

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE VITICOLE ED ENOLOGICHE

**STUDIO DEGLI EFFETTI DI PROCEDURE DIVERSE,
PRIMA E DOPO LA DISTILLAZIONE, SUL PROFILO
AROMATICO DELLA VINACCIA E DEL DISTILLATO DI
PROSECCO**

Relatore:

Dott. Riccardo FLAMINI

Correlatore:

Dott.ssa Annarita PANIGHEL

Laureando:

Alessio ZANARDO

Matricola n. 499505

ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 LA GRAPPA	5
1.1.1 IL CICLO PRODUTTIVO DELLA GRAPPA DA VINACCE VERGINI.....	6
1.1.2 LA GRAPPA DI PROSECCO	9
1.2 LA VINACCIA.....	11
1.2.1 LA COMPOSIZIONE DELLA VINACCIA	12
1.3 IL DISTILLATO D’UVA.....	14
1.4 I COMPOSTI VOLATILI DEI DISTILLATI.....	16
1.4.1 I COMPOSTI AROMATICI VARIETALI DELLE VINACCE.....	16
1.4.1.1 TERPENI.....	17
1.4.1.2 NORISOPRENOIDI	19
1.4.1.3 COMPOSTI BENZENOIDI.....	21
1.4.2 I COMPOSTI DI FERMENTAZIONE DELLE VINACCE	22
1.4.2.1 ALCOLI SUPERIORI.....	22
1.4.2.2 ALDEIDI E CHETONI.....	23
1.4.2.3 ACETALI.....	23
1.4.2.4 ACIDI CARBOSSILICI.....	23
1.4.2.5 ESTERI	24
1.5 METANOLO	26
1.6 GASCROMATOLOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA PER L’ANALISI DEGLI AROMI.....	27
2. SCOPO DELLA TESI.....	35
3. MATERIALI E METODI	37
3.1 MATERIALI, REAGENTI E STRUMENTI DI LABORATORIO	37
3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	39
3.2.1 IL CAMPIONE DI FERMENTATO D’UVA	39
3.2.2 CAMPIONI DI PUREA DI VINACCIA	40
3.2.3 CAMPIONI DI PUREA DI VINACCIA TRATTATA CON ENZIMA GLICOSIDASICO	40

3.2.4	CAMPIONI DI PUREA DI VINACCIA ADDIZIONATA DI ETANOLO	41
3.3	DISTILLAZIONI E MISURE DEL GRADO ALCOLICO	41
3.4	ESTRAZIONE DELLA PUREA ESAUSTA	41
3.5	ESTRAZIONE DEI DISTILLATI	42
3.6	ANALISI GC/MS	43
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	47
4.1	STUDIO DEL PROFILO DEL DISTILLATO D’UVA PROSECCO	47
4.2	IL PROFILO DEL DISTILLATO DI PUREA DI VINACCIA PROSECCO TRATTATA CON ENZIMA ED ADDIZIONATA DI ETANOLO PRIMA DELLA DISTILLAZIONE	50
4.3	CONFRONTO DEL PROFILO DEI DISTILLATI DI PUREA DI VINACCIA PROSECCO TRATTATA CON ENZIMA ED ADDIZIONATA DI ETANOLO PRIMA DELLA DISTILLAZIONE	53
4.4	STUDIO DEI PRINCIPALI COMPOSTI CARBONILICI NEI DISTILLATI DI PUREA DI VINACCIA PROSECCO TRATTATA CON ENZIMA ED ADDIZIONATA DI ETANOLO PRIMA DELLA DISTILLAZIONE	55
4.5	I PROFILI DEI COMPOSTI VOLATILI DELLE PUREE DI VINACCIA PROSECCO ESAUSTE DOPO LA DISTILLAZIONE	57
4.6	CONFRONTO TRA I PROFILI DEI COMPOSTI VOLATILI RIMASTI NELLE PUREE DI VINACCIA PROSECCO ESAUSTE DOPO LA DISTILLAZIONE	59
4.7	CONFRONTO DEL PROFILO AROMATICO DEL DISTILLATO DI PUREA DI VINACCIA TAL QUALE CON IL PROFILO DEL DISTILLATO D’UVA	61
4.8	CONFRONTO DEL PROFILO AROMATICO DEL DISTILLATO DI PUREA DI VINACCIA TAL QUALE CON IL PROFILO DI UNA GRAPPA	64
5.	CONCLUSIONI	67
6.	BIBLIOGRAFIA	69

RIASSUNTO

Questo lavoro di tesi ha come principale obiettivo il miglioramento della qualità della grappa Prosecco, una varietà semi-aromatica caratterizzata da rilevanti contenuti di aromi in particolare a livello delle bucce. E' stato studiato il potenziale aromatico del distillato d'uva, l'utilizzo della purea di vinaccia per produrre il distillato, ed i profili aromatici dei due distillati sono stati messi a confronto. Sono stati inoltre studiati gli effetti sui composti aromatici del distillato come conseguenza del trattamento della vinaccia con un enzima glicosidasico e della macerazione con una soluzione idroalcolica al 60% prima della distillazione, determinando anche i principali composti carbonilici nel distillato ed i composti volatili rimasti nelle puree esauste dopo la distillazione.

I risultati indicano che il trattamento della purea con enzima glicosidasico non arricchisce ulteriormente il distillato di aromi varietali, al contrario la macerazione con etanolo sembra favorire l'estrazione di acidi grassi ed esteri etilici a lunga catena con carattere oleoso e ceroso. Pertanto, tra le diverse tesi studiate risulta preferibile distillare la purea di vinaccia fermentata con i lieviti autoctoni senza operare alcuno dei trattamenti studiati prima della distillazione.

Dal confronto tra distillato d'uva e distillato di purea, quest'ultimo risulta caratterizzato da maggiori contenuti di terpenoli e composti a 6 atomi di carbonio, probabilmente riconducibile al processo di sminuzzamento della vinaccia.

PAROLE CHIAVE: grappa, vinaccia, distillato, aromi varietali, composti di fermentazione, gascromatografia, spettrometria di massa.

ABSTRACT

The principal aim of this graduate thesis is the Prosecco grappa quality improvement. Prosecco is a semi-aromatic grape variety characterized by an high level of varietal compounds particularly in the skins.

The aromatic potential of the distillate made from soft-pressed and fermented grape and the use of mashed grape marc to produce the grappa were studied, and aroma profiles of two distillates were compared.

Also the aroma compounds contained in the distillate as a consequence of grape marc treatment with a glycosidic enzyme and maceration with a 60% alcoholic solution before distillation, were investigated. Finally, the principal carbonyl compounds of distillate and the volatile compounds in the grape marc residue after the distillation, were studied.

Mashed grape marc treated with glycosidase not showed to enhance the aroma compounds in distillate; maceration with ethanol showed to promote the extraction of long chain fatty acids and ethyl esters characterized by oily and waxed sensory proprieties. As a consequence, for the grappa production it is preferable the use of mashed grape marc fermented by indigenous yeasts without treatments before distillation.

The comparison of distillates made using mashed grape marc and grape soft-pressed showed the former is characterised by higher content of terpenols and 6C compounds, probably due to the mashed grape marc preparation.

KEYWORDS: grappa, grape marc, distillate, varietal and fermentation compounds, and carbonyl compounds, gas chromatography, mass spectrometry.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA GRAPPA

La grappa è l'acquavite italiana ricavata dalla distillazione diretta delle vinacce. Un tempo considerata distillato povero, negli ultimi anni ha assunto il ruolo di status qualificante soprattutto nella fascia dei consumatori di cultura superiore e disponibilità economica sopra la media (D'Agostino *et al.*, 2001).

L'arte della distillazione ha verosimilmente avuto inizio sette secoli a.C. grazie ai primi esperimenti di cinesi, persiani ed egizi con sidro e vino; nel VII secolo d.C. gli arabi conquistarono l'Egitto e appresero e migliorarono la tecnica distillatoria, diffondendola poi in Europa, dove per secoli fu conosciuta e praticata solo da pochi alchimisti o nei monasteri. Nel Medioevo la distillazione si diffonde anche in Italia, e negli anni viene sempre più perfezionata, soprattutto per produrre acquavite di vino e, dal 1636, anche di vinaccia. Dal 1700 si svilupparono le conoscenze nel campo della distillazione e dal 1800 si realizzarono impianti di distillazione tecnologicamente avanzati e adatti alla produzione industriale. Da qui fino ai giorni nostri la grappa ha avuto una continua evoluzione qualitativa (Castagner, 2008).

La grappa è tutelata dalla legislazione italiana dal D.P.R. del 16 luglio 1997, n. 297 che stabilisce al capo IV, art. 9 che "la denominazione "grappa" è riservata esclusivamente all'acquavite di vinaccia ottenuta da materie prime ricavate da uve prodotte e vinificate in Italia, distillate in impianti ubicati nel territorio nazionale rispondente alle prescrizioni contenute nel presente regolamento". È regolamentata anche a livello europeo dal Regolamento (CE) n. 110/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 gennaio 2008 relativo alla definizione, alla designazione, alla presentazione, all'etichettatura e alla protezione delle indicazioni geografiche delle bevande spiritose (ALLEGATO II, articolo 6).

1.1.1 IL CICLO PRODUTTIVO DELLA GRAPPA DA VINACCE VERGINI

Il processo produttivo inizia in cantina nel periodo di vendemmia: l'uva conferita allo stabilimento viene pigiata e diraspata e la frazione liquida (il mosto) viene separata dalla frazione solida (la vinaccia). A questo punto le vinacce vergini devono essere trasportate subito in distilleria, in quanto il periodo di tempo in cui le vinacce permangono completamente vergini è di brevissima durata, essendo la buccia stessa sede principale dei lieviti alcoligeni i quali, in condizioni normali di temperatura e con tenori normali di SO₂, aggrediscono rapidamente gli zuccheri contenuti in soluzione, iniziando così la fermentazione alcolica; se tale fermentazione avviene in condizioni inospitali per i lieviti alcoligeni, si verificherà un sensibile aumento della produzione di prodotti secondari, a scapito della resa in alcol ma soprattutto della qualità.

Una volta giunte in distilleria le vinacce vengono stoccate in diversi tipi di locali e infrastrutture: silos di cemento armato (esterni o interrati) o in acciaio inossidabile, piccoli fermentini in plastica o in sacchi di nylon utilizzando il sistema denominato Grappasystem®. È importante proteggere la vinaccia dal contatto con l'aria per evitare fenomeni di acescenza ad opera di batteri acetici e quindi la formazione di acetato d'etile (pungente) eliminabile solo con un maggior taglio delle frazioni di testa in distillazione, che comporta però la perdita di gran parte degli aromi fruttati positivi (Versini, 1995).

All'insilamento è consigliata un'opportuna acidificazione del prodotto con acidi forti (acido solforico o fosforico) adeguatamente diluiti ed irrorati per portare la vinaccia a pH di circa 3.0-3.3. Questa è operata al fine di conseguire, nel caso di vinacce vergini o parzialmente fermentate, una fermentazione degli zuccheri ad opera dei soli lieviti – resa eventualmente più rapida con l'aggiunta di lieviti selezionati – e limitare le attività batteriche (penalizzate a pH più bassi) e l'attività enzimatica pectinmetilesterasica che determina la formazione di alcol metilico (Versini, 1995).

La vinaccia trova così le migliori condizioni per svolgere la fermentazione alcolica, in cui i lieviti trasformano gli zuccheri in alcol.

Terminata la fermentazione alcolica, la vinaccia viene distillata. Nelle aziende di grandi dimensioni, dove la mole di lavoro non permette di distillare tutta la vinaccia contemporaneamente, si procede allo stoccaggio e conservazione di una parte di questa, che verrà così distillata in un secondo tempo.

A differenza di molte altre acquaviti, dove le caratteristiche dell'apparecchio sono accuratamente pianificate e standardizzate, la grappa può vantarsi di essere figlia di diversi tipi di alambicchi, dai quali dipende in gran parte la sua personalità (Odello, 1997). La distillazione sfrutta le diverse temperature di ebollizione dei vari composti volatili presenti nella vinaccia, per ottenere la separazione di alcol e aromi a mezzo della loro evaporazione. L'impianto di distillazione è dunque l'insieme degli strumenti meccanici con cui si concentrano e poi purificano alcol e aromi (Castagner, 2008).

Esistono due grandi famiglie di impianti di distillazione: continui e discontinui.

Impianto di distillazione in continuo

In questo impianto il ciclo produttivo avviene automaticamente e senza interruzioni. È costituito da un primo distillatore (detto disalcolatore), alimentato con vinaccia, che produce la "flemma" alcolica (soluzione contenente 15-20% di alcol). Questa viene rettificata con una seconda distillazione in colonna a piatti (specifici diaframmi posti all'interno della colonna), che costringe i diversi composti a frazionarsi e a concentrarsi in zone specifiche della colonna, a seconda della loro natura fisico-chimica.

Le grappe prodotte con questo tipo di impianto sono equilibrate e di grande morbidezza e gli aromi varietali vengono catturati in modo molto selettivo e preciso (Castagner, 2008).

Impianto di distillazione in discontinuo

Esistono principalmente due tipi di alambicchi per operare la distillazione in discontinuo: a caldaie a vapore e a bagnomaria.

Negli impianti a caldaie a vapore il lavoro è suddiviso nelle seguenti fasi:

- riempimento di piccole caldaie disponendo la vinaccia in cestelli forati posti all'interno
- riscaldamento della vinaccia con vapore acqueo
- distillazione ed estrazione della Grappa in un unico passaggio, eliminando testa e coda (distillato iniziale e finale) e conservando solo il cuore (la parte migliore)
- eliminazione della vinaccia esausta e lavaggio della caldaia

Questo ciclo viene detto "cotta" e la sua durata oscilla da 1.5 a 3 ore, per cui durante il giorno viene ripetuto più volte.

Negli impianti a bagnomaria, invece, la vinaccia non viene riscaldata direttamente dal vapore, ma indirettamente per contatto. Per permettere lo scambio termico viene quindi

aggiunta acqua alle vinacce. A questo punto la caldaia può essere riscaldata. Il tempo di distillazione è superiore rispetto alla distillazione a vapore diretto.

Le grappe prodotte da impianti discontinui sono aromaticamente importanti e fortemente caratterizzate (Castagner, 2008).

La regolazione e la conduzione degli impianti di distillazione è molto complessa: infatti una parte delle sostanze volatili si comporta sempre allo stesso modo, ma un'altra parte può comportarsi sia come coda che come testa, a seconda della loro solubilità in alcol e della temperatura e pressione in colonna. Tra queste sostanze, dette impurezze ibride, troviamo gli alcoli isoamilici, l'alcol metilico, l'isobutirrato di etile e gli aromi in generale. La grappa ottenuta deve poi essere tagliata, ovvero miscelata con altre produzioni per caratterizzare ed equilibrare al meglio il prodotto finale, ed eventualmente messa ad invecchiare in botte, meglio se in barrique (botte da 225 – 228 l).

Infine la grappa viene diluita con acqua deionizzata purissima fino alla gradazione prescelta, filtrata e quindi imbottigliata (De Rosa e Castagner, 1994).

1.1.2 LA GRAPPA DI PROSECCO

Il Prosecco, pur non essendo una varietà propriamente aromatica, presenta rilevanti contenuti di aromi varietali quali terpenoli e norisoprenoidi in forma glicosilata, e dalla distillazione delle vinacce si possono ottenere grappe caratterizzate da un bouquet di note fruttate e floreali di considerevole intensità (Flamini *et al.*, 2002).

Lo studio del profilo aromatico della grappa di Prosecco ha messo in luce come questa sia caratterizzata da contenuti considerevoli di vitispirani (nota di eucalipto), linalolo (nota floreale) e geraniolo (nota di rosa), terpenoli quali furan linalolo ossidi, nerolo e citronellolo, etil cinnamato (nota di prugna); caratterizzante è la presenza di benzaldeide (nota di mandorla); sono presenti anche significativi livelli di esteri salicilici (nota di speziato-balsamico) e farnesolo (nota floreale), che rispecchiano il profilo della varietà (Tabella 1.1) (Flamini *et al.*, 2002).

È stato inoltre osservato che alcuni composti varietali, quali β -feniletanolo e vanillina (rispettivamente nota floreale e di vaniglia), sono presenti in forma glicosilata nella vinaccia e non passano quindi al prodotto finale durante la distillazione, in quanto non vengono liberati da enzimi endogeni dell'uva con la fermentazione o con la distillazione. Questi, se trasferiti al distillato, potrebbero essere utili come ulteriori marcatori varietali.

Da uno studio (Flamini *et al.* 2005) condotto sui principali composti carbonilici in quattro grappe monovarietal (grappe Chardonnay e Cabernet Sauvignon ottenute commercialmente e grappe Prosecco e Raboso ottenute mediante distillazione con un impianto pilota), la grappa di Prosecco risulta caratterizzata da rilevanti concentrazioni di esanale (5004 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro, nota erbacea), 2 e 3-metilbutanale (411 e 1203 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro), propanale (820 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro, nota fruttata), eptanale (151 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro) e nonanale (73 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro, nota fruttata e floreale). Questo particolare profilo aromatico permette al distillato di Prosecco di distinguersi dagli altri distillati di monovitigno, come osservato dal confronto con le grappe di Chardonnay (caratterizzata da un elevato contenuto di 2-esenale: 73 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro), Raboso (elevato contenuto di esanale (10490 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro) e di acetoino (1894 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro)) e Cabernet Sauvignon (elevato contenuto di benzaldeide: 1117 $\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro).

Alcoli e Terpenoli	media (µg/l)	Esteri	media (µg/l)
2 e 3 metil butanolo	71460	Capronato di metile	1069
1-esanolo	39982	Capronato di etile	41326
(Z)-3-esen-1-olo	820	Butanoato di isoamile	853
(E)-3-esen-1-olo	1371	Acetato di esile	6738
3-ottanolo	979	Enantato di etile	2350
(E)-2-esen-1-olo	1221	Lattato di etile	2504
1-otten-3-olo	1257	2-esenoato di etile	938
<i>cis</i> -furan linalolo ossido	4215	Caprilato di metile	1612
2-nonanolo	1893	Caprilato di etile	84570
Linalolo	10506	Capronato di isoamile	1913
1-ottanolo	2131	7-ottenoato di etile	2490
Terpinen-4-olo	1741	Pelargonato di etile	4276
1-nonanolo	5865	Caprato di metile	5416
α-terpineolo	4956	Capronato di esile	495
Citronello	4685	Caprato di etile	159293
Nerolo	2446	Caprilato di isoamile	3799
Geraniolo	10310	Dietil succinato	10355
β-feniletanolo	1885	Metil geranato	468
Farnesolo	3334	Metil salicilato	2995
		Neril acetato	3052
Composti Carbonilici		Benzeneacetato di etile	573
2-eptanone	509	Etil salicilato	5342
Eptanale	538	Laurato di etile	131954
2-esenale	66	3-fenilpropionato di etile	2643
Ottanale	524	Tridecanoato di etile	1240
2-nonanale	805	Miristato di metile	1432
Nonanale	2085	Miristato di etile	46286
Decanale	1457	Etil cinnamato	943
Benzaldeide	669	Palmitato di metile	12919
		Palmitato di etile	342007
Altri composti		Palminoleato di etile	25742
Stirene	466	Stearato di etile	5953
α-metilstirene	945	Oleato di etile	31649
Vitispirani	1946	Linoleato di metile	9978
Acido laurico	192	Linoleato di etile	132254
2-pentil furano	1557	Linolenato di metile	2335
		Linolenato di etile	52833

Tabella 1.1. Composti identificati nel profilo aromatico della grappa di Prosecco. Le concentrazioni si riferiscono ad una media dei valori riscontrati nei distillati prodotti da due cotte distinte, espresse in µg/l di 1-eptanolo (Flamini *et al.*, 2002).

1.2 LA VINACCIA

La vinaccia è la materia prima che viene utilizzata per la produzione della grappa. Essa viene definita dalla legislazione italiana come “il complesso delle parti solide dell’uva, quali bucce e vinaccioli, in presenza o meno del raspo” (Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998).

Le vinacce sono essenzialmente costituite dalle bucce le quali, con il mosto, forniscono la quasi totalità dei composti che, nella loro evoluzione e successiva distillazione, caratterizzano la grappa. Il raspo non riveste in pratica alcun interesse dal punto di vista enologico, né per la distillazione, essendo formato in gran parte da sostanze cellulosiche, piccole quantità di glucidi semplici e da sali organici e minerali. Separare quindi il raspo è certamente un primo passo positivo per favorire una buona tecnologia di produzione della grappa (De Rosa e Castagner, 1994).

In distilleria le vinacce vengono distinte in vergini, semi-fermentate e fermentate a seconda del loro contenuto alcolico. Le vinacce vergini provengono in genere da uve bianche, all’atto della pressatura delle uve vengono separate dal mosto e mandate subito in distilleria. Sono le vinacce più difficili da gestire, a causa della bassa acidità fissa e degli zuccheri pronti a fermentare, e sono anche le più soggette agli attacchi batterici (Castagner, 2008). Le vinacce vergini sono caratterizzate da un odore erbaceo, qualche volta addirittura piatto, hanno un colore vivo e una buona consistenza al tatto (De Rosa e Castagner, 1994).

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata vinaccia vergine di uve Prosecco clone Balbi.

1.2.1 LA COMPOSIZIONE DELLA VINACCIA

Le vinacce presentano composizione chimica variabile a seconda di vari fattori, quali l'andamento stagionale, il luogo della loro provenienza, la varietà del vitigno, l'epoca di vendemmia nonché le diverse tecniche impiegate in vinificazione. Mediamente ritroviamo i seguenti valori: acqua 50-70%, zuccheri 6-8%, acidi organici 1-2%, tannini 1-2%, sostanze minerali 1-2%, cellulosa 10-20%, grassi 2-4%, oltre a numerose altre sostanze quali proteine, pectine, sostanze coloranti, sostanze aromatiche, vitamine, lieviti, batteri e altro (De Rosa e Castagner, 1994).

Composti di maggior interesse presenti nelle vinacce:

1) **Acqua**: è sempre presente in gran quantità. Più elevato è il valore di umidità, maggiore è il pregio delle vinacce, in quanto hanno caratteristiche chimico-fisiche più simili a quelle del mosto ottenuto con la stessa uva.

2) **Zuccheri**: la loro quantità è in stretta relazione con il valore di umidità. Sono costituiti essenzialmente da glucosio e fruttosio, in rapporto 0.9 : 1 al momento della maturazione fisiologica.

I lieviti nella loro demolizione glucidica attaccano preferibilmente il glucosio per cui, verso il termine della fermentazione alcolica, i $\frac{3}{4}$ dello zucchero presente ancora nelle vinacce è costituito da fruttosio.

3) **Acidi**: il principale è l'acido tartarico, ma si riscontrano anche piccole quantità di acido malico, acido citrico, acido succinico ed altri. Tali acidi però sono presenti perlopiù in forma salificata, per cui nelle vinacce vi è appunto scarsa presenza di acidi liberi, da cui la bassa acidità (3 – 4%).

L'acidità delle vinacce varia a causa di umidità delle stesse, varietà e andamento stagionale.

Avere una vinaccia con alti valori di acidità è molto importante in quanto opera un'azione selettiva sui lieviti che interessano la fermentazione alcolica e previene attacchi batterici, garantendo una protezione di tipo sanitario.

4) **Composti polifenolici**: sono soprattutto le sostanze tanniche ed i pigmenti coloranti, caratterizzati dal fatto di possedere nella loro molecola più gruppi fenolici.

5) **Sostanze pectiche**: sono costituite da lunghe catene lineari di condensazione di acido galatturonico; i gruppi funzionali acidi sono in parte liberi ed in parte (sempre superiore al 50% del totale) esterificati con alcol metilico.

6) **Cellulosa**: chimicamente è un polisaccaride e precisamente un polimero del β -glucosio; è un costituente delle pareti cellulari e di sostegno. È insolubile in acqua e può essere degradata a molecole più semplici (quali cellobiosio e α -glucosio) grazie all'azione dell'enzima cellulasi. Ha scarsa conducibilità termica.

7) **Sostanze aromatiche**: le bucce sono la sede naturale delle sostanze aromatiche varietali in cui sono presenti in contenuti maggiori rispetto alla polpa dell'acino. Le vinacce contengono quindi la maggioranza delle sostanze aromatiche dell'uva.

1.3 IL DISTILLATO D'UVA

Il D.M. 3 novembre 1988 stabilisce che l'acquavite o distillato d'uva è il prodotto ottenuto dalla distillazione del mosto fermentato di uve fresche in presenza delle parti solide dei grappoli (De Rosa e Castagner, 1994).

Qualitativamente il distillato d'uva è superiore rispetto alla grappa e la qualità principale che deve possedere (per potersi appunto differenziare da una grappa) è la sua finezza (De Rosa e Castagner, 1994).

Mentre la grappa viene prodotta partendo dalle vinacce e dalla feccia (ossia da "sottoprodotti" della vinificazione), il distillato d'uva si ottiene a partire dall'uva intera, che viene vinificata direttamente in distilleria, seguendo delle metodologie completamente diverse da quelle utilizzate normalmente in cantina per la produzione di vino.

I punti fondamentali da seguire per produrre un distillato d'uva di qualità sono i seguenti:

1) **Il vitigno.** Utilizzare dei vitigni fruttati e/o aromatici (nel nostro caso Prosecco), coltivati in ambienti vocati (nel nostro caso Fregona) e con carichi di produzione contenuti, in modo da favorire l'accumulo di aromi varietali negli acini.

2) **La vendemmia.** La raccolta dell'uva deve essere eseguita a maturazione ottimale, normalmente posticipata rispetto alla vendemmia che eseguiamo per produrre vino, in quanto favoriamo così l'accumulo di aromi varietali. La vendemmia deve essere manuale, per meglio controllare che vengano raccolte solo uve sane.

3) **La pigiatura.** Questa operazione deve essere eseguita subito dopo la raccolta, preferibilmente con macchina diraspa-pigiatrice e non pigia-diraspatrice, in modo da eliminare i raspi prima della pigiatura. Al pigiato normalmente non viene aggiunta anidride solforosa (SO₂) in quanto potremmo ritrovarla nel distillato, dove comprometterebbe il profilo aromatico.

4) **La fermentazione alcolica.** Viene svolta utilizzando lieviti selezionati e mantenendo la temperatura tra i 18 ed i 20°C, necessaria per ottenere una ricca dotazione in aromi secondari (eteri e esteri). Devono essere eseguiti frequenti rimontaggi per omogeneizzare

al meglio la massa. La durata della fermentazione non è quasi mai inferiore a 7 giorni, durante i quali deve essere monitorata costantemente.

5) **La distillazione.** A fine fermentazione l'intera massa viene distillata immediatamente, utilizzando dei distillatori discontinui.

6) **L'affinamento.** Il distillato viene lasciato affinare in cisterne inox per almeno 6 mesi, quindi si procede al taglio, alla riduzione del grado alcolico, alla stabilizzazione ed alla filtrazione. Infine si procede all'imbottigliamento del prodotto finito, che per almeno 60 giorni dovrà riposare in bottiglia prima di poter essere commercializzato (De Rosa e Castagner, 1994).

L'obiettivo organolettico di un'acquavite di pregio è la caratterizzazione aromatica derivante dal vitigno, o dai vitigni qualora si impieghino qui congiuntamente più varietà di uva. Le varietà di vitigno normalmente consigliate vengono divise in 3 gruppi a seconda delle loro caratteristiche: fruttate, aromatiche, neutre. Varietà principe tra le fruttate è da considerarsi il Prosecco, il quale consente di ottenere un prodotto di altissima classe e di finezza ineccepibile (De Rosa e Castagner, 1994).

1.4 I COMPOSTI VOLATILI DEI DISTILLATI

I composti volatili presenti nei distillati, oltre che dall'uva, possono derivare dal metabolismo dei lieviti e dei batteri, dal legno dei contenitori in cui vengono affinati. La caratterizzazione dei distillati implica la conoscenza sia della composizione aromatica varietale dell'uva di origine, in quanto si presume intuitivamente che da quest'ultima derivi il carattere di un distillato, sia dalle reazioni enzimatiche e acido catalizzate che avvengono durante il processo di fermentazione, pressatura, insilamento, distillazione (Di Stefano e Borsa, 2006).

1.4.1 I COMPOSTI AROMATICI VARIETALI DELLE VINACCE

Sono quei composti dati dalla materia prima di partenza e legati alla varietà d'uva impiegata. Questi sono costituiti da una frazione di composti liberi facilmente trasferiti al distillato, e da una frazione legata agli zuccheri (in forma glicosilata) che, in base ai processi tecnologici impiegati (trattamenti enzimatici, acidificazioni, macerazione alcolica) possono dare ulteriori importanti contributi al profilo aromatico del prodotto (Flamini *et al.*, 2002).

Se tutte le fasi del processo produttivo vengono condotte in maniera corretta, gli aromi varietali possono trasferirsi in maniera significativa nel distillato finale e rispecchiare le specifiche proprietà organolettiche della varietà d'uva utilizzata per la produzione (Lukić *et al.*, 2010).

I composti varietali di maggiore importanza sono gli isoprenoidi C₁₀ (monoterpeni) C₁₅ (sesquiterpeni) e C₁₃ (norisoprenoidi).

1.4.1.1 TERPENI

Sono i composti maggiormente responsabili dell'aroma varietale dei vini e dei relativi distillati prodotti da varietà aromatiche (Lukić *et al.*, 2010). Costituiscono una grande famiglia di composti (circa 4.000) all'interno della quale i composti suscettibili di essere odorosi sono i monoterpeni C₁₀ (composti a 10 atomi di carbonio) e i sesquiterpeni C₁₅ (composti a 15 atomi di carbonio), formati rispettivamente a partire da due e da tre unità isopreniche (struttura a 5 atomi di carbonio) (Ribèreau-Gayon *et al.*, 2004).

I terpeni esistono sotto diverse forme:

-idrocarburi terpeni: limonene, myrcene, α -terpinene, p-cimene, α -pinene

-idrocarburi sesquiterpenici: farnesene, γ -cadinene

-monoalcoli terpenici: linalolo, geraniolo, nerolo, α -terpineolo, citronellolo, terpinen-4-olo

-monoalcoli sesquiterpenici: farnesolo, nerolidolo, γ -cadinolo

-dioli e trioli terpenici: tipo diolo I (2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diolo), diolo II (2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diolo), endiolo (2,6-dimetil-7-octen-2,6-diolo), 8-OH linalolo, 7-OH geraniolo, 7-OH nerolo, triolo (2,6-dimetil-7-octen-2,3,6-triolo)

-esteri terpenici: neril acetato

-eteri terpenici: furanlinalolo ossidi, piranlinalolo ossidi, nerol ossido

-aldeidi terpeniche: nerale, geraniale

-acidi terpenici: acido geranico

Sicuramente i monoalcoli terpenici sono quantitativamente e qualitativamente i più importanti nell'uva (strutture in Figura 1.1). Tutti presentano odori molto gradevoli e sono caratterizzati da basse soglie olfattive.

I composti terpenici presenti nell'uva si trovano sotto forma libera o glicosilata. Inoltre le forme libere possono essere odorose (monoidrossilate, non ossigenate, eteri...) e non odorose (poliidrossilate). Queste ultime, insieme a quelle glicosilate, presentano una bassa volatilità e pertanto non possono passare nel distillato. Tuttavia esse sono facilmente idrolizzabili in ambiente acido e portano alla formazione di sostanze di notevole interesse dal punto di vista sensoriale. Perciò i precursori fungono da un'importante riserva aromatica. La forma libera dei monoterpenoli, linalolo, geraniolo, nerolo, determina in gran parte l'intensità del carattere terpenico varietale. Va comunque sottolineata che

l'intensità aromatica non è correlata alla concentrazione totale dei terpeni, in quanto esistono differenze significative tra le soglie olfattive dei singoli composti.

I terpeni sono quasi sempre localizzati negli strati più interni della buccia, in dosi da pochi microgrammi fino a qualche centinaio di microgrammi per chilogrammo d'uva, variabili a seconda dell'andamento stagionale (le piogge sono negative) e del grado di maturazione dell'uva (se prolungata può portare a perdite aromatiche per ossidazione). Hanno un punto di ebollizione molto alto (dai 150 ai 198 °C) ed in distillazione si comportano pertanto come prodotti di coda, passando cioè nel distillato soprattutto nella fase finale (De Rosa e Castagner, 1994).

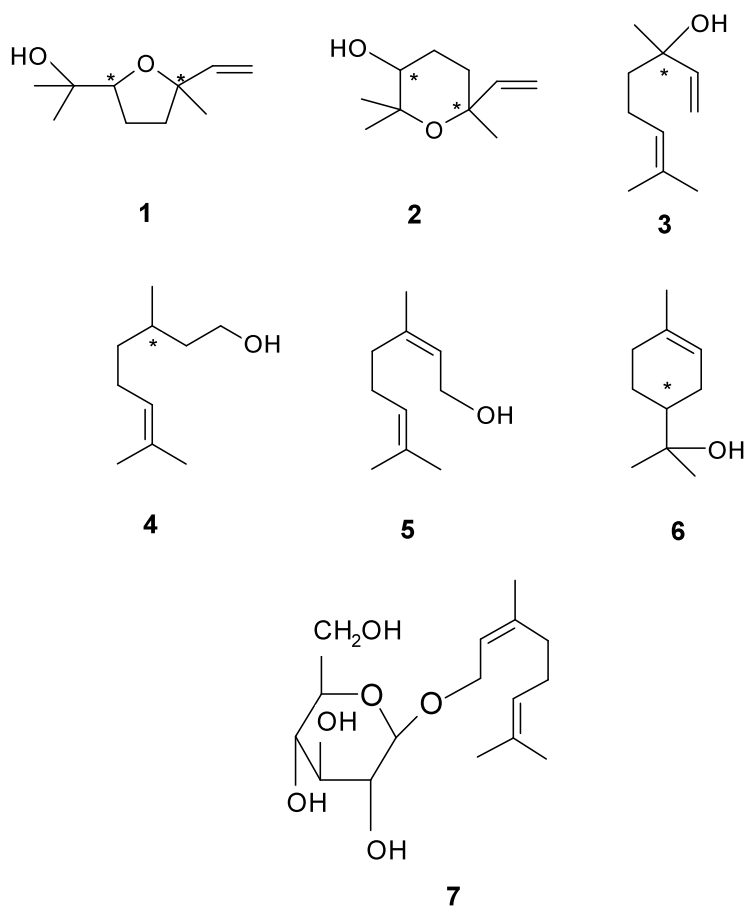


Figura 1.1. Principali terpenoli identificati nelle uve e nei vini. 1. furan linalolo ossido (*cis* e *trans*); 2. piran linalolo ossido (*cis* e *trans*); 3. linalolo; 4. citronello; 5. nerolo (*Z*) e geraniolo (*E*); 6. α -terpineolo; 7. nerolo- β -D-glucopiranoside (precursore in forma glicosilata).

1.4.1.2 NORISOPRENOIDI

Sono composti isoprenoidi a 13 atomi di carbonio (C₁₃) che presentano soglie olfattive molto basse. Sono termodinamicamente piuttosto stabili, perché sono i prodotti finali della trasformazione dei loro precursori presenti nell'uva. Derivano dalla degradazione dei carotenoidi (β -carotene, luteina, 5,6-epossiluteina, neoxanthina), costituenti comuni di molte piante.

Studi recenti hanno dimostrato che i composti C₁₃ identificati fino ad ora, non sono costituenti propri del frutto, ma derivano da altre forme meno volatili o non volatili, quali ad esempio: a) agliconi meno volatili che sono intermedi della formazione di potenti forme aromatiche; b) composti glicosilati altamente o moderatamente polari. La maggioranza di questi progenitori si accumulano nel frutto come glicosidi.

Il contributo organolettico dei norisoprenoidi è molto importante. Tra i più rappresentativi troviamo i vitispirani (odore di canfora, eucalipto), β -damascone (odore di rosa) β -damascenone (nota floreale, miele). Quest'ultimo ha una soglia olfattiva di 2 ng/l in acqua, che lo rende, uno dei più potenti aromi.

Esistono anche dei precursori di norisoprenoidi, quali ad esempio 3-oxo- α -ionolo, vomifoliolo, 3-idrossi- β -damascone, 7,8-diidrovomifoliolo, che in ambiente acido possono venire degradati a composti odorosi (strutture in Figura 1.2).

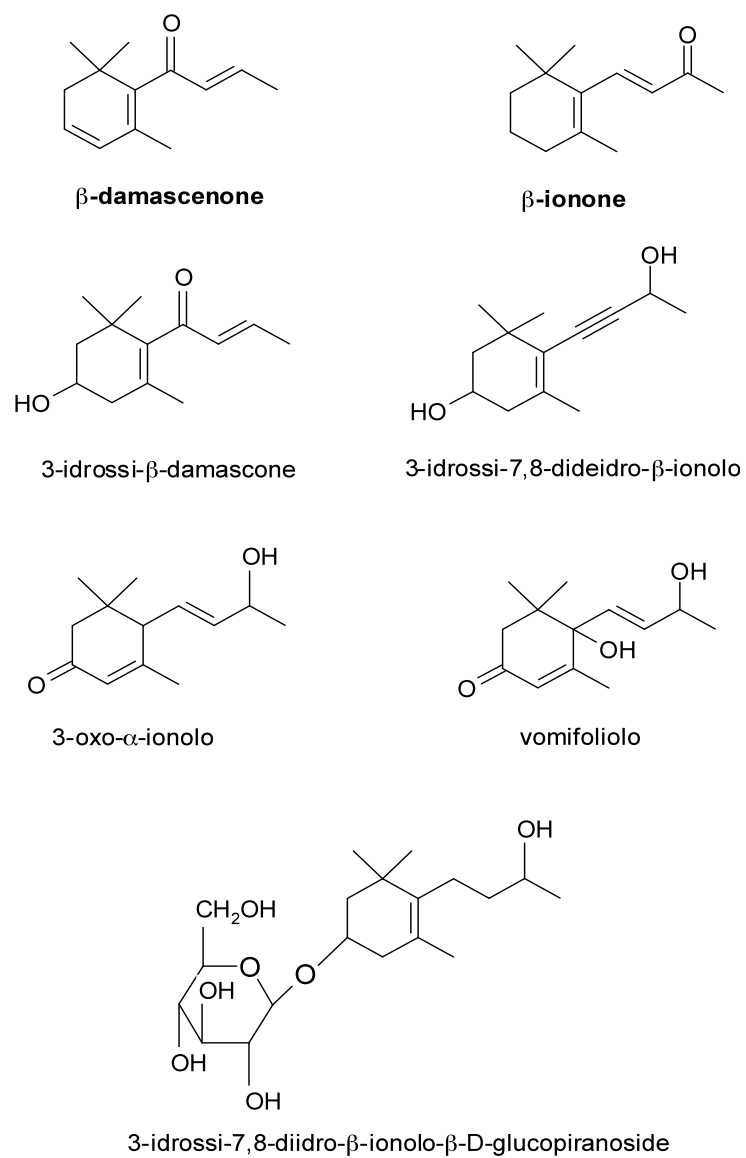


Figura 1.2. Principali norisoprenoidi identificati nelle uve e nei vini.

1.4.1.3 COMPOSTI BENZENOIDI

La biosintesi dei benzenoidi (Figura 1.3) è legata a quella dei composti fenolici e delle lignine e risulta legata alla varietà. Alla classe dei benzenoidi fanno parte composti aventi come caratteristica comune un anello benzenico. Si possono suddividere in composti con anello benzenico non sostituito (alcol benzilico, β -feniletanolo), composti con un ossidrile legato all'anello (salicilato di metile, 4-idrossibenzaldeide), composti con due ossidrili (derivati dell'acido salicilico), composti con un gruppo funzionale guaiacolo (vanillina, acetovanillone, alcol vanillico), composti aventi sull'anello benzenico un ossidrile e due metossili (siringaldeide, acetosiringone) (Di Stefano, 1996).

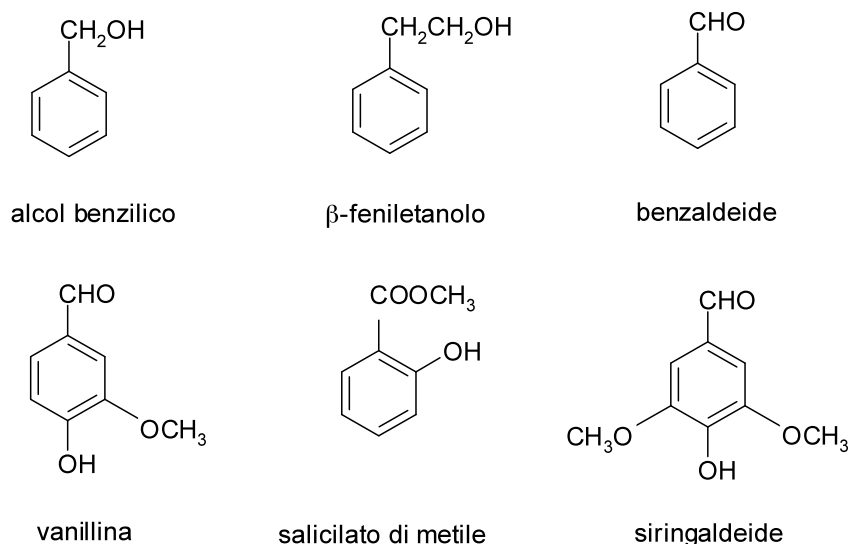


Figura 1.3. Principali composti benzenoidi identificati nelle uve e nei vini.

1.4.2 I COMPOSTI DI FERMENTAZIONE DELLE VINACCE

Sono quei composti che si formano nel corso della fermentazione alcolica ad opera dei lieviti, e da altri processi batterici che intervengono in fase fermentativa o di stoccaggio delle vinacce (es. fermentazione malolattica), principalmente costituiti da alcoli ed esteri metilici, etilici, acetati (Flamini *et al.*, 2002).

1.4.2.1 ALCOLI SUPERIORI

Gli alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio sono chiamati alcoli superiori. Sono prodotti dai lieviti, sia direttamente a partire dagli zuccheri, sia a partire dagli amminoacidi dell'uva per reazione di Ehrlich.

Diversi fattori possono influenzare la formazione di alcoli superiori: durata della macerazione (influenza la degradazione delle pectine), presenza di un substrato fermentabile (come fonte di azoto per lo sviluppo dei lieviti), tipo di lieviti, pH e temperatura che influenzano il numero ed il tipo di lieviti (Silva *et al.*, 2000).

A differenza dell'etanolo, che è l'alcol maggiormente presente nella grappa ma che fornisce uno scarso contributo all'aroma del distillato, gli alcoli superiori sono presenti in basse quantità, ma sono responsabili delle più complesse e particolari sfumature aromatiche (Silva *et al.*, 2000). A causa della loro volatilità si ritrovano anche nei distillati, dove contribuiscono alla formazione dei caratteri aromatici specifici (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

I più importanti alcoli superiori sono: 2 e 3-metil-1-butanolo (alcoli isoamilici), 2-metil-1-propanolo (isobutanolo), 2-fenil-etanolo (β -feniletanolo). Oltre a questi, presenti a più basse concentrazioni, troviamo: 1-propanolo, 1-butanolo, 2-butanolo, 1-esanolo, *cis*-3-esenolo, *trans*-2-esenolo (Silva *et al.*, 2000).

L'apporto dato dagli alcoli superiori è giudicato "alcolico", "aromatico" e da taluni persino "piacente".

1.4.2.2 ALDEIDI E CHETONI

La loro formazione dipende dal tipo di lievito, composizione nutritiva, temperatura e pH di fermentazione alcolica, presenza o meno di anidride solforosa.

Nella vinaccia sono presenti molti composti carbonilici differenti, quelli presenti in livelli quantitativamente maggiori sono acetaldeide, diacetile e acetoino (Flamini *et al.*, 2005).

L'acetaldeide (o etanale) è l'aldeide quantitativamente più abbondante ed è prodotta dai lieviti durante la fermentazione alcolica o può provenire da processi di ossidazione a carico dell'etanolo. È chimicamente molto reattiva e non dovrebbe essere presente nei distillati sopra i 100-150 mg/ml alcol anidro, limite oltre il quale conferisce uno spiccato e sgradevole odore pungente (Versini e Margheri, 1979; Silva *et al.*, 2008).

Il diacetile (2-3-butandione) e l'acetoino (3-idrossi-2-butanone) sono due chetoni e possono essere indicatori di attività batteriche a carico delle vinacce (Silva *et al.*, 2008).

Oltre a questi importanti composti, nei distillati sono presenti altre aldeidi in concentrazioni più basse, quali 2-butanale, propanale, 2-metil-propanale, idrossi-etil-furfurale ed esanale (Flamini *et al.*, 2005).

1.4.2.3 ACETALI

Le aldeidi possono reagire con l'etanolo e formare acetali. In questo modo si riduce il contenuto di aldeidi libere. L'acetale più abbondante nei distillati è il 1,1-dietossietano.

1.4.2.4 ACIDI CARBOSSILICI

Si formano prevalentemente con la fermentazione alcolica e durante l'insilamento e comprendono acidi carbossilici volatili ed acidi grassi.

Il più importante è l'acido acetico, che rappresenta il 90% dell'acidità totale. Seguono gli acidi caprilico, caprinico, caprico e laurico, prodotti dai lieviti nel metabolismo dei carboidrati. Acidi presenti in minori concentrazioni sono formico, propionico, butirrico,

isobutirrico, , undecanoico, miristico, valerico, isovalerico, 2-metil-butirrico e pelargonico (Silva *et al.*, 2008).

Gli acidi grassi a catena corta hanno un odore sgradevole, simile al burro rancido e al formaggio putrido; quindi, se presenti in concentrazioni elevate, sono indicatori della scarsa qualità della vinaccia.

1.4.2.5 ESTERI

Gli esteri sono originati dalla reazione tra una funzione alcolica con una funzione acida, con eliminazione di una molecola d'acqua (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

Nell'ambito della classe degli esteri si possono distinguere, ai fini organolettici, tre gruppi.

Il primo è costituito dagli esteri più volatili, quali formiati di etile e di metile, gli acetati di metile e di etile ed il propinato di etile. Fra questi spiccano in concentrazione soprattutto l'acetato di etile e secondariamente l'acetato di metile ed il propinato di metile, che manifestano, ai limiti di percezione organolettica, un odore da solvente e da fruttato leggero non ben definibile. La quantità di acetato di etile, formato da batteri acetici, dipende dalla quantità di acido acetico presente e dalla presenza di microrganismi aerobi.

Il secondo gruppo è costituito da quasi tutti gli altri esteri che seguono in scala crescente di peso molecolare, i principali sono gli acetati di isobutile, isoamile e di esile, gli esteri etilici degli acidi butirrico, capronico e caprilico, tutti a nota fruttata del tipo mela, pera, banana, gli esteri etilici degli acidi caprico e laurico e, anche se in concentrazione relativamente bassa, quelli metilici, isobutilici ed isoamilici degli acidi caprinico, caprilico e laurico con odore di frutta esotica. In questo gruppo si ritrovano i composti con gli odori più fini e soglie di percezione bassissime. Gli esteri etilici di acidi grassi sono probabilmente il gruppo di composti aromatici di più grande impatto organolettico. L'acetato di etile, se unito agli esteri del secondo gruppo, può diversificare il suo odore o attenuare gli altri. Quindi se non oltrepassa la soglia di sgradevolezza (150–200 mg/100 ml di alcol anidro) può essere utile ad equilibrare o attenuare altri odori troppo intesi o a nota troppo spiccata (Versini e Margheri, 1979).

Il terzo gruppo può raggruppare soprattutto gli esteri etilici degli acidi grassi a peso molecolare ancora più elevato cioè dal miristico al linoleico. Tali composti hanno sensazione oleosa, rancida e sgradevole (Versini e Margheri, 1979).

Il lattato di etile, tradizionalmente associato, con il 2-butanolo, alla presenza di attacchi batterici, non deve superare la soglia di 150 mg/100 ml di alcol anidro, oltre questo limite il suo odore melenso, lattico e di lampone diventa stucchevole (Versini e Margheri, 1979). La determinazione quantitativa di acetato e lattato di etile, unita a quella dell'acetaldeide, fornisce importanti informazioni sulle caratteristiche organolettiche e sulla qualità del distillato (Gabri e Salvagiotto, 1980).

1.5 METANOLO

Le sostanze pectiche presenti nelle vinacce sono costituite da lunghe catene lineari di acido galatturonico la cui funzione acida è in parte libera ed in parte esterificata con alcol metilico (De Rosa e Castagner, 1994). Sia per azioni legate ad attività enzimatiche specifiche (particolarmente per azione della pectinmetilesterasi soprattutto durante il periodo di insilaggio), sia per l'azione della temperatura di distillazione, una frazione di pectine viene idrolizzata liberando alcol metilico. La reazione nelle vinacce è facilitata dal valore di pH elevato, e dalla temperatura di fermentazione spesso superiore a 30 °C. La quantità di alcol metilico liberata è legata al vitigno di appartenenza e al tipo di lavorazione dell'uva in cantina. La liberazione di metanolo è rapida quasi quanto la fermentazione alcolica, per cui dopo una quindicina di giorni di permanenza nei silos di fermentazione, le vinacce, pervenute vergini alla distilleria, oltre ad avere già trasformato il 95% degli zuccheri originari, hanno già sviluppato circa l'85% del metanolo totale che si riscontra dopo 30 giorni di insilamento.

Il modo migliore per contenere il livello di metanolo nelle vinacce entro valori normali è quello di ottenere vinacce più umide, possibilmente con valori di alcol etilico svolto o da svolgere vicini a 5 gradi alcolici (De Rosa e Castagner, 1994).

Il tenore massimo legale di metanolo nel distillato è fissato dalla legislazione europea in 1000 g/hl di alcole a 100 % vol (Regolamento CE n. 110/2008). Per portare il distillato al di sotto di questo valore viene utilizzata la colonna demetilante con un elevato numero di piatti di gorgogliamento che permette di concentrare l'alcol metilico in testa alla colonna in modo da ottenere nella caldaietta di base una grappa con il minor contenuto possibile di metanolo (De Rosa e Castagner, 1994).

1.6 GASCROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA PER L'ANALISI DEGLI AROMI

Per identificare e quantificare gli aromi presenti nei distillati e negli estratti che sono stati preparati, è stata utilizzata la tecnica di gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC/MS), una metodica analitica utilizzata per separare ed identificare i composti volatili presenti nel campione (Figura 1.4).

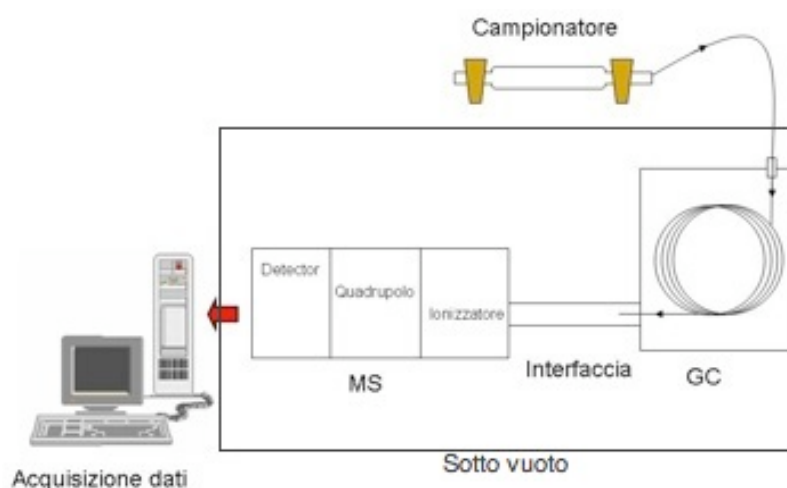


Figura 1.4. Schema di un sistema di gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC/MS) (da <http://www.pa.ingv.it/laboratori/gasmassa/gasmassa.html>).

La gascromatografia

Il gascromatografo è uno strumento utilizzato per l'analisi dei campioni in fase gassosa ed è sostanzialmente costituito da:

- 1) Bombola di gas di trasporto (He , H_2 , N_2) con regolatore di portata
- 2) Valvola fine per il controllo dell'ordine di grandezza del flusso del gas
- 3) Dispositivo di controllo della costanza del flusso contenente il flussimetro, uno strumento che consente la misurazione micrometrica e continua del flusso del gas di trasporto
- 4) Sistema di iniezione. Per le nostre analisi è stato utilizzato un iniettore costituito da una microsiringa che preleva il campione (qualche microlitro) e lo inietta in una camera di vaporizzazione percorsa dal gas di trasporto (liner). Tale camera si può trovare a

temperature comprese tra 150 e 300 °C ed è separata dall'esterno da un setto di gomma siliconica, che viene forato dall'ago della microsiringa al momento dell'iniezione e che si richiude ermeticamente appena viene estratto l'ago, evitando così la fuoriuscita del campione vaporizzato. La sostanza iniettata subisce una vaporizzazione istantanea e viene subito trasportato dal gas carrier all'interno della colonna.

5) Colonna gascromatografica. La sua funzione è quella di separare i vari composti già vaporizzati nell'iniettore al fine di poterli rivelare singolarmente.

6) Camera termostatica della colonna: serve a portare la colonna alla temperatura desiderata. Deve essere il più uniforme e precisa possibile per garantire l'affidabilità dei tempi di ritenzione.

7) Rivelatore. Ha la funzione di rivelare i singoli composti che, frazionati previamente dalla colonna, pervengono al suo interno. Ne esistono diversi tipi, a seconda dei principi di funzionamento; nel nostro caso è stato utilizzato uno spettrometro di massa ad impatto elettronico.

Mentre il gas di trasporto fluisce continuamente dal vaporizzatore al rivelatore, la miscela da analizzare, costituita ad esempio dai componenti A, B e C viene introdotta nel dispositivo mediante il sistema di iniezione (microsiringa). Iniettata nel vaporizzatore la miscela vaporizza immediatamente e viene trasportata dal gas eluente attraverso la colonna e quindi al rivelatore. Quest'ultimo inizialmente rivela il solo passaggio del gas eluente, poiché i componenti della miscela vengono diversamente trattenuti dalla fase stazionaria della colonna, e emergeranno da questa ad intervalli di tempo diversi, cioè in tempi tanto più brevi quanto meno fortemente sono trattenuti dai materiali che costituiscono la fase fissa della colonna. Se il componente A viene trattenuto più labilmente, esso sarà il primo ad uscire e pertanto, dopo un certo intervallo di tempo dall'introduzione della miscela in esame, il rivelatore darà un segnale che sarà direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza A nel gas che fluisce attualmente nel rivelatore; cioè segnala che in un certo tempo esce dalla colonna una determinata sostanza A mescolata, in una certa concentrazione, al gas di trasporto. Questo segnale, amplificato e inviato ad un apparecchio di registrazione (PC), viene riportato in funzione del tempo. Viene così registrato automaticamente un grafico (cromatogramma) portante in ordinate la risposta del rivelatore, direttamente proporzionale alla concentrazione e in ascisse il tempo, quest'ultimo misurato dall'istante di iniezione.

Dopo un certo tempo passerà B e infine C in ordine alla relativa adsorbità o solubilità nella fase fissa e il rivelatore segnalerà ancora con appositi segnali il loro passaggio (Garoglio, 1973; De Rosa e Castagner, 1994).

La spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata per analisi qualitative e quantitative di sostanze presenti in tracce o a concentrazioni molto basse in miscele complesse. Permette di determinare la struttura ed identificare composti incogniti, e di determinare la concentrazione di composti noti in soluzioni complesse. Una molecola neutra sottoposta a ionizzazione in fase gassosa, produce ioni e frammenti che vengono opportunamente separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z) e vengono raccolti da un rivelatore, nel quale generano un segnale elettrico proporzionale alla loro quantità. Un calcolatore permette di convertire questi segnali elettrici in uno spettro di massa in cui sono riportate le abbondanze ioniche in funzione del rapporto massa/carica e attraverso il quale è possibile stabilire la natura e la concentrazione del composto preso in esame.

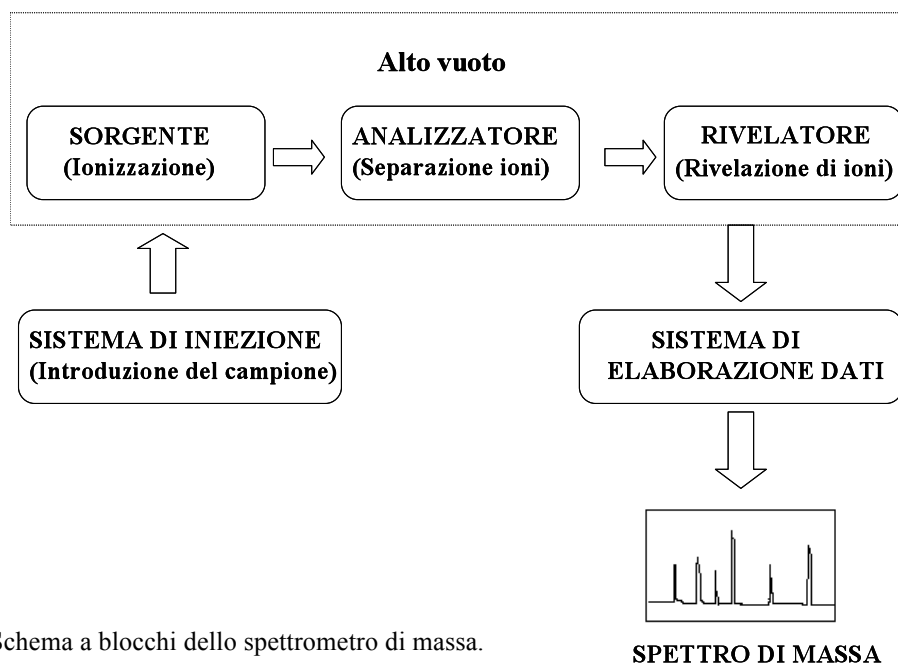


Figura 1.5. Schema a blocchi dello spettrometro di massa.

La massa molecolare (m) viene espressa utilizzando come unità di misura il Dalton (Da), che è convenzionalmente definito come la dodicesima parte della massa di un atomo di carbonio 12 (^{12}C), mentre la carica di uno ione (z) viene misurata utilizzando come unità di riferimento la carica elementare posseduta da un singolo elettrone o protone. Il rapporto massa/carica è quindi espresso in termini di Dalton per unità elementare di carica. Nella maggior parte dei casi gli ioni hanno una sola carica e quindi il rapporto m/z è numericamente uguale alla massa espressa in Da.

Il campione, che può essere un gas, un liquido o un solido, viene introdotto mediante un opportuno sistema di introduzione, in una camera sottovuoto ad elevata temperatura, ove viene vaporizzato o sublimato in fase gassosa (Figura 1.5). Successivamente il campione passa nella sorgente ionica a ionizzazione elettronica (EI), ove viene bombardato da un fascio di elettroni con un'energia di 70 eV, molto maggiore delle energie dei legami chimici (solitamente dell'ordine di 5-10 eV), così da provocare oltre alla ionizzazione della molecola, anche la rottura di alcuni legami e quindi la scissione della molecola originaria in frammenti più piccoli. Gli ioni positivi, che sono quelli maggiormente prodotti, vengono guidati nell'analizzatore mantenendo la sorgente ionica ad un potenziale positivo rispetto a quello dell'analizzatore, e focalizzando il fascio ionico mediante opportuni potenziali applicati a un sistema di lenti situate tra la sorgente e l'analizzatore.

L'analizzatore, chiamato filtro di massa a quadrupolo, è costituito da quattro barre metalliche disposte parallelamente. Alle barre è applicata una corrente continua e quelle disposte diagonalmente hanno lo stesso potenziale; a questa corrente è sovrapposto un potenziale di corrente alternata a radiofrequenza. In questa maniera gli ioni saranno tenuti al centro del quadrupolo dal potenziale di corrente continua e dovranno percorrere una traiettoria oscillante per la corrente alternata a radiofrequenza.

Per ogni valore di m/z il percorso dello ione è unico e dipendente dal potenziale. Solo gli ioni con m/z adeguato alla radiofrequenza riescono ad attraversare l'analizzatore, gli altri entrano in oscillazione instabile e urtano contro le barre. Questo consente di selezionare un particolare ione, oppure di effettuare la scansione nel campo delle masse tramite la variazione sistematica del potenziale di questi campi.

Il rivelatore è un tubo fotomoltiplicatore, ovvero un moltiplicatore elettronico che amplifica la debolissima corrente prodotta dagli ioni in uscita dall'analizzatore. I segnali ottenuti in questo modo vengono trasmessi ad un calcolatore annesso al rivelatore, in

grado, con l'opportuno software, di rappresentare l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa che è lo spettro di massa finale.

Il calcolatore permette di gestire l'elevata quantità di dati attraverso sistemi di elaborazione dei dati stessi (data system), in cui sono inclusi programmi utili per l'analisi quantitativa, per l'interpretazione degli spettri e per l'identificazione dei composti mediante ricerca in banche dati di spettri (biblioteche) in modo da poter automatizzare l'identificazione dei composti in base al loro spettro ed alle condizioni operative in cui è stata condotta l'analisi.

La sorgente ionica, l'analizzatore ed il rivelatore sono collocati in una camera ad alto vuoto, necessario affinché la ionizzazione/frammentazione avvenga a carico del campione in uscita dalla colonna cromatografia e non del gas atmosferico eventualmente presente.

Nel caso dell'analisi dei composti volatili dell'uva si lavora con estratti costituiti da matrici complesse. È quindi necessario procedere ad una separazione dei vari componenti della matrice prima di effettuare l'analisi al fine di evitare la sovrapposizione degli spettri di frammentazione di composti presenti contemporaneamente nella sorgente. A questo scopo, si suole abbinare la spettrometria di massa a tecniche separative quali la gascromatografia (GC). In questa tecnica analitica il campione viene portato in fase vapore, trascinato da un gas di trasporto attraverso una colonna cromatografia nei confronti della quale i costituenti della campione hanno diversa affinità; essi sono quindi separati ed eluiti in tempi diversi. Inoltre, mediante variazioni programmate di temperatura del forno della colonna e di pressione del gas di trasporto si ottiene una ulteriore separazione dei vari costituenti del campione. In questa maniera i singoli composti in fase vapore arrivano in tempi successivi allo spettrometro di massa, posto in uscita della colonna gascromatografica.

Al termine dell'analisi si possono ottenere, per ogni singola scansione, spettri di massa, costituiti da diagrammi dell'abbondanza ionica in funzione del rapporto m/z di ogni ione e dei rispettivi frammenti. Questi spettri sono riuniti e rappresentati nel cromatogramma di corrente ionica totale (TIC), costituito dalla somma dell'abbondanza dei vari ioni in ciascuna scansione in funzione del tempo di ritenzione. Ogni piccolo cromatografico presente sul TIC rappresenta un composto eluito, che può essere identificato dall'interpretazione del relativo spettro di massa.

La peculiarità della spettrometria di massa consiste nella possibilità di identificare i composti eluiti dal GC grazie al confronto con le banche dati degli spettri di frammentazione delle molecole consultabile per l'identificazione, essendo gli spettri di

frammentazione estremamente riproducibili se ottenuti con la stessa energia di ionizzazione. Si può in questo modo effettuare l'analisi qualitativa senza dover ricorrere a composti standard che tra l'altro non sono sempre disponibili in commercio.

Dal cromatogramma, oltre alla identificazione del composto, è possibile stimare anche la sua concentrazione esprimendola (ad es.) in mg/l di standard interno, mediante il confronto tra l'area del composto in esame e l'area dello standard interno con la seguente proporzione:

$$A_{SI} : C_{SI} = A_X : C_X ; C_X = C_{SI} * A_X/A_{SI}$$

dove:

A_{SI} = Area dello standard interno

A_X = Area del composto in esame

C_{SI} = Concentrazione dello standard interno

C_X = Concentrazione del composto in esame

Un metodo più accurato per determinare la concentrazione di un composto è mediante la retta di calibrazione calcolata con l'analisi di soluzioni di analita a concentrazioni note. La retta è calcolata sul rapporto tra le aree del picco cromatografico dell'analita e dello standard interno (asse delle ordinate) contro il rapporto tra le concentrazioni dell'analita e dello standard interno (asse delle ascisse) (figura 1.6).

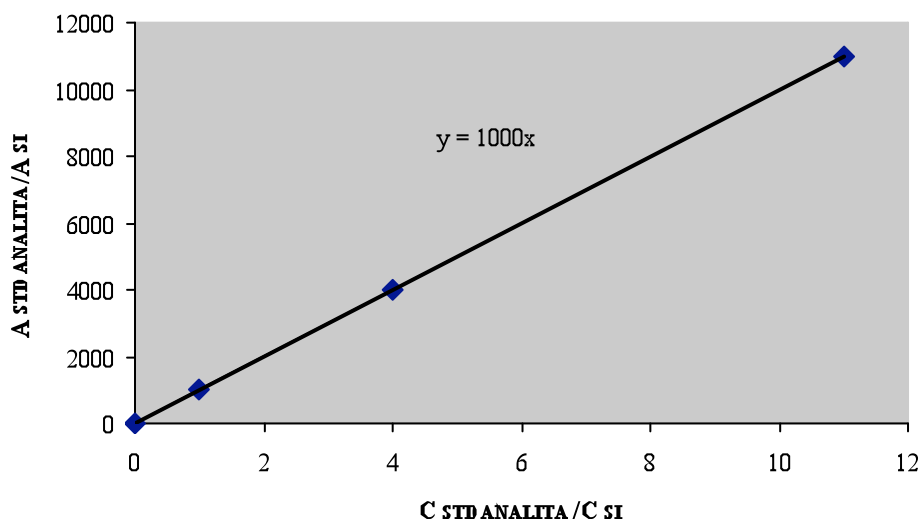


Figura 1.6. Retta di calibrazione.

L'equazione della retta è la seguente:

$$A_{\text{STD ANALITA}}/A_{\text{SI}} = K * C_{\text{STD ANALITA}}/C_{\text{SI}}$$

dove:

A_{SI} = Area del picco cromatografico dello standard interno

$A_{\text{STD ANALITA}}$ = Area del picco cromatografico dell'analita nelle soluzioni standard

C_{SI} = Concentrazione dello standard interno introdotto alla stessa concentrazione nelle diverse soluzioni standard di analita

$C_{\text{STD ANALITA}}$ = Concentrazione dell'analita nelle soluzioni standard

K = Fattore di risposta cromatografico

In questo modo è possibile calcolare il fattore di risposta cromatografico che verrà utilizzato per il calcolo della concentrazione incognita del composto da determinare nel campione:

$$C_x = (A_x / A_{\text{SI}}) * (C_{\text{SI}} / K)$$

dove:

A_x = Area del picco cromatografico dell'analita

C_x = Concentrazione incognita dell'analita

2. SCOPO DELLA TESI

Scopo principale della ricerca è il miglioramento della qualità della grappa Prosecco, una varietà semi-aromatica caratterizzata da rilevanti contenuti di aromi in particolare a livello delle bucce. Questo obiettivo è perseguito evidenziando la tipicità legata alla componente varietale, con lo studio del potenziale aromatico delle vinacce e degli effetti che possono avere procedure diverse, attuate in fase di distillazione delle vinacce, sul profilo aromatico del distillato.

È studiato l'utilizzo della purea di vinaccia per produrre il distillato, individuando i processi di estrazione che maggiormente arricchiscono la frazione volatile dei composti varietali e che riducono i composti potenzialmente legati a caratteristiche organolettiche negative. Dopo la fermentazione, una parte della purea di vinaccia è aggiunta di un enzima glicosidasico, ed un'altra di una soluzione idroalcolica al 60% e le due tesi sono lasciate macerare per un tempo determinato prima della distillazione. Sui campioni di distillato sono studiati i composti volatili varietali e di fermentazione, e le principali aldeidi alifatiche responsabili di note erbacee. È inoltre determinato il profilo aromatico del distillato del fermentato d'uva, che viene assunto come riferimento, ed i parametri aromatici delle tesi sono confrontati con questo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI, REAGENTI E STRUMENTI DI LABORATORIO

- Vetreria da laboratorio
- Acido solforico (Romil – Pure Chemistry, Cambridge, England)
- Acido cloridrico 1:5 (Romil – Pure Chemistry, Cambridge, England)
- Diclorometano (Romil – Pure Chemistry, Cambridge, England)
- Metanolo (Romil – Pure Chemistry, Cambridge, England)
- 1-eptanolo 450.6 mg/l (Carlo Erba, Milano, Italy)
- 1-decanolo 176.4 mg/l (Carlo Erba, Milano, Italy)
- *o*-Cl benzaldeide 19.71 mg/l (Sigma Aldrich, Milano, Italy)
- *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilamina (PFBOA) (Fluka, Milano, Italy)
- Etere etilico (Romil – Pure Chemistry, Cambridge, England)
- Esano (Romil – Pure Chemistry, Cambridge, England)
- Isoottano (2,2,4-trimetilpentano) (J.T. Baker, The Netherlands)
- Sodio solfato anidro (AppliChem, Oldenburg, Germany)
- Sale NaCl (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany)
- Lieviti *Saccharomyces Cerevisiae* CHALLENGE EZferm (ESSECO s.r.l., San Martina Trecate, NO, Italy)
- Enzima pectolitico RAPIDASE AR 2000 (DSM Food Specialties B.V., Delft, The Netherlands)
- Sistema di purificazione acqua Elix 5™ (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Centrifuga 4235A (ALC International s.r.l., Milano, Italy)
- pHmetro pH 211 HANNA Instruments
- Elettrodo Foodtrode (Hamilton, Bonaduz, Switzerland)
- Bilancia elettronica PM4800 Deltarange® (Mettler Toledo, Novarate Milanese, MI, Italy)
- Bilancia elettronica di precisione A200S (Sartorius, Göttingen, Germany)
- Bilancia idrostatica (Gibertini Elettronica s.r.l., Novate, MI, Italy)
- Omogeneizzatore Ultra Turrax® T18 basic (IKA® Works INC., Wilmington, NC, USA)
- Pipetta Acura® 825 autoclavabile 20-200 µl (Socorex Isba S.A., Switzerland)

- Carta da filtro a fascia blu 42 (Whatman® Schleicher&Schuell, Whatman International Ltd, Maidstone, England)
- Isomantello Isopad Isomantle (Borehamwood Herts, England)
- Gascromatografo HP 5890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)
- Sistema di iniezione HP 6890 Series (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)
- Spettrometro di massa HP 5971 Series (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)
- Colonna capillare in silice fusa HP-Innowax in polietilenglicole (lunghezza 30 m x 0.25 mm diametro interno; spessore film 0.25 μm) (J&W Scientific, Agilent Technologies, Milano, Italy)

3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Lo studio è stato condotto su uve Prosecco clone Balbi, raccolte in un vigneto della zona di Fregona (TV) il giorno 22 settembre 2010 e portate in laboratorio lo stesso giorno. Con questo materiale sono stati preparati i diversi campioni che sono stati successivamente oggetto delle nostre analisi.

3.2.1 IL CAMPIONE DI FERMENTATO D'UVA

Il campione di uve, che rappresenta la base per il distillato d'uva, è stato preparato pigiando manualmente 6.2 kg di acini diraspati a mano. Il pH è stato portato a 3 acidificando la massa con una soluzione di acido solforico al 33%, in modo da favorire lo sviluppo di lieviti alcoligeni migliori anziché di altri blastomiceti non graditi, e garantire una buona protezione di tipo sanitario nella fase di inizio fermentazione quando il mosto, non avendo ancora la protezione della CO₂, è maggiormente esposto a fenomeni di ossidazione favorevoli alla flora batterica acetica e attacchi indesiderabili dei pericolosi batteri lattici (De Rosa e Castagner, 1994).

Per lo svolgimento della fermentazione alcolica sono stati inoculati 1.8 g di lieviti selezionati *Saccharomyces cerevisiae* seguendo il dosaggio indicato dal produttore. I lieviti sono stati pre-idratati in un beker da 100 ml aggiungendo acqua a 35 °C e dosi crescenti di mosto per farli ambientare; una volta iniziata la fermentazione, osservabile dalla produzione di anidride carbonica, sono stati inoculati alla massa.

La bacinella contenente il pigiato è stata quindi coperta e lasciata fermentare a temperatura ambiente (circa 20 °C), controllando l'andamento con misure periodiche del contenuto zuccherino che alla partenza era 17.4 Brix.

Terminata la fermentazione (dopo 7 giorni), il campione è stato ripartito omogeneamente in tre vasi di vetro che sono stati sigillati e congelati fino al momento della distillazione.

3.2.2 CAMPIONI DI PUREA DI VINACCIA

Il campione di purea è stato preparato partendo dalle stesse uve utilizzate per il campione di fermentato d'uva.

L'uva è stata diraspata, pigiata e sgrondata in distilleria e si sono ottenuti 2 kg circa di vinaccia umida. La preparazione di una massa omogenea di purea di vinaccia è stata ottenuta mediante sminuzzamento delle bucce e dispersione in un volume di acqua in misura del 29% in peso; inoltre è stata tolta la maggior parte dei vinaccioli per evitare che, durante la distillazione, rilascino oli che conferiscono aromi sgraditi al distillato. Il pH è stato portato a 3 acidificando la massa con una soluzione di acido solforico al 33%.

La fermentazione alcolica di questo campione è stata condotta da lieviti autoctoni. La massa è stata ripartita in due vasi di vetro chiusi con carta stagnola forata più volte con un ago e lasciata fermentare a temperatura ambiente (circa 20 °C) per i primi 3 giorni, poi messi in camera a 30 °C fino a fine fermentazione. Anche in questo caso la fermentazione è stata seguita con la misura del grado zuccherino. Dopo 5 giorni era terminata la fermentazione degli zuccheri ed i campioni sono stati congelati fino al momento della distillazione.

3.2.3 CAMPIONI DI PUREA DI VINACCIA TRATTATA CON ENZIMA GLICOSIDASICO

Due campioni di 100 g di purea di vinaccia fermentata sono stati addizionati ciascuno con 10 mg di enzima pectolitico RAPIDASE AR2000 con attività glicosidica secondaria derivato da *Aspergillus Niger*. L'enzima è stato solubilizzato in 30 ml di acqua deionizzata a 40 °C ed aggiunto alla purea posta in un pallone da 250 ml. I due palloni sono stati messi in stufa alla temperatura costante di 40 °C per 17 ore per mettere l'enzima nelle migliori condizioni di operare. Il giorno seguente sono state eseguite le distillazioni e misurato il grado alcolico dei distillati.

3.2.4 CAMPIONI DI PUREA DI VINACCIA ADDIZIONATA DI ETANOLO

A 100 g di purea di vinaccia fermentata posti nel pallone da 250 ml sono stati aggiunti 30 ml di soluzione idroalcolica al 60%. I due palloni così preparati sono stati chiusi e messi in stufa alla temperatura costante di 30 °C per 17 ore. La mattina seguente sono state eseguite le distillazioni e le misure del grado alcolico.

3.3 DISTILLAZIONI E MISURE DEL GRADO ALCOLICO

Per la preparazione del distillato d'uva si è proceduto come segue: in un pallone di vetro da 250 ml sono stati posti 100 g di fermentato d'uva e 30 ml di acqua deionizzata, quindi il pallone è stato messo in un bagno ad olio di silicone a 140 °C per circa 3 ore. Il distillato è stato raccolto in un matraccio da 100 ml. Per la misura della densità è stata utilizzata una bilancia idrostatica impiegando 100 ml circa di distillato a 20 °C ed usando le tabelle riportate da Miconi (2005) per la conversione della densità a grado alcolico. Il grado alcolico medio dei distillati d'uva era 8.7 % v/v.

Per la preparazione del distillato di purea di vinaccia, dopo aver scongelato i campioni fermentati si è proseguito nel lavoro di eliminazione dei vinaccioli iniziato prima della fermentazione alcolica e la massa è stata ulteriormente sminuzzata. I campioni sono stati quindi distillati come il campione di fermentato d'uva (100 g posti in un pallone da 250 ml ed addizionati di 30 ml di acqua deionizzata) e sono state misurate le gradazioni alcoliche dei distillati. Il grado alcolico medio dei distillati di purea di vinaccia era 7.6 % v/v.

3.4 ESTRAZIONE DELLA PUREA ESAUSTA

Sulla purea esausta dalla distillazione delle tre tesi studiate (tesi tal quale, tesi trattata con enzima glicosidasico e tesi macerata con etanolo prima della distillazione) è stata eseguita un'estrazione per indagare i composti aromatici rimasti nel residuo e non recuperati con la distillazione. I campioni sono stati analizzati in doppio.

Il campione è stato preparato misurando il peso effettivo della purea esausta contenuta nel pallone dopo la distillazione ed aggiungendo a questa la stessa quantità in peso di acqua deionizzata. Dopo aver agitato per 5 minuti, è stata eseguita una centrifugazione a 4500 giri/min per 10 minuti. Il surnatante è stato trasferito in un imbuto separatore in vetro da 250 ml, aggiunto di 200 µl di una soluzione idroalcolica al 50% di 1-decanolo 176.4 mg/l come standard interno e di 7 g di NaCl. I composti organici sono stati estratti con 20 ml di diclorometano per 3 volte successive (3x20 ml) e le fasi organiche riunite. La soluzione è stata disidratata mediante sodio solfato anidro (Na₂SO₄) che assorbe nel suo reticolo cristallino l'acqua presente nella soluzione, depositandosi sul fondo della beuta sotto forma di cristalli. L'estratto è stato filtrato su filtro di carta fascia blu 42 per eliminare il sodio solfato anidro e trasferito in un pallone da 100 ml. La soluzione ottenuta è stata concentrata a 3 ml con colonna Vigreux (lunghezza 40 cm) e portata a volume finale di 200 µl mediante flusso di azoto (N₂) prima dell'analisi gascromatografica.

3.5 ESTRAZIONE DEI DISTILLATI

3.5 a Estrazione dei composti varietali e di fermentazione

I distillati d'uva fermentata e di purea di vinaccia sono stati estratti mediante estrazione liquido-liquido per l'analisi gascromatografica. L'estrazione è stata eseguita seguendo la metodica proposta da Di Stefano (Di Stefano e Borsa, 2006) modificata per le nostre esigenze: in un matraccio da 25 ml sono stati posti 10 ml di distillato, a questi sono stati aggiunti 200 µl di una soluzione idroalcolica al 50% di 1-eptanolo 450.6 mg/l come standard interno e 1 g di NaCl. L'estrazione è stata eseguita mediante aggiunta di 0.5 ml di isoottano agitando vigorosamente per 1 minuto, poi si è aggiunta acqua deionizzata per portare la fase organica nel collo del matraccio dove questa è stata prelevata, trasferita su vial da 2 ml ed analizzata mediante GC/MS.

Prima dell'estrazione con isoottano i distillati delle puree trattate con etanolo (grado alcolico medio 32.7% v/v) sono stati diluiti in modo da portare la loro gradazione alcolica agli stessi valori degli altri distillati di purea di vinaccia e dei distillati d'uva fermentata.

3.5 b Estrazione dei composti carbonilici

Sui campioni di distillato di purea sono stati studiati i composti carbonilici mediante l'analisi GC/MS in modalità SCAN dei loro *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilamina derivati: 10 ml di distillato (8% v/v di etanolo) sono stati posti in un beker aperto sotto agitazione per 10 minuti per eliminare parte dell'acetaldeide, aggiustati a pH 3 mediante aggiunta di una goccia di HCl 1:5, aggiunti di 200 µl di *o*-clorobenzaldeide 19.71 mg/l come standard interno e 20 mg di PFBOA. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente i PFBOA derivati sono stati estratti con 3X2 ml di etere etilico/esano. Le fasi organiche sono state unite, anidificate con sodio solfato anidro e concentrate a 500 µl sotto flusso di azoto prima dell'analisi gascromatografica.

Le concentrazioni dei composti sono espresse in µg di *o*-clorobenzaldeide/100 ml di alcol anidro. I campioni sono stati analizzati in doppio.

3.6 ANALISI GC/MS

3.6a Analisi GC/MS dei composti volatili varietali e di fermentazione

Per le analisi si è utilizzato un sistema GC/MS della Hewlett-Packard (Palo Alto,CA,USA) costituito da un gascromatografo HP 5890 Series II, con sistema di iniezione HP 6890 Series Injector e come rivelatore uno spettrometro di massa HP 5971. Nel nostro caso è stata adottata un'iniezione di tipo "splitless", caratterizzata dalla completa introduzione in colonna del campione vaporizzato, idonea per l'analisi di componenti presenti in matrici complesse in concentrazioni basse. La colonna utilizzata era di tipo capillare, costituita da un sottilissimo tubo in silice fusa avvolto a spirale, lungo 30 metri e con diametro interno di 0.25 mm; sulla parete interna è applicato un film dello spessore di 0.25 µm che funge da materiale assorbente e consente la ripartizione del campione (fase stazionaria), offrendo un buon compromesso tra potere risolutivo e capacità di carico. Tale colonna permette di ottenere un'efficiente separazione dei composti presenti nel campione.

La colonna è posta all'interno una camera termostatica a temperatura programmabile, che permette di programmare delle rampe di temperatura crescente (compresa tra i 30 e 280 °C) che permettono di limitare inizialmente l'evaporazione dei composti alto-bollenti a vantaggio dei basso-bollenti, senza così creare ingolfamenti di composti.

Per le analisi degli estratti dei distillati è stato utilizzato il programma GRAPPA, mentre per le analisi degli estratti delle puree di vinaccia esauste si è applicato il programma AROMI2. In Tabella 3.1 sono riportate i parametri dei programmi utilizzati.

Parametro	Programma GRAPPA	Programma AROMI2
Temperatura iniettore	250 °C	230 °C
Temperatura transfer line	280 °C	280 °C
Modalità di iniezione	Splitless	Splitless
Volume campione iniettato	1 µl	1 µl
Gas carrier	He	He
Pressione in testa alla colonna	12 psi	12 psi
Programma della temperatura del forno	0.5 minuti a 32 °C, incremento di 30 °C/min fino a 60 °C, 2 minuti a 60 °C, incremento di 2°C/min fino a 160 °C, incremento di 3°C/min fino a 230 °C, 10 minuti a 230 °C.	1 minuto a 40 °C, incremento di 2 °C/min fino a 160 °C, incremento di 3 °C/min fino a 230 °C, 15 minuti a 230 °C.
Energia ionizzazione spettrometro di massa	70 eV	70 eV
Modalità e range di acquisizione spettri di massa	SCAN <i>m/z</i> 40-550	SCAN <i>m/z</i> 40-550
Tempo di analisi cromatografica	91.77 minuti	99.33 minuti

Tabella 3.6a. Parametri dei programmi utilizzati per le analisi dei composti volatili varietali e di fermentazione.

A ciascun picco del cromatogramma, corrisponde una sostanza con un determinato tempo di ritenzione cromatografica, che è stata identificata sulla base dello spettro di frammentazione.

L'identificazione dei composti è avvenuta per confronto dei tempi di ritenzione dei composti e mediante comparazione degli spettri di frammentazione con quelli della libreria NIST98 (Version 1.6) e della libreria ESTRATTI del Laboratorio Chimico CRA-VIT.

L'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando la seguente formula:

$$C_X = C_{SI} * A_X/A_{SI}$$

dove:

C_X = concentrazione del composto da quantificare

C_{SI} = concentrazione dello standard interno (nota)

A_X = area del picco del composto da quantificare

A_{SI} = area del picco dello standard interno (nota)

Gli estratti dei distillati sono stati quantificati in μg di 1-eptanolo/100 ml di alcol anidro, mentre gli estratti delle puree esauste sono stati quantificati in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di 1-decanolo.

3.6b Analisi GC/MS dei composti carbonilici

Per le analisi si è utilizzato lo stesso sistema GC/MS usato per l'analisi dei composti volatili e di fermentazione. In questo caso è stato utilizzato il programma ALDSCAN, i cui parametri sono riportati nella tabella 3.6b.

Parametro	Programma ALDSCAN
Temperatura iniettore	250 °C
Temperatura transfer line	280 °C
Modalità di iniezione	Splitless
Volume campione iniettato	1 μl
Gas carrier	He
Pressione in testa alla colonna	12 psi
Programma della temperatura del forno	5 minuto a 60 °C, incremento di 3 °C/min fino a 210 °C, 10 minuti a 210 °C
Energia ionizzazione spettrometro di massa	70 eV
Modalità e range di acquisizione spettri di massa	SCAN m/z 40-550
Tempo di analisi cromatografica	60 minuti

Tabella 3.6b. Parametri dei programmi utilizzati per le analisi dei composti carbonilici.

In seguito alla reazione di derivatizzazione con PFBOA si formano due isomeri geometrici *syn* ed *anti* per ogni composto carbonilico, e quattro di-ossime isomere per i composti dicarbonilici come il diacetile (Cancilla e Que Hee, 1992; Flamini *et al.*, 2005). Di conseguenza nel cromatogramma si trovano due picchi (corrispondenti agli isomeri Z ed E) per i composti monocarbonilici, mentre per il diacetile sono presenti tre segnali corrispondenti agli isomeri (Z,Z), (E,E), (Z,E)+(E,Z) relativi alle di-ossime (i due isomeri Z,E e E,Z si sovrappongono dando lo stesso segnale). I tempi di ritenzione cromatografici ed i segnali massa/carica (*m/z*) caratteristici dei composti studiati sono riportati nella Tabella 3.6c.

Composto	RT1 (min)	RT2 (min)	RT3 (min)	Segnali <i>m/z</i>
SI	50.30	51.11		300
esanale	28.26	28.67		239; 295
<i>trans</i> -2-esenale	33.70	34.17		250; 293
acetoino	39.91	41.72		240
benzaldeide	45.96	46.14		301
diacetile	46.10	48.13	50.51	476

Tabella 3.6c. Tempi di ritenzione cromatografici (RT) e segnali *m/z* caratteristici delle ossime dei composti studiati e dello standard interno *o*-clorobenzaldeide (SI).

Per la conferma identificativa degli analiti è stato utilizzato l'Extract Ion Chromatogram (EIC) sui segnali *m/z* 239 (relativo al riarrangiamento delle aldeidi alifatiche sature) e *m/z* 295 (relativo allo ione molecolare delle ossime corrispondenti) per l'esanale, *m/z* 250 (relativo al riarrangiamento delle aldeidi alifatiche insature) e *m/z* 293 (relativo allo ione molecolare delle ossime corrispondenti) per la *trans*-2-esenale. La conferma identificativa della benzaldeide e dell'*o*-clorobenzaldeide (SI) è stata ottenuta mediante EIC dello ione molecolare delle ossime a *m/z* 301 e 300 rispettivamente, e del segnale *m/z* 240 (corrispondente ad un frammento dell'ossima) per l'acetoino. La conferma identificativa del diacetile è stata ottenuta con l'EIC dello ione molecolare della di-ossima a *m/z* 476.

Per la quantificazione degli analiti è stata usata la stessa equazione utilizzata per l'estrazione dei composti volatili varietali e di fermentazione, e i risultati sono stati espressi in mg di *o*-clorobenzaldeide/100 ml di alcol anidro.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 STUDIO DEL PROFILO DEL DISTILLATO D'UVA PROSECCO

Nelle tabelle 4.1a e 4.1b sono riportati rispettivamente i principali composti volatili varietali e di fermentazione identificati del distillato di uva Prosecco Balbi vendemmia 2010. Nelle tabelle sono riportati i valori di due ripetizioni con le medie e semidisposizioni.

Composti volatili varietali	t _R (min)	Distillato d'uva 1	Distillato d'uva 2	Media Distillato d'uva
		µg/100 ml alcol anidro		
linalolo	22.96	614	621	617±4
α-terpineolo	30.70	93	470	281±189
citronellolo	34.98	165	211	188±23
geraniolo	39.29	263	310	287±24
actinidolo A	42.51	65	63	64±1
actinidolo B	43.17	93	109	101±8
farnesolo	62.00	1210	994	1102±108

Tabella 4.1a. Principali composti volatili varietali (espressi in µg di 1-eptanolo/100 ml di alcol anidro) nei distillati di uva di Prosecco Balbi. Sono riportati i valori di due ripetizioni, i contenuti medi e la semidisposizione.

Sotto il punto di vista dei composti varietali, il profilo del distillato d'uva ottenuto in laboratorio è risultato essere caratterizzato da importanti contenuti di linalolo (nota floreale di rosa) e di farnesolo, un alcol sesquiterpenico caratterizzato dalla fragranza di mugheretto con soglia di percezione di 20 ppb (Porretta, 2000). Il prodotto è inoltre caratterizzato dalla presenza, anche se in livelli più bassi, di altri terpenoli dalle note positive floreali quali geraniolo, α-terpineolo e citronellolo, e di actinidoli (nota di canfora, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). L'alta variabilità nei contenuti di α-terpineolo è probabilmente dovuta al fatto che questo composto si forma a partire da linalolo e geraniolo, (Usseglio-Tomasset e Di Stefano, 1980), e per ciclizzazione del nerolo (Di Stefano *et al.*, 1992). Infatti, distillando in corrente di vapore un omogeneizzato di uve di Moscato bianco del Piemonte, varietà particolarmente ricca di terpenoli, era già stata riscontrata la formazione di importanti quantità di α-terpineolo (Di Stefano, 1981).

Composti volatili di fermentazione	t _R (min)	Distillato d'uva 1	Distillato d'uva 2	Media distillato d'uva
		µg/100 ml alcol anidro		
esanale	4.48	150	123	136±13
acetati di isoamile	5.15	868	979	923±55
alcoli isoamilici	6.92	3622	6649	5135±1514
<i>trans</i> -2-esenale	7.45	183	125	154±29
capronato di etile	7.97	2270	2341	2305±36
acetato di esile	9.30	78	88	83±5
1-esanolo	12.56	377	453	415±38
caprilato di etile	16.64	8873	7615	8244±629
caprato di etile	27.85	9944	10344	10144±200
caprilato di isoamile	28.90	397	466	431±34
2-feniletilacetato	37.03	723	811	767±44
laurato di etile	39.07	2863	4607	3735±872
β-feniletanolo	42.06	1674	3637	2655±982
miristato di etile	49.57	123	602	362±239
acido caprilico	50.23	7681	8548	8115±434
palmitato di etile	58.86	1230	7268	4249±3019
acido caprinico	59.65	21267	20171	20719±548
oleato di etile	66.54	366	1643	1004±638
acido laurico	66.89	5235	6401	5818±583
linoleato di etile	67.97	1654	4176	2915±1261
linolenato di etile	69.93	1185	457	821±364
acido palmitico	78.74	8670	9363	9016±347

Tabella 4.1b. Principali composti volatili di fermentazione (espressi in µg di 1-eptanolo/100 ml di alcol anidro) nei distillati di uva di Prosecco Balbi. Sono riportati i valori di due ripetizioni, i contenuti medi e la semidispersione.

Tra i composti volatili di fermentazione, si osserva con la distillazione un recupero di rilevanti quantità di capronato, caprilato e caprato di etile (da 2 a 10 mg/100 ml a.a.), esteri dalle note positive fruttate (Versini e Margheri, 1979). Si riscontrano notevoli contenuti di β-feniletanolo (nota di rosa, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004), acetati di isoamile (circa 1 mg/100 ml a.a., nota di banana, mela, caramella inglese, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004) e 2-feniletilacetato (2.6 mg/100 ml a.a., nota di miele).

Il contenuto di esteri di acidi grassi a media catena risulta inferiore a quello dei distillati di pere Williams (compreso tra 0.3-2 mg/100 ml a.a.; Versini *et al.*, 1989), nelle grappe del Trentino (tra 2-20 mg/100 ml a.a.; Versini, 1978) e nel whiskey (0.2-1.4 mg/100 ml a.a.; Reazin, 1981).

Gli acetati di isoamile nel distillato d'uva Prosecco risultano paragonabili a quelli riportati in altri distillati (0.7 mg/100 ml a.a. nel distillato di pere Williams, 1.1 mg/100 ml a.a. nelle grappe del Trentino), mentre il contenuto di 2-feniletilacetato è inferiore a quello del distillato di pere Williams e del whiskey (0.17 mg/100 ml a.a.).

4.2 IL PROFILO DEL DISTILLATO DI PUREA DI VINACCIA PROSECCO TRATTATA CON ENZIMA ED ADDIZIONATA DI ETANOLO PRIMA DELLA DISTILLAZIONE

Nelle tabelle 4.2a e 4.2b sono riportati i contenuti dei composti volatili varietali e di fermentazione nella purea di vinaccia di uva Prosecco diversamente trattata prima della distillazione. Per ogni tesi sono riportati i dati di ciascuna ripetizione, i valori medi e le semidisersioni.

Composti volatili varietali	TQ 1	TQ 2	TQ media	EZ 1	EZ 2	EZ media	ET 1	ET 2	ET media
	µg/100 ml alcol anidro			µg/100 ml alcol anidro			µg/100 ml alcol anidro		
linalolo	2485	2179	2332±153	1626	1566	1596±30	1175	1318	1247±72
<i>trans</i> -ocimenolo	328	216	272±56	n.d.	197	99±99	n.d.	n.d.	n.d.
α-terpineolo	505	410	457±48	362	366	364±2	145	67	106±39
citronellolo	823	833	828±5	762	671	716±45	338	846	592±254
nerolo	343	284	313±30	278	287	282±5	n.d.	135	67±67
acido geranico	1275	1061	1168±107	935	758	847±89	483	675	579±96
farnesolo	1029	968	999±31	728	984	856±128	821	675	748±73
geraniolo	1407	1107	1257±150	1130	1111	1120±10	1106	1025	1065±40
actinidolo A	144	114	129±15	107	171	139±32	n.d.	n.d.	n.d.
actinidolo B	185	190	187±2	154	270	212±58	n.d.	n.d.	n.d.

Tabella 4.2a. Contenuti di composti volatili varietali (espressi in µg di 1-eptanolo/100 ml di alcol anidro) identificati nei distillati di purea di vinaccia di Prosecco Balbi. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni macerati con una soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione. Per ciascuna tesi sono riportati i dati di due ripetizioni, i valori medi e le semidisersioni.

Durante il processo di distillazione a causa delle alte temperature viene favorita la formazione di nuove sostanze dovute soprattutto a reazioni di idrolisi (Di Stefano, 1986) ed una parziale liberazione di agliconi (Flamini *et al.*, 2002).

Nelle tre tesi i contenuti medi di geraniolo (nota di rosa) risultano paragonabili, mentre i contenuti medi di linalolo, α-terpineolo, acido geranico, *trans*-ocimenolo risultano maggiori nel distillato di purea tal quale. Inoltre, nel distillato di purea lasciata macerare 17 ore con la soluzione di etanolo prima della distillazione, non è stata riscontrata la presenza degli actinidoli.

Composti volatili di fermentazione	TQ 1	TQ 2	TQ media	EZ 1	EZ 2	EZ media	ET 1	ET 2	ET media
	µg/100 ml alcol anidro			µg/100 ml alcol anidro			µg/100 ml alcol anidro		
esanale	573	770	672±98	541	466	503±38	714	749	731±17
<i>trans</i> -2-esenale	740	738	739±1	578	358	468±110	725	667	696±29
1-esanolo	2436	2143	2289±147	2455	2021	2238±217	2257	1856	2056±201
acetati di isoamile	1152	878	1015±137	716	563	640±77	530	619	574±44
alcoli isoamilici	6043	4214	5128±915	4735	4250	4493±242	5090	3288	4189±901
capronato di etile	3117	2327	2722±395	1634	1013	1324±310	1601	1546	1574±27
acetato di esile	377	239	308±69	102	n.d.	51±51	n.d.	n.d.	n.d.
caprilato di etile	13317	5704	9510±3806	8745	2405	5575±3170	3351	2751	3051±300
caprato di etile	12111	5033	8572±3539	7839	2382	5110±2729	2269	2116	2192±76
2-feniletilacetato	1304	1044	1174±130	623	545	584±39	749	700	724±24
laurato di etile	2784	2944	2864±80	1929	2537	2233±304	2223	2149	2186±37
β-feniletanolo	4122	2908	3515±607	4160	3850	4005±155	3236	2246	2741±495
miristato di etile	196	360	278±82	161	390	275±114	1635	651	1143±492
acido caprilico	8376	7815	8095±281	9051	8188	8619±432	5412	3662	4537±875
palmitato di etile	3161	4015	3588±427	1852	4290	3071±1219	10076	10987	10532±455
acido caprinico	25570	23463	24516±1054	21180	21818	21499±319	16099	15105	15602±497
oleato di etile	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1492	746±746	338	1335	836±498
acido laurico	10783	8544	9663±1119	6842	7153	6998±156	2850	5160	4005±1155
linoleato di etile	4788	11371	8080±3291	3551	6961	5256±1705	19036	22137	20586±1551
linolenato di etile	884	2236	1560±676	1691	3108	2399±709	2850	3508	3179±329
acido miristico	970	1688	1329±359	603	1345	974±371	1159	877	1018±141
acido palmitico	6484	5897	6191±294	8272	19902	14087±5815	29642	22105	25873±3769

Tabella 4.2b. Contenuti dei principali composti volatili di fermentazione (espressi in µg di 1-eptanolo/100 ml di alcol anidro) nei distillati di purea di vinaccia di Prosecco Balbi. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione. Per ciascuna tesi sono riportati i dati di due ripetizioni, i valori medi e le semidispersioni.

Anche i contenuti di esteri quali acetati di isoamile (nota di banana, Versini e Margheri, 1979), acetato di esile (nota di pera, Versini e Margheri, 1979) e 2-feniletilacetato (nota di miele) risultano superiori nelle tesi tal quale rispetto alle altre due. Il β-feniletanolo (nota di rosa) recuperato con la distillazione risulta inferiore nella tesi macerata in etanolo. Il distillato di purea trattato con etanolo risulta caratterizzato da più elevati contenuti di esteri etilici di acidi grassi a lunga catena quali miristato, palmitato, linoleato e linolenato di etile. L'andamento dei contenuti medi degli acidi caprilico, caprinico e laurico è analogo a quello osservato per rispettivi esteri etilici (es. la tesi che presenta un contenuto elevato di acido laurico ha anche un contenuto elevato di laurato di etile).

In generale le variabilità riscontrate tra le due ripetizioni sono dovute alla non omogeneità della vinacce campionate per preparare i campioni di purea.

4.3 CONFRONTO DEL PROFILO DEI DISTILLATI DI PUREA DI VINACCIA PROSECCO TRATTATA CON ENZIMA ED ADDIZIONATA DI ETANOLO PRIMA DELLA DISTILLAZIONE

Nelle Tabelle 4.3a e 4.3b sono riportate rispettivamente le percentuali dei composti volatili varietali e di fermentazione nei distillati di purea di vinaccia di uva Prosecco Balbi 2010 trattata con enzima e con etanolo prima della distillazione, rispetto alla tesi non trattata.

Composti varietali	(EZ media/ TQ media) x 100	(ET media/ TQ media) x 100
linalolo	68	53
<i>trans</i> -ocimenolo	36	n.d.
α -terpineolo	80	23
citronellolo	87	72
nerolo	90	22
acido geranico	72	50
farnesolo	86	75
geraniolo	89	85
actinidolo A	108	n.d.
actinidolo B	113	n.d.

Tabella 4.3a. Percentuali dei composti trovati nella purea trattata con enzima (EZ) e con etanolo (ET) prima della distillazione rispetto a quelli non trattati. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione.

Entrambi i distillati di purea trattata risultano meno ricchi in composti varietali rispetto al distillato ottenuto dalla purea non trattata. Questo fa presupporre che anche se l'enzima era nelle condizioni di pH e temperatura favorevoli, la sua azione non sia stata efficace per liberare gli agliconi. Nel confronto tra le due tesi trattate, il distillato di purea addizionato con etanolo risulta meno ricco di composti varietali.

Composti di fermentazione	(EZ media/ TQ media) x 100	(ET media/ TQ media) x 100
esanale	75	109
<i>trans</i> -2-esenale	63	94
1-esanolo	98	90
acetati di isoamile	63	57
alcoli isoamilici	88	82
capronato di etile	49	58
acetato di esile	17	n.d.
caprilato di etile	59	32
caprato di etile	60	26
2-feniletilacetato	50	62
laurato di etile	78	76
β -feniletanolo	114	78
miristato di etile	99	411
acido caprilico	106	56
palmitato di etile	86	293
acido caprinico	88	64
oleato di etile	n.d.	n.d.
acido laurico	72	41
linoleato di etile	65	255
linolenato di etile	154	204
acido miristico	73	77
acido palmitico	228	418

Tabella 4.3b. Percentuali dei composti trovati nella purea trattata con enzima (EZ) e con etanolo (ET) rispetto a quelli non trattati. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione.

In generale, si riscontrano meno composti di fermentazione in entrambi i distillati di purea trattata rispetto al distillato proveniente dalla purea tal quale.

Il distillato di purea trattata con enzima risulta caratterizzato da quantità di 1-esanolo (nota vegetale e nocciola) paragonabile, e β -feniletanolo (nota di rosa) superiore, al TQ.

Il distillato di purea trattato con etanolo è caratterizzato da più elevati contenuti di esteri di acidi grassi a lunga catena (note oleose e cerose, Versini e Margheri, 1979) e di acido palmitico rispetto alle altre due tesi. Questo può essere dovuto al fatto che nella fase di trattamento della vinaccia per la preparazione della purea non sono stati completamente tolti tutti i vinaccioli e molto probabilmente il contatto con l'etanolo ha consentito l'estrazione di questi oli dai semi.

4.4 STUDIO DEI PRINCIPALI COMPOSTI CARBONILICI NEI DISTILLATI DI PUREA DI VINACCIA PROSECCO TRATTATA CON ENZIMA ED ADDIZIONATA DI ETANOLO PRIMA DELLA DISTILLAZIONE

È stato valutato l'effetto dei due trattamenti alla vinaccia Prosecco Balbi 2010 operati prima della distillazione sulla purea sui contenuti di alcuni dei principali composti carbonilici rilevanti dal punto di vista organolettico.

I composti carbonilici caratterizzati da basse soglie sensoriali (Tabella 4.4a) hanno un ruolo importante nella formazione dell'aroma della grappa. I composti studiati, esanale, *trans*-2-esanale, 3-idrossi-2-butanone (acetoino), 2,3-butandione (diacetile) e benzaldeide, sono stati estratti mediante distillazione della purea di vinaccia ed identificati utilizzando un metodo analitico che consiste nella derivatizzazione con *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilammina (PFBOA) e la determinazione delle ossime derivate mediante GC/MS. I cromatogrammi sono stati registrati in modalità FULL SCAN. La quantificazione di ciascun composto è stata fatta sullo ione *m/z* 181 relativo allo ione pentafluorobenzile.

Composto	Soglia olfattiva	Nota sensoriale
esanale	4.5 – 5 ppb	vegetale, erbaceo
<i>trans</i> -2-esanale	17 ppb	vegetale, erbaceo
benzaldeide	0.35 – 3.5 ppm	mandorla
acetoino	0.8 ppm	burro rancido
diacetile	2.3 – 6.5 ppb	burro, noce

Tabella 4.4a. Soglie olfattive e note sensoriali dei composti carbonilici studiati (Porretta, 2000).

Nella Tabella 4.4b sono riportate le concentrazioni dei principali composti carbonilici nel distillato delle tre tesi, sono riportati i dati di ciascuna ripetizione, i valori medi e le semidispersioni, in Tabella 4.4c i contenuti in percentuale dei composti.

Composti carbonilici	TQ 1	TQ 2	TQ media	EZ 1	EZ 2	EZ media	ET 1	ET 2	ET media
	µg/100 ml alcol anidro								
esanale	2539	3606	3073±534	2373	3411	2892±519	3277	3789	3533±256
<i>trans</i> -2-esenale	2199	2712	2455±256	1735	1651	1693±42	2158	2199	2179±20
benzaldeide	331	356	343±12	347	607	477±130	440	626	533±93
acetoino	30881	34024	32453±1572	27489	35540	31514±4026	21961	29010	25485±3524
diacetile	3462	2984	3223±239	2748	3411	3079±331	5435	3789	4612±823

Tabella 4.4b. Contenuti di composti carbonilici (espressi in µg di *o*-clorobenzaldeide/100 ml di alcol anidro) nei distillati di purea di vinaccia di Prosecco Balbi. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione. Per ciascuna tesi sono riportati i dati di due ripetizioni, i valori medi e le semidisposizioni.

Composti carbonilici	(EZmedia/TQ media) x 100	(ETmedia/TQ media) x 100
esanale	94	115
<i>trans</i> -2-esenale	69	89
benzaldeide	139	155
acetoino	97	79
diacetile	96	143

Tabella 4.4c. Percentuali dei composti trovati nella purea trattata con enzima (EZ) e con etanolo (ET) rispetto ai campioni non trattati. EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione.

Tutti i composti studiati sono stati riscontrati in concentrazioni superiori alle soglie olfattive riportate in letteratura (Porretta, 2000). Paragonati con i dati riportati in Tabella 4.4b, i dati di esanale e *trans*-2-esenale riportati in Tabella 4.2b risultano superiori. Tali differenze si riscontrano in quanto, benché l'analisi delle PFBOA-ossime sia un approccio molto più selettivo, entrambi i metodi consentono delle determinazioni semiquantitative che non sono basate sulla costruzione delle rette di calibrazione, ma esprimono i dati come concentrazione di standard interno. Questo approccio è comunque efficace per eseguire uno studio comparativo tra le diverse tesi.

Nelle tesi trattate con enzima i contenuti di esanale e *trans*-2-esenale sono tendenzialmente inferiori, acetoino e diacetile sono paragonabili alla tesi TQ, il contenuto di benzaldeide risulta invece superiore. Il distillato di purea trattata con etanolo presenta quantità medie di esanale, benzaldeide e diacetile superiori alla tesi TQ.

4.5 I PROFILI DEI COMPOSTI VOLATILI DELLE PUREE DI VINACCIA PROSECCO ESAUSTE DOPO LA DISTILLAZIONE

In Tabella 4.5 sono riportati i contenuti dei composti volatili varietali e di fermentazione negli estratti di purea di vinaccia di uva Prosecco Balbi 2010 esausta dopo la distillazione per le tre tesi. Sono riportati i dati di ciascuna ripetizione, i valori medi delle due ripetizioni e le semidispersioni.

Composti volatili	TQ 1	TQ 2	TQ media	EZ 1	EZ 2	EZ media	ET 1	ET 2	ET media
	µg/kg vinaccia esausta			µg/kg vinaccia esausta			µg/kg vinaccia esausta		
3-idrossi-2-butanone	607	486	547±61	380	339	359±21	399	620	510±110
lattato di etile	16	16	16±0	22	12	17±5	66	63	65±2
3-etossi-1-propanolo	90	75	82±7	67	59	63±4	88	119	104±15
benzaldeide	14	10	12±2	15	16	15±0	13	17	15±2
2,3-butandiolo A	2662	2321	2491±170	1615	1665	1640±25	1371	3278	2325±953
2,3-butandiolo B	681	618	650±31	451	494	472±21	354	914	634±280
γ-butilrolattone	650	506	578±72	427	475	451±24	338	557	448±109
2-furanmetanolo	35	27	31±4	30	34	32±2	14	33	23±9
alcol benzilico	87	80	84±3	47	42	44±3	48	55	51±3
β-feniletanolo	8513	7409	7961±552	5821	4852	5336±485	7812	8791	8301±490
pantolattone	94	80	87±7	72	86	79±7	56	95	76±19
8-idrossidiidrolinalolo	18	24	21±3	27	22	24±2	20	35	28±7
idrossicitronellolo	60	44	52±8	135	118	126±9	105	145	125±20
<i>trans</i> -8-idrossilinalolo	25	23	24±1	18	17	18±0	16	27	21±5
<i>cis</i> -8-idrossilinalolo	78	69	73±4	78	72	75±3	49	74	62±12
idrossinerolo	52	39	45±6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
idrossigeraniolo	142	123	133±10	113	116	114±2	82	134	108±26
succinato di etile	391	306	348±43	405	410	407±2	573	968	770±197
vanillina	227	158	192±34	381	285	333±48	194	238	216±22
acido benzenacetico	428	348	388±40	1728	1430	1579±149	1325	1858	1591±266
3-oxo-α-ionolo	34	58	46±12	124	116	120±4	94	105	100±6
acetovanillone	64	13	38±25	178	285	231±54	135	168	151±17
alcol omovanillico	140	35	88±53	421	362	391±30	290	497	394±103
vomifoliolo	76	65	69±3	67	72	70±3	40	83	61±21

Tabella 4.5. Contenuti di composti volatili varietali e di fermentazione (espressi in µg di 1-decanolo/kg di vinaccia esausta) negli estratti di purea di Prosecco Balbi esausta dopo distillazione. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione. Per ciascuna tesi sono riportati i dati di due ripetizioni, i valori medi e le semidispersioni.

Negli estratti di purea esausta di tutte le tesi si riscontra la presenza di terpenoli poli-idrossilati quali 8-idrossidiidrolinalolo, idrossicitronellolo, *trans*-8-idrossilinalolo, *cis*-8-idrossilinalolo, idrossinerolo ed idrossigeraniolo, inoltre di vanillina, acido benzenacetico, acetovanillone, alcol omovanillico (composti riconducibili alla classe dei benzenoidi), 3-oxo- α -ionolo, vomifoliolo. Tutti questi composti risultano assenti nei distillati in quanto poco volatili o presenti in forma glicosilata e non vengono recuperati con la distillazione.

Il contenuto medio di β -feniletanolo e degli isomeri del 2,3-butandiolo (nota dolce, oleosa) risultano superiori nella tesi trattata con enzima, mentre nelle tesi TQ e trattata con etanolo sono paragonabili. I composti benzenoidi ed il 3-oxo- α -ionolo risultano superiori in entrambe le tesi trattate rispetto alla tesi TQ. I contenuti di lattato di etile risultano superiori nella purea trattata con etanolo prima della distillazione.

4.6 CONFRONTO TRA I PROFILI DEI COMPOSTI VOLATILI RIMASTI NELLE PUREE DI VINACCIA PROSECCO ESAUSTE DOPO LA DISTILLAZIONE

In tabella 4.6 sono riportate le percentuali di composti volatili negli estratti di purea esausta di vinaccia di uva Prosecco Balbi 2010 trattata con enzima ed etanolo prima della distillazione rispetto alla tesi non trattata.

Composti volatili	(EZ media/ TQ media) x 100	(ET media/ TQ media) x 100
3-idrossi-2-butanone	66	93
lattato di etile	107	401
3-etossi-1-propanolo	77	126
benzaldeide	124	123
2,3-butandiolo A	66	93
2,3-butandiolo B	73	98
γ -butirrolattone	78	77
2-furanmetanolo	104	77
alcol benzilico	53	61
β -feniletanolo	67	104
pantolattone	91	87
8-idrossiidrolinalolo	115	133
idrossicitronello	242	239
<i>trans</i> -8-idrossilinalolo	75	90
<i>cis</i> -8-idrossilinalolo	103	84
idrossinerolo	n.d.	n.d.
idrossigeraniolo	86	82
succinato di etile	117	221
vanillina	173	112
acido benzenacetico	407	410
3-oxo- α -ionolo	261	217
acetovanillone	601	394
alcol omovanillico	447	450
vomifoliolo	102	90

Tabella 4.6. Percentuali dei composti trovati negli estratti della puree esauste dalla distillazione trattate con enzima (EZ) e con etanolo (ET) rispetto alla tesi non trattata. TQ = campioni non trattati; EZ = campioni trattati con enzima prima della distillazione; ET = campioni trattati con soluzione di etanolo al 60% (v/v) prima della distillazione.

Dopo trattamento con l'enzima glicosidasico la purea presenta contenuti superiori di benzaldeide (nota di mandorla), vanillina (nota di vaniglia), acido benzenacetico,

acetovanillone, alcol omovanillico, idrossicitronellolo e 8-idrossidiidrolinalolo (potenziali precursori di composti odorosi) e 3-oxo- α -ionolo (precursore dei megastigma-4,6,8-trien-3-oni dal caratteristico odore di tabacco), rispetto alla tesi TQ. L'utilizzo dell'enzima per 17 ore prima della distillazione ha liberato in quantità maggiore alcuni terpenoli poli-idrossilati che non sono però recuperabili con la distillazione (la loro presenza è stata riscontrata solo nella purea esausta) ma che costituiscono un ulteriore potenziale aromatico della purea.

Anche la purea trattata con etanolo rivela quantità più elevate di idrossicitronellolo, 8-idrossidiidrolinalolo, 3-oxo- α -ionolo, acetovanillone ed alcol omovanillico rispetto alla tesi TQ, probabilmente a causa di un effetto di estrazione dalle parti solide da parte dell'etanolo, e si riscontra un livello elevato di lattato di etile (nota di lampone).

4.7 CONFRONTO DEL PROFILO AROMATICO DEL DISTILLATO DI PUREA DI VINACCIA TAL QUALE CON IL PROFILO DEL DISTILLATO D'UVA

In Figura 4.7a sono riportati i contenuti di terpenoli totali nel distillato di purea non trattata (TQ) e nel distillato d'uva Prosecco.

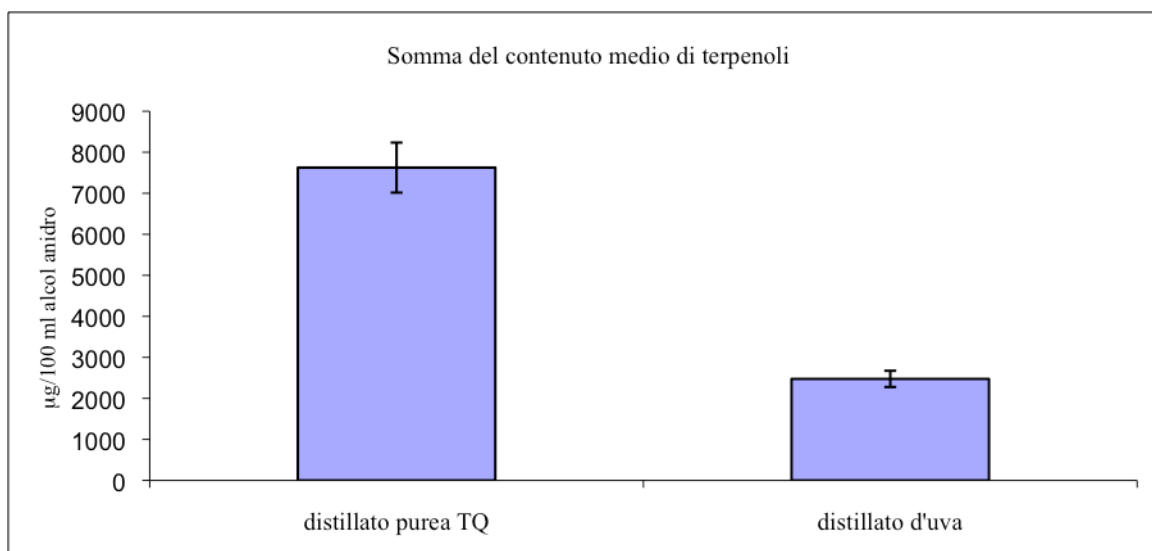


Figura 4.7a. Contenuti medi di terpenoli totali (espressi in µg di 1-eptanolo/100 ml alcol anidro) nei campioni di distillato di purea non trattato (tal quale) e nel distillato d'uva Prosecco Balbi 2010. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Come si evidenzia dalla figura, il distillato di purea risulta caratterizzato da contenuti molto maggiori di terpenoli rispetto al distillato d'uva. Questo è dovuto al fatto che i composti monoterpenici sono localizzati soprattutto nella buccia della bacca che funge da centro di sintesi e di immagazzinamento, la purea è stata ottenuta sminuzzando le bucce e favorendo così la liberazione dei composti aromatici. Il distillato d'uva è stato invece prodotto da una massa composta per circa il 60-70% in peso dal mosto ottenuto dalla pigiatura soffice delle uve, e presenta pertanto contenuti inferiori di tali composti. Il maggior contenuto di terpenoli nelle purea è inoltre dovuto alla maggior percentuale di bucce nel materiale utilizzato per la distillazione.

In figura 4.7b sono riportate le somme dei contenuti medi di composti a sei atomi di carbonio responsabili di sentori erbacei che si formano al momento della disorganizzazione dei tessuti vegetali riscontrati nel distillato di purea tal quale e nel distillato d'uva Prosecco (Joslin e Ough, 1978; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006).

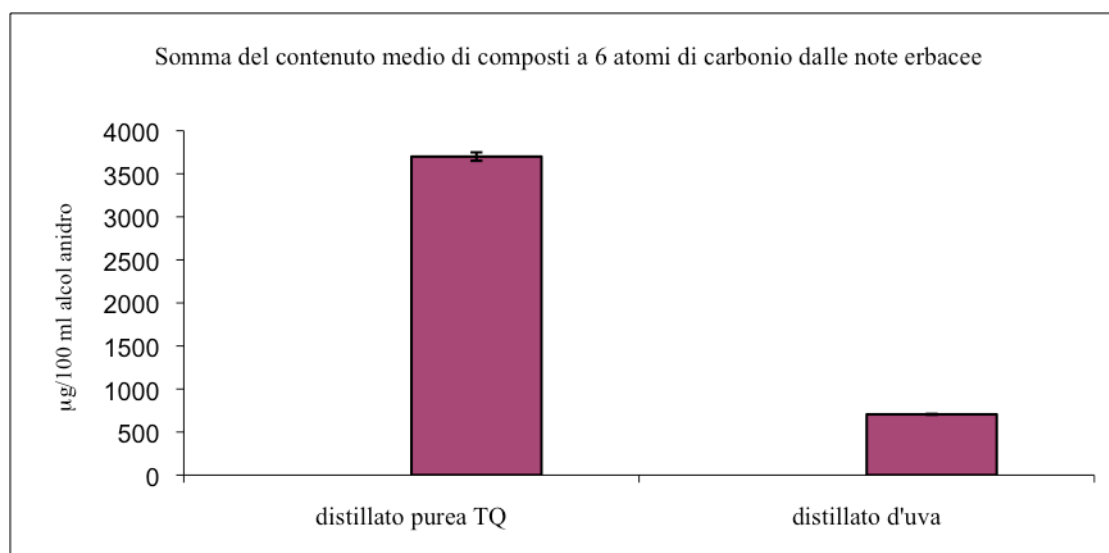


Figura 4.7b. Somme dei contenuti medi di composti a sei atomi di carbonio (espressi in µg di 1-eptanolo/100 ml alcol anidro) nei campioni di distillato di purea tal quale e distillato d'uva Prosecco Balbi 2010. I composti che sono stati sommati sono: 1-esanolo, *trans*-2-esenale, esanale. Le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Le aldeidi sembra che non siano contenute naturalmente nell'uva, però è nota la presenza in fase prefermentativa di *trans*-2-esenale e di esanale che contribuiscono, insieme agli alcoli a sei atomi di carbonio, alle note aromatiche di erbaceo e vegetale (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). Questi composti sono formati dagli acidi linoleico e linolenico mediante reazioni catalizzate da enzimi quali lipoossigenasi, perossidasi ed alcoldeidrogenasi (Joslin e Ough, 1978).

Il distillato di purea risulta caratterizzato anche da contenuti maggiori di composti a sei atomi di carbonio rispetto al distillato d'uva, probabilmente a causa della liberazione di enzimi e substrati favorita dalle operazioni di sminuzzamento della vinaccia.

In figura 4.7c sono riportati le somme dei contenuti medi degli esteri acetici, esteri etilici a media catena prevalentemente caratterizzati da note fruttate, esteri etilici a lunga catena ed acidi grassi nel distillato di purea tal quale e nel distillato d'uva Prosecco. Questi sono composti prodotti prevalentemente con la fermentazione, non provenienti dalle materie prime.

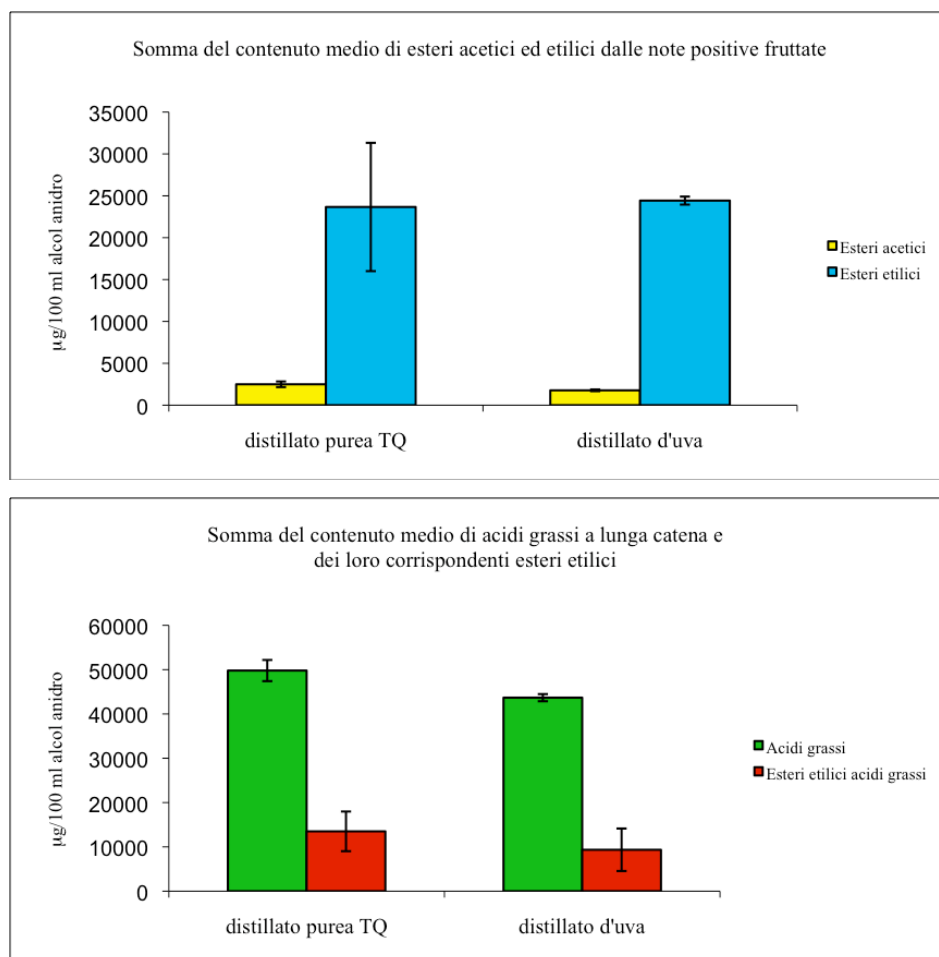


Figura 4.7c. Somma dei contenuti medi esteri acetici (2-feniletilacetato, acetato di esile, isoamil acetati), esteri etilici a media catena (capronato, caprilato, caprato, laurato di etile), esteri etilici a lunga catena (miristato, palmitato, oleato, linoleato, linolenato di etile) ed acidi grassi (acidi caprilico, caprinico, laurico, miristica, palmitico) nei campioni di distillato di purea tal quale e di distillato d'uva Prosecco Balbi 2010. Dati espressi come μg 1-eptanolo/100 ml alcol anidro; le barre riportano per ciascun dato medio la semidispersione calcolata per i due prelievi analizzati.

Si osserva in generale che i contenuti totali esteri etilici a media catena sono paragonabili nei due campioni, invece gli esteri acetici e gli esteri etilici a lunga catena risultano sensibilmente più elevati nei campioni di distillato di purea di vinaccia.

4.8 CONFRONTO DEL PROFILO AROMATICO DEL DISTILLATO DI PUREA DI VINACCIA TAL QUALE CON IL PROFILO DI UNA GRAPPA

Confrontando il profilo degli aromi varietali e dei composti di fermentazione del distillato di purea della vinaccia tal quale con quello della grappa di Prosecco riportato in letteratura (Tabelle 4.8a e 4.8b) si riscontrano concentrazioni di linalolo e farnesolo paragonabili, mentre i contenuti di altri terpenoli quali citronellolo, geraniolo, nerolo e α -terpineolo risultano superiori nella grappa (Flamini *et al.*, 2002).

Composti volatili varietali	Distillato di purea Prosecco Balbi TQ	Grappa di Prosecco
	($\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro)	
linalolo	2332	2627
α -terpineolo	457	1239
citronellolo	828	1171
nerolo	313	612
farnesolo	999	834
geraniolo	1257	2578

Tabella 4.8a. Contenuti di aromi volatili varietali (espressi in μg di 1-eptanolo/100 ml a.a.) nei distillati di purea di Prosecco Balbi TQ e nella grappa di Prosecco riportata in letteratura (Flamini *et al.*, 2002). Per ciascuna tesi sono riportati i valori medi di due ripetizioni.

Composti volatili di fermentazione	Distillato di purea Prosecco Balbi TQ	Grappa di Prosecco
	($\mu\text{g}/100$ ml alcol anidro)	
<i>trans</i> -2-esenale	739	17
1-esanolo	2289	9996
acetato di esile	308	1685
capronato di etile	2722	10332
caprilato di etile	9510	21143
caprato di etile	8572	39823
laurato di etile	2864	32989
acido laurico	9663	48
miristato di etile	278	11572
palmitato di etile	3588	85502
linoleato di etile	8080	33064
linolenato di etile	1560	13208

Tabella 4.8b. Contenuti di composti volatili di fermentazione (espressi in μg di 1-eptanolo/100 ml a.a.) nei distillati di purea di Prosecco Balbi tal quale (TQ) e nella grappa di Prosecco riportata in letteratura (Flamini *et al.*, 2002). Per ciascuna tesi sono riportati i valori medi di due ripetizioni.

Anche i contenuti di 1-esanolo, acetato di esile e di esteri etilici di acidi grassi a media e lunga catena risultano presenti in concentrazioni superiori nella grappa, mentre *trans*-2-esenale ed acido laurico risultano superiori nel distillato di purea di vinacce.

In relazione alle differenze riscontrate nei contenuti di composti volatili tra i due campioni, bisogna però evidenziare che il distillato di purea presentava un contenuto alcolico del 7% v/v di etanolo, mentre la grappa del 40% v/v ed era stata ottenuta mediante rettifica in colonna di distillazione. Questo ha comportato sicuramente un effetto di concentrazione delle frazioni dei composti volatili nella grappa rispetto al distillato di purea di vinaccia ottenuto in laboratorio. Una comparazione diretta dei risultati sarebbe possibile preparando i distillati alla stessa concentrazione alcolica, con lo stesso metodo di distillazione ed utilizzando lo stesso quantitativo di materia prima.

5. CONCLUSIONI

Il confronto tra il distillato di purea di vinaccia ed il distillato d'uva Prosecco ha evidenziato nel primo contenuti molto più elevati di terpenoli, favorita da una maggiore estrazione dei composti dalle pareti cellulari avvenuta con lo sminuzzamento e dispersione in acqua delle vinacce. Inoltre, essendo i composti varietali dell'uva maggiormente localizzati nelle bucce, a parità di peso la vinaccia presenta un potenziale aromatico più elevato al pigiato d'uva fermentato.

Il distillato di purea di vinaccia risulta però anche caratterizzato da maggiori contenuti di composti a 6 atomi di carbonio potenzialmente legati a note di erbaceo e vegetale, e di esteri acetici ed esteri etilici a lunga catena potenzialmente legati alle note grasse. Questo è probabilmente dovuto ad una maggiore incidenza dei processi batterici che possono innescarsi nelle vinacce durante lo stoccaggio, più difficili da avviarsi nella massa proveniente dalla pigiatura soffice delle uve che è stata subito fermentata con l'inoculo di lieviti selezionati.

Pertanto, l'utilizzo del pigiato d'uva per la produzione di distillati garantisce da una parte un migliore stato sanitario delle materie prime, ma dall'altra rappresenta una materia prima con minore potenziale aromatico (a parità di peso) e costi maggiori. La soluzione migliore risulterebbe l'utilizzo di vinacce con uno stato sanitario quanto migliore possibile, ed è quello che attualmente stanno cercando di perseguire le maggiori distillerie attraverso l'utilizzo di tecniche e tecnologie adeguate per la conservazione delle vinacce.

Lo studio dei due metodi di trattamento della purea di vinaccia prima della distillazione non ha evidenziato arricchimenti qualitativi o quantitativi nei profili aromatici dei distillati. Al contrario, la macerazione della purea di vinaccia con etanolo ha favorito l'estrazione di acidi grassi a lunga catena che conferiscono caratteristiche organolettiche negative di oleoso e ceroso al distillato.

Dai risultati di questo studio, al fine di un maggiore recupero di composti con note organolettiche positive, risulta preferibile l'utilizzo della purea di vinaccia fermentata senza operare alcuno dei trattamenti indagati prima della distillazione. L'utilizzo della purea di vinaccia non fermentata (vinacce vergini), costituita da una massa omogenea che può essere tenuta sotto agitazione ed a temperatura controllata, consente di condurre una fermentazione più regolare ed uniforme con conseguenze positive sui profili aromatici dei distillati. Anche la fermentazione con l'impiego di lieviti selezionati, favorita lavorando su

una massa omogenea consentirebbe di limitare le attività batteriche portando a profili aromatici dei distillati qualitativamente ancora migliori.

6. BIBLIOGRAFIA

D.M. 3.11.1988. Autorizzazione alla produzione e all'immissione in commercio di acqueviti o distillati di frutta. Gazzetta Ufficiale n. 270, 17 novembre.

D.P.R. 16.7.1997, n. 297. Regolamento recante norme in materia di produzione e commercializzazione d'acquaviti, grappa, brandy italiano e liquori. Gazzetta Ufficiale n. 213, 12 settembre.

Regolamento (CE) N. 110/2008 del Parlamento e del Consiglio del 15 gennaio 2008 relativo alla definizione, alla designazione, alla presentazione, all'etichettatura e alla protezione delle indicazioni geografiche delle bevande spiritose e che abroga il regolamento (CEE) n. 1576/89 del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 39/16-54, 13 marzo.

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

Castagner R. 2008. *Il mondo delle grappe*. Conegliano: Editrice Arti Grafiche Spa.

D'Agostino S., Papucci A., Agozzino P., Avellone G., Barbera D. 2001. Caratteristiche compositive di grappe di monovitigni autoctoni siciliani a frutto bianco. *Industria delle bevande XXX*: 238-243.

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

Di Stefano R. 1981. Presenza di precursori del linalolo nel Moscato bianco del Piemonte. *Vignevini* 9 (7-8): 45-47.

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

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

Di Stefano R. 1996. Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. Valutazioni attraverso lo studio dei composti volatili liberi e legati. Annali dell'Istituto sperimentale per l'enologia di Asti XXVII: 33-53.

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

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

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

Gabri G., Salvagiotto R. 1980. Dosamento gas-cromatografico simultaneo dell'acetaldeide, del metanolo, dell'acetato e del lattato di etile e degli alcoli superiori nei distillati alcolici. Vini d'Italia XXII: 37-42.

Garoglio P. G. 1973. Enciclopedia vitivinicola mondiale Vol. 4. Milano: Edizioni Scientifiche UIV.

Istituto nazionale di geofisica e vulcanologia. 2010. Laboratorio Gas Massa. <http://www.pa.ingv.it/laboratori/gasmassa/gasmassa.html>

Joslin W.S., Ough C.S. 1978. Cause and fate of certain C6 compounds formed enzymatically in macerated grape leaves during harvest and wine fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 29 (1): 11-17.

Lukić I., Miličević B., Banović M., Tomas S., Radeka S., Peršurić D. 2010. Characterization and Differentiation of Monovarietal Grape Marc Distillates on the Basis of Varietal Aroma Compound Composition. J. Agric. Food Chem. 58: 7351-7360.

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

Odello L. 1997. La grappa e l'innovazione tecnologica in atto. *Vignevini* 24 (9): 38-47.

Oliveira J.M., Faria M., Sà F., Barros F., Araújo I.M. 2006. C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta* 563: 300-309.

Porretta S. 2000. *Analisi Sensoriale & Consumer Science*. Editore Chiriotti: 159-164.

Reazin G.H. 1981. Chemical mechanisms of whiskey maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* 32(4): 283-289.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2004. *Trattato di enologia Vol. 2 – Chimica del vino. Stabilizzazione. Trattamenti*. Bologna: Edizioni Edagricole.

Silva M. L., Macedo A. C., Malcata F. X. 2000. Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Science and Tecnology International* 6: 285-300.

Usseglio-Tomasset L., Di Stefano R. 1980. Profilo aromatico del Moscato bianco del Piemonte. *Riv. Vitic. Enol.* 33(2): 58-68.

Versini G. 1978. La grappa del Trentino: ricerche inerenti alla sua caratterizzazione. Nota II. Il comportamento alla distillazione negli impianti tradizionali dei principali esteri ed aldeidi e dell'alcol β -feniletilico. *Vini d'Italia XX*: 347-357.

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

Versini G., Dell'Eva M., Inama S. 1989. Filtrazione e refrigerazione nei distillati grezzi. *Vini d'Italia XXXI*: 25-32.

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

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento al Prof. Riccardo Flamini e alla Dr.ssa Annarita Panighel per la disponibilità ed il supporto nella ricerca ed elaborazione dei dati.

Un ringraziamento all'Accademia Italiana della Grappa e delle Acquavite.

Ringrazio di cuore i miei genitori Liliana e Paolo per quanto hanno fatto in questi anni.

Infine un ringraziamento speciale ad Elena per essermi sempre stata vicina.