.1 Vini rossi da tavola

Le prove delle prime due serie di campioni sono state realizzate come studio preliminare, in modo da valutare se, e quali, fossero i possibili effetti del trattamento ad ultrasuoni sul vino rosso.

Avendo i due vini caratteristiche similari, gli effetti dei trattamenti vengono commentati contemporaneamente.

Poiché l'eventuale innalzamento della temperatura, conseguente al trattamento del campione, costituisce un fattore importante sugli eventuali effetti del trattamento e/o sulla qualità finale del prodotto, questa è stata monitorata nel corso delle prove. I dati hanno mostrato un andamento analogo per tutte le prove, in grafico (Fig. 99) si riportano, a titolo di esempio, le temperature finali dei campioni di vino rosso della serie 1.

È evidente un innalzamento rispetto alla temperatura del campione di riferimento (20 °C) correlato al tempo ed all'intensità del trattamento.

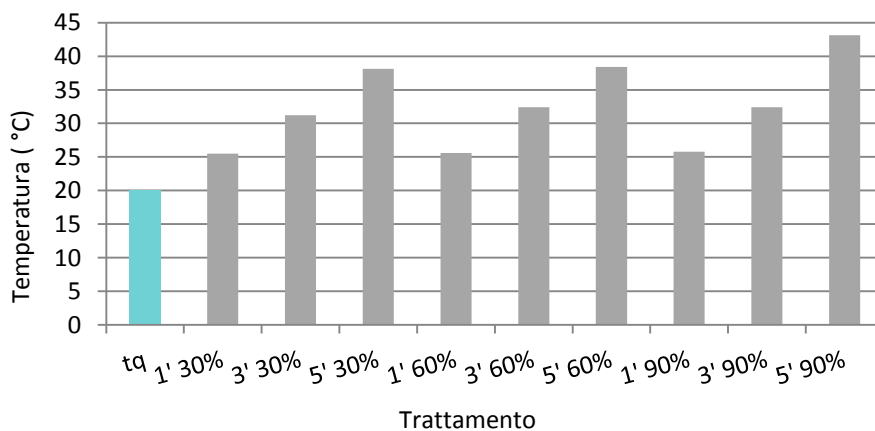


Figura 99: Andamento delle temperature raggiunte dopo trattamento ad US, e del campione di riferimento (tq), per i campioni di vino rosso della Serie 1.

Trattandosi di vini rossi, le prime osservazioni sono state quelle relative al possibile effetto del trattamento sulla materia colorante (Fig. 100 e 101).

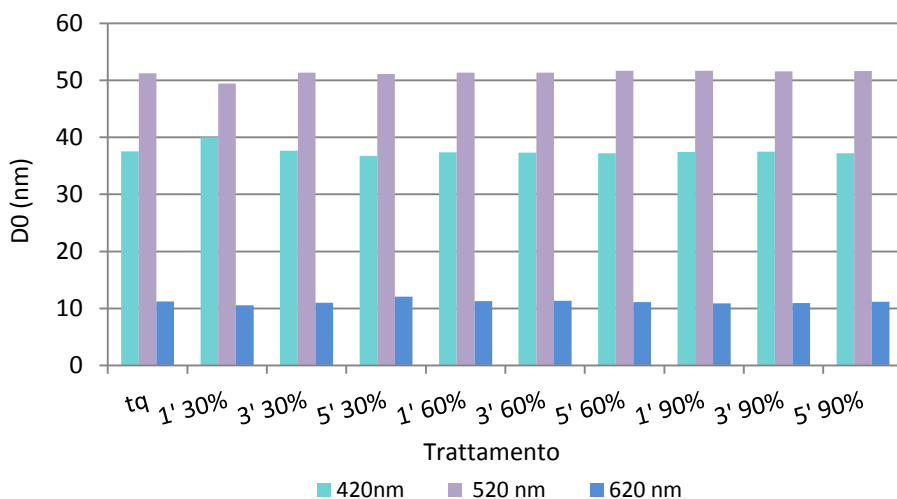


Figura 100: Effetto del trattamento ad US sulle densità ottiche (420, 520 e 620 nm) dei campioni di vino rosso della Serie 1, confrontate con il campione di riferimento (tq).

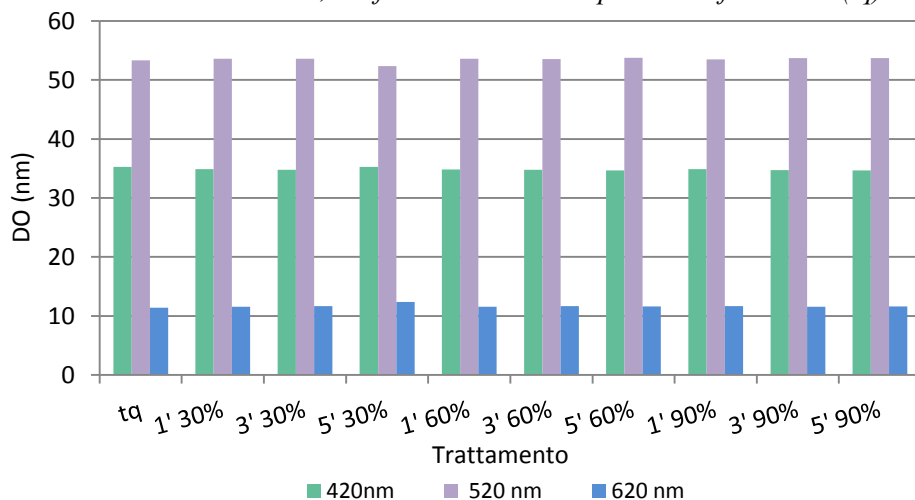


Figura 101: Effetto del trattamento ad US sulle densità ottiche (420, 520 e 620 nm) dei campioni di vino rosso della Serie 2, confrontate con il campione di riferimento (tq).

Come si nota dai grafici relativi ai campioni della serie 1 e 2, il trattamento ad ultrasuoni non ha comportato variazioni significative delle densità ottiche (420, 520 e 620 nm) e neanche sul contenuto in antociani (Fig. 102).

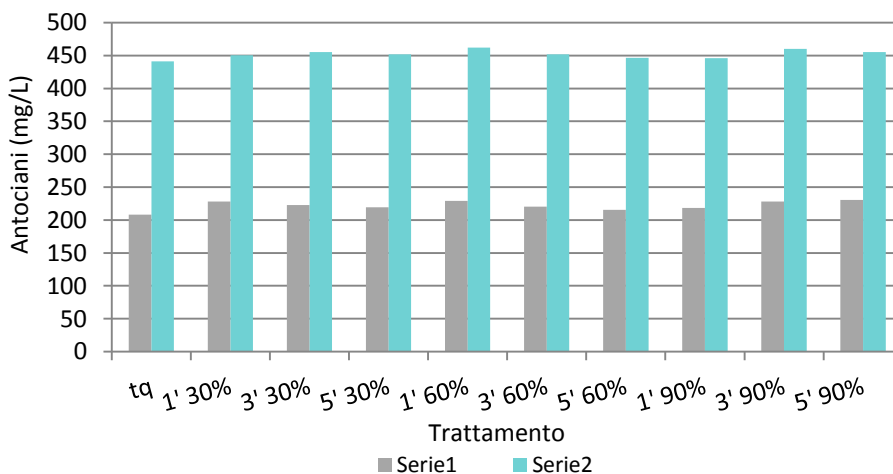


Figura 102: Effetto del trattamento ad US sul contenuto in antociani (mg/L) dei campioni di vino della Serie 1 e 2, confrontate con il rispettivo campione di riferimento (tq).

Anche i valori dell'indice di pigmenti polimerizzati (Fig. 103), che denota il contributo rosso dei tannini condensati e delle forme polimerizzate degli antociani, non presentano differenze evidenti. Dai dati considerati, non sono emersi effetti del trattamento ad ultrasuoni sul colore e sul contenuto degli antociani, aspetto interessante in previsione di una possibile stabilizzazione dei tannini senza perdita di colore.

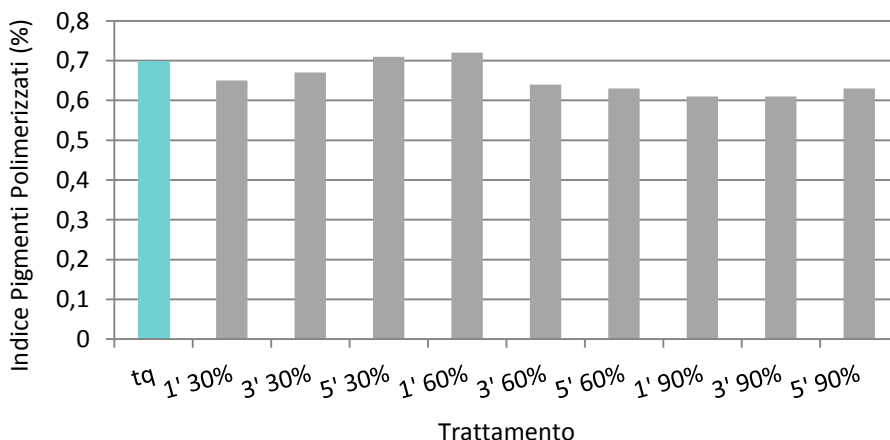


Figura 103: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di Pigmenti Polimerizzati (%) dei campioni di vino, e del campione di riferimento (tq), della Serie 1.

L'indice di etanolo (Fig. 104) ha fornito dati interessanti, sottolineando il diverso comportamento dei due vini relativamente allo stato colloidale dei tannini. Il Cabernet Sauvignon (Serie 2) presenta un basso valore iniziale di tale indice, che aumenta in tutti i campioni per effetto del trattamento, raggiungendo un picco per il trattamento di 5 minuti al 60% di amplitudine, invece per il vino rosso (Serie 1), che presentava un valore già

elevato in partenza, il trattamento non sembra provocare effetti rilevanti. Questi dati, se confermati da ulteriori prove, possono ipotizzare l'applicazione di tale tecnologia nel trattamento di affinamento dei vini rossi.

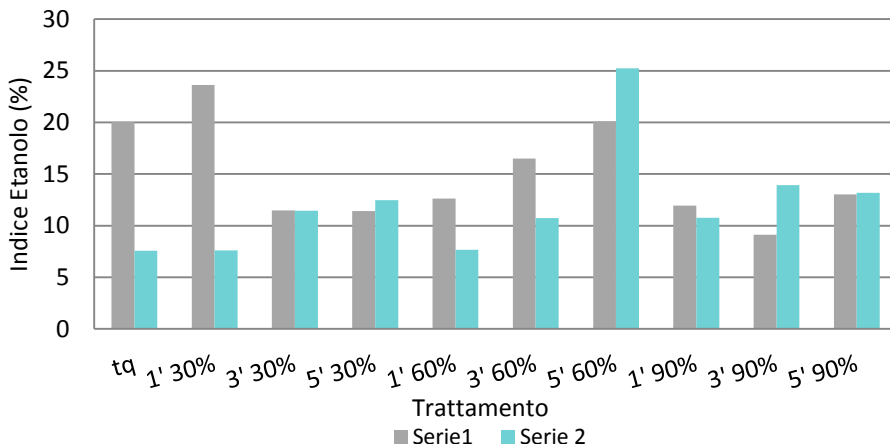


Figura 104: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di Etanolo (%) dei campioni di vino, e del rispettivo campione di riferimento (ta), della Serie 1 e 2

L'indice di acido cloridrico ha dato, invece, risultati diversi per le due serie di vini, ma la tendenza è univoca: l'applicazione degli ultrasuoni comporta un aumento di tale indice per tutti i campioni, indipendentemente dall'intensità del trattamento applicato (Fig. 105 e 106). Inoltre i valori a 24 ore sono risultati sempre più alti di quelli a 7 ore (soprattutto per la Serie 2), il che suggerisce la polimerizzazione di tutti i tannini presenti.

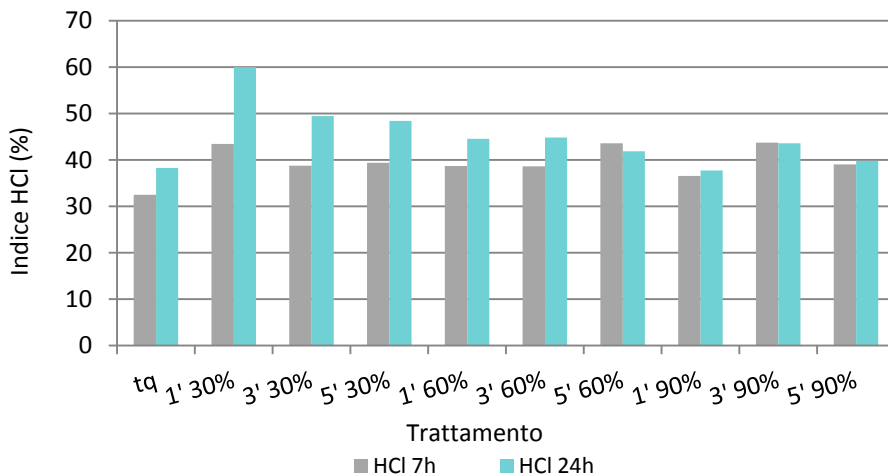


Figura 105: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di HCl (%) a 7 ore e 24 ore dei campioni di vino, e del rispettivo campione di riferimento (ta), della Serie 1.

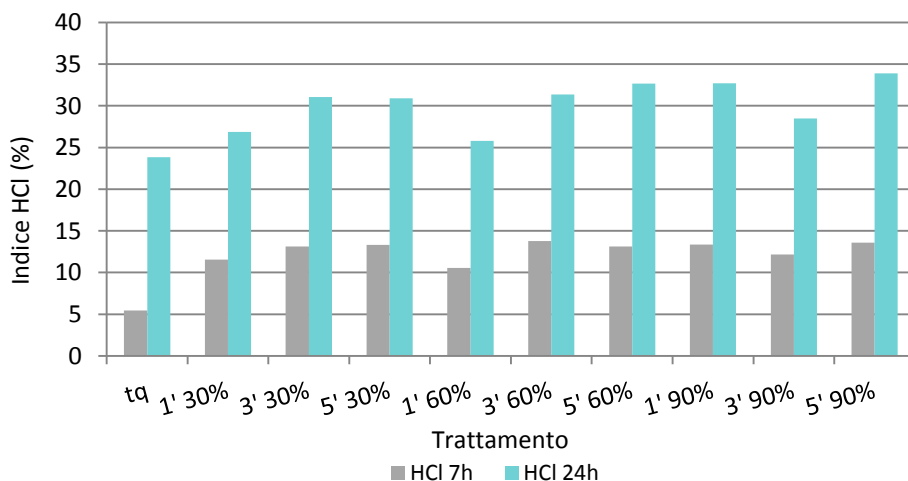


Figura 106: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di HCl (%) a 7 ore e 24 ore dei campioni di vino, e del rispettivo campione di riferimento (tq), della Serie 2.

L'indice di gelatina, esprimendo in percentuale la reattività dei tannini, indica indirettamente il livello di astringenza di un vino.

Per il campione di vino rosso della Serie 1 si nota un calo di tale percentuale nei campioni sottoposti a trattamenti di pochi minuti e basse intensità, mentre si evidenzia un aumento nei campioni sottoposti ai trattamenti più intensi e più lunghi (Fig. 107).

Diversi sono, invece, i risultati della Serie 2, che presenta tannini polimerizzati sicuramente più stabili e pertanto non suscettibili al trattamento; infatti i valori tra il campione di riferimento e quelli sottoposti a trattamento non presentano variazioni così evidenti.

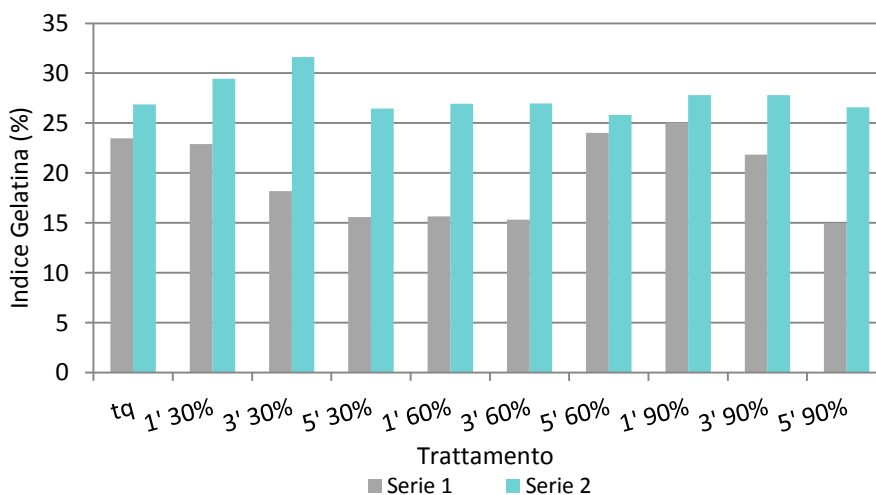


Figura 107: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di Gelatina (%) dei campioni di vino trattati, e del rispettivo campione di riferimento (tq), della Serie 1 e 2.

Rappresentando le catechine la componente principale della frazione tannica, è stato valutato il loro contenuto prima e dopo trattamento, in modo da stimare l'eventuale effetto degli ultrasuoni anche su tale componente. I risultati (Fig. 108) hanno mostrato un aumento dei valori, anche se in alcuni casi meno evidente, per tutti in campioni di entrambe le serie; è probabile, quindi, che il trattamento favorisca il rilascio di catechine monomere dai tannini.

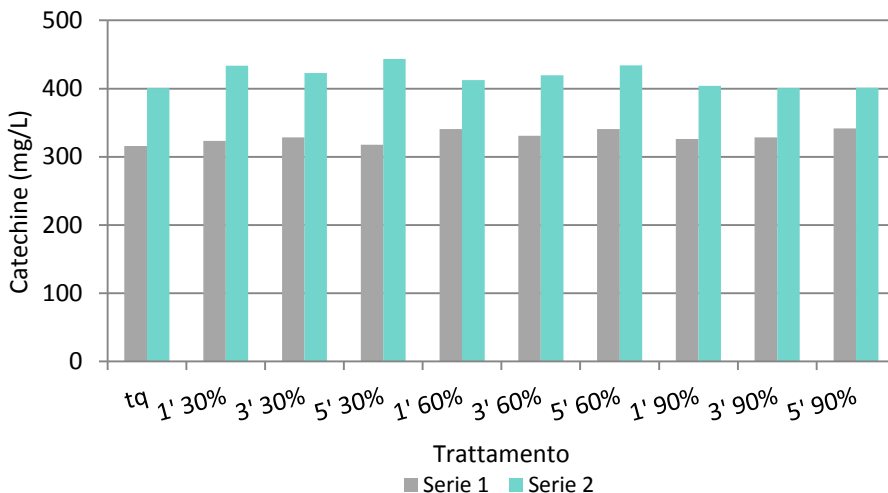


Figura 108: Effetto del trattamento ad US sul contenuto di catechine (mg/L) dei campioni di vino trattati, e del rispettivo campione di riferimento (tq), della Serie 1 e 2.

L'analisi della varianza, effettuata sui vari parametri analitici in relazione alle diverse condizioni amplitudine/tempo di trattamento, ha evidenziato differenze significative relativamente al contenuto di catechine per la Serie 1 (Tab. 35), e all'intensità colorante e indice di HCl a 24 ore per la Serie 2 (Tab. 36). A prescindere dal livello di amplitudine (%) e dal tempo, invece, non sono state riscontrate differenze significative relativamente a tutti gli altri parametri (antociani, indice di etanolo, indice di gelatina e catechine).

	Intensità Colorante	Antociani	Indice Etanolo	Indice HCl 7h	Indice HCl 24h	Indice Gelatina	Catechine
F	2,91745	0,458293	1,14114	0,876225	0,899239	2,00409	8,88915
p	0,132	0,998	0,444	0,556	0,454	0,232	0,016
R²	0,74476	0,0432037	0,532959	0,467017	0,473462	0,667107	0,898881
R² Adj.	0,489446	-0,912811	0,065918	-0,06597	-0,05305	0,334235	0,797746
Q²	0,451348	-0,0451939	0,270434	0,119642	0,145995	0,195779	0,402307
Validità modello	0,394068	0,922821	0,382411	0,208063	0,276056	0,883913	0,155895
Riproducibilità	0,92319	-0,2	0,865957	0,924328	0,901695	0,195018	0,98836

Tabella 35 Analisi della varianza dei parametri di regressione del modello predittivo per i diversi parametri della Serie 1. In grassetto sono riportate le differenze significative ($p < 0,05$).

	Intensità Colorante	Antociani	IPP	Indice Etanolo	Indice HCl 7h	Indice HCl 24h	Indice Gelatina	Catechine
F	5,6199	4,87654	1,17325	1,0866	0,41318	6,83351	0,348142	1,66962
p	0,041	0,053	0,433	0,465	0,823	0,027	0,864	0,294
R²	0,848928	0,82983	0,53985	0,520752	0,292379	0,872343	0,258239	0,625376
R² Adj.	0,697859	0,659661	0,079732	0,041504	-0,41523	0,744687	0,097025	-0,0419095
Q²	0,245413	0,246934	0,062605	0,087819	0,061466	0,097025	-0,04190	-0,0843038
Validità modello	0,880114	0,658403	-0,03924	0,832154	0,854769	0,564473	0,638687	0,765924
Riproducibilità	0,641311	0,848059	0,975782	0,090078	-0,2	0,922907	0,390257	0,470369

Tabella 36: Analisi della varianza dei parametri di regressione del modello predittivo per i diversi parametri. In grassetto sono riportate le differenze significative ($p < 0,05$).

Infine, dai grafici seguenti (Fig. 109 e 110) è possibile valutare l'effetto del livello dell'amplitudine e del tempo di sonicazione sui parametri risultati statisticamente significativi: modulando i due fattori è infatti possibile ottimizzare i trattamenti al fine di ottenere effetti analoghi.

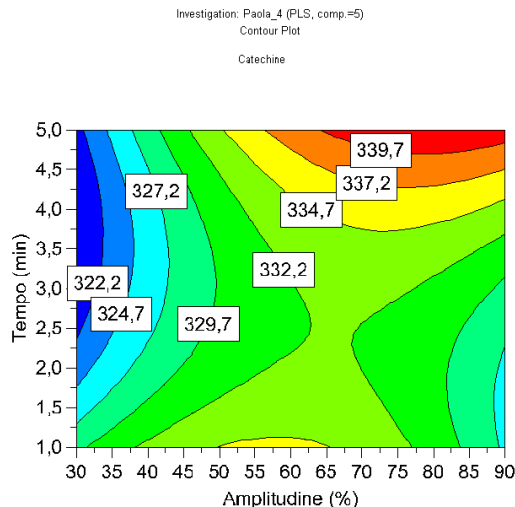


Figura 109 : Grafici della superficie di risposta rappresentanti l'effetto dell'amplitudine (%) e del tempo di sonicazione (min) sul contenuto di catechine (Serie 1)

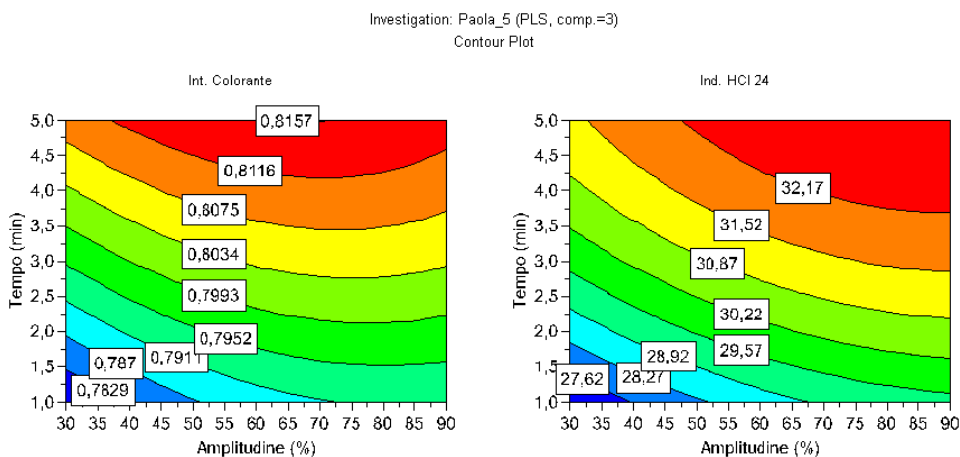


Figura 110 : Grafici della superficie di risposta rappresentanti l'effetto dell'amplitudine (%) e del tempo di sonicazione (min) sull'intensità colorante e sull'indice di HCl a 24 ore (Serie 2)

3.2.2 Vino Raboso

I trattamenti sui campioni di vino Raboso sono stati replicati tre volte, in modo da valutare eventuali differenze significative.

Relativamente all'Indice dei polifenoli totali - DO 280 nm (Fig. 111), si è registrato un calo, fino al 10%, per i campioni trattati alle amplitudini del 60 e 90%. Tra i trattamenti sono state riscontrate differenze significative, tuttavia resta da indagare il motivo di tale diminuzione.

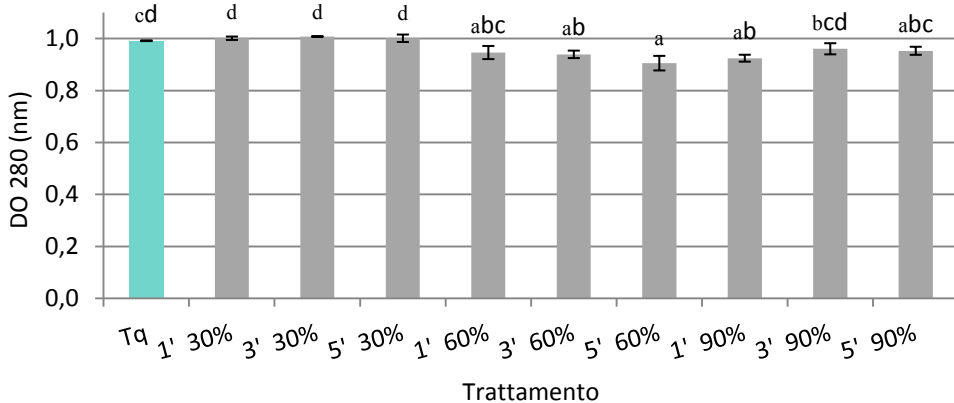


Figura 111: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di polifenoli totali dei campioni di vino Raboso, e del campione di riferimento (Tq). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Considerate le caratteristiche del vino oggetto di studio, il campione di riferimento presenta un valore dell'indice di etanolo che rientra nella media. I trattamenti alle basse intensità (30%) evidenziano dei valori di tale indice inferiori rispetto al campione non trattato, mentre intensità più elevate (60 e 90%) portano ad un aumento significativo di tale percentuale (Fig. 112); effetto che conferma quanto riscontrato precedentemente per la Serie 1 e 2 (i trattamenti di 3 e 5 minuti al 60% avevano dato, infatti, gli innalzamenti più importanti di tale indice).

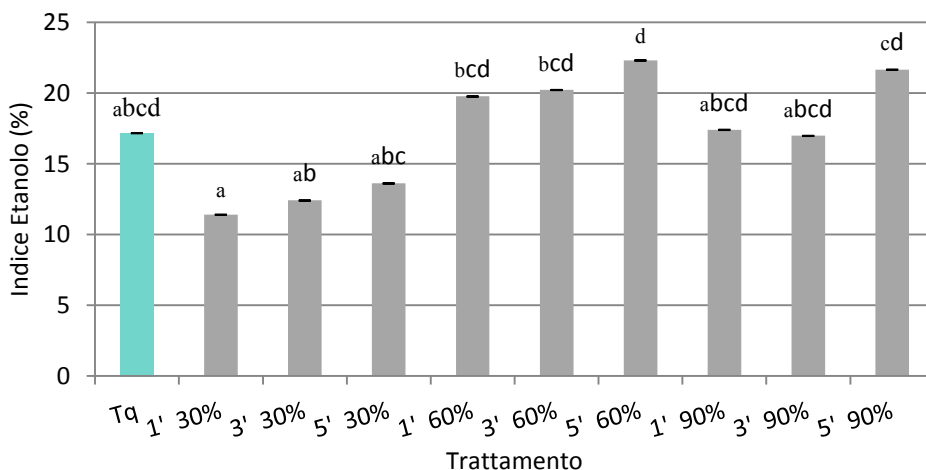


Figura 112: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di etanolo (%) dei campioni di vino Raboso, e per il campione di riferimento (Tq). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Per quanto riguarda la polimerizzazione dei tannini, l'indice di HCl a 7 ore (Fig. 113) non presenta differenze significative tra campioni, tuttavia i dati mostrano un andamento decrescente per i trattamenti sottoposti alle intensità maggiori: i trattamenti più intensi potrebbero causare una maggiore rottura delle macromolecole tanniche comportando una diminuzione dell'indice, in particolar modo all'amplitudine del 90%. Diverso, invece, è risultato l'effetto a 24 ore (Fig. 114): in particolare, risulta che il campione trattato 5 minuti al 90% differisce da tutti i campioni trattati ad amplitudini inferiori.

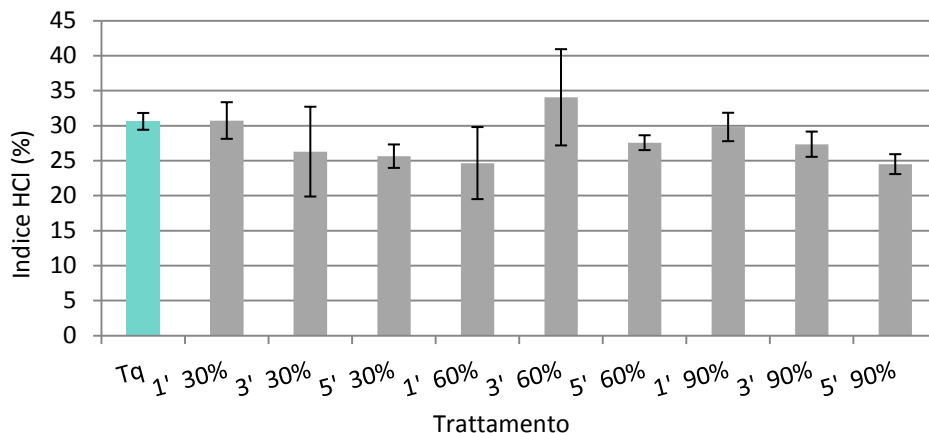


Figura 113: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di HCl (%) a 7 ore dei campioni di vino Raboso, e del campione di riferimento (Tq.) Nessuna differenza significativa tra campioni ($p \leq 0.05$).

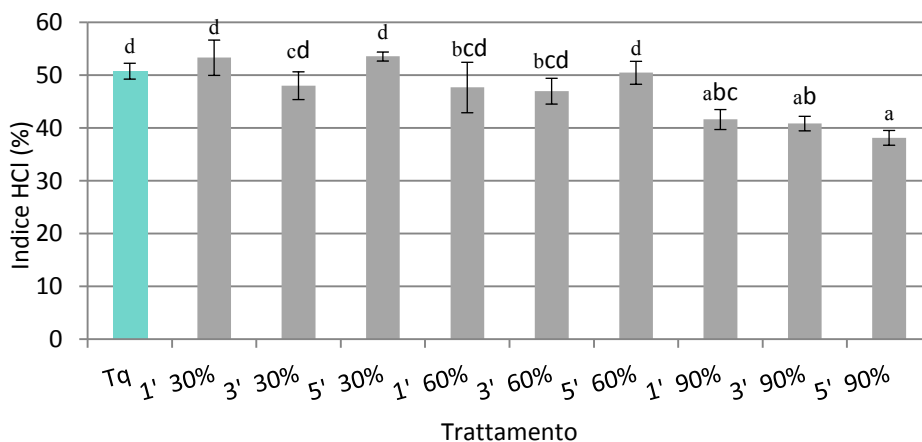


Figura 114: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di HCl a 24 ore dei campioni di vino Raboso, e del campione di riferimento (Tq). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

I dati relativi all'indice di gelatina (Fig. 115) mostrano un effetto importante sulla reattività dei tannini. Il campione di riferimento presenta valori che suggeriscono la presenza di tannini abbastanza reattivi; i trattamenti ad ultrasuoni meno intensi comportano un lieve aumento di tale valore, mentre i trattamenti più intensi e lunghi ne comportano una diminuzione importante; effetto non desiderato in quanto vini con indice di gelatina così basso possono dare problemi legati alla loro amarezza. Tuttavia la diminuzione di tale indice rientra in un range di valori che può risultare favorevole soprattutto ad un ammorbidimento dei tannini caratterizzanti i vini rossi giovani.

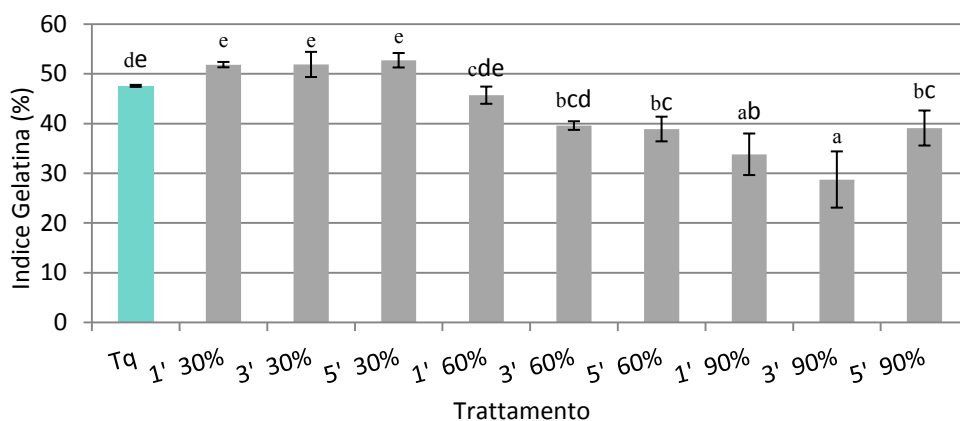


Figura 115: Effetto del trattamento ad US sull'Indice di gelatina (%) dei campioni di vino Raboso, e del campione di riferimento (Tq). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Il trattamento provoca un aumento del contenuto in catechine (fino al 6% per il trattamento di 5 minuti al 60% e dell'8% per quello di 5 minuti al 90%) rispetto al campione di riferimento, anche se non vi sono differenze così marcate correlabili alle condizioni di trattamento impiegate (Fig. 116). Questo incremento potrebbe derivare dalla rottura delle macromolecole in frazioni più piccole che danno quindi una maggiore risposta.

Da sottolineare, inoltre, una probabile relazione, per i trattamenti con intensità del 90%, tra le catechine e l'indice di HCl dopo 24 ore: alla diminuzione dell'indice corrisponde una maggiore quantità di catechine. Correlazione che non trova però riscontro dal punto di vista statistico.

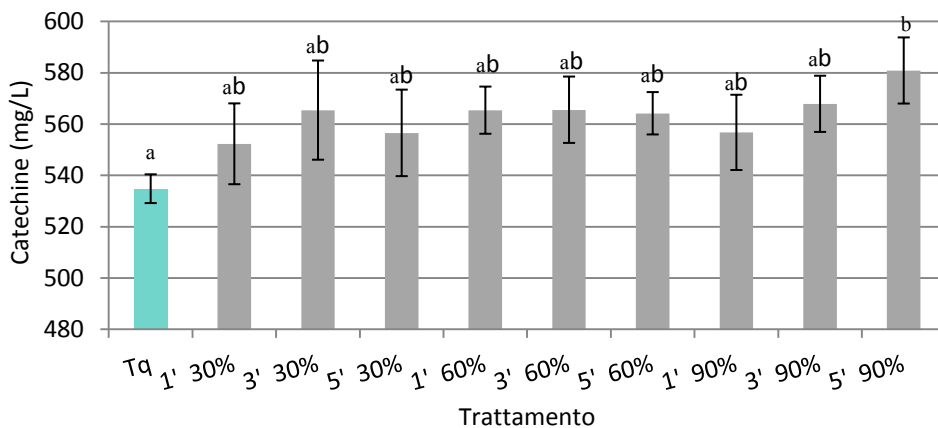


Figura 116: Effetto del trattamento ad US sulle catechine (mg/L) dei campioni di vino Raboso, e del campione di riferimento (Tq). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Dall'analisi multivariata (Fig. 117) si evidenzia come i singoli trattamenti influenzino i vari indici: i trattamenti più intensi hanno maggior effetto sull'indice di etanolo, viceversa quelli più blandi sull'indice di gelatina.

L'indice di HCl a 7 ore non viene influenzato da nessun trattamento, come già evidenziato precedentemente dall'ANOVA. Gli altri indici si posizionano centralmente, quindi non è chiaro quali siano le condizioni di trattamento che influenzano un indice piuttosto che un altro.

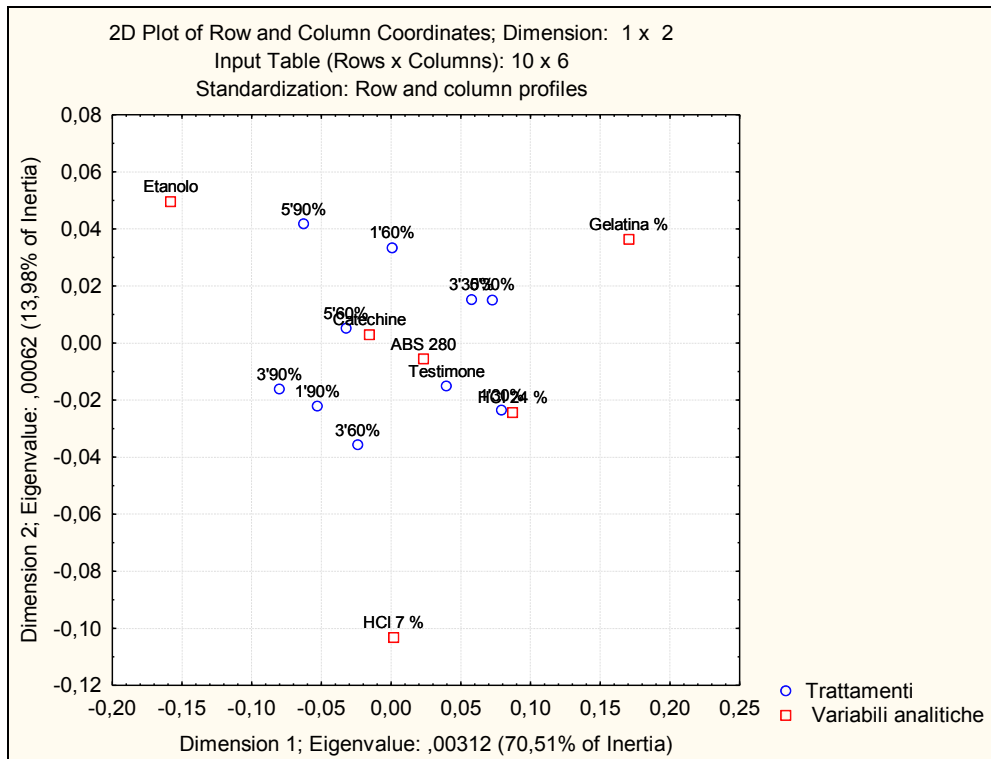


Figura 117: Risultati dell'elaborazione statistica (analisi delle corrispondenze) tra condizioni di trattamento e indici analitici.

Dalla PCA (analisi delle componenti principali), si nota come i trattamenti appaiano ben separati (Fig. 118): nei quadranti di sinistra si individuano i trattamenti più blandi, mentre a destra quelli più intensi, come osservato nell'analisi della varianza.

Questi risultati confermano il fatto che gli effetti del trattamento ad ultrasuoni cambino notevolmente in funzione dei parametri adottati.

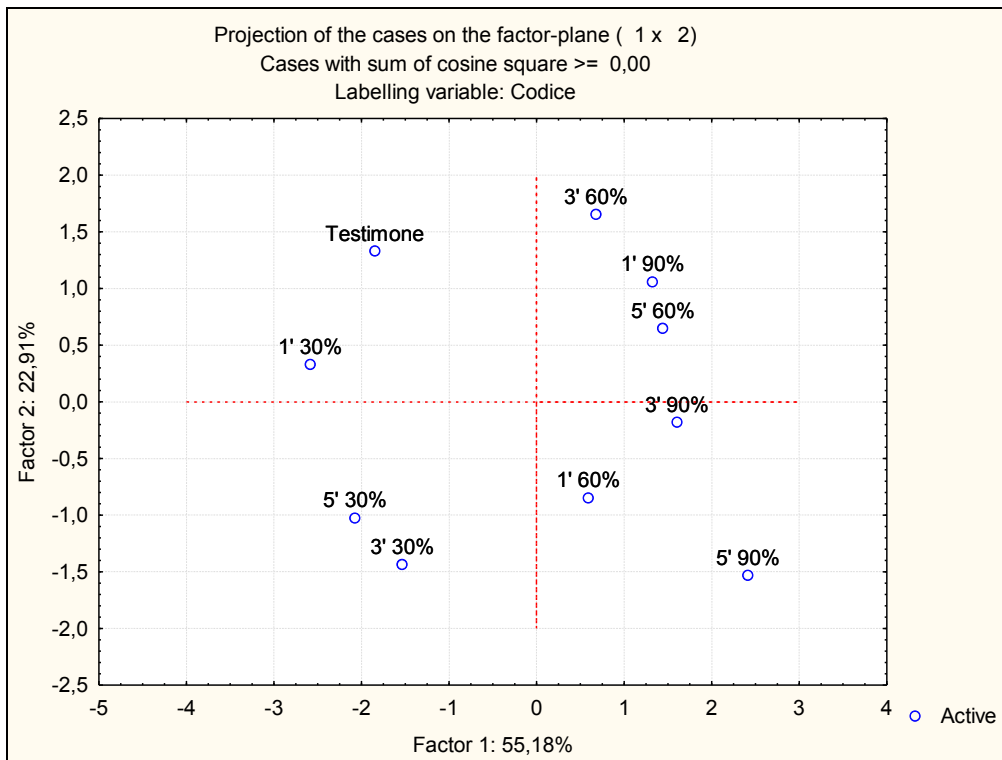


Figura 118: Risultati dell'analisi statistica PCA (Principal Component Analysis) relativa alle condizioni di trattamento (variabili indipendenti).

3.2.3 ANALISI SENSORIALE

L'analisi sensoriale è stata condotta su un vino Merlot; sono stati sottoposti a degustazione i campioni che presentavano le differenze più interessanti dal punto di vista analitico.

I campioni sono stati trattati tre giorni prima della degustazione, ad eccezione dell'ultimo (una replica del trattamento di 5 minuti al 90%), trattato anche lo stesso giorno della degustazione per verificare eventuali effetti immediati provocati dagli ultrasuoni, e quindi applicabili alla vendita di vino alla mescita.

Il panel costituito da 10 giudici ha degustato i campioni nel seguente ordine:

- Campione non trattato
- 5 minuti al 30%
- 3 minuti al 60%
- 5 minuti al 60%
- 5 minuti al 90%
- 5 minuti al 90%

Relativamente all'aspetto visivo (Fig. 119), viene confermato quanto riscontrato analiticamente: i trattamenti ad ultrasuoni, alle condizioni applicate, non incidono sul colore. L'unica lieve variazione si evidenzia sulla presenza di riflessi, che virano sul granato a discapito del violaceo.

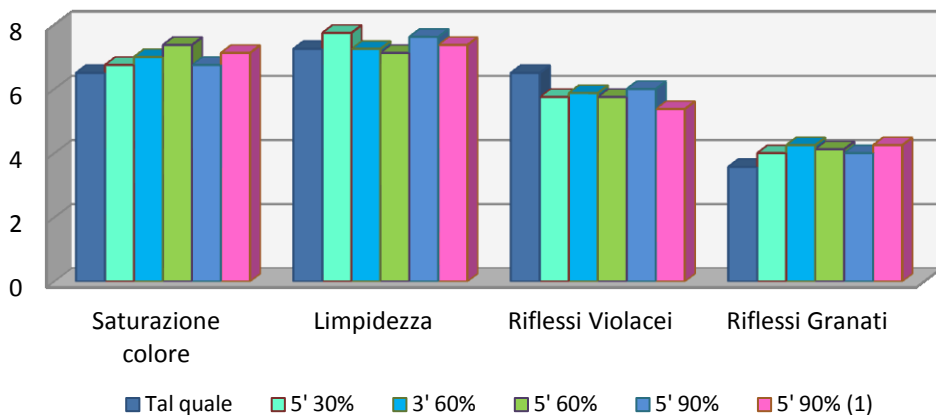


Figura 119: Evoluzione dell'aspetto visivo dei campioni di vino trattati con US e del campione di riferimento (Tal quale) oggetto di analisi sensoriale.

All'olfatto (Fig. 120) si è potuto notare la reazione agli ultrasuoni delle molecole aromatiche: l'impatto più importante si è registrato sull'intensità aromatica, che diminuisce in maniera significativa in tutti i campioni degustati. È stato riscontrato un aumento generalizzato del sentore vegetale. I giudici hanno segnalato, infine, una diminuzione della qualità olfattiva dei campioni trattati con ultrasuoni, nonostante questi siano risultati più 'aperti' rispetto al campione di riferimento.

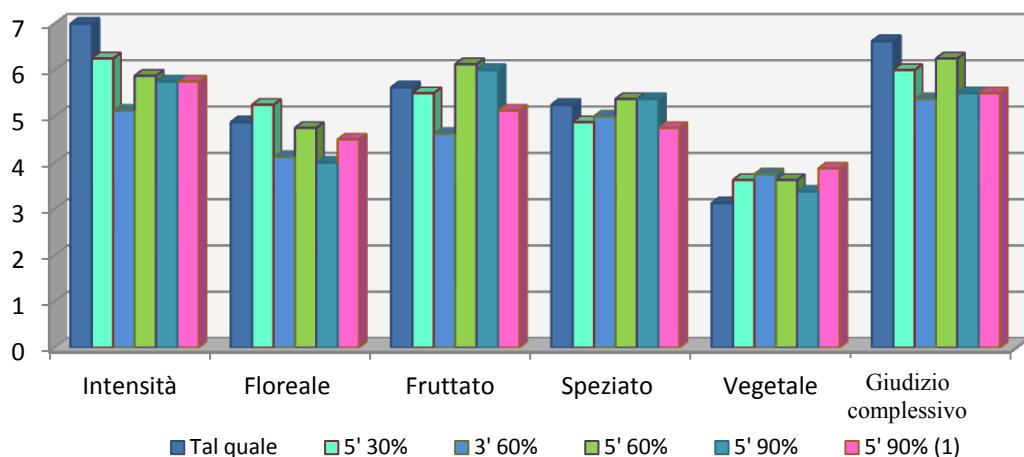


Figura 120: Evoluzione delle sensazioni olfattive dei campioni di vino trattati con US e del campione di riferimento (Tal quale) oggetto di analisi sensoriale.

Al gusto, il trattamento ad ultrasuoni non ha comportato variazioni dal punto di vista della struttura del vino; altrettanto dicesi per volume e acidità. Questo dato può essere correlato alla quantità di catechine e all'indice di gelatina determinato (Fig. 121). La quantità di composti fenolici non polimerizzati può causare, infatti, problemi di gusto amaro, così come bassi valori dell'indice di gelatina possono portare ad un incremento della sensazione amara. Tale sensazione è risultata più marcata nei campioni trattati per tempi più lunghi ed intensità più elevate.

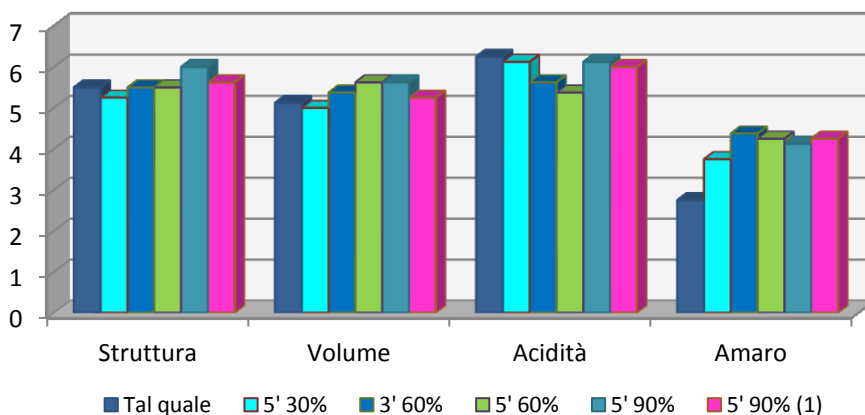


Figura 121: Evoluzione delle sensazioni gustative dei campioni di vino trattati con US e del campione di riferimento (Tal quale) oggetto di analisi sensoriale.

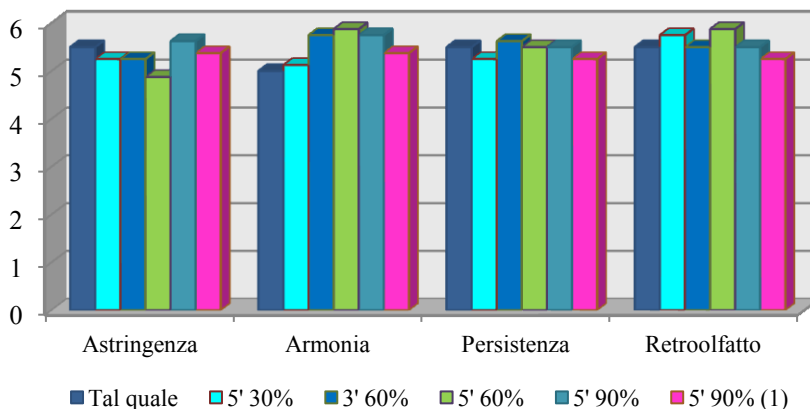


Figura 122: Evoluzione delle sensazioni gustative dei campioni sottoposti trattati con US e del campione di riferimento (Tal quale) oggetto di analisi sensoriale.

I dati rielaborati in Fig. 122 mostrano delle interazioni interessanti: l'astringenza, in particolare per il campione trattato con ultrasuoni per 5 minuti al 60% di ampiezza, subisce una buona riduzione; anche le sensazioni legate all'armonia risultano migliorate, e tale miglioramento è più marcato nel campione in cui si è riscontrato il calo di astringenza. Valutando attentamente il parametro legato all'astringenza, è risultato interessante notare come l'intero panel abbia percepito la stessa sensazione di astringenza di tipo adesivo nel campione trattato per 5 minuti al 60% (Fig. 123). Questo dato risulta interpretabile positivamente: infatti sebbene si riscontri una diminuzione della sensazione tannica, ciò deriva dal fatto che viene traslata verso una sensazione più gradevole. Il campione è stato valutato migliore rispetto agli altri anche dal punto di vista dell'armonia.

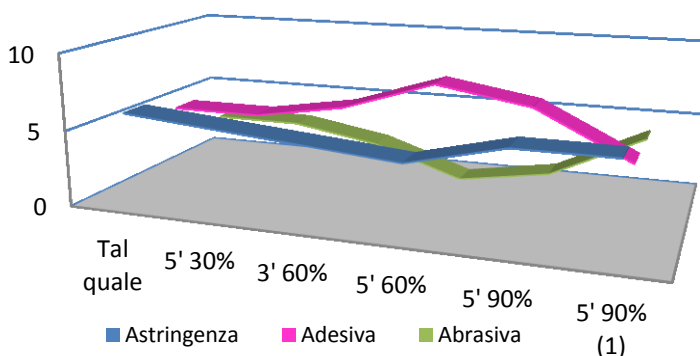


Figura 123: Astringenza globale, adesiva ed abrasiva valutata sui campioni di vino trattati con US nelle diverse condizioni di trattamento e sul campione di riferimento (Tal quale).

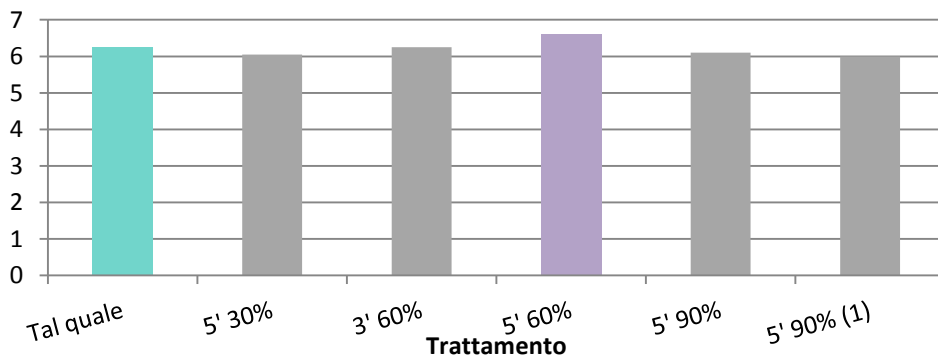


Figura 124: Giudizio complessivo attribuito dal panel ai vini oggetto dell'analisi sensoriale.

Globalmente, i giudici hanno attribuito il miglior punteggio al campione di vino sottoposto a trattamento con ultrasuoni per 5 minuti al 60% di amplitudine (Fig. 124).

3.3 CONCLUSIONI

È provato che l'immissione di energia meccanica e chimica all'interno di un mezzo quale il vino comporti dei cambiamenti. Come si è notato dalle prove della serie 1 e 2 e della serie 3, trattamenti ad ultrasuoni applicati a vini con caratteristiche chimico-analitiche diverse possono portare a risultati diversi.

Il fatto che, in conseguenza del trattamento, non vi siano state ricadute sulla componente colorante è certamente un risultato positivo ai fini della sperimentazione.

Dal punto di vista del profilo aromatico, i trattamenti hanno registrato una diminuzione dell'intensità; problema che potrebbe risolversi effettuando la sonicazione in atmosfera protetta da gas inerti e con controllo della temperatura. Inoltre, la comparsa di nuovi sentori, rispetto al testimone, può far presupporre la formazione o la ricombinazione delle molecole aromatiche, soprattutto relative ai sentori di vegetale.

I risultati più interessanti sono stati registrati relativamente ai composti tannici. Significativi anche i risultati dell'indice di etanolo che, aumentando, rafforza la tesi di un riarrangiamento dovuto probabilmente ad un incremento della reattività dei composti polisaccaridici presenti.

Anche dal punto di vista dell'astringenza, si è notato un cambiamento positivo verso una sensazione meno intensa.

Il trattamento ad ultrasuoni non prevedeva la presenza di un ambiente riducente, quindi non si possono escludere eventuali polimerizzazioni con ponte ossigeno di tipo ordinato.

Infine, l'analisi sensoriale sconsiglia il trattamento per prodotti destinati ad un consumo rapido: il campione trattato subito prima della degustazione ha dato i risultati peggiori rispetto agli altri campioni. Si consiglia pertanto di effettuare il trattamento con un periodo di riposo di almeno 3 - 5 giorni prima del consumo.

3.4 MATERIALI E METODI – INDAGINE SU SIMILVINO E VINO AGGIUNTI DI TANNINO

Dopo la prova preliminare presentata nel capitolo precedente, questa seconda parte si è proposta di valutare la possibile riduzione dei tempi di affinamento di un vino rosso, senza pregiudicare il colore e la qualità generale del prodotto, in seguito a trattamento con ultrasuoni.

Lo studio si articola in due parti: la prima prevede prove di trattamento su soluzioni similvino con tannino condensato di buccia e con tannino idrolizzabile di quercia; la seconda con l'obiettivo di confrontare gli effetti del trattamento su un vino tal quale, sullo stesso vino aggiunto di tannino condensato con, e senza, aggiunte di acetaldeide.

È stata, infine, effettuata l'analisi sensoriale allo scopo di valutare le eventuali modificazioni organolettiche apportate dal punto di vista organolettico.

L'attenzione è stata volta in particolar modo alla risposta della componente polifenolica al trattamento, in particolare su antociani e tannini, considerando l'elevata importanza che hanno nel determinare il colore, la stabilità ed il corpo dei vini.

3.4.1 Campioni e condizioni di trattamento

Per valutare al meglio l'impatto del trattamento solo sulle singole componenti della matrice fenolica dei vini si è scelto di effettuare delle prove sia su una soluzione similvino (5 g/L L(+)-tartarico (Carlo Erba, Milano, Italia), 12% v/v etanolo in acqua distillata, correzione del pH a 3,5 con NaOH 4N – Carlo Erba, Milano, Italia) contenente tannino condensato, sia una simile, ma contenente tannino idrolizzabile anziché condensato.

Sono state condotte 5 diverse prove:

✓ Prova 1: similvino + tannino idrolizzabile

Alla soluzione similvino è stato aggiunto tannino ellagico da legno di quercia (EverINTEC) in concentrazione di 2 g/L.

✓ Prova 2: similvino + tannino condensato

Alla soluzione similvino è stato aggiunto tannino commerciale con contenuto minimo in acido tannico da buccia d'uva del 65% (EverINTEC), in concentrazione di 2 g/L.

✓ Prova 3: vino + tannino condensato

Il campione è stato preparato miscelando vino e soluzione similvino in rapporto 3:1 in modo da avere una soluzione con circa 400 mg/L di antociani.

Per avere un elevato contenuto di antociani è stato utilizzato un vino rossissimo 2011, provenienza Veneto, con le seguenti caratteristiche chimico-analitiche:

Intensità colorante: 31

Tonalità: 0,57

Antociani: 666 mg/L

Indice di pigmenti polimerizzati: 74%

Tannini totali: 7,51 g/L

Catechine: 1384 mg/L

DO 280 nm: 112

Indice di gelatina: 107%

Indice di HCl: 28%

Al campione così preparato è stato aggiunto tannino condensato fino a raggiungere la concentrazione di 2 g/L.

✓ Prova 4: vino + tannino condensato + acetaldeide

Il campione è stato preparato come per la Prova 3 ed è stato successivamente addizionato di acetaldeide (Sigma Aldrich LLC, St.Louis, MO, USA) in concentrazione di 50 mg/L.

✓ Prova 5: vino Merlot

È stato utilizzato vino Merlot 2011 di provenienza Veneto (Pramaggiore, VE), prelevato direttamente dalla vasca e non stabilizzato.

Per ogni prova sono stati trattati 200 mL di campione, con sonda posizionata a 2 cm di distanza dal fondo del becker. I trattamenti sono stati effettuati al 90% di amplitudine per un tempo di 1, 3 e 5 minuti.

Per ogni trattamento sono state effettuate tre repliche.

Al termine di ogni trattamento è stata rilevata la temperatura massima raggiunta tramite una termosonda digitale.

3.4.2 Determinazioni analitiche

Le metodiche di analisi sono già state presentate nel corso delle sezioni trattate precedentemente.

In tabella (Tab.37) viene riassunto il piano sperimentale delle prove svolte, e le analisi effettuate per ogni campione.

	Soluzione modello + tannino idrolizzabile				Soluzione modello + tannino condensato				Vino + tannino condensato				Vino + tannino condensato + acetaldeide				Vino			
	C		minuti		C		minuti		C		minuti		C		minuti		C		minuti	
	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5
Torbidità	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓												
Ø particelle	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓												
ABS 280	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Intensità colorante									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Tonalità									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Purezza del colore rosso									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Catechine	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Tannini totali					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Gelatina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Antociani									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Indice Pigmenti Polimerizzati									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Indice Acido Cloridrico									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Analisi sensoriale																	✓	✓	✓	✓

Tabella 37: Piano sperimentale delle prove e analisi svolte (C indica il campione non trattato).

3.4.3 Analisi sensoriale

Il vino Merlot della Prova 5 è stato fatto degustare ad un panel di 10 giudici. La scheda utilizzata, riportata di seguito (Tab. 25), presenta pochi descrittori scelti con l'intento di portare l'attenzione dei giudici verso i parametri direttamente coinvolti con la tecnologia in oggetto.

ANALISI SENSORIALE													
ASSAGGIATORE													
CAMPIONE													
VISTA			GIUDIZIO										
Intensità colore			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Limpidezza			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
												Eventuali note _____ _____ _____	
OLFATTO			GIUDIZIO										
Intensità			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
												Eventuali note _____ _____ _____	
GUSTO			GIUDIZIO										
Astringenza			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Morbidezza			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Amaro			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Persistenza olfatto			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
												Eventuali note _____ _____ _____	

Tabella 27: Scheda analisi sensoriale.

3.4.4 Analisi statistica

Per tutte le prove, i risultati sono stati sottoposti all'Analisi della Varianza (ANOVA), mediante il modulo di base STATISTICA per Windows, versione 7.0, al fine di stabilire eventuali differenze significative.

3.5 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.5.1 Soluzione similvino aggiunta di tannino idrolizzabile

Per verificare che i campioni non abbiano subito un eccessivo riscaldamento è stata rilevata la temperatura dopo ogni trattamento.

Per la prova di 1 minuto è stata registrata la temperatura di 26° C; 29° C per quella di 3 minuti e 36,5° C per quella di 5 minuti.

Il modesto innalzamento è funzione della durata del trattamento di sonicazione ed è dovuto alla cavitazione indotta dagli ultrasuoni; anche in questo caso i valori non sono tali da compromettere la qualità organolettica del prodotto finale.

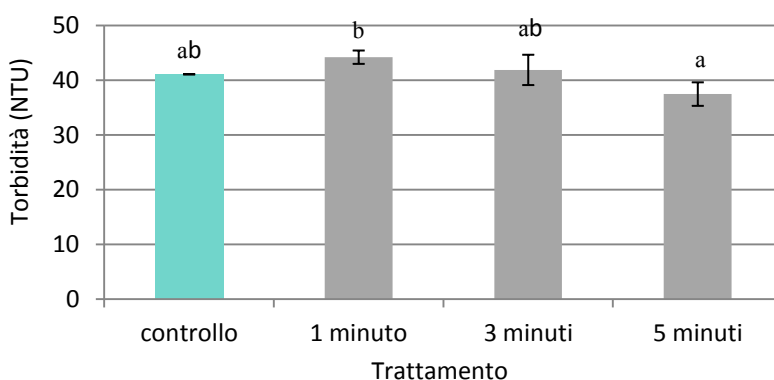


Figura 125: Andamento della torbidità in funzione della durata del trattamento e rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Dal grafico (Fig. 125) si notano differenze significative fra il campione trattato 1 minuto e quello trattato 5 minuti, mentre non vi sono differenze tra il controllo ed il trattamento di 3 minuti.

Il trattamento ha comportato, rispetto al controllo, un aumento della torbidità nelle tesi di 1 e 3 minuti, mentre in quella di 5 minuti una riduzione della stessa.

La torbidità è influenzata principalmente dal numero di particelle in sospensione piuttosto che dalla loro dimensione; è probabile quindi, che vi sia stata una effettiva rottura delle molecole tanniche, con conseguente creazione di nuovi polimeri di dimensioni diverse.

Nonostante siano state riscontrate differenze significative tra i campioni sottoposti a trattamento, la variazione assoluta della torbidità non risulta così marcata.

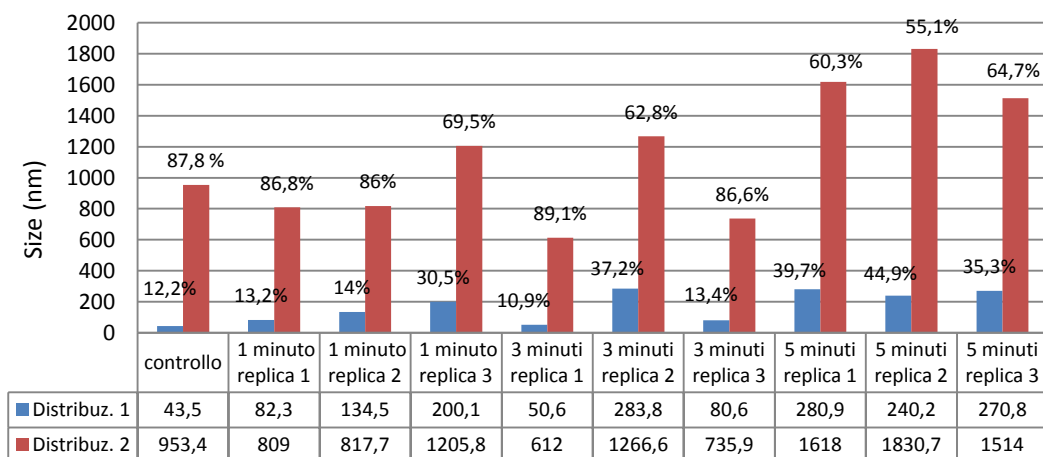


Figura 126: Distribuzione dei diametri medi delle particelle presenti nei campioni sottoposti a trattamento ad US e nel campione di riferimento (controllo).

La misura del diametro medio delle particelle in dispersione nei campioni oggetto della prova (Fig. 126) ha rilevato almeno due principali distribuzioni, ciascuna espressa in percentuale rispetto al numero delle particelle totali.

Il trattamento ha comportato modificazioni per entrambi i parametri considerati, ovvero la ripartizione percentuale delle distribuzioni, ed i diametri medi delle stesse.

Nelle prove a 1 e 3 minuti, nonostante vi sia una certa variabilità tra le repliche, si nota un leggero aumento sia in termini percentuali sia nel diametro medio della distribuzione 1, mentre vi è una riduzione degli stessi parametri nella distribuzione 2.

Nella prova a 5 minuti, caratterizzata da una maggiore omogeneità tra le repliche, vi è un notevole aumento dei diametri medi di entrambe le distribuzioni, mentre la differenza di ripartizione percentuale si riduce.

Questi risultati sono compatibili con i dati di torbidità rilevati: è plausibile, infatti, che nei campioni a 5 minuti vi sia una riduzione del numero di particelle totali, dovuto ad una maggior polimerizzazione delle stesse.

Per quanto riguarda l'indice di polifenoli totali (DO 280 nm), in tutti i campioni trattati viene riscontrata una riduzione significativa (Fig. 127). Non si riscontrano differenze tra le tesi trattate, dipendenti dal fattore tempo. Tale riduzione potrebbe ipotizzare una degradazione ossidativa dei tannini (De Freitas, 1995) con rottura dell'anello benzenico, o un riarrangiamento delle molecole polifenoliche tali da avere un massimo di assorbimento discostato da quello riscontrato nel controllo. Nei campioni non è stata riscontrato alcun tipo di precipitazione.

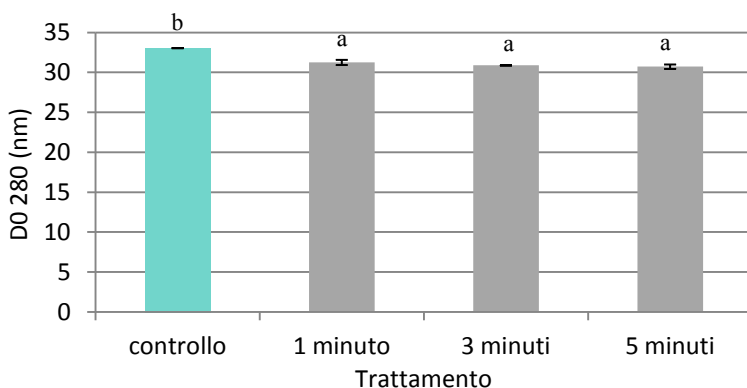


Figura 127: Variazioni dell'Indice di polifenoli totali in funzione del tempo di trattamento e rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

I valori delle catechine riportati in grafico (Fig. 128) fanno notare un aumento del loro valore in funzione del tempo di trattamento, anche se non vengono evidenziate differenze significative.

L'aumento di tali valori, in linea con gli altri risultati analitici, potrebbe far supporre una rottura delle molecole tanniche con conseguente liberazione di catechine monomere ed una loro probabile polimerizzazione.

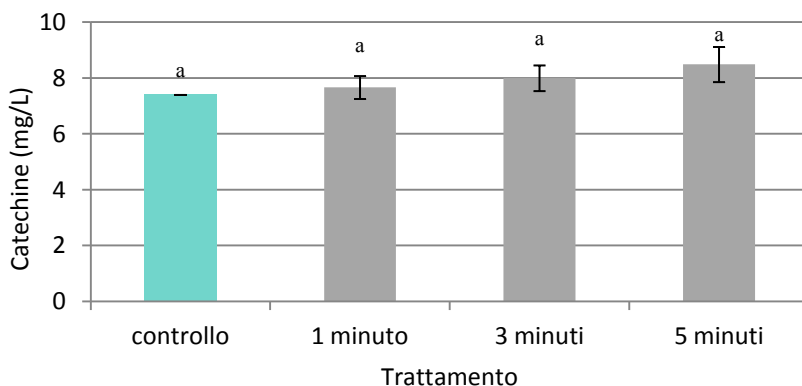


Figura 128: Andamento del contenuto in catechine (mg/L) in funzione del tempo di trattamento e rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

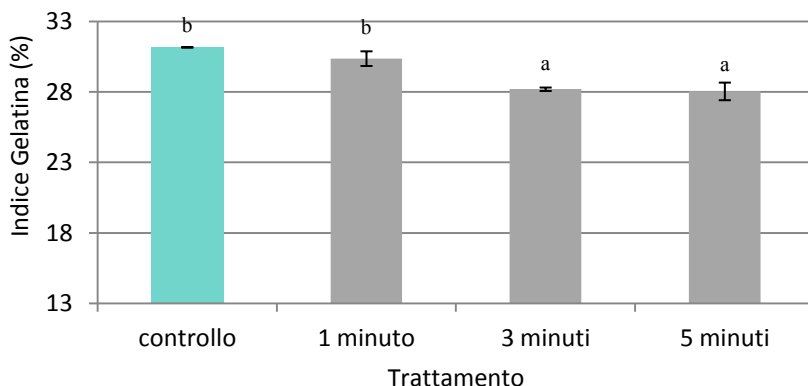


Figura 129: Andamento dell'indice di gelatina (%) in funzione del tempo di trattamento e rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'indice di gelatina presenta una differenza significativa tra i trattamenti di 3 e 5 minuti, e il controllo, ed il trattamento di 1 minuto. Dal grafico (Fig. 129) si può notare come tutti i campioni trattati presentino un indice di gelatina inferiore al riferimento. La reattività dei tannini nei confronti delle proteine cresce all'aumentare della dimensione dei tannini (Lea, 1992) fino al raggiungimento di un massimo, associato a polimeri formati da 8-10 unità. La polimerizzazione mediata, e la combinazione con antociani, polisaccaridi neutri e proteine, invece, ne riducono la reattività (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998b).

Trattandosi di una soluzione modello, la riduzione dell'indice è probabilmente legata ad una riduzione del grado di polimerizzazione delle molecole tanniche, ma non è da escludere la polimerizzazione mediata da acetaldeide formatasi dall'ossidazione dell'etanolo, dato che i valori del diametro medio delle particelle non forniscono indicazioni precise. Inoltre non si dispone del valore dei tannini totali poiché l'analisi proposta da Bate-Smith mal si adatta alla misura dei tannini idrolizzabili.

Anche in questo caso, pur essendoci una differenza statistica rilevabile, da un punto di vista pratico le variazioni non sono importanti.

In conclusione l'analisi statistica ha permesso di evidenziare le differenze nei campioni trattati rispetto al controllo per la maggior parte dei parametri valutati, ma le variazioni assolute ottenute non sono tali da suscitare interesse ai fini pratici, nonostante la semplicità della matrice similvino.

3.5.2 Soluzione similvino aggiunta di tannino condensato

La temperatura massima rilevata nei campioni dopo trattamento è stata di 23 °C per la prova di 1 minuto, 26,5 °C per quella di 3 minuti, e 33,5 °C per quella di 5 minuti. Come

riscontrato nella prova precedente, la temperatura aumenta all'aumentare del tempo di trattamento, senza però raggiungere valori troppo elevati che possano portare ad effetti indesiderati e non dipendenti dal trattamento.

In seguito al trattamento, sono stati registrati valori di torbidità più elevati e statisticamente diversi rispetto al controllo. Tra i campioni sottoposti a trattamento, non si notano invece differenze. È probabile che il trattamento ad ultrasuoni abbia comportato un aumento del numero delle particelle in sospensione. Tale aumento di torbidità si discosta dal comportamento evidenziato con il tannino idrolizzabile, ma anche in questo caso la variazione assoluta non è rilevante (Fig. 130).

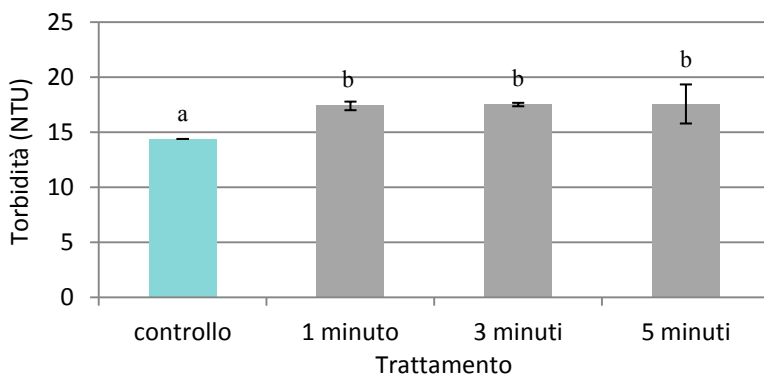


Figura 130: Andamento della torbidità in funzione della tempo di trattamento e rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

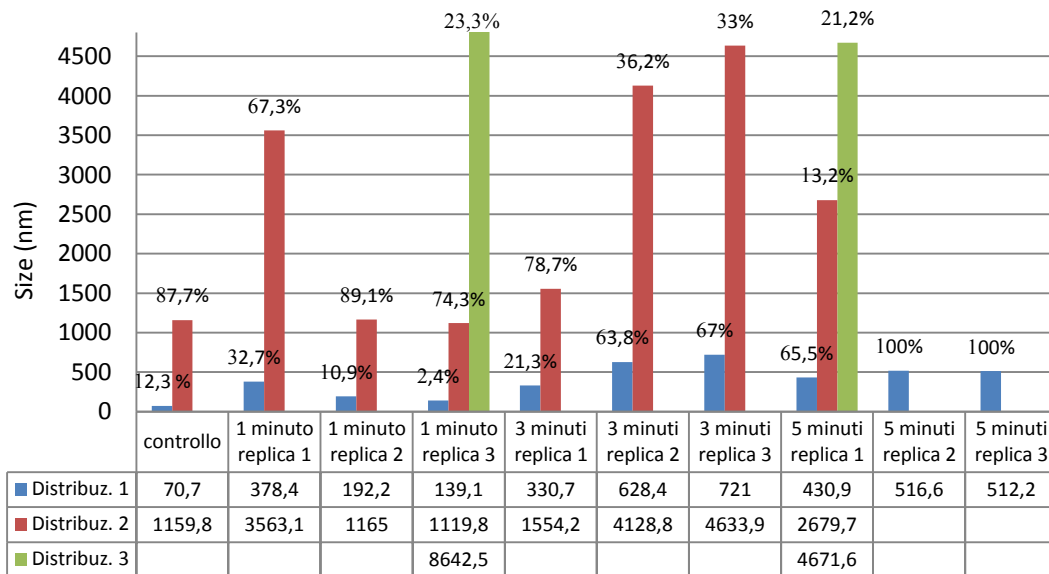


Figura 131: Distribuzione dei diametri medi delle particelle presenti nei campioni sottoposti a trattamento ad US e nel campione di riferimento (controllo).

Dai valori del diametro medio delle particelle in dispersione (Fig. 131), per ogni campione sono state rilevate almeno due distribuzioni principali. Il trattamento ha comportato variazioni sia del diametro che della percentuale di ripartizione e, in un paio di campioni, anche del numero totale delle distribuzioni individuate.

In tutti i campioni vi è un aumento del diametro medio della distribuzione 1, associato ad un aumento generale della percentuale di ripartizione; anche il diametro medio della distribuzione 2 aumenta, mentre la percentuale relativa diminuisce. Riassumendo, in seguito al trattamento, è stato riscontrato un aumento dei diametri medi di tutte le distribuzioni; in particolare è aumentato il numero degli agglomerati di piccole dimensioni, mentre è diminuito quello degli aggregati di grosse dimensioni.

Per quanto riguarda l'indice di polifenoli totali (DO 280 nm), l'analisi statistica ha confermato che non vi sono differenze significative tra il campione di riferimento ed i campioni trattati con ultrasuoni (Fig. 133). Diversamente dalla Prova 1, quindi, il trattamento non ha influito su questo indice, nonostante le analisi di torbidità ed il diametro medio delle particelle indichino che vi sono state delle modificazioni a carico delle frazioni tanniche.

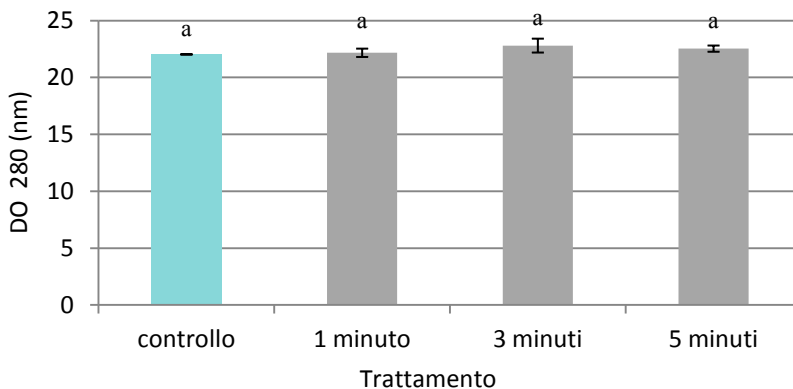


Figura 132: Variazioni dell'Indice di polifenoli totali in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Dall'analisi dei tannini totali non sono state riscontrate variazioni significative tra il campione di riferimento ed i campioni trattati (Fig. 133). Inoltre l'analisi, comportando la rottura dei legami dei polimeri tannici in ambiente ossidante, non tiene conto delle modificazioni strutturali che potrebbero aver subito i diversi tannini.

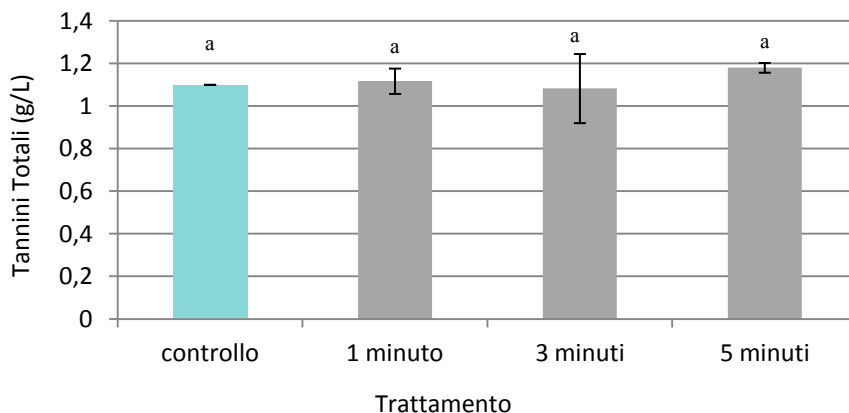


Figura 133: Andamento del contenuto in tannini totali (g/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Neanche per quanto riguarda il contenuto in catechine non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni trattati ed il riferimento (Fig. 134); confrontando questi dati con i risultati delle altre analisi effettuate si può ipotizzare la rottura dei legami idrofobici a carico delle aggregazioni colloidali dei tannini, ma non vi sono indicazioni evidenti di una effettiva rottura dei legami covalenti interflavanici che caratterizzano i tannini condensati.

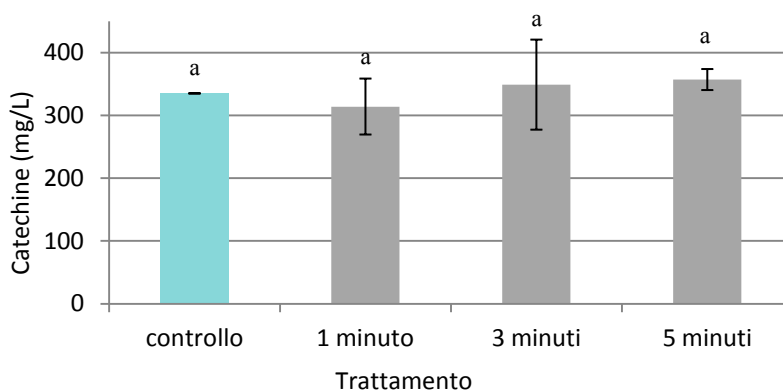


Figura 134: Andamento del contenuto di catechine (mg/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

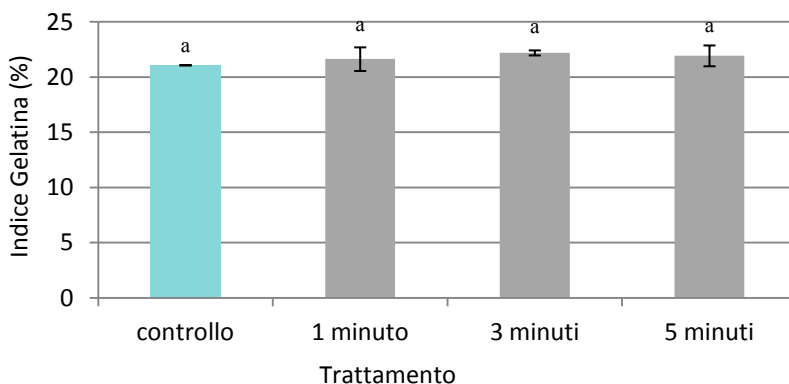


Figura 135: Andamento dell'indice di gelatina (%) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

A differenza della Prova 1, l'indice di gelatina non rivela variazioni apprezzabili tra i campioni sottoposti a trattamento e il campione di riferimento (Fig. 135). Si può pensare che la reattività dei tannini nei confronti dei polimeri proteici non sia stata modificata. Questo dato è in linea con quelli dei tannini totali e delle catechine.

In conclusione, in questa prova l'unica analisi ad aver evidenziato una variazione statisticamente rilevante è quella effettuata sulla torbidità. L'effetto della sonicazione è stato più evidente nella soluzione con tannini idrolizzabili rispetto a quella con tannini condensati.

In termini pratici il trattamento non ha fornito differenze significative in alcuna prova.

Gli ultrasuoni in soluzione acquosa generano radicali liberi (Henglein, 1993). Entrambi i tipi di tannino hanno la peculiarità di bloccare i radicali liberi, ma i tannini condensati sono più antiossidanti (Vlietinck *et al.*, 1997).

L'elevata capacità di catturare i radicali liberi dei tannini condensati rispetto agli idrolizzabili potrebbe quindi spiegare la maggiore inerzia al trattamento.

3.5.3 Vino aggiunto di tannino condensato

La temperatura misurata sui campioni subito dopo trattamento è risultata in linea con quella rilevata nelle soluzioni modello trattate (24,5 °C per la prova ad 1 minuto, 29,5 °C per quella a 3 minuti e 37 °C per quella a 5 minuti).

Di seguito vengono presentati i risultati relativi all'evoluzione del colore (Fig. 136):

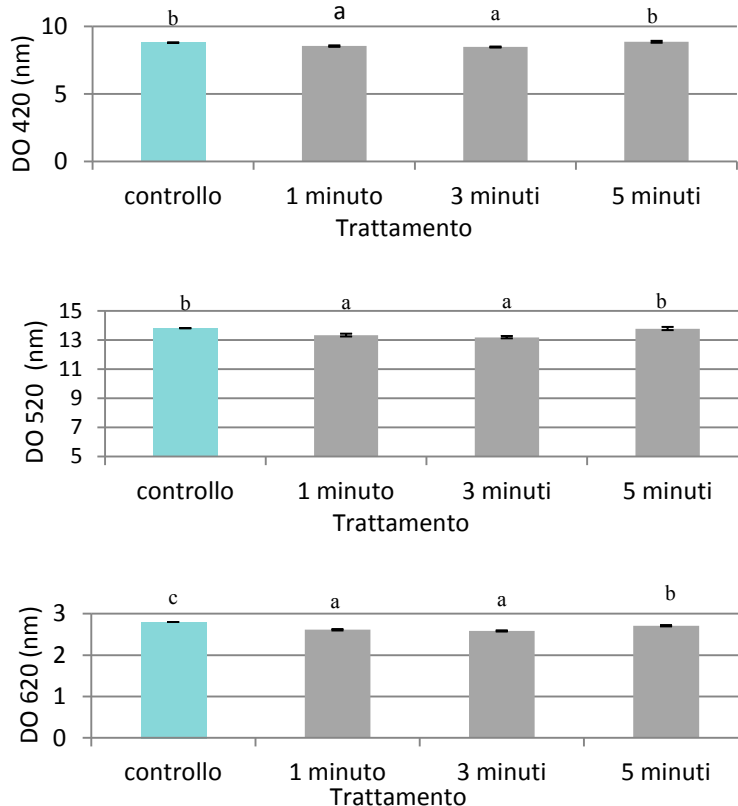


Figura 136: Variazione delle densità ottiche (420, 520, 620 nm) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'analisi statistica ha evidenziato differenze tra le tesi trattate ed il controllo, mostrando un comportamento comune per tutte le densità ottiche.

In particolare l'andamento della densità ottica a 520 nm rivela una riduzione del contenuto in antociani sotto forma di catione flavilio (antociani liberi e legati a tannini) nelle tesi a 1 e 3 minuti.

La densità ottica a 620 nm presenta le differenze più marcate sia tra le tesi trattate sia rispetto al controllo.

Questi dati risultano in linea con quelli ottenuti dall'analisi degli antociani decolorabili.

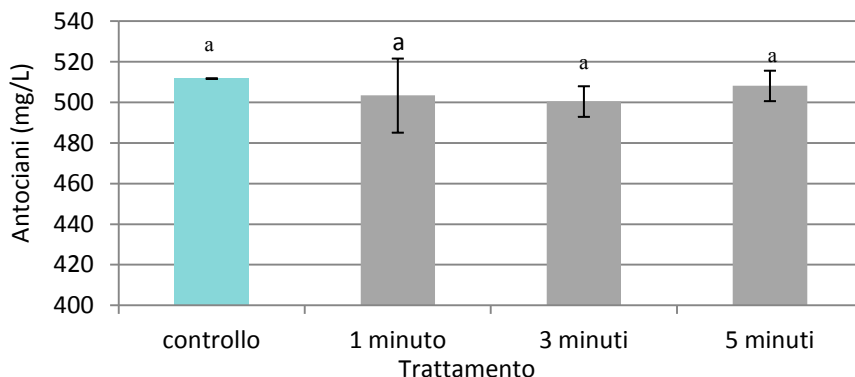


Figura 137: Variazione del contenuto in antociani (mg/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Dal grafico (Fig. 137) si può notare che il contenuto in antociani ha un andamento simile a quello delle densità ottiche, anche se l'analisi statistica non attribuisce differenze significative. Tutte le tesi trattate, infatti, presentano un contenuto in antociani inferiore rispetto al campione di riferimento. Questa diminuzione è probabilmente dovuta ad una degradazione ossidativa delle molecole coloranti.

Ai fini pratici questi cali non hanno un effetto negativo sul colore del vino, come evidenziato dagli indici di intensità colorante, tinta, e purezza del colore rosso (Fig. 138).

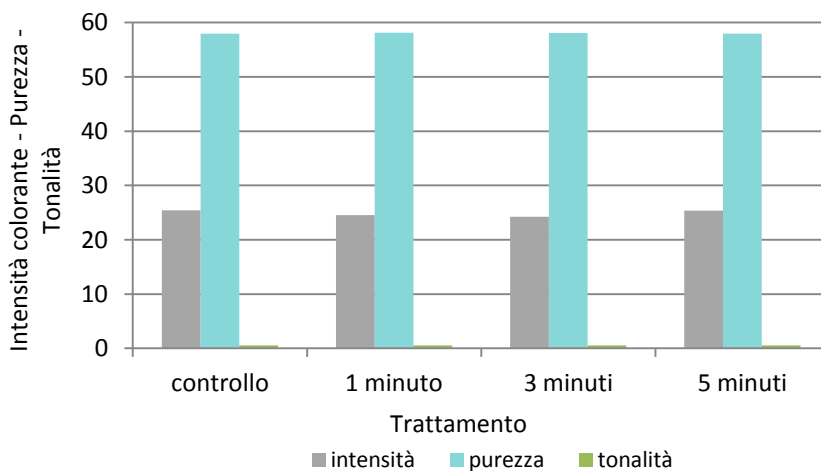


Figura 138: Variazione di intensità colorante, tinta e purezza del colore rosso in funzione del tempo di trattamento dei campioni trattati con US e del campione di riferimento (controllo).

In particolare, l'intensità colorante e la tonalità non variano, mentre la purezza del colore rosso aumenta leggermente.

È quindi probabile che, unitamente ad una degradazione degli antociani, vi sia stata anche una condensazione degli stessi con i tannini, con la formazione di complessi che contribuiscono alla stabilizzazione del colore.

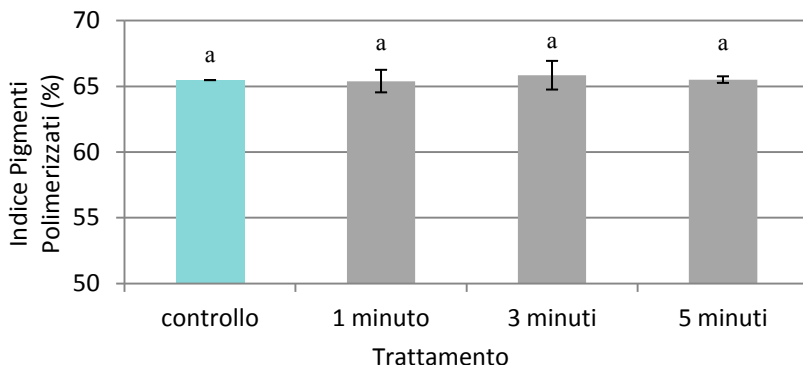


Figura 139: Andamento dell'Indice dei pigmenti polimerizzati (%) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'indice dei pigmenti polimerizzati permette di valutare le associazioni tannini-antociani. Dall'analisi statistica dei risultati non sono emerse differenze significative come per l'andamento degli antociani, ma, come si può vedere dal grafico (Fig. 139), risulta un leggero aumento delle tesi a 3 e 5 minuti rispetto al controllo.

Relativamente ai parametri monitorati per valutare l'evoluzione dei polifenoli, la DO 280 nm, non ha riscontrato differenze significative dal punto di vista statistico tra il controllo e le tesi trattate, mentre la tesi a 1 minuto è risultata significativamente diversa da quella a 3 e a 5 minuti (Fig. 140), seppur le differenze appaiano minime.

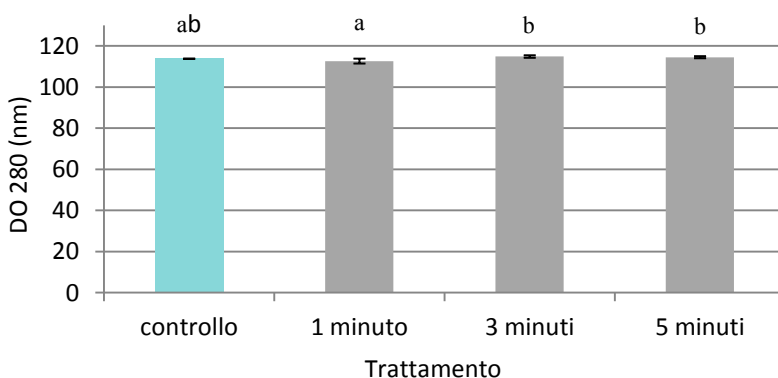


Figura 140: Variazione dell'Indice di polifenoli totali (DO 280 nm) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Pertanto, in seguito al trattamento ad ultrasuoni, non sono state riscontrate modificazioni significative del contenuto dei polifenoli totali.

I valori registrati, se confrontati con quelli riscontrati normalmente nei vini, sono elevati a causa del particolare tipo di vino utilizzato nella prova, il rossissimo è per natura ricco di antociani e tannini, e per l'aggiunta del tannino.

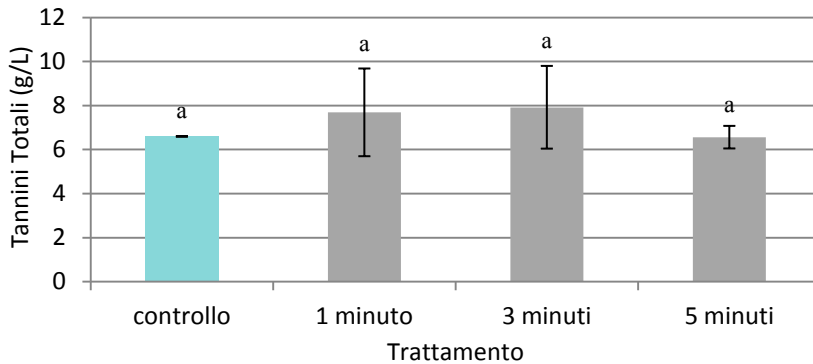


Figura 141: Andamento del contenuto in tannini totali (g/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'andamento dei tannini totali (Fig. 141) non ha riportato variazioni statisticamente significative, ma si può comunque notare come nelle tesi di 1 e 3 minuti vi sia un aumento del valore rispetto al campione. Ciò può essere dovuto alla formazione di nuove molecole di tannini generate dall'unione di più catechine; l'analisi dei tannini totali, infatti, è in grado di rilevarne solo i polimeri, non i monomeri (reazione di Bate-Smith).

Si può supporre che tale spinta alla polimerizzazione sia stata indotta dalla sonicazione probabilmente a causa della formazione di carbocationi, o direttamente di radicali liberi reattivi con le catechine; considerazione che, in parte, viene supportata dai dati ottenuti sulle catechine (Fig. 142).

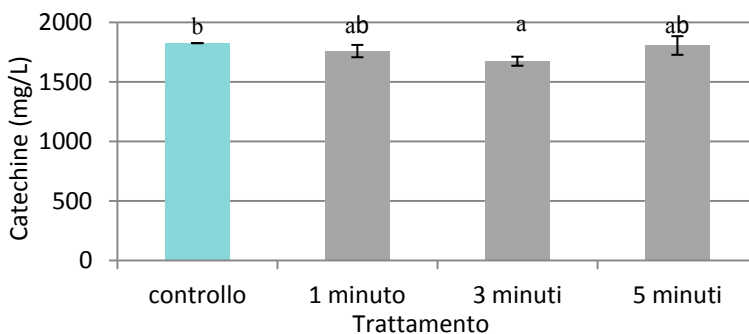


Figura 142: Andamento del contenuto in catechine (mg/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Come risulta dal grafico (Fig. 142) si nota un calo generale del contenuto in catechine, con differenze significative tra la tesi a 3 minuti ed il controllo. Si può individuare, quindi, un'analogia tra i due grafici: nelle tesi in cui vi è un aumento di tannini corrisponde un calo di catechine.

L'indice di HCl sfrutta l'instabilità delle procianidine in ambiente fortemente acido; la velocità di precipitazione è funzione del grado di polimerizzazione. Dall'analisi statistica non vengono evidenziate differenze significative, ma ciò dipende dall'elevata variabilità riscontrata tra le repliche delle tesi a 1 e 3 minuti (Fig. 143).

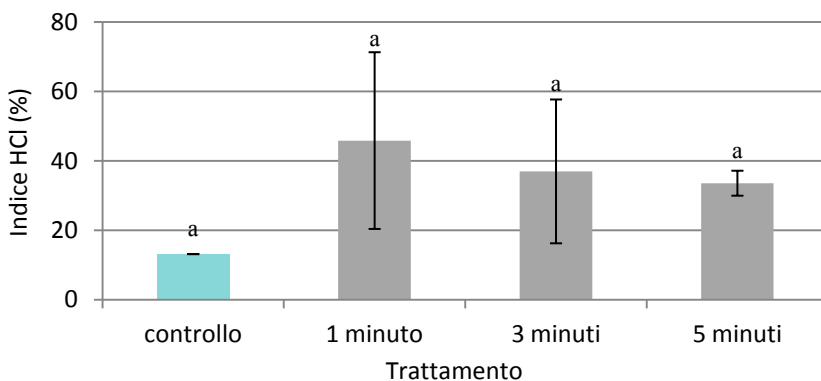


Figura 143: Andamento dell'Indice di HCl in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$

Ciononostante, osservando i valori medi, è necessario apprezzare il forte aumento dell'indice di HCl delle tesi trattate rispetto al controllo; questa tendenza è dovuta alla forte reattività delle molecole tanniche che ha portato ad una polimerizzazione spinta. Tale reattività deriva, probabilmente, dalla formazione di carbocationi e radicali liberi indotta dal trattamento. Non è chiaro quale tipo di polimerizzazione prevalga.

È possibile, inoltre, ipotizzare la formazione di una piccola quantità di acetaldeide a partire dall'etanolo che favorisce una condensazione mediata e contribuisce così all'aumento della dimensione dei polimeri tannici.

Analizzando i dati sui pigmenti polimerizzati (Fig. 139), è ipotizzabile che la polimerizzazione abbia interessato solo minimamente gli antociani, ma non è quantificabile il ruolo svolto dai polisaccaridi presenti nel vino.

Una considerazione sulle differenze tra le varie tesi trattate non risulta attendibile per l'elevata variabilità riscontrata tra le repliche.

Il campione di riferimento presenta un valore dell'indice di HCl particolarmente basso, analogo a quello riscontrabile in vini giovani con una struttura tannica ancora acerba; tale elemento è riconducibile all'aggiunta del tannino condensato. I valori dell'indice di HCl delle tesi trattate sono paragonabili a quelli di un vino già affinato.

L'aumento di questo indice in seguito al trattamento è sicuramente favorevole alla qualità del vino, soprattutto in vini giovani e poco strutturati.

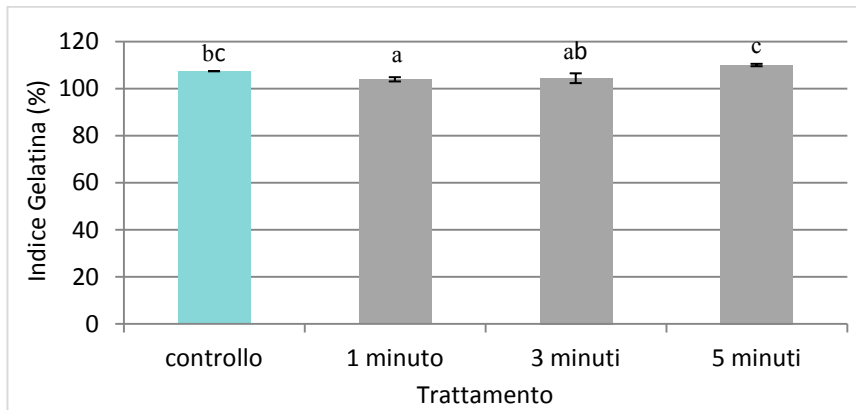


Figura 144: Andamento dell'Indice di gelatina (%) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'analisi statistica relativa all'indice di gelatina (Fig. 144) ha evidenziato una variazione significativa tra la tesi a 5 minuti e le tesi a 1 e 3 minuti, e tra il controllo e la tesi a 1 minuto. Queste differenze risultano tuttavia poco importanti ai fini pratici.

Un indice di gelatina così elevato è giustificato dall'elevata presenza di tannini, caratteristica del vino utilizzato.

Le analisi finora descritte indicano, nel complesso, una tendenza alla polimerizzazione del sistema tannico, mentre l'indice di gelatina esprime una ridotta o comunque non aumentata reattività verso le proteine.

Questa scarsa variabilità può indicare che, unitamente ad una polimerizzazione delle procianidine, i tannini si siano legati ai polisaccaridi presenti nel vino e quindi risultino voluminosi, ma meno reattivi nei confronti delle proteine. È possibile, inoltre, che vi sia stata la formazione di una piccola quantità di acetaldeide a partire dall'etanolo, e che questa abbia portato all'accrescimento di polimeri voluminosi e poco reattivi.

In conclusione il trattamento con ultrasuoni non ha modificato in modo apprezzabile il colore del vino, mentre sembra aver indotto una polimerizzazione a carico dei tannini provocando variazioni dell'indice di HCl. Queste effetti sono molto favorevoli alla

qualità, soprattutto per i vini giovani, in cui il colore è uno tra i più importanti fattori di pregio.

Un'evoluzione così rapida della struttura tannica potrebbe inoltre consentire una precoce messa in commercio, ed un abbattimento dei costi di cantina, riducendovi il tempo di sosta in cantina dei vini, a seguito di un affinamento accelerato.

3.5.4 Vino aggiunto di tannino condensato ed acetaldeide

La temperatura misurata è stata di 25 °C per la prova ad 1 minuto, 33,5 °C per quella a 3 minuti e 39,5 °C per quella a 5 minuti.

Relativamente ai parametri che monitorano l'evoluzione del colore, non sono state riscontrate grosse variazioni delle densità ottiche misurate a 420, 520 e 620 nm per le tesi trattate, rispetto al campione di riferimento, ma il valore del campione a 5 minuti si discosta dagli altri in modo statisticamente significativo (Fig. 145).

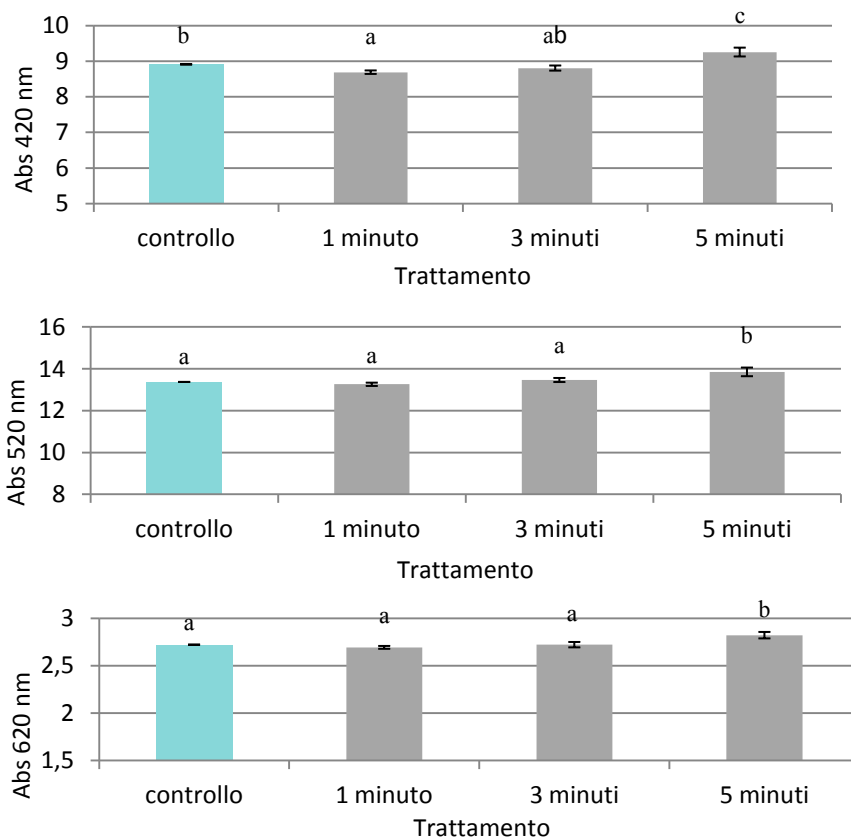


Figura 145: Variazione delle densità ottiche (420, 520, 620 nm) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'andamento delle densità ottiche rispecchia quello dell'intensità colorante. Come si può notare, il trattamento ad ultrasuoni non porta a modifiche apprezzabili per alcuno dei tre parametri (Fig. 145), e confrontando questi valori con quelli determinati per la Prova 3, sembra che l'acetaldeide aggiunta non abbia un'influenza diretta sul colore (Fig. 146). Per entrambe le prove l'andamento delle densità ottiche resta invariato.

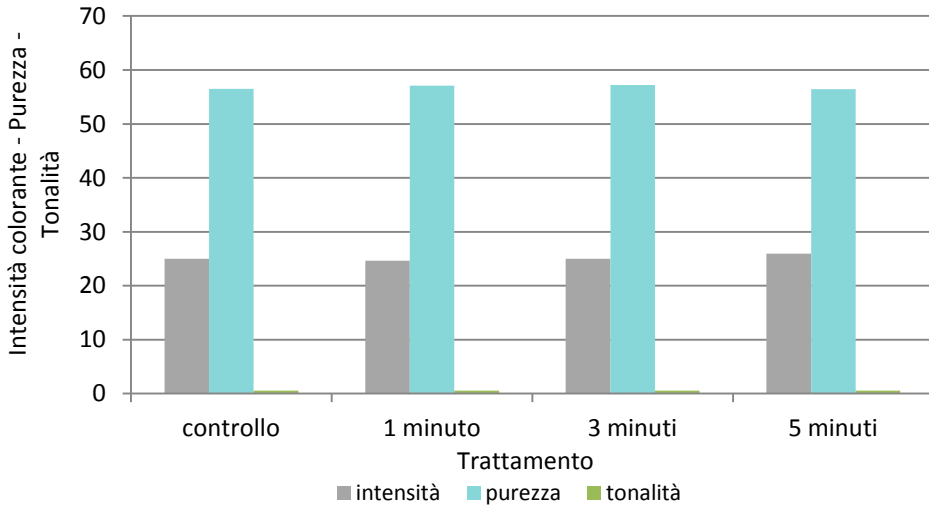


Figura 146: Variazione di intensità colorante, tinta e purezza del colore rosso in funzione del tempo di trattamento dei campioni trattati con US e del campione di riferimento (controllo).

Per quanto riguarda il contenuto in antociani, le tesi a 1 e 3 minuti hanno delle differenze significative rispetto a quella a 5 minuti ed al campione di riferimento (Fig. 147).

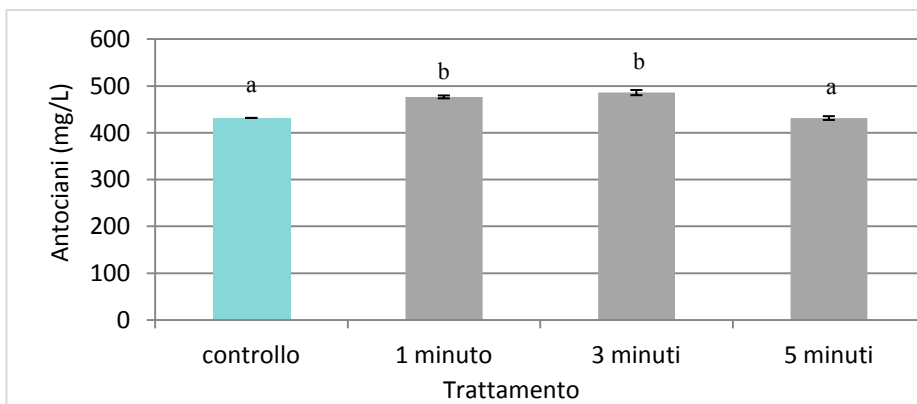


Figura 147: Variazione del contenuto in antociani (mg/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

L'aumento del contenuto in antociani è importante, ma non sembra avere influenza sugli indici relativi al colore (Fig. 146).

Dalla valutazione dell'indice dei pigmenti polimerizzati (Fig. 148) è stato riscontrato un lieve aumento nelle tesi trattate per 1 e 3 minuti, che, nella Fig. 147 risultano essere quelle con il maggior contenuto in antociani. Tali differenze però non emergono dall'analisi statistica.

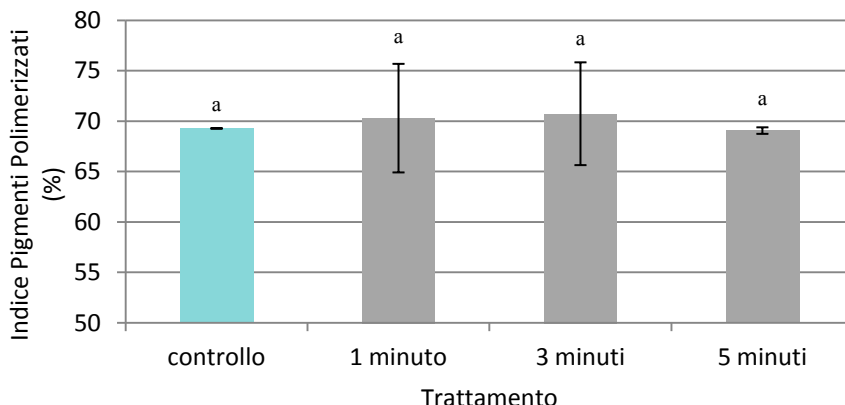


Figura 148: Andamento dell'indice dei pigmenti polimerizzati (%) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Confrontando i grafici dell'indice di pigmenti polimerizzati della Prova 3 (Fig. 139) e della Prova 4 (Fig. 148), è possibile osservare un lieve aumento generalizzato di tale indice nelle tesi aggiunte di acetaldeide: è probabile quindi che quest'ultima svolga un ruolo attivo nella stabilizzazione degli antociani con i tannini.

Va ricordato che non vi è differenza tra le tesi della Prova 3 e quelle della Prova 4 relativamente ad intensità colorante, tonalità e purezza del colore rosso.

Di seguito verranno presentati i risultati relativi all'evoluzione dei polifenoli ed i potenziali effetti sull'astringenza e sulla morbidezza del vino.

L'indice di polifenoli totali (Fig. 149) non fa riscontrare differenze statisticamente significative tra il campione di riferimento e le tesi sottoposte a trattamento. Come per la Prova 3, ciò sta ad indicare che il trattamento non abbia comportato modifiche rilevanti al contenuto in polifenoli totali.

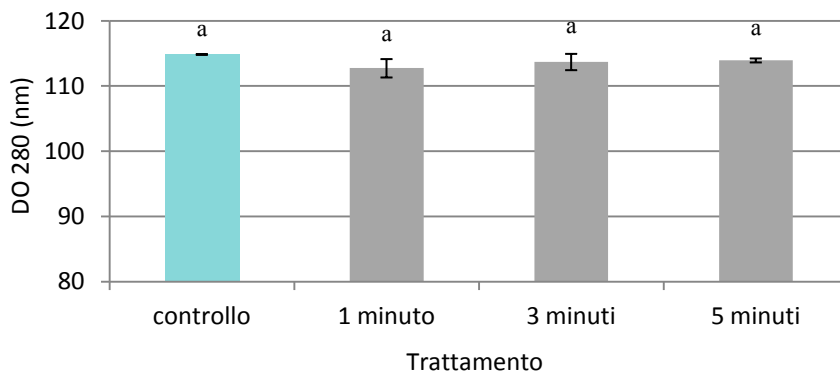


Figura 149: Variazioni dell'indice di polifenoli totali in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Anche il contenuto di tannini totali non presenta differenze statisticamente significative, soprattutto per l'elevata variabilità tra le repliche della tesi a 1 minuto. Dal grafico (Fig. 150) si può notare comunque un calo dei valori nelle tesi a 1 e 3 minuti.

Se questo fosse dovuto solamente ad una degradazione ossidativa (De Freitas, 1995), si riscontrerebbe un calo massimo nella tesi a 5 minuti. È probabile, quindi, che il motivo di questo calo sia da ricercare nel metodo analitico.

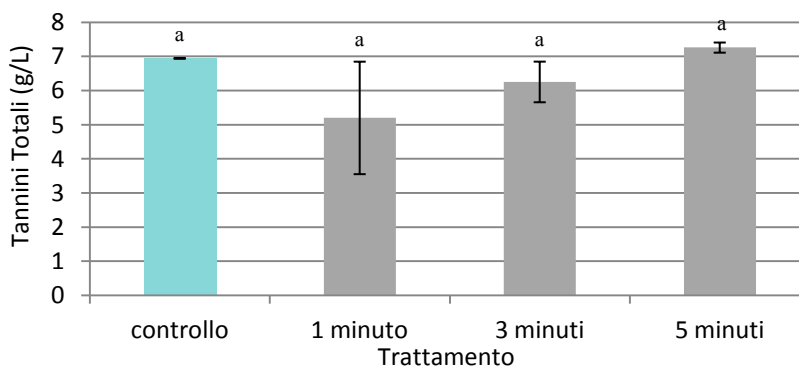


Figura 150: Andamento del contenuto in tannini totali (g/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento. Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

La formazione di carbocationi, che avviene durante l'invecchiamento in bottiglia, e che causa la rottura dei polimeri presenti al momento dell'imbottigliamento, ha una cinetica diversa a seconda delle caratteristiche delle molecole dei tannini.

Le proantocianidine polimerizzate reagiscono più lentamente delle proantocianidine oligomere, e le proantocianidine associate attraverso ponti etile ancor più lentamente (Guerra, 1997).

Questo fenomeno influisce sulla determinazione dei tannini per trasformazione in antociani a caldo ed in ambiente acido (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b). In questo modo è possibile che i tempi previsti per l'analisi non siano sufficienti per dar modo a tutti i tannini di decomporsi. In nessun campione risultano evidenti precipitazioni.

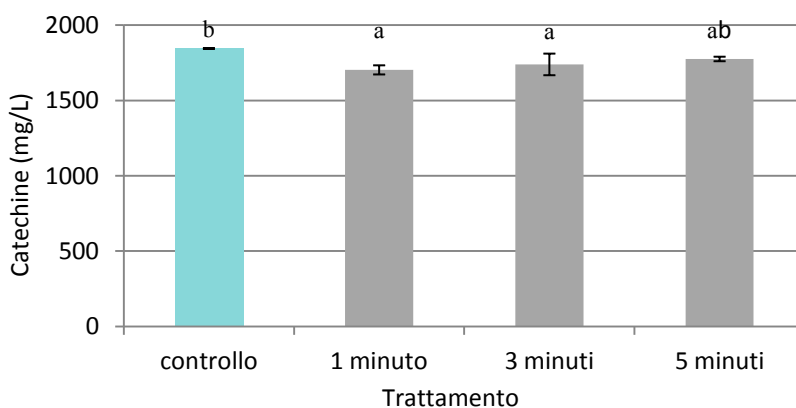


Figura 151: Andamento del contenuto in catechine (mg/L) in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Per quanto riguarda il contenuto in catechine, il grafico (Fig. 151) mostra un calo generale dei valori per tutte le tesi trattate, con differenze statisticamente significative tra tesi a 1 e 3 minuti, rispetto al controllo.

Questa diminuzione, più importante nella tesi a 1 minuto, potrebbe indicare una condensazione delle catechine monomere in polimeri, come riscontrato nella Prova 3.

Il progressivo aumento del contenuto in catechine in funzione del tempo di trattamento, seppur non rilevante da un punto di vista statistico, suggerisce anche un'azione di rottura dei tannini già presenti o neoformati. Il sistema tannico sottoposto ad ultrasuoni risulta, quindi, dinamico: la scissione operata dagli ultrasuoni potrebbe essere controbilanciata dalla capacità del sistema nel riorganizzare nuovi polimeri.

La risposta dell'indice di HCl mostra ad un innalzamento considerevole della% nelle tesi a 1 e 3 minuti, e un leggero calo nella tesi a 5 minuti (Fig. 15).

Il campione di riferimento presenta un valore elevato rispetto a quello della Prova 3 (Fig. 143), ciò quindi potrebbe essere imputabile al ruolo svolto dall'acetaldeide.

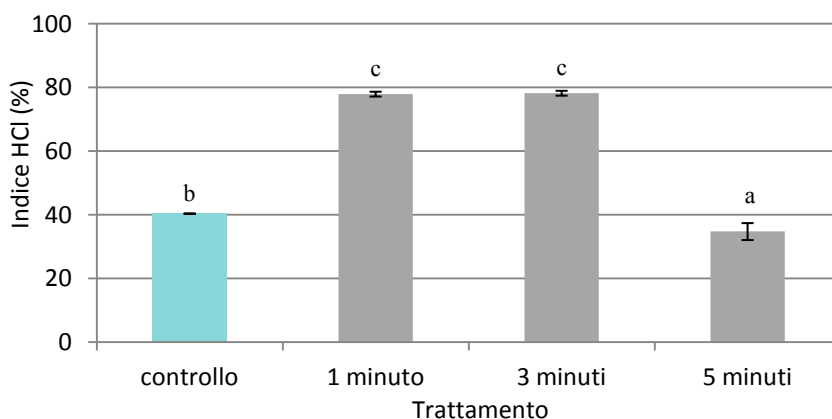


Figura 152: Andamento dell'Indice di HCl in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Nel corso dell'affinamento dei vini, in presenza di una blanda ossidazione, l'acetaldeide è originata per ossidazione dell'etanolo in seguito alla catalisi di ioni metallici (Glories, 1974), o all'intervento di perossidi originati dall'ossidazione dei flavani (Galvin, 1993). In seguito l'acetaldeide porta alla formazione di polimeri attraverso ponti etile.

I vini rossi europei contengono dai 34 ai 94 mg/L di acetaldeide, mentre quelli italiani hanno un contenuto medio di 34 mg/L (Nykänen, 1986). Generalmente l'etanale è presente sotto forma combinata con l'anidride solforosa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b).

L'acetaldeide disponibile per la polimerizzazione mediata è quella che si forma a partire dall'etanolo per ossidazione, ma non è chiara la cinetica con cui questa reazione avvenga.

Nella prova in esame, sebbene si consideri che la polimerizzazione mediata sia avvenuta in poche ore (periodo intercorso tra l'aggiunta e l'analisi), la concentrazione raggiunta nei campioni è stata ben superiore a quella riscontrabile in affinamento.

Come ipotizzato nella Prova 3, l'aumento dell'indice potrebbe essere dovuto alla formazione di carbocationi e radicali liberi, con conseguente forte polimerizzazione. Sicuramente in questa prova l'acetaldeide ha un ruolo nella polimerizzazione, ma non è possibile definire la relativa importanza rispetto alle condensazioni dirette.

La tesi a 5 minuti se confrontata al controllo presenta invece una riduzione dello stesso indice. La maggiore esposizione agli ultrasuoni può aver comportato una rottura dei polimeri formati nelle prime fasi del trattamento, come indicano le tesi a 1 e 3 minuti.

Il valore dell'indice del controllo è simile a quello riscontrabile in un vino già affinato, mentre quello nelle tesi a 1 e 3 minuti risulta essere molto elevato, espressione di polimeri tannici estremamente voluminosi che, molto probabilmente, andranno incontro a precipitazione.

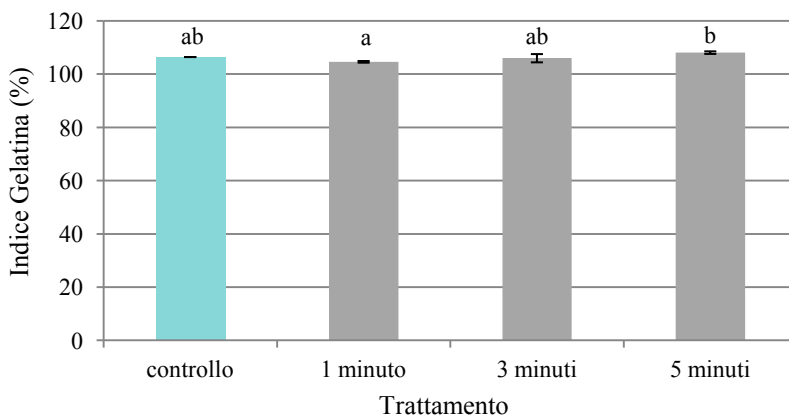


Figura 153: Andamento dell'Indice di gelatina in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Infine, sebbene l'analisi statistica relativa all'indice di gelatina mostri differenze significative tra la tesi a 5 minuti e quella a 1 minuto, sono variazioni di scarso interesse pratico (Fig. 153).

Confrontando gli indici di gelatina ottenuti delle prove 3 e 4 (Fig. 144 e 153) risulta evidente che l'aggiunta di acetaldeide non ha influenzato la reattività dei tannini.

Considerando però che vi è una forte differenza tra gli indici di acido cloridrico (Fig. 143 e 152) risulta di difficile interpretazione la quasi identica risposta degli indici di gelatina.

In conclusione, come nella Prova 3, anche per questa prova, il trattamento ad ultrasuoni ha indotto una polimerizzazione delle molecole tanniche, interessando sia le catechine sia i polimeri già formati.

L'indice di HCl ha evidenziato un forte aumento rispetto alla Prova 3, probabilmente dovuto ad un maggiore ruolo della polimerizzazione mediata.

Pertanto non è da escludere un utilizzo del trattamento anche nella fase di affinamento, considerando che neanche in questa prova il colore ha subito alterazioni.

3.5.5 Vino Merlot

L'analisi sensoriale è stata effettuata su un vino Merlot (annata 2011- provenienza Veneto) senza alcuna aggiunta di tannino.

Poiché dalle varie prove è emerso che l'indice maggiormente interessato a variazioni, in seguito al trattamento con ultrasuoni, è quello dell'acido cloridrico, è stata eseguita la sua determinazione anche per i campioni oggetto dell'analisi sensoriale.

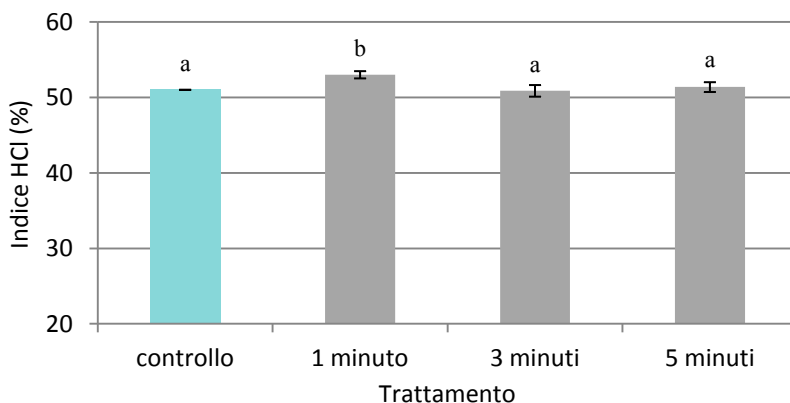


Figura 154: Andamento dell'indice di HCl in funzione del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento (controllo). Lettere diverse identificano campioni diversi significativamente per $p \leq 0,05$.

Come si nota dal grafico (Fig. 154), i valori dell'indice di HCl della tesi ad 1 minuto risultano statisticamente diversi, sia rispetto alle altre tesi, che al controllo. Il fatto che sia variata, però, solo la tesi ad un minuto è di difficile interpretazione, e poco importante ai fini pratici.

Confrontando questi dati con i valori degli indici di HCl delle prove 3 e 4 (Fig. 143 e 152), è possibile notare che in questa prova vi è una certa imperturbabilità al trattamento; comportamento probabilmente dovuto al fatto che l'evoluzione tannica del vino aveva già raggiunto un buon livello. Un valore di tale indice del 35-40% caratterizza, infatti, un vino già affinato, mentre un valore superiore in genere è associato a precipitazioni (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b).

Un'ulteriore conferma a questa ipotesi è la presenza, dopo un solo giorno di conservazione, di un sedimento di materia colorante.

Dal grafico (Fig. 154), infine, è possibile notare come non vi siano stati fenomeni di depolimerizzazione, come invece è accaduto probabilmente nella tesi a 5 minuti della Prova 4 (Fig. 152).

La valutazione sensoriale è stata eseguita con l'obiettivo di verificare se il trattamento ad ultrasuoni abbia comportato una modificazione percepibile a livello degustativo.

Al panel, composto da 10 giudici, è stato proposto l'assaggio di 4 campioni in ordine casuale, sottoposti a trattamento poche ore prima dell'analisi sensoriale.

Il grafico sottostante (Fig. 155) riassume la media dei valori assegnati dai giudici per ogni descrittore del campione di riferimento.

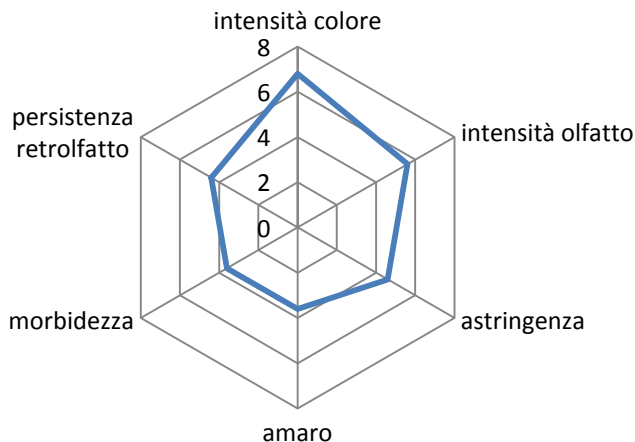


Figura 155: Media dei valori attribuiti ai vari descrittori per il campione di riferimento.

Nella scheda sensoriale utilizzata è stata proposta la valutazione di pochi descrittori proprio per indirizzare l'attenzione dei giudici sui parametri direttamente coinvolti dalla tecnologia oggetto di studio.

Data l'elevata variabilità espressa dai giudici, è stato considerato per ogni descrittore lo scostamento delle tesi trattate dal controllo. In questo modo, il valore attribuito al controllo è il termine di riferimento ed il valore assegnato alla tesi trattata può essere positivo o negativo, a seconda che al descrittore sia stato attribuito un punteggio rispettivamente maggiore o minore del controllo.

Le medie degli scostamenti delle tesi trattate, rispetto al controllo, sono riportate nel grafico sottostante (Fig. 156).

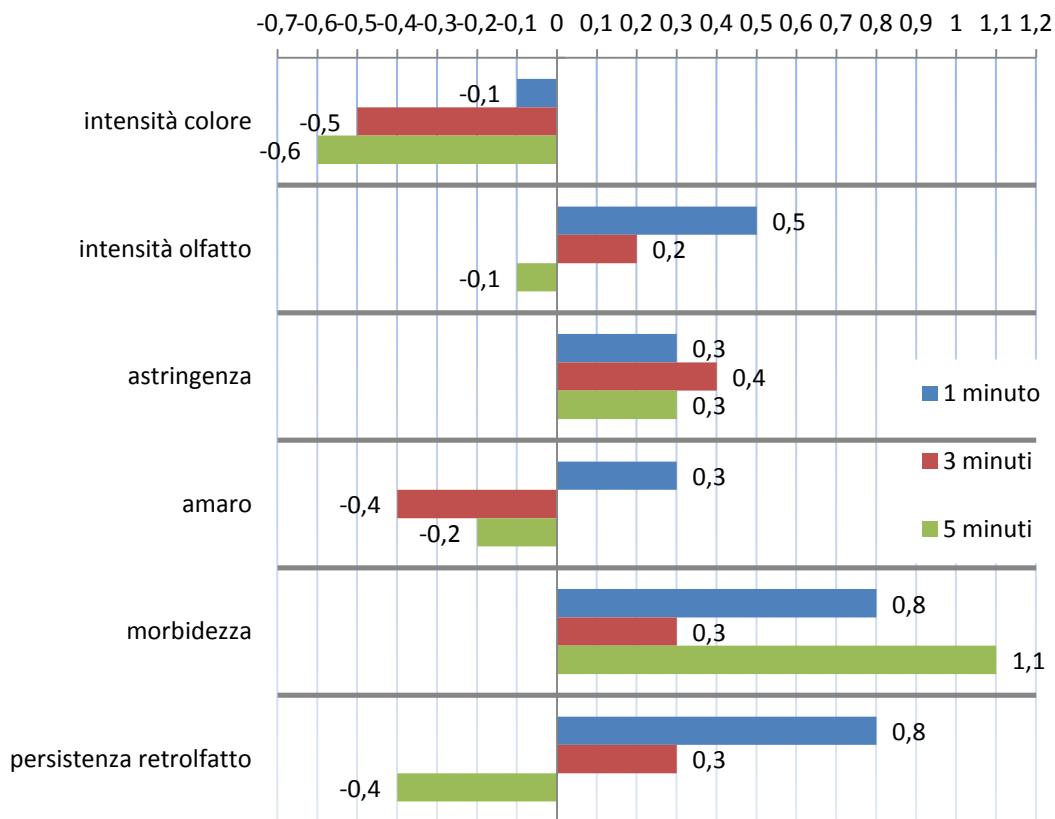


Figura 156: Scostamento medio dei descrittori delle tesi trattate rispetto al campione di riferimento (controllo).

I dati, sottoposti ad analisi statistica, non hanno evidenziato alcuna variazione significativa, probabilmente per l'elevata variabilità tra i punteggi attribuiti.

È comunque possibile fare alcune interessanti considerazioni: tutte le tesi trattate presentano una diminuzione dell'intensità colorante, diminuzione che aumenta all'aumentare del tempo di trattamento. Questo dato risulta singolare in quanto altrettanto non si è verificato nelle prove 3 e 4 (con aggiunta di tannini), e non è stato riscontrato nemmeno in precedenti lavori con vini diversi (dati non ancora pubblicati).

È stato anche notato un lieve aumento dell'astringenza, ma con differenze minime tra le tesi trattate. Tra i vari descrittori quello che tratta la morbidezza presenta il maggior scostamento dal controllo, in particolare nelle tesi a 1 e 5 minuti.

È curioso osservare, in tutte le tesi, il contemporaneo aumento dell'astringenza e della morbidezza, che sono sensazioni in genere antitetiche.

Rispetto al controllo la sensazione amara aumenta leggermente nella tesi a 1 minuto, mentre nelle altre cala.

Queste modifiche indicano un possibile cambiamento della struttura tannica del vino, cambiamento che però non viene evidenziato dall'indice di acido cloridrico. Infatti non è emersa alcuna correlazione tra l'aumento dell'indice nella tesi a 1 minuto e l'analisi sensoriale.

Risulta interessante, infine, notare che gli andamenti dell'intensità olfattiva e della persistenza del retrofatto sono simili; vi è in entrambi un aumento nelle tesi a 1 e 3 minuti (maggiore in quella a 1 minuto) ed una diminuzione a 5 minuti, rivelando una certa linearità in funzione del tempo di trattamento.

Il cambiamento dell'intensità del profilo aromatico potrebbe essere un indizio dell'effetto del trattamento sui colloidi polisaccaridici. Nei vini rossi la componente aromatica ha sicuramente minor importanza rispetto ai vini bianchi, ma una sua enfaticizzazione non può che migliorare la qualità del vino.

In conclusione, l'indice di HCl non ha subito variazioni importanti in seguito al trattamento, ciò può essere dovuto ad un grado di polimerizzazione della struttura tannica già elevato fin dall'inizio.

La degustazione dei vini ha invece fatto emergere delle differenze tra le tesi trattate.

In particolare si è osservato un calo dell'intensità colorante, non riscontrato nelle prove precedenti.

Sotto il profilo aromatico e della morbidezza sembra essere migliore la tesi ad 1 minuto, ma è necessario considerare che il breve periodo di tempo intercorso tra la preparazione dei campioni e la degustazione può avere una forte influenza sulle modifiche apportate.

3.6 CONCLUSIONI

Nelle prime due prove, caratterizzate dall'utilizzo della soluzione modello, il trattamento agli ultrasuoni sembra aver comportato una modifica della struttura tannica, in particolare per ciò che riguarda la dimensione degli aggregati colloidali, come indicato dall'analisi del diametro medio delle particelle in dispersione. Le altre analisi invece non hanno fatto emergere variazioni importanti ai fini pratici.

Inoltre sarebbe interessante valutare, a distanza di tempo, come la struttura tannica si modifichi per effetto della sonicazione, in quanto questo lavoro illustra i dati delle sole analisi effettuate immediatamente dopo il trattamento.

Anche nelle due prove successive, in cui si è utilizzato il vino aggiunto di tannini, il trattamento ha probabilmente indotto una polimerizzazione a carico di questi. L'indice di acido cloridrico infatti aumenta con il trattamento, e vi è una generale diminuzione delle catechine in entrambe le prove.

Ai fini pratici risulta molto interessante riscontrare una quasi inesistente variazione del colore rosso, permettendo così la preservazione di uno tra i più importanti fattori di qualità dei vini rossi.

Il vino dell'ultima prova non ha evidenziato variazioni significative dell'indice di acido cloridrico, ma la degustazione ha determinato delle differenze tra le tesi trattate; in particolare vi è stato un calo dell'intensità colorante.

Analizzando i risultati di queste prove è possibile ipotizzare un aumento dell'indice di acido cloridrico in vini con una struttura tannica ancora in evoluzione, mentre, con vini più strutturati e con tannini già molto polimerizzati, l'indice apparirebbe stabile o in leggera diminuzione. Infatti l'indice di HCl ha avuto risposte diverse nelle varie prove condotte, e nei vari vini utilizzati in questo lavoro; tale circostanza si è potuta osservare anche nei lavori precedenti.

Si rende quindi necessaria una verifica su diverse varietà e con variabili di composizioni delle frazioni fenoliche, con particolare attenzione al rapporto tannini/antociani, ed al grado di evoluzione dei polifenoli.

Al fine di apprezzare meglio l'induzione del trattamento alla polimerizzazione, potrebbero essere utili esperienze di sonicazione in soluzioni sintetiche di (+)catechina.

Inoltre può risultare interessante valutare l'impatto del trattamento sulle interazioni tannini-polisaccaridi e successive modifiche sotto il profilo aromatico.

Dai risultati ottenuti è possibile trarre delle indicazioni che permettano di suggerire l'utilizzo degli ultrasuoni in enologia come tecnica per conseguire un affinamento accelerato. Tale tecnica potrebbe ottenere i migliori risultati se indirizzata a vini giovani, colorati, e con una struttura tannica ancora in evoluzione.

È necessario approfondire cinetiche e tempi di risposta, al fine di perfezionare l'applicazione tecnologica degli ultrasuoni nel trattamento dei vini rossi.

4 BIBLIOGRAFIA

- Amrani Joutei K. (1993). Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin: étude de leur extractibilité. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- Bate-Smith E.-C. (1954). Leucoanthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanin formed from leucoanthocyanins in plant tissues. *Biochemical Journal* 11,1153-1156.
- Boulton R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 67-87.
- Brouillard P. (1982). Chemical structure of anthocyanins. In: *Anthocyanins As Food Colors*. P. Markakis (Ed.), Acad. Press, New York 1-38.
- Comuzzo P. (2003). Effetto di derivati industriali di lievito sulla stabilità colloidale e sulla percezione aromatica dei vini. *Tesi di Dottorato*, Università degli Studi di Udine.
- De Freitas V. (1995). Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et des propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- Galvin C. (1993) Etude de certaines réaction de dégradation des anthocyanes et de leur condensation. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- Glories Y. (1974). Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. I. Précipitation par l'aldéhyde formique et par l'acide chlorhydrique concentré. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 8, 57-78.
- Glories Y. (1978). Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- Glories Y. (1984 a). La couleur des vins rouges, 1re partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 195-217.
- Guerra C. (1997). Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: Application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

Henglein A. (1993). Contributions to various aspects of cavitation chemistry. *Advances in Sonochemistry* 3, 17-84.

Lea A.G.H. (1992). *Plant Polyphenol*. New York: Hemingway Editions.

Malien-Aubert C., Dangles O., Amiot M.J. (2002). Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3299-3305.

Mirabel M., Saucier C., Guerra C., Glories Y. (1999). Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 211-218.

Nykänen L. (1986). Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 84-96.

Osawa Y. (1982). Copigmentation of anthocyanins. In: *Anthocyanins As Food Colors*. P. Markakis (Ed.), Acad. Press, New York 41-65.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonraud A. (1998a). *Traité d'OEnologie. Microbiologie du vin, vinifications. I*. Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D (1998b). *Traité d'OEnologie. Chimie du vin, stabilisation et traitements. II*. Dunod, Paris.

Vlietnik A.J., De Bruyne T., Van den Berghe D.A. (1997). Plant substances as antiviral agents. *Current Organic Chemistry* 1, 307-344.

Zironi R., Buiatti S., Celotti E. (1992). Evaluation of a new colourimetric method for the determination of catechins in musts and wines. *Wein-Wissenschaft* 47, 1, 1-7.

CONCLUSIONI GENERALI

L'ampia panoramica di aspetti indagati in questo studio ha permesso una visione generale sul possibile utilizzo degli ultrasuoni in enologia.

Alcuni dati presentati mostrano una variabilità degli effetti ottenuti, correlata con i diversi tipi di trasformazione e/o applicazione; quindi è necessaria particolare cautela nell'interpretazione dei risultati di certe prove.

La sonicazione delle uve fresche aumenta in tutti i casi la quantità totale del succo ottenuto dopo la pressatura. È importante sottolineare come questo aumento riguardi la quantità di mosto fiore, e quindi vada a migliorare la qualità finale del succo. Il trattamento enzimatico resta comunque l'alternativa più efficace.

Conseguentemente al trattamento ad ultrasuoni deriva anche una significativa produzione di fecce.

L'incidenza più notevole di questa tecnologia innovativa è rappresentata dal suo impatto sull'estrazione dei polifenoli dall'uva: nel contesto di una produzione di vino rosato, tale trattamento applicato in pre-pressatura permette di modulare selettivamente l'estrazione degli antociani dalle bucce in base ai parametri ultrasonici applicati.

Analogamente, è stata rilevata una forte interazione anche con i tannini dei vinaccioli.

Per i campioni di pigiato, trattati e monitorati durante la fermentazione, è stata descritta una cinetica di estrazione accelerata rispetto alla macerazione tradizionale, con un risparmio fino a 3 giorni: si assiste, infatti, ad una ottimizzazione delle condizioni di estrazione di antociani e tannini che potrebbe causare un aumento del grado di polimerizzazione e quindi un colore più intenso e stabile.

Nel caso del trattamento della feccia di fermentazione, la sonicazione ha svolto un'attività litica piuttosto evidente: la feccia trattata con gli ultrasuoni ha infatti rilasciato una maggiore quantità di colloidali, proteine e polisaccaridi, ed è stata inoltre riscontrata una riduzione del diametro delle particelle. I risultati sono correlati principalmente ai tempi di trattamento e secondariamente all'ampiezza.

L'applicazione di 3 minuti di trattamento al 90% di ampiezza è risultata sufficiente per i nostri obiettivi, e pertanto è stata scelta per il confronto con altre tecniche, come la sosta *sur lies* tradizionale e l'enzimaggio. Questa tecnica è risultata vantaggiosa subito dopo il trattamento e per tempi inferiori ad un mese. All'opposto non è stato riscontrato un effetto stabilizzante delle aggiunte di feccia trattata con ultrasuoni, anche se sono stati osservati dei valori di Protocheck più bassi rispetto al controllo.

Non essendo stato notato un effetto comune sui diversi campioni analizzati, si ritiene opportuno effettuare delle prove su ogni tipo di matrice su cui si intende applicare la tecnologia degli ultrasuoni.

L'applicazione diretta degli ultrasuoni sul vino ha portato ad un incremento dell'instabilità con possibili effetti positivi sul trattamento di chiarifica. Inoltre, si è verificato un aumento del numero delle particelle con diametro minore, ed una diminuzione di quelle di maggiore dimensioni, fenomeno che potrebbe essere dovuto ad una ristrutturazione delle interazioni tra colloidali.

I risultati ottenuti sui vini permettono infine di affermare che l'immissione di energia meccanica e chimica all'interno di un mezzo quale il vino, comporta modificazioni. Appare evidente come il trattamento su vini diversi dia risultati diversi. Molto positivo è il risultato sul profilo della componente colorante: i trattamenti non comportano perdita di colore. I risultati più interessanti si sono avuti sui composti tannici. La formazione di H_2O_2 causata dagli ultrasuoni potrebbe indurre l'ossidazione dell'etanolo con formazione di aldeide acetica, promovendo, quindi, la polimerizzazione con ponte etanale. L'incremento medio dell'8% della quantità di catechine nei campioni sonicati potrebbe far presupporre un riarrangiamento della loro struttura. Molto importanti sono anche i risultati dell'indice di etanolo, i quali, aumentando, consolidano la tesi di un riassetto, altrettanto vale per l'indice di acido cloridrico che, con il trattamento, aumenta nel caso di vini giovani e ancora poco strutturati.

Anche dal punto di vista sensoriale sono stati riscontrati dei cambiamenti, con la comparsa di nuovi sentori vegetali ed un miglioramento della sensazione astringente.

L'utilizzo di questa tecnica potrebbe pertanto risultare vantaggiosa al fine di accelerare i normali tempi di macerazione, favorire la lisi cellulare del lievito, riducendo i tempi di affinamento sulle fecce, migliorare la stabilità proteica dei vini, favorire le polimerizzazioni tra i polifenoli e migliorare l'astringenza dei vini rossi.