Università degli studi di Udine

Facoltà di Agraria

Corso di laurea in Viticoltura ed Enologia

Tesi di laurea

UTILIZZO DEGLI ULTRASUONI PER L'ESTRAZIONE DEI TANNINI DA VINACCIOLI

Relatore : Prof. Emilio Celotti

Correlatrice : Dott.ssa Paola Ferraretto

Laureando: Andrea Bortolussi

ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011

INDICE

1.INTRODUZIONE……3

2.ULTRASUONI……..

2.1.STRUMENTAZIONE……..

2.2.IL FENOMENO DELLA CAVITAZIONE……..

2.3.APPLICAZIONI NEL SETTORE ALIMENTARE……

3.POLIFENOLI…….

3.1.ANTOCIANI…….

3.2.FLAVONI……

3.3.FLAVANI……

3.4.ACIDI FENOLICI…….

3.5.TANNINI……

3.5.1.CLASSIFICAZIONE……

3.5.2.ASTRINGENZA E AMARO……

4.VINACCIOLI……..

5.SCOPO DEL LAVORO……

6.MATERIALI E METODI…….

7.DISCUSSIONE DEI RISULTATI……..

8.CONCLUSIONI…….

9.BIBLIOGRAFIA……

10.RINGRAZIAMENTI…….

INTRODUZIONE

Gli ultrasuoni hanno suscitato notevoli interessi nell'ambito delle scienze alimentari grazie alle numerose applicazioni alle quali sono stati sottoposti. Le più diffuse si ritrovano nei processi di cristallizzazione, emulsione, estrazione, sanitizzazione, ecc. . La capacità delle onde ultrasonore ad elevata intensità ha quindi destato interesse nel settore alimentare, in cui la promozione di reazioni chimico-fisiche può comportare, nei processi di lavorazione, un vantaggio strategico.

Molta attenzione è stata data all'applicazione degli ultrasuoni per l'estrazione di composti naturali che, attraverso l'utilizzo di tecniche convenzionali, impiegano ore o giorni per giungere a conclusione, a differenza dei primi che agiscono in qualche minuto . Nel caso specifico di questo studio l'attenzione si è concentrata sull'estrazione di tannini da vinaccioli. Secondo studi condotti da Pineiro *et al*. (2004) vi è un migliore recupero di catechine ed epicatechine dai vinaccioli attraverso l'utilizzo di Ultrasuoni.

Questi ultimi sono spesso utilizzati in accoppiata con i solventi maggiormente conosciuti che penetrano meglio all'interno dei vinaccioli, grazie all'azione meccanica dovuta ai fenomeni di cavitazione che creano canali preferenziali per il passaggio del liquido attraverso la distruzione delle pareti cellulari e la scissione dei legami fra lignina ed emicellulosa.

Precedenti studi hanno offerto interessanti risultati nel campo enologico. Nello specifico è stato dimostrato un'effetto significativo riguardante la riduzione dei tempi di macerazione e la lisi dei lieviti durante l'affinamento sulle fecce.

Questi aspetti sono strettamente legati all'ottenimento di prodotti di alta qualità che preservino il più possibile le caratteristiche naturali del prodotto.

Inoltre questa tecnica permette di mantenere temperature del mezzo più basse che si riflettono favorevolmente sul mantenimento della stabilità dei composti.

ULTRASUONI

Gli ultrasuoni sono perturbazioni di tipo ondulatorio la cui frequenza è superiore al limite massimo di udibilità da parte dell'essere umano. Il valore soglia è di circa 16 kHz anche se alcune persone al di sotto dei 20 anni riescono a percepire suoni fino ad una frequenza di 20 kHz. Gli ultrasuoni hanno trovato applicazione in diversi settori, da quello medico-sanitario per seguire lo sviluppo fetale attraverso l'ecografia, alla cosmesi per trattamenti emulsionanti, all'industria per la saldatura della plastica, alla sanitizzazione su larga scala, sino al campo a noi più strettamente legato che è quello alimentare (Kenneth S.Suslick,1994) .

Nel 1927, un documento intitolato "Gli effetti chimici delle onde sonore ad alta frequenza" presentava lo studio degli ultrasuoni per processi quali l'emulsione e la pulizia di superfici (Richards e Loomis,1927). Questa tecnologia trovò per la prima volta applicazione per la disgregazione delle cellule nel 1959 grazie alla progettazione dei primi processori ultrasonici del tipo a sonda che attualmente vengono utilizzati per numerosi scopi : catalisi, omogeneizzazione, sospensione, disaggregazione, scissione, dispersione, solubilizzazione, polimerizzazione e degassamento (Kenneth S.Suslick,1994). Negli anni sessanta l'uso degli ultrasuoni nei processi industriali iniziava a trovare riscontro positivo e l'interesse nei confronti di questa tecnologia era in continuo aumento (Abramov,1998; Mason,2000; Mason e Lorimer, 2002).

In base all'energia associata si distinguono due tipologie di ultrasuoni:

1. US Power : alta energia e bassa frequenza, influenzano la reattività chimica

    a) US di potenza caratterizzati da frequenze variabili tra 20 kHz e 100 kHz

    b) US di potenza intermedia caratterizzati da frequenze tra 20 kHz e 2 kHz non di interesse né per il settore industriale né per quello diagnostico;

2. US Diagnostic: bassa energia ed alta frequenza, vengono utilizzati per le diagnosi con frequenze tra 5-10 MHz;

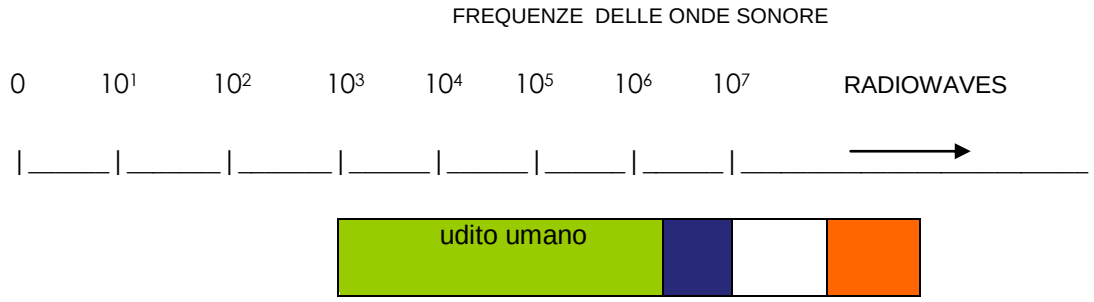


Figura 1: radiofrequenze.

Onde sonore percepite dall'udito umano: 16 Hz – 18 kHz

Onde power: 20 kHz – 100 kHz

Range esteso della sonochemistry: 20 kHz – 2 MHz

Onde diagnostic, ad alta frequenza : 5 MHz – 10 MHz

STRUMENTAZIONE

Il sistema più comunemente usato per la produzione di ultrasuoni è costituito da un **generatore di corrente** che fornisce elettricità alla frequenza desiderata al trasduttore, da un **trasduttore o convertitore**, che converte l'energia elettrica in vibrazioni meccaniche, onde di pressione, che vengono convogliate in una sonda e da un reattore o **sonda** vera e propria che amplifica la vibrazione prodotta e rappresenta la sede della sonicazione che può essere continua o discontinua (Kenneth S.Suslick,1994).

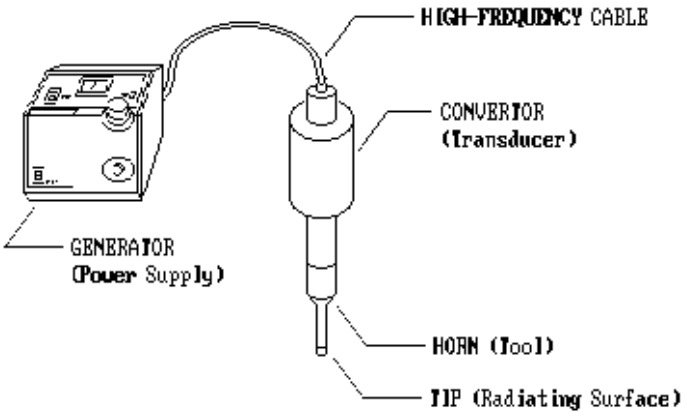


Figura 2: Componenti costitutive la strumentazione: generatore, trasduttore o convertitore, sonda.

GENERATORE

I generatori emettono impulsi di energia ad elevata frequenza ed elevato voltaggio e trasformano corrente alternata di 220 V e 60 Hz in energia elettrica a 1000 V e 20 kHz. I sonicatori più evoluti regolano l'energia emessa in funzione della temperatura e della viscosità del liquido(Kenneth S.Suslick,1994).

TRASDUTTORE O CONVERTITORE

Ha la funzione di convertire l'energia elettrica proveniente dal generatore in energia meccanica manifestata attraverso le vibrazioni che subiscono i materiali.
I tre principali tipi di trasduttori ultrasonici sono:

PIEZOELETTRICI : Nella loro costruzione vengono utilizzate delle ceramiche piezoelettriche che si espandono e contraggono se soggette ad un campo elettrico alternato. Per le applicazioni del trasduttore le caratteristiche del materiale devono rimanere costanti rispetto al tempo, alle sollecitazioni meccaniche, al campo elettrico ed alla temperatura. Nella maggior parte dei casi vengono utilizzati materiali quali il piombo, il titanato di zirconio e di bario (Nitin Rana,2010) Poiché i materiali ceramici sono molto fragili, vengono disposti a "sandwich" tra i blocchi dei metalli. Questa struttura non solo protegge la ceramica dalla rottura ma impedisce il surriscaldamento dei blocchi di metallo che possono agire come dissipatori di calore.

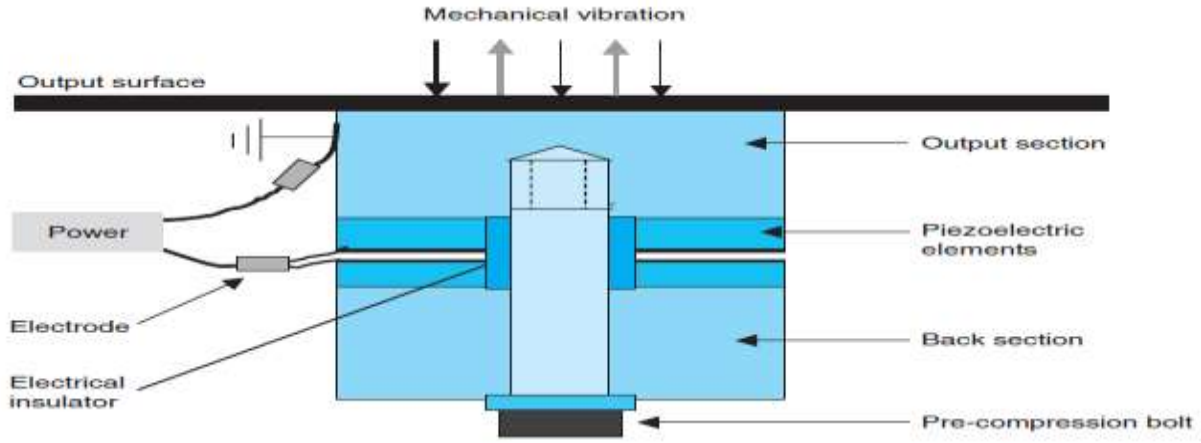


Figura 3: mostra un trasduttore che consiste di due dischi di ceramiche piezoelettriche disposte a "sandwich" tra due blocchi di metallo. Le ceramiche sono utilizzate in coppia per ottenere un movimento meccanico supplementare. I due dischi sono polarizzati in direzioni opposte, separati da un elettrodo collegato al generatore.

Rispetto ai traduttori magnetostrittivi offrono una conversione elettromeccanica maggiore (Nitin Rana,2010). Manifestano un'efficacia del 95% e possono essere utilizzati su tutta la gamma degli ultrasuoni. Sono di piccole dimensioni e poco costosi. Tuttavia la durata è limitata dal loro deterioramento che comporta una diminuzione progressiva dell'energia vibrazionale al passare del tempo (Nitin Rana,2010).

MAGNETOSTRITTIVI: sono basati sulla magnetostrizione nella quale materiali ferromagnetici come il Nickel o il Ferro cambiano dimensione a causa di un campo magnetico. Nella sua forma più semplice si tratta di un solenoide con la bobina assemblata come una lamina formata da molti strati di materiali magnetostrittivi mentre nel centro vi è una striscia metallica di rame. Quando viene applicata della corrente alla bobina, si genera un campo magnetico, che causa una riduzione delle dimensioni della striscia di rame. Lo spegnimento della corrente provoca un aumento delle dimensioni della striscia che torna alla forma originale. L'alternarsi di accensioni e spegnimenti genera delle vibrazioni meccaniche che vengono consegnate a mezzo tramite il diaframma.

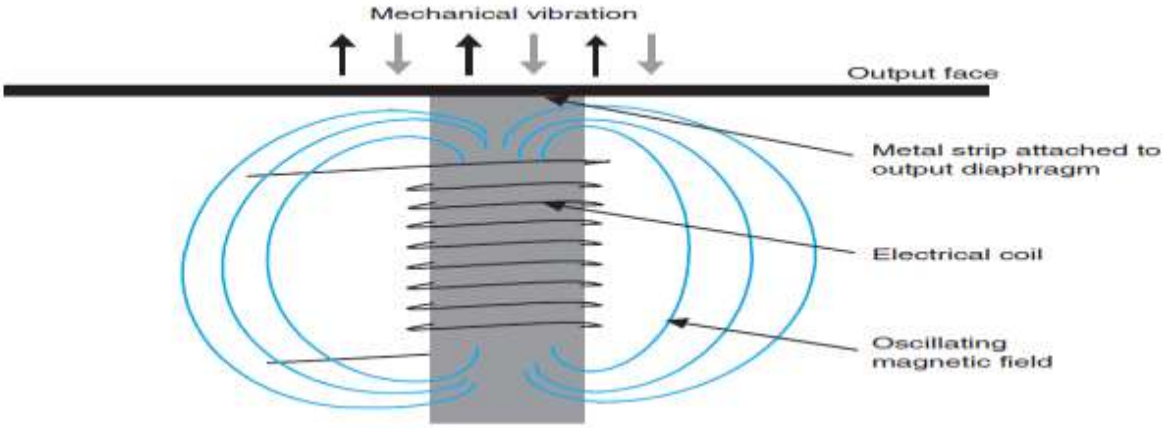


Figura 4: rappresentazione di un trasduttore magnetostrittivo.

E' importante che il trasduttore sia strettamente legato alla membrana dal momento che ogni spazio d'aria tra il trasduttore ed il diaframma sarà responsabile della perdita di energia poiché essa presenta un'impedenza acustica bassa ed un assorbimeto alto. Il principale vantaggio è di fornire una grande forza di guida perché il sistema possiede una costruzione robusta (Mason,1998). Tuttavia il 40% dell'energia viene persa sottoforma di calore e risulta necessario un raffreddamento esterno. Inoltre la frequenza massima di funzionamento è limitata a 100 kHz (Mason,1998). Attraverso una serie di studi e di prove sperimentali si è giunti all'ottimale composizione di preparati sfruttati per la costruzione di generatori ultrasonori capaci di emettere notevoli ampiezze di vibrazione.

A LIQUIDO SPINTO: si basa su “fischi liquidi” che vengono pompati velocemente su di una lama sottile, provocandone la vibrazione. Le oscillazioni comportano la produzione di onde a pressione dalla leading face e cavitazione dalla trailing face. La rapida alternanza di pressione e cavitazione attorno alla lama fornisce una potente fonte di miscelazione. Per questo motivo le applicazioni sono limitate ad omogeinizzazioni.

SONDE

Trasmettono e concentrano l’energia liberata dal convertitore e la irradiano al liquido con il quale sono in contatto. Amplificano il segnale, grazie alla loro geometria, intensificando il fenomeno della cavitazione ottenendo una maggiore efficacia complessiva del trattamento. La distanza fra la sonda e il campione da trattare è un parametro importante da considerare poiché un aumento comporta un’attenuazione del campo ultrasonico (Mason,1998). Nella pratica, l‘energia trasferibile dalla fonte dipende da due fattori:

- **caratteristiche del materiale utilizzato per la costruzione del trasduttore e della sonda**: Per una migliore trasmissione della vibrazione sono necessari materiali resistenti come alluminio e titanio. Il primo però non è molto indicato nelle situazioni in cui viene a contatto con il liquido in cavitazione a causa della possibile erosione; il titanio, di conseguenza, tende ad essere preferito (Malcolm J. W. Povey,1998);
- **la zona di emissione**: i risultati migliori si ottengono con zone di emissione di piccole dimensioni. Nel caso di elevate amplitudini la cavitazione delle bolle sulla superficie del liquido potrebbe limitare la potenza di trasmissione(Malcolm J. W. Povey, 1998);

Gli ultrasuoni a bassa energia sono caratterizzati da intensità sonora inferiore a 1 W/cm^2 e frequenze maggiori di 100 kHz (Mason e Luche,1996;Vilamiel e de Jong,2000). Sono utilizzati per il rilevamento non invasivo e per la caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche dei materiali. Questi trovano applicazione per la stimolazione delle attività delle cellule viventi, per la pulizia delle superfici, per i loro effetti sugli enzimi e sull’estrazione assistita. Gli US ad alta energia sono caratterizzati, invece, da un’intensità sonora superiore a 1 kW/cm^2 e frequenze comprese fra 18 kHz e 100 kHz(McClements, 1995; Povery e Mason, 1998; Villamiel e De Jong, 2000).Vengono sfruttati ad esempio per indurre fenomeni di ossidazione e riduzione, l’estrazione di enzimi e proteine, l’induzione della cristallizzazione, il degassamento dei liquidi (Roberts,1993;Thakur e

Nelson,1997;Villamiel e Jong, 2000). I risultati (ad es.% della resa di estrazione/ velocità) sono in funzione di :

- Potenza sonora : espressa in Watt
- Intensità sonora : espressa in W/cm^2 indica la potenza effettiva per area di superficie
- Densità di energia sonora : Ws/m^3

La potenza non è il solo criterio per la selezione,questo valore indica solamente la potenza, in Watt, del generatore ma non l'energia fornita al campione. L'amplitudine sulla superficie della sonda è il fattore determinante per la valutazione dei risultati dell'irradiazione tenuto in considerazione il volume del campione.

IL FENOMENO DELLA CAVITAZIONE

E' un fenomeno fisico che porta alla formazione di microcavità all'interno di un liquido irradiato da ultrasuoni. La formazione, crescita ed implosione di microbolle causa elevate pressioni (2000 bar) e temperature (5000 °C) che svolgono un ruolo fondamentale nei processi di lisi cellulare, di sanitizzazione, estrazione di componenti, miscelazione di liquidi immiscibili, ecc. (Kenneth S.Suslick,1994).

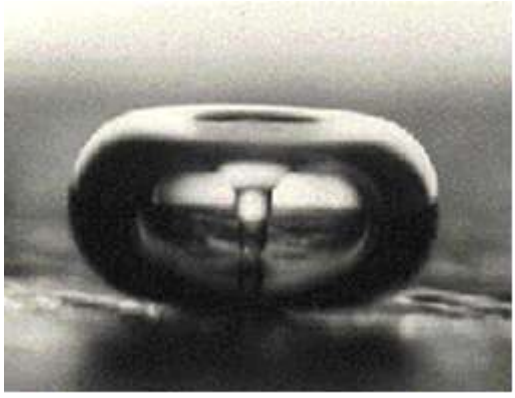


Figura 5 : bolla prima dell'implosione.

La formazione delle cavità avviene quando la pressione dell'onda di espansione supera la tensione superficiale del liquido. L'assorbimento di energia provoca un aumento del diametro delle bolle

fino al raggiungimento di un punto critico (170 µm; 20 kHz), situazione in cui non sono più in grado di autosostenersi ed il liquido che le circonda si insinua nella cavità provocando l'implosione. Tale fenomeno comporta l'aumento di pressione e temperatura precedentemente accennato. La cavitazione crea delle turbolenze che condizionano fortemente le condizioni fisiche e chimiche del mezzo soprattutto per quanto riguarda gli urti fra particelle che possono andare incontro a fusione. A differenza del processo appena descritto caratterizzato dalla formazione di microbolle conseguentemente ad una irradiazione caratterizzata da intensità acustiche alte, nel caso opposto ,ovvero per intensità acustiche basse, è possibile notare come la formazione di microcavità si manifesti in maniera ciclica attraverso un susseguirsi di espansioni e contrazioni (Marchiori, 2005).

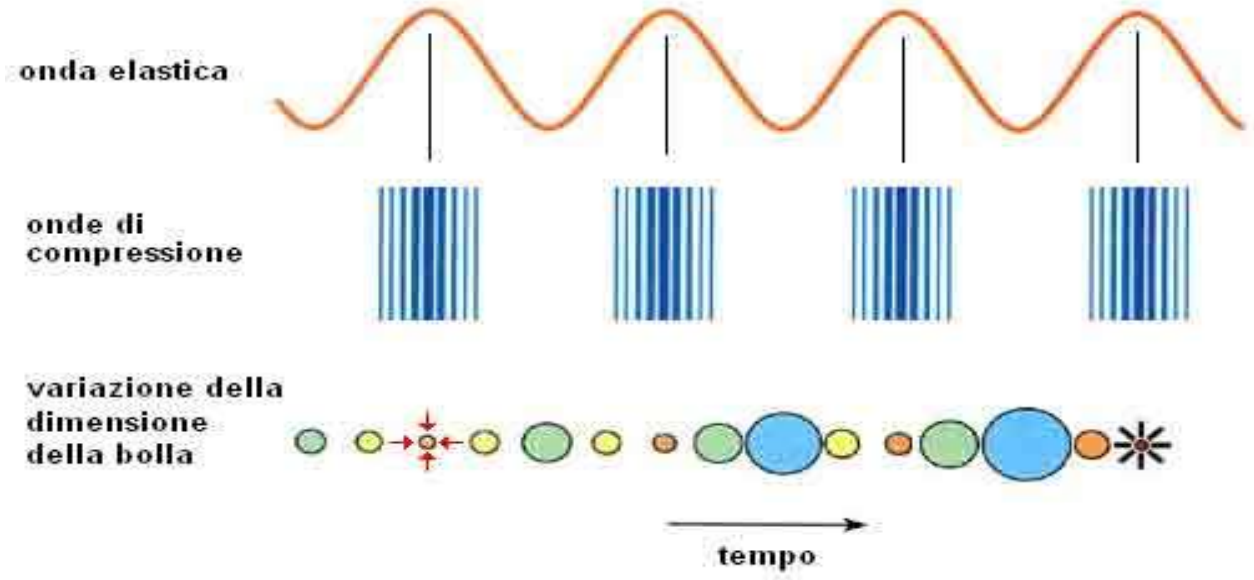


Figura 6 : la bolla si espande assorbendo l'energia associata all'onda elastica.

Durante queste fasi la quantità di gas o di vapore che può diffondere all'interno delle cavità è proporzionale alla superficie delle stesse e sarà maggiore nel processo di espansione piuttosto che in quello di contrazione. Dopo una serie di cicli si raggiunge un momento critico in cui c'è assorbimento di energia ultrasonica. Con entrambi i metodi si introducono elevate quantità di energia in tempi molto brevi e ciò permette di aumentare notevolmente le cinetiche di reazione. La cavitazione ultrasonora ha effetti meccanici per frequenze di 20 kHz o chimici per lunghezze d'onda $10\text{-}10^3$ cm (Marchiori,2005) .

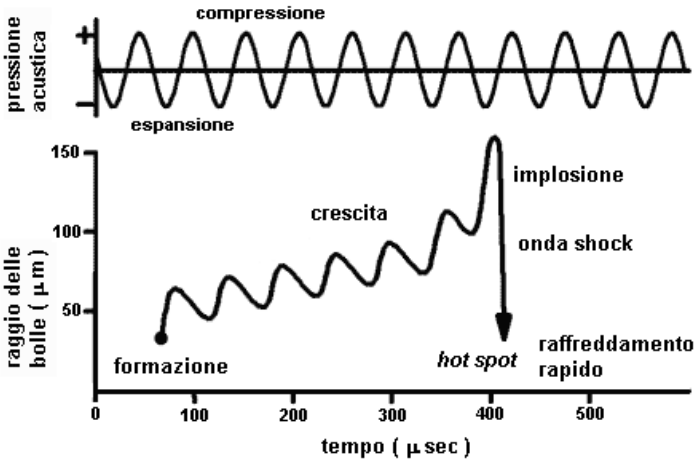


Figura 7 : gli ultrasuoni generano delle bolle che si espandono e si contraggono nella fase di crescita fino al collasso (implosione) in cui si sviluppano pressioni e temperature elevatissime. Questo fenomeno è conosciuto sotto il nome di cavitazione.

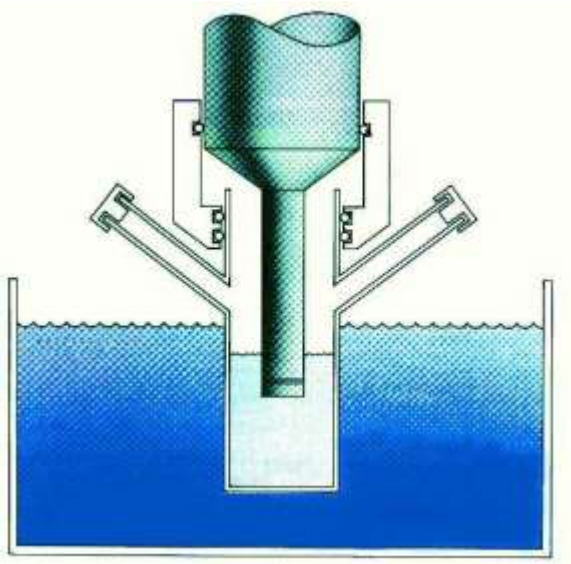


Figura 8 : rappresentazione strutturale di un apparecchio ULTRASONICO. Il puntale in titanio viene immerso nel liquido e grazie alle vibrazioni dovute al cristallo piezoelettrico eccitato da una corrente alternata si ha l'emissione di ultrasuoni.

APPLICAZIONI NEL SETTORE ALIMENTARE

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

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

- ✓ ESTRAZIONE : molta attenzione è stata data all'applicazione degli ultrasuoni per l'estrazione di composti naturali che, attraverso l'utilizzo di tecniche convenzionali, impiegano ore o giorni per giungere a conclusione, a differenza dei primi che agiscono in qualche minuto. Se da un lato, gli ultrasuoni possono essere utilizzati come una tecnica di diagnosi per controllare gli aspetti ed i processi alimentari, dall'altra vengono sfruttati per il loro miglioramento, influenzando la cinetica, il rendimento e la qualità del prodotto finito. Diverse classi di composti come aromi, polifenoli, sostanze organiche e minerali vengono estratte in modo efficiente da una varietà di matrici. L'estrazione avviene grazie al fenomeno della cavitazione: quando le bolle collassano, le alte pressioni e temperature generano dei micro getti diretti verso la superficie solida, responsabili della rottura delle pareti delle cellule e del rilascio del loro contenuto nel mezzo. (Tomaet al. 2001). Inoltre, permette temperature di processo più basse e rese maggiori in tempi minori (Vinatoru, 2001).

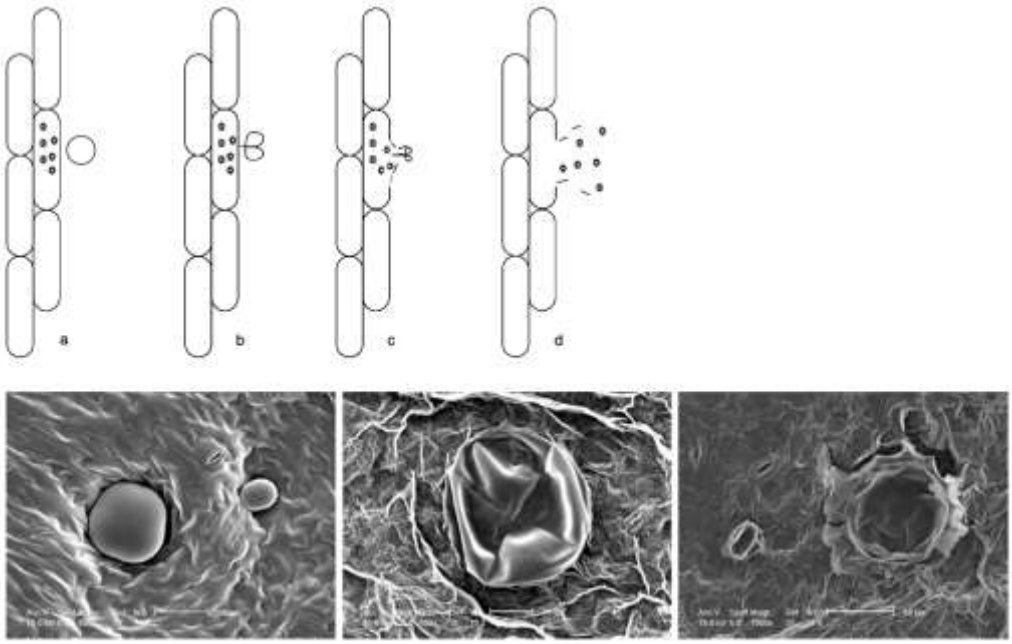


Figura 9: fenomeno dell'estrazione per effetto della cavitazione.

Questi processi sono in stretta relazione con due parametri che ne influenzano l'efficacia e le prestazioni. L'aumento della pressione esterna aumenta la pressione nella bolla al momento critico, con conseguente collasso, che risulterà molto più rapido rispetto alle condizioni iniziali (Lorimer e Mason, 1987) Tale fenomeno risulta essere uno strumento efficace per intensificare il processo senza variare l'amplitudine (Hielscher, 2005). L'influenza della temperatura si riflette sulla pressione di vapore, sulla tensione superficiale e sulla viscosità del mezzo liquido (Muthukumaran *et al.*, 2006). Mentre l'aumento della temperatura diminuisce la viscosità del mezzo e aumenta il numero delle bolle, il crollo viene smorzato dalla maggiore tensione di vapore. Inoltre si formano meno velocemente in un ambiente viscoso. Risulta dunque opportuno individuare una temperatura ottimale che garantisca una viscosità bassa per permettere la formazione di un numero sufficiente di bolle e per ridurre al minimo l'effetto negativo di un'alta tensione di vapore.

- ✓ ANTIBATTERICO E SANITIZZANTE: sfrutta le alte temperature ed il fenomeno della cavitazione per distruggere la membrana cellulare dei batteri. Studi condotti da Knorr nel 2004 hanno dimostrato una riduzione, in seguito a trattamento con US, del numero di E.Coli nell'uovo. Una maggiore suscettibilità risulta a temperature maggiori di 50°C, se utilizzate in accoppiata con US (Sala *et al*, 1995; Villamiel e de Jong, 2000). Si hanno risultati

positivi dal punto di vista delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto come colore, sapore, ecc., rispetto a quelli che si ottengono con tecniche convenzionali come ad esempio la pastorizzazione che sfrutta temperature più elevate. Un'altra applicazione degli US relativa alla sanitizzazione si riscontra nel trattamento con gli stessi delle barrique infestate da Brettanomyces e Dekkera. Uno studio,condotto da Yap nel 2008, ha messo a confronto l'efficacia sanitizzante degli ultrasuoni rispetto alle tecniche di pulizia convenzionali. E' stato dimostrato che l'utilizzo di acqua a 60°C ad alta pressione rimuove dal 50% al 90% dei residui solidi presenti sulla superficie interna della botte, mentre un trattamento con ultrasuoniraggiunge una percentuale superiore al 99%. La combinazione di US per cinque minuti e temperatura a 60°C ha prodotto una riduzione 1000 volte maggiore. I principali vantaggi di questa applicazione sono:

- Diminuzione dei costi;
- Allungamento della " vita" della barrique;
- Diminuzione dell'impiego di composti chimici;
- Elimina gli antociani assorbiti dal legno che potrebbero essere utilizzati dai Brettanomyce/Dekkera come fonte di carbonio;

✓ EMULSIONE : se una bolla di cavitazione implode, lungo la superficie di contatto fra due liquidi immiscibili, è in grado di formare una miscelazione stabile anche a bassa energia (Canselier et al., 2002; Freitaset al., 2006). L'emulsione generata dagli US è stata sfruttata soprattutto nel settore petrolchimico, chimico , cosmetico e farmaceutico, quello alimentare nella tecnologia dei succhi di frutta, della maionese e del ketchup (Hulbert e Mount, 2000).

✓ CRISTALIZZAZIONE : gli ultrasuoni ad alta potenza influenzano il processo di cristallizzazione attraverso l'avvio della nucleazione, il controllo dello sviluppo e la formazione di piccoli cristalli (Luque de Castro e Priego-Capote, 2007; Virone, *et al.* 2006). Uno dei problemi della conservazione degli alimenti è la formazione lenta dei cristalli di ghiaccio. Questo fenomeno si manifesta con cristalli più grossolani che possono causare la rottura delle cellule e conseguente ammorbidimento dei tessuti (ad es. carne, vegetali ecc.). Il congelamento assistito con ultrasuoni permette pertanto di ridurre i tempi di

formazione dei cristalli ed una loro maggiore omogeneità riducendo il danno cellulare e preservando l'integrità del prodotto (Zheng & Sun, 2006).

- ✓ FILTRAZIONE : i moti vibrazionali generati dagli US permettono di lasciare libere le superfici dei filtri permettendo il passaggio del liquido nei fori e diminuendola durata del trattamento (Telsonic, 2007).

- ✓ SEPARAZIONE: se gli ultrasuoni vengono usati a bassa frequenza (30 kHz) possono dividere un'emulsione acquosa (ad es. acqua ed olio) (Pangu e Feke, 2004; Gardner e Apfel, 1993). Se aumentiamo le frequenze l'effetto che si ottiene è opposto.

- ✓ VISCOSITÀ : gli ultrasuoni sono applicati sia per aumentare che per diminuire la viscosità ed, in base all'intensità, l'effetto può risultare permanente o temporaneo.

- ✓ ANTISCHIUMA : applicato soprattutto su bevande gassate per evitare l'insorgere di caratteri negativi che influenzano la qualità del prodotto, per limitare le perdite , per ridurre i volumi e quindi i costi di gestione per vasche supplementari (Gallego-Juárez,1998; Morey *et al.*, 1999).

- ✓ FERMENTAZIONE : ad alta intensità, gli ultrasuoni possono rompere le cellule o denaturare gli enzimi e possono migliorare il trasferimento di massa attraverso le membrane cellulari (Sinisterra, 1992; Pitt e Rodd, 2003). E' stato dimostrato un conseguente aumento della fermentazione (Matsuura *et al.*,1994) grazie all'effetto di degasaggio che limita l'accumulo di CO_2, che costituisce il fattore inibente.

POLIFENOLI

Costituiscono quella classe di composti responsabile della caratterizzazione e differenziazione fra vini bianchi e rossi, soprattutto per quanto riguarda colore e gusto. Vengono estratti durante la vinificazione da diverse parti dell'acino (buccia, polpa, vinaccioli) e subiscono nel tempo notevoli variazioni dipendenti dall'obiettivo enologico prefissato, dalla durata, dallo stile dell'affinamento e dal substrato in cui i processi si svolgono.

I composti fenolici dell'uva si dividono in due grandi classi:

- FLAVONOIDI
- NON FLAVONOIDI

La prima classe contiene composti caratterizzati da gruppi fenolici.

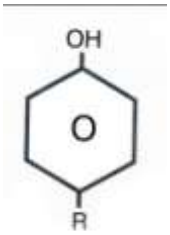


Figura 10:rappresentazione di un fenolo con ossidrile ed gruppo "R";

Sono formati da due anelli aromatici A e B, legati fra loro da un etero ciclo ossigenato C.

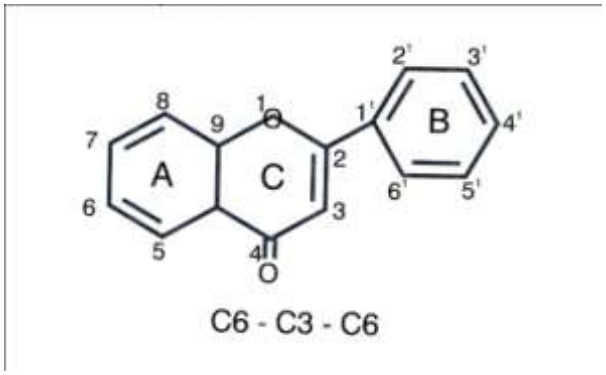


Figura 11: struttura chimica generale di un polifenolo;

A questa classe appartengono i principali polifenoli responsabili della qualità dei vini, soprattutto rossi, tra cui:

- ANTOCIANI
- FLAVONI
- FLAVANI

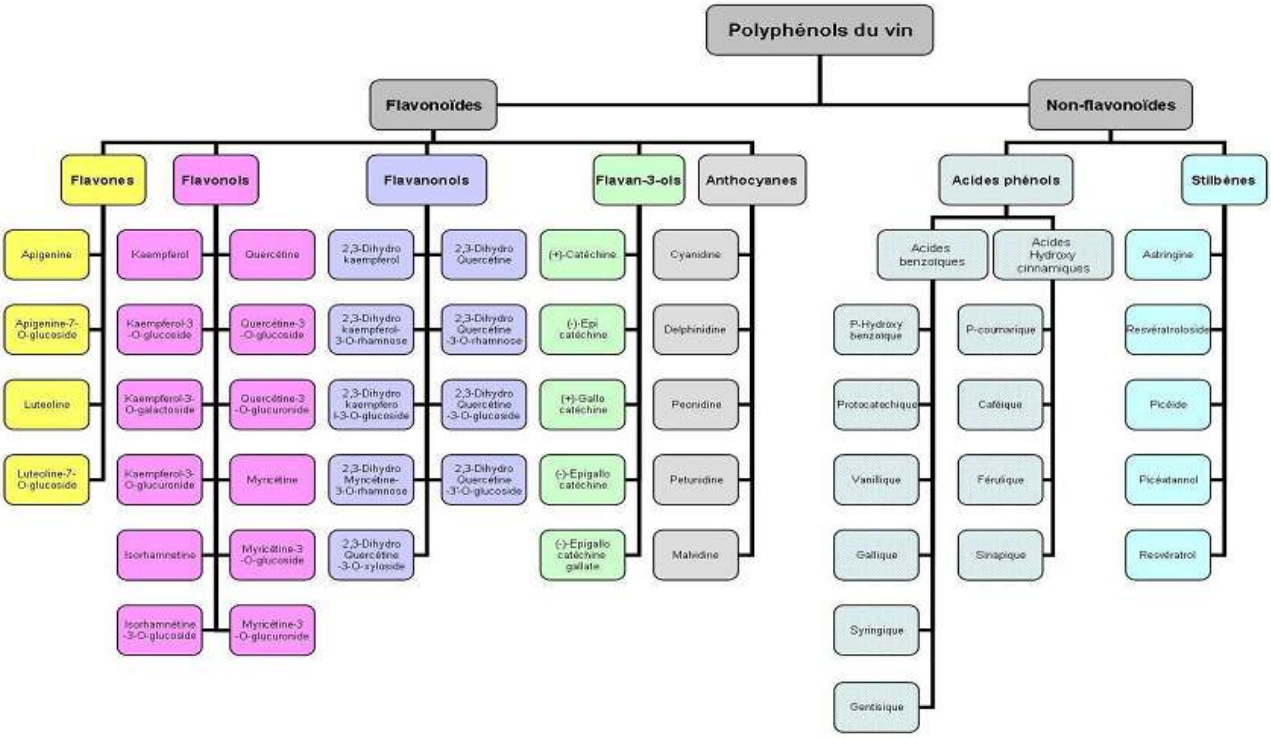


Figura 12: schema delle principali classi dei polifenoli del vino(G. Schmauch,2010).

ANTOCIANI

Sono i pigmenti colorati delle uve rosse che si accumulano principalmente nei vacuoli delle cellule della buccia ad eccezione delle varietà “Teinturiers” che li contengono anche nella polpa. La molecola è formata da due anelli benzenici uniti da un eterociclo ossigenato, insaturo, carico positivamente, chiamato ione flavilio. In natura vi sono cinque antociani che si differenziano tra di loro in base ai sostituenti dei gruppi (Ribéreau-Gayon,2007) :

- Cianidina
- Peonidina
- Delfinidina
- Petunidina
- Malvidina

Vengono definiti antocianine e in tutte le varietà risulta essere dominante la malvidina, in percentuali variabili dal 90% al 50% rispettivamente in uve Grenache e Sangiovese (Ribéreau-Gayon, 2007). Il contenuto di antociani nelle uve può variare da 0 a 3000 mg/Kg (Fregoni,2005). Nei vini la loro concentrazione diminuisce nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento, fino a valori limite di 0-50 mg/L. La maggior parte però è implicata in reazioni di condensazione con altre molecole, quali ad es. i tannini, dando origine a composti stabili responsabili del mantenimento del colore.

FLAVONI

Derivano dal pirone, sono caratterizzati da un gruppo carbonilico e, presentando in soluzione idro-alcolica una colorazione gialla, sono in parte responsabili della colorazione dei vini bianchi. Risultano poco sensibili all'ossidazione e dal punto di vista gustativo non conferiscono particolari sentori. Nel vino sono rappresentati dalla Quercetina, Miricetina, Canferolo e Rutina. Il contenuto negli acini varia approssimativamente da 10 a 50 mg/Kg (Fregoni,2005).

FLAVANI

Si trovano nelle uve sotto forma di oligomeri e polimeri , sono definiti tannini condensati o proantocianidine. Derivano dal pirano, sono molecole prive del doppio legame nell'anello centrale e nell'uva sono presenti sottoforma di catechine e leucoantociani, incolori ed insapori in acqua. Essendo sostanze altamente ossidabili, la filiera di vinificazione deve essere monitorata adeguatamente in modo da limitare il più possibile il contatto con l'ossigeno, soprattutto nelle situazioni in cui le concentrazioni di tali componenti sono rilevanti.

La seconda classe comprende i NON FLAVANOIDI rappresentati dagli Acidi fenolici.

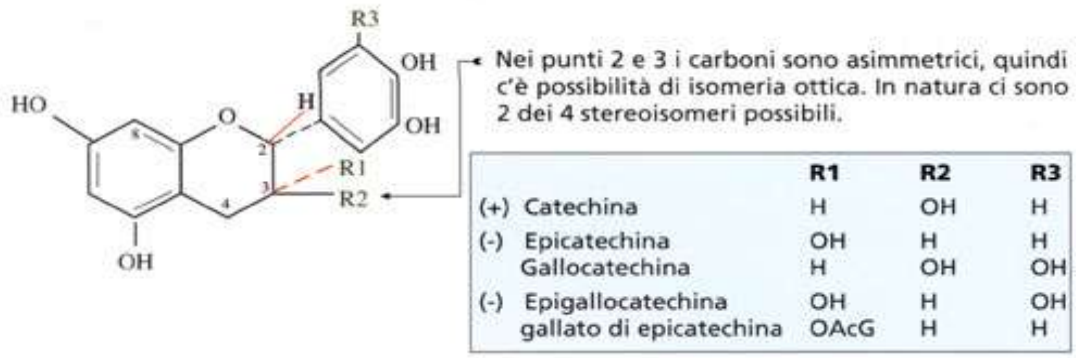
ACIDI FENOLICI

Sono costituiti da un anello benzenico con uno o più gruppi fenolici e metossilici e da un gruppo carbossilico legato direttamente (nel caso degli acidi benzoici) o tramite una catena di atomi di carbonio (nel caso degli acidi cinnamici) all'anello. Nell'uva sono presenti in concentrazioni variabili da 150 a 400 mg/Kg. Gli acidi benzoici sono legati alla parete delle cellule della buccia mentre gli acidi idrossicinnamici sono gli unici polifenoli contenuti nella polpa. Dal punto di vista sensoriale non presentano né sapore né odore ma, per azione di certi microrganismi, possono formare fenoli volatili quali il 4-etil-fenolo (odore di animale) ed il 4-etil-guaiacolo (affumicato) nei vini rossi, il 4-vinil–fenolo (odore farmaceutico o di vernice) ed il 4-vinil-guaiacolo (garofano, pepato) nei vini bianchi(Ribéreau-Gayon,2007).

TANNINI

I tannini sono sostanze polifenoliche, contenute sia nella buccia che nei semi dell'uva, dal sapore amaro e astringente, che svolgono molte funzioni sia dal punto di vista sensoriale che chimico, interagendo con gran parte delle molecole presenti nel vino. Capaci di originare combinazioni stabili con le proteine e con altri polimeri vegetali, quali ad esempio i polisaccaridi. Essi reagiscono con le proteine responsabili del collaggio delle pelli rendendo elastici e imputrescibili questi materiali, con le glicoproteine della saliva precepitandole e determinando la sensazione di astringenza, con le colle proteiche nel collaggio dei vini e con le frazioni proteiche degli enzimi. E' importante che le dimensioni di tali composti (1000 – 3000 Da) siano, sufficientemente grandi per permettere combinazioni stabili con le proteine, ma allo stesso tempo sufficientemente piccole in modo da rendere possibile il loro avvicinamento ai siti attivi di queste molecole e facilitarne la reazione (Ribéreau – Gayon, 2007).

La struttura generale di un tannino è formata da due anelli aromatici laterali legati fra loro da un eterociclo ossigenato in posizione centrale. Dalla struttura di base, uguale per tutti, si differenziano i vari tipi di composti in base ai sostituenti presenti nelle catene laterali "R1","R2","R3".



	R1	R2	R3
(+) Catechina	H	OH	H
(-) Epicatechina	OH	H	H
Gallocatechina	H	OH	OH
(-) Epigallocatechina	OH	H	OH
gallato di epicatechina	OAcG	H	H

Figura 13: struttura generale dei tannini.

I tannini vengono distinti in nativi, se riferiti a quelli presenti nell'uva e in neoformati se riferiti a quelli presenti nel vino. A differenza degli antociani presentano l'eterociclo ossigenato saturo.
Un passo importante per lo studio dei tannini venne fatto nel 1920 quando Freudemberg li raggruppò in due grandi classi(Freudenberg,1920) :

1) IDROLIZZABILI : liberano acido gallico ed acido ellagico per idrolisi acida;

2) NON IDROLIZZABILI: chiamati anche condensati, non idrolizzano;

CLASSIFICAZIONE

I tannini, in base alla natura delle molecole elementari, si distinguono in cinque grandi famiglie; quattro più conosciute (Gallotannini ed Ellagitannini appartenenti ai tannini Idrolizzabili; tannini Condensati ; tannini Complessati) mentre la quinta, aggiunta più recentemente, va sotto il nome di Florotannini (Khanbabaee & Van Ree, 2001)(Glombitza *et al.*, 1977).

- ✓ IDROLIZZABILI: il cui nome deriva dalla capacità di liberare acido gallico o acido ellagico per idrolisi acida. Vengono estratti dal legno di Acacia, Rovere, Castagno, ecc.(Mueller-Harvey, 2001). Nel legno di Quercia, utilizzato per la fabbricazione delle botti, si trovano concentrazioni elevate di due ellagitannini isomeri : la vescalagina e la castalagina. Tali molecole essendo idrosolubili passano facilmente in soluzioni idroalcoliche come vino e acquaviti. I tannini idrolizzabili costituiscono i principali tannini commerciali utilizzati nei trattamenti dei vini (Ribéreau – Gayon, 2007).

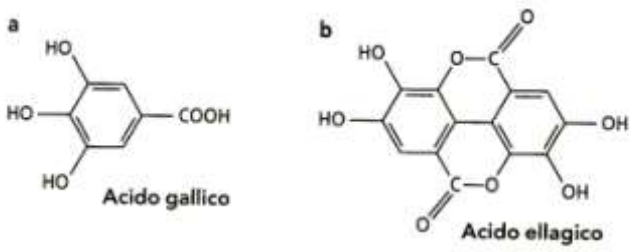


Figura 14: Ac.gallico ed ac.ellagico.

- ELLAGITANNINI: derivano dall'accoppiamento ossidativo di almeno due unità galliche di un gallotannino. Le differenze fra di essi derivano dai gradi di galloilazione, dagli accoppiamenti ossidativi esistenti, dalla formazione di C-glicosidi aromatici e dalle polimerizzazioni C-O (Quideau & Feldman, 1996). L'acido ellagico può provenire sia dai recipienti in cui è conservato il vino sia dall' aggiunta esterna.

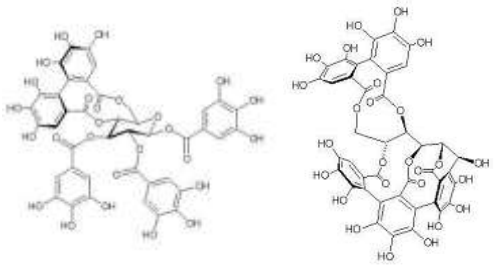


Figura 15: Ellagitannini (Telligrandina sinistra e Vescalagina a destra).

- GALLOTANNINI : derivano dalla reazione dell'acido gallico che si sostituisce ai gruppi ossidrili di un poliolo. Sono presenti in numerose specie vegetali, ma a differenza degli ellagitannini, possono derivare anche dalle bucce e dai semi dell'uva.

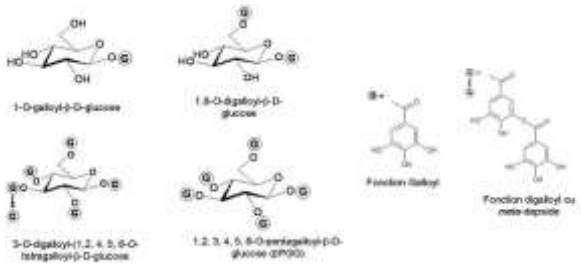


Figura 16: I principali Gallotannini.

- ✓ COMPLESSATI: sono dei tannini idrolizzati legati ad un gruppo di flavonoidi da un legame C-glicosidico (Khanbabaee & Van Ree, 2001). Possono formarsi nel vino invecchiato in barrique quando i flavonoidi entrano in contatto con i tannini idrolizzabili liberati dal legno. L'acutissimina A è uno fra i tannini complessati più conosciuti.

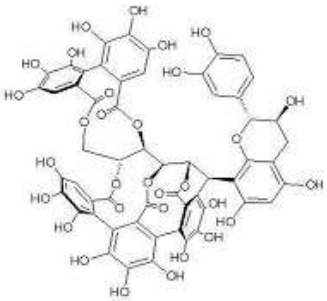


Figura 17: Acutissimina.

- ✓ CONDENSATI: i tannini condensati dell'uva sono polimeri dei flavan-3-oli o catechine; la (+)-catechina e la (-)-epicatechina sono le unità monomeriche fondamentali. Il loro riscaldamento in ambiente acido libera carbocationi instabili che si trasformano in prodotti di condensazione bruni quali ad es. delfinidina e cianidina rosse, da cui ne deriva il nome di procianidine o prodelfinidine o proantocianidine (Ribéreau–Gayon, 2007). La formazione di cianidine dal polimero delle procianidine può essere rappresentata nel seguente modo:

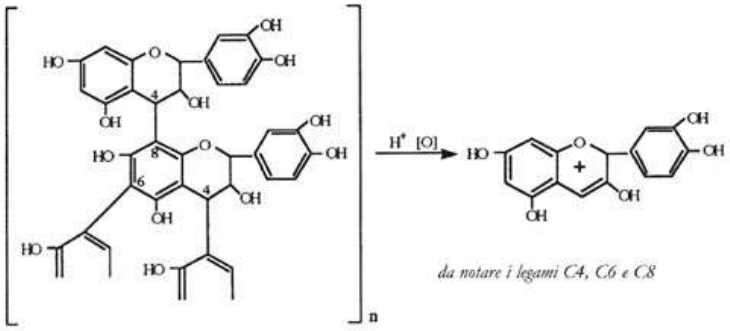


Figura 18: formazione di cianidine dal polimero della procianidine.

Il processo non è tutt'oggi compreso completamente ed avviene solo con il gruppo delle leucocianidine.

Le catechine, ad es., se sottoposte alle medesime condizioni invece di dissociarsi sviluppano prodotti più condensati. Queste ultime non sono considerate come dei veri e propri tannini poiché la loro massa molecolare è troppo piccola e ciò si esemplifica sulla ridotta reattività nei riguardi delle proteine. Esse presentano due cicli benzenici legati ad un ciclo ossigenato saturo. Tale struttura presenta due carboni asimmetrici (C2 e C3) che originano quattro isomeri; da ricordare (+)-catechina e (-)-epicatechina.

Le procianidine dimere possono essere divise in due categorie :

- Procianidine B: flavan-3-oli legati fra loro da legami C4-C8 o C4-C6;
- Procianidine A: oltre al legame interflavanico vi è un legame etere fra C5 e C7 della parte terminale e il carbonio C2 dell'unità superiore;

Le procianidine trimere a loro volta suddivise in due categorie:

- Procianidine C: i legami interflavanici corrispondono al tipo B dei dimeri;
- Procianidine D: un legame corrisponde al tipo B e l'altro al tipo A dei dimeri;

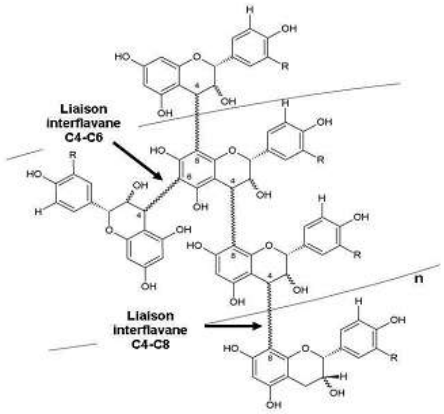


Figura 19: Procianidine.

I tannini condensati sono presenti in tutte le parti solide dell'uva e passano nel vino attraverso i processi di macerazione. Il loro tenore nel vino dipende dalla varietà, ma soprattutto dalle condizioni di vinificazione ed estrazione (Ribéreau-Gayon, 2007). Secondo alcuni (Fournand *et al.,* 2006) nel vino viene estratto il 23 % dei tannini dell'uva, mentre per altri (Kennedy, 2008) solo il 9 %; secondo questi lavori oggi si stima che la percentuale di estrazione per i tannini da vinaccioli sia del 6 % mentre per quelli della buccia del 29 %.

Le procianidine si trovano sia nella buccia che nei vinaccioli, ma in percentuali diverse e con grado di polimerizzazione differente (La polimerizzazione è più elevata nelle bucce. Nei vinaccioli c'è una maggior percentuale di oligomeri: nel vinacciolo i polimeri raggiungono le 20 unità, nella buccia i polimeri possono raggiungere le 80 unità e a questi elevati valori risultano insolubili (Fregoni, 2005).

A differenza della polpa, nei semi, i flavonoli si trovano in gran parte sotto forma di monomeri (catechina ed epicatechina) in genere esterificati con acido gallico.

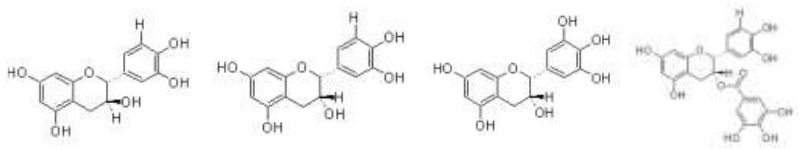


Figura 20: Monomeri dei flavan-3-oli(da sinistra a destra: catechina, epicatechina , epigallocatechina, catechina gallata).

- ✓ FLOROTANNINI : oligomeri o polimeri derivati dal floroglucinolo in cui la differenziazione si basa sulle interconnesioni fra unità monomeriche (Parys *et al*, 2007). Questa classe di tannini si trova esclusivamente nelle alghe brune come *Bifurcaria, Carpophyllum, Cystophora, Cystoseira, Eisenia, Fucus* et *Sargassum* (Ragan *et al.,* 1986).

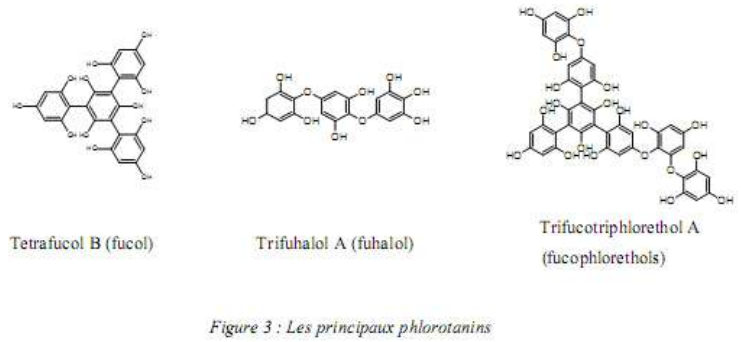


Figura 21: I principali Florotannini.

I tannini dei vinaccioli sono procianidine parzialmente legate all'acido gallico (galloilazione). Costituite da unità monomeriche di catechina ed epicatechina, ed epicatechina esterificata con acido gallico; legate tra di loro attraverso legami C4-C6 oppure C4-C8. Conferiscono sensazioni molto lontane fra loro in base alla maturità degli acini. Nel caso di uve poco mature avremo sensazioni di durezza e rugosità; al contrario armonia e corpo. L'1% dei tannini ceduti dai semi inciderà al 40% sui tannini totali del vino. La percentuale di tannini proveniente dai vinaccioli è pari al 65% rispetto al totale dell'acino. Le proprietà antiossidanti delle proantocianidine sono venti volte maggiori rispetto alle vitamine E e 50 volte rispetto alla C.

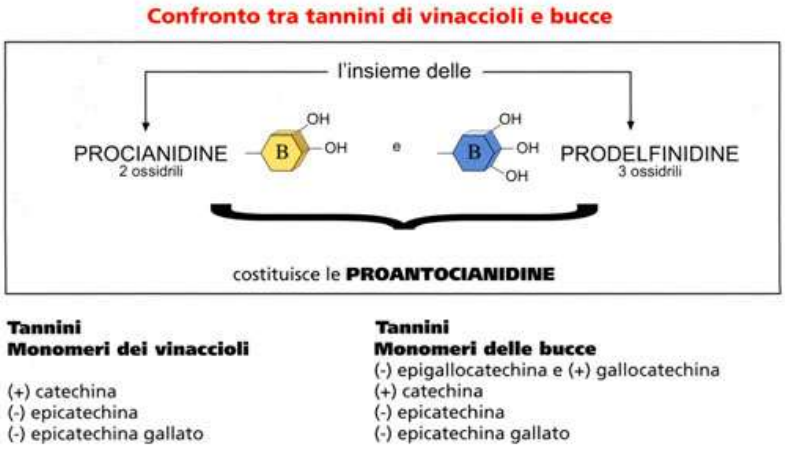


Figura 22: confronto fra tannini da vinaccioli e bucce.

Alcune differenze tra	Vinacciolo e	Bucce
Prodelfinidine	assenza	presenza
galloillazione %	20-40	3-10
mDP (grado di polimerizzazione medio)	20	30
oligomeri	elevata	scarsa

Tabella 1: differenze fra vinacciolo e bucce.

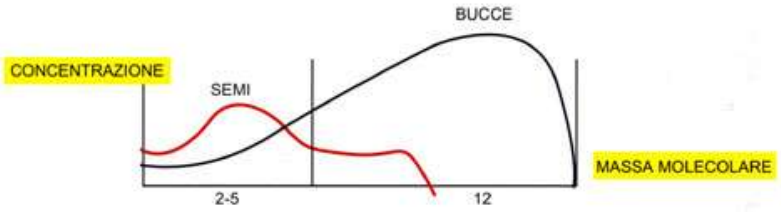


Figura 23: concentrazione di tannini da vinacciolo e bucce in relazione alla massa molecolare.

Per motivi cinetici i tannini dei semi sono più reattivi di quelli presenti nelle bucce dal momento che son caratterizzati da un peso molecolare medio più basso.

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

ASTRINGENZA E AMARO

Principali descrittori sensoriali dei tannini, si manifestano in maniera armoniosa ed elegante in vini ben strutturati che hanno subìto, nella maggior parte dei casi un invecchiamento più o meno lungo. Nel caso di uve poco mature o di tecniche di vinificazione condotte in modo sbagliato questi descrittori sono da interpretare come difetti da risolvere. Se per l'amaro possiamo tranquillamente parlare di sapore, così non è per l'astringenza che viene definita come una sensibilità di tipo chimico (Ubigli M.2009).

Il gusto amaro, che di per se non è molto gradevole, sarebbe dovuto all'interazione fra le molecole polari e la frazione lipidica della membrana delle papille gustative, situate sulla base della lingua e disposte a forma di " V ". Esso è maggiormente presente nei vini rossi poiché ricchi di sostanze polifenoliche, dirette responsabili di tale sapore. Ovviamente la tipologia di vino ma soprattutto lo stile con cui viene prodotto sono fattori discriminanti sia per quanto riguarda la concentrazione che l'intensità finale, basti pensare ad un vino Novello ed un vino commercializzato dopo anni di invecchiamento in legno. L'aumento della concentrazione delle sostanze amare comporta sia una maggiore intensità che una più lunga percezione nel tempo.

L'astringenza, secondo Peynaud (Ribéreau-Gayon, 2007), è dovuta ad un fenomeno di coagulazione di una proteina salivare, chiamata mucina, ad opera di alcuni polifenoli ,tra cui i tannini (particolarmente reattivi risultano quelli da vinacciolo). Questo fenomeno comporta una diminuzione della viscosità del cavo orale con conseguente disidratazione ed aumento della sensazione astringente accompagnata da secchezza e rugosità tipica. Un aumento della concentrazione comporta una maggiore intensità, ma non un prolungamento della percezione. Secondo Dubois (1993) essa è responsabile del mascheramento degli aromi e dell'acidità. Anche se presentate in questo modo, sembrano due aspetti sensoriali distinti, possono nella realtà essere confuse o scambiate l'una per l'altra, anche da un panel di degustatori esperti. Inoltre l'intensità sia dell'amaro che dell'astringenza aumentano con il numero di degustazioni come dimostrato da Càstino (1991) .

VINACCIOLI

Il vinacciolo non è altro che il termine tecnico per designare il seme dell'uva, contenuto all'interno di ogni acino,in quantità e forme variabili,dipendenti sia dalla varietà che dalla fecondazione. Una fecondazione avvenuta male o non avvenuta porta alla formazione, nel primo caso di vinaccioli rudimentali (fenomeno che prende il nome di stenospermocarpia), nel secondo ad acini completamente privi di semi (partenocarpia), fenomeno ricercato per l'uva da tavola (Ribéreau-Gayon,2007).

Figura 24: Rappresentazione di un acino d'uva al cui interno sono visibili i vinaccioli.

La forma dei vinaccioli è molto caratteristica; comunemente descritta come piriforme e caratterizzata da una parte tondeggiante che si assottiglia alla sommità formando un tipico becco appuntito. La zona rigonfia ha una parte convessa in cui si manifesta una leggera depressione circolare chiamata calaza. Nella parte ventrale invece si possono notare due fossette, una a sinistra ed una a destra che prendono il nome di rumini(Dalmasso G.,2005).

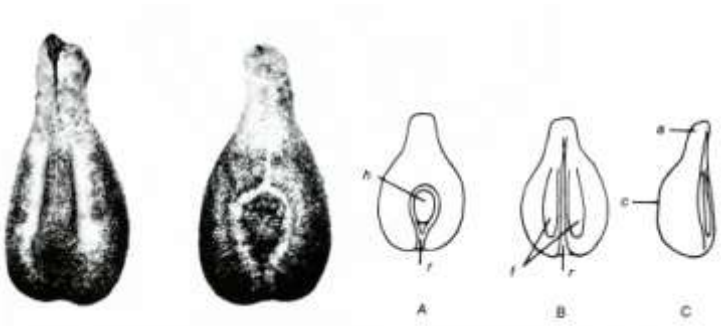


Figura 25: visuale ventrale,dorsale e laterale dei vinaccioli.

All'interno del seme si contraddistinguono due tegumenti e la mandorla. Nel tegumento esterno si differenziano, proseguendo dalla periferia al centro, la cuticola, l'epidermide, un numero variabile di strati caratterizzati da cellule di grosse dimensioni ma con parete fine e un'ultima zona con cellule sclerificate che sono le responsabili della durezza del seme.

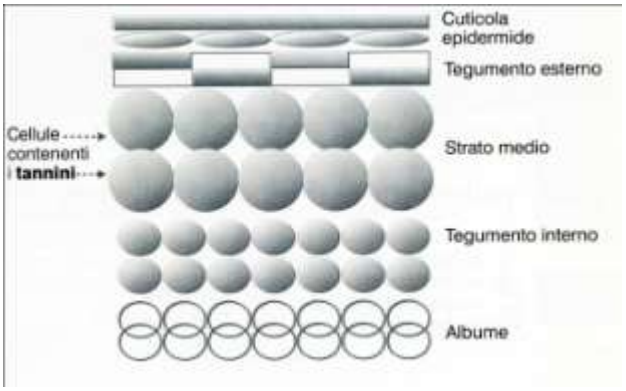


Figura 26: rappresentazione degli strati che costituiscono un vinacciolo.

Nel tegumento interno sono presenti alcuni strati di cellule di piccole dimensioni ed infine la mandorla che è la parte più importante e vitale. Essa è ricca di sostanze di riserva che verranno utilizzate principalmente per il nutrimento necessario allo sviluppo e alla crescita dell'embrione. Le cellule contenenti tannini sono quelle localizzate in uno strato medio fra il tegumento esterno e quello interno(Dalmasso G.,2005).

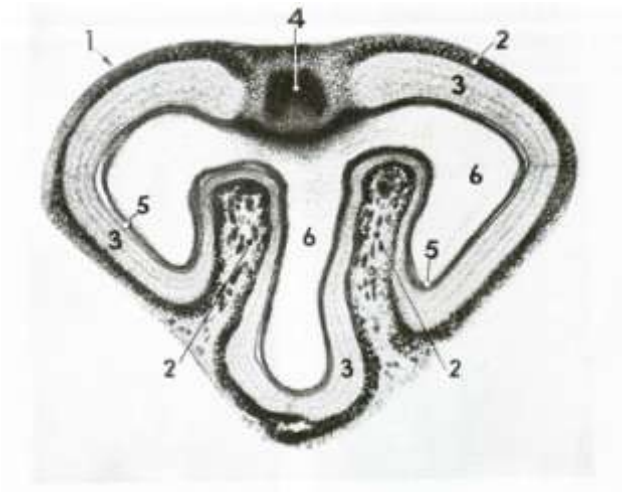


Figura 27: sezione trasversale d'un vinacciolo. 1.Tegumento esterno;2.Zona mediana parenchimatica che riempie anche la fossetta;3.Epidermide interna sclerificata ed introflessa in corrispondenza della fossetta;4.Calaza;5.Tegumento interno;6.Albume.

LO SCOPO DEL LAVORO

Gli ultrasuoni sono ben conosciuti per avere un effetto significativo in svariati processi all'interno dell'industria alimentare. Utilizzando questa tecnologia, molti processi alimentari possono ora essere completati in pochi secondi o minuti mantenendo un'elevata riproducibilità, ottimizzando i costi di trasformazione, semplificando il lavoro, dando maggiore purezza al prodotto finale eliminando i trattamenti delle acque reflue ed usando solo una frazione del tempo e dell'energia necessaria per i processi convenzionali.

Il nostro interesse si è indirizzato sullo studio di un'applicazione specifica, valutandone per la prima volta, gli effetti e interpretandone i risultati.

Lo studio è stato focalizzato sull'estrazione di tannini da vinaccioli tramite la tecnologia degli ultrasuoni.

MATERIALI E METODI

Le prove per valutare il possibile effetto estrattivo degli US nei confronti dei composti polifenolici presenti nei vinaccioli sono state condotte sia su vinaccioli freschi che su vinaccioli provenienti da un oleificio.

- Vinaccioli freschi: provenienti da serbatoi di macerazione, puliti dalle impurità, lavati con acqua ed asciugati in stufa ad una temperatura di 40 °C;
- Vinaccioli da oleificio;

Per le prove è stato utilizzato l'apparecchio SONOPULS HD 2200 Ultrasonic Homogenizer della Monmouth Scientific . Utilizzabile per volumi fino a 1000 mL. E' composto da un generatore GM 2200, convertitore ultrasuoni UM 2200, corno SH213G con punta piatta di Titanio TT13 di 13 mm di diametro e con un'efficienza massima di 200 Watt.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Durante il corso della sperimentazione sono stati utilizzati diversi preparati a causa della limitata disponibilità della materia prima; sono state condotte pertanto delle prove preliminari su:

- 20g di vinaccioli freschi in 100 mL di soluzione simil-vino (preparato con 5g/L di ac.tartarico, 12 % di Etanolo e correzione del pH a 3.2 con NaOH 4M);
- 45g di vinaccioli da oleificio in 150 mL di soluzione simil-vino (tampone tartarico);

ed una prova, effettuata in triplo, su:

- 20g di vinaccioli "da oleificio" in 200 mL di Vino Bianco Friulano;

I campioni sono stati sottoposti a trattamento con ultrasuoni con lo scopo di valutare l'estrazione delle sostanze polifenoliche, in particolare dei tannini, dalla matrice solida dei vinaccioli e confrontati con un campione di riferimento. Le condizioni di trattamento applicate sono state scelte in base ai risultati ottenuti in prove precedenti e si differenziano per il tempo di trattamento (da 1 a 5 minuti) e la percentuale (%) di amplitudine (30%, 60% e 90%). Considerate tutte le ipotesi di trattamento, per le prime prove, è stato seguito un piano sperimentale randomizzato sviluppato con il sofware Modde by Umetric in modo da ottenere la massima informazione con il minor numero di campioni possibile.

	TEMPO DI TRATTAMENTO (min)	AMPLITUDINE(%)
1	5	90%
2	3	30%
3	5	60%
4	3	60%
5	5	30%
6	3	60%
7	1	90%
8	3	90%
9	1	60%
10	3	60%
11	1	30%

Tabella 2: ordine dei campioni come previsto dal piano sperimentale e rispettive condizioni di trattamento applicate (tempi e percentuali di amplitudine).

Per tutti i campioni è stata rilevata la temperatura massima raggiunta a fine trattamento. Sul surnatante dei campioni sottoposti a trattamento e del campione di riferimento, ottenuto dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti, sono state condotte le seguenti analisi:

ANALISI E METODICHE

Tannini totali: il metodo si basa sulla proprietà dei 3,4 flavandioli monomeri e condensati di ossidarsi in mezzo acido-alcolico a caldo, per dare antocianidine colorate(Weinges e Nader, 1982)

I reattivi utilizzati sono: 1L di soluzione di butanolo acido, preparata solubilizzando 150 mg di $Fe_2(SO_4)$ in 500 ml di n-butanolo e 500 ml di HCl 37%

Procedura: a 2 ml di campione diluito 50 volte si addizionano in una provetta 6 ml di soluzione di butanolo acido (provetta A). Metà di questa soluzione viene travasata in una seconda provetta in vetro pyrex con tappo vite (provetta B) che viene posta in bagnomaria a 100°C per 30 minuti. Dopo raffreddamento della provetta B, si leggono le densità ottiche a 550 nm di entrambe le provette contro acqua.

Tannini totali g/L= $(D.O._B - D.O_A) \times 0.1736 \times 50$

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

I reattivi sono: Na_2CO_3 al 15%

Reattivo di Folin-Ciocalteu

In un matraccio da 100 ml si introducono:

- 1 ml di campione diluito 1:5 o 1:10
- 40-50 ml di acqua distillata
- 5 ml di reattivo di Folin

Dopo 30 secondi si aggiungono 20 ml di Na_2CO_3 ,si porta a volume con acqua distillata, si tappa, si agita e si lascia in sosta per 2 ore. Si procede quindi alla misura dell'assorbanza a 750 nm contro un bianco preparato sostituendo il campione con acqua distillata. Il risultato è espresso in mg/L e si ricava mediamente una retta di taratura, ottenuta con soluzione di acido gallico oppure moltiplicando per 900 e per il numero delle diluizioni effettuate.

Indice dei polifenoli totali (Abs 280nm): è un indice del contenuto di polifenoli totali ottenuto tramite assorbanza diretta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280nm.

Indice di Etanolo: (Glories, 1978): indice rappresentativo della frazione di tannini legati a polisaccaridi e sali presenti nella frazione colloidale del vino.

A 1 ml di campione si addizionano, in un becker, 9 ml di etanolo al 96% e 90 ml di acqua distillata; si legge la D.O. a 280 nm contro acqua(d0). In un secondo becker 5 ml di campione e 45 ml di etanolo al 96 %, sono sottoposti dopo 24 ore, a centrifugazione (3000 rpm per 10 min) e sul surnatante, diluito 10 volte, si legge la D.O. a 280 nm contro acqua(d24).

% Indice di Etanolo = ((d0-d24)/d0)x100

Indice di gelatina: si basa sulle proprietà che hanno i tannini astringenti di combinarsi in modo stabile con la gelatina e di precipitare; esso è una modifica dell'indice di gelatina originariamente elaborato da Glories (1978) ottenuto tramite la determinazione dei tannini totali al tempo 0 e dopo 72 ore.

Procedura: a 10 ml di campione si addizionano 1 ml di acqua e si misura la D.O. a 280 nm contro acqua, previa diluizione 1:50(d0). Contemporaneamente ad altri 10 ml di soluzione si addizionano in una provetta 1 ml di soluzione di gelatina(20g/L), si insuffla azoto nello spazio di testa, si tappa e si pone a 10°C per 72 ore. Dopo questo periodo, si centrifuga (3000 rpm per 10 min) e si misura la D.O. del surnatante a 280 nm contro acqua, previa diluizione 1:50(d72).

Indice di gelatina= (d0-d72)/d0

Torbidità: deriva dalla presenza di particelle in sospensione che interrompono il raggio luminoso e diffondono una parte della luce in direzioni diverse da quella del raggio incidente (Ribéreau-Gayon, 2004) . La deviazione è causata non solo dalla presenza di particelle opache, cioè non trasparenti alla luce, ma anche dalla non omogeneità ottica provocata da particelle che, pur essendo trasparenti, hanno un indice di rifrazione diverso da quello del liquido in cui sono sospese. La misura della luce riflessa è in relazione diretta con il numero delle particelle in sospensione e costituisce la base della turbimetria (Tyndall,1870). Per le analisi è stato utilizzato il turbidimetro TN-100 della Eutech.

Particle size: il diametro delle particelle in sospensione viene determinato attraverso uno strumento che sfrutta il principio della diffusione dinamica della luce (DLS) per dimensioni comprese fra 1 nm e 5 µm. Lo strumento utilizzato è Nicomp^{TM} 380/ZLS (Zeta Potential/Particle Sizer – PSS NICOMP, Santa Barbara, California, USA). Il principio di funzionamento si basa sulla diffusione da parte delle particelle colpite da un raggio laser incidente. L'intensità di diffusione di una singola particella dipende dalla dimensione, dalla forma, dal peso molecolare e dalla differenza fra gli indici di rifrazione della particella stessa e il liquido circostante. L'onda della luce incidente può essere considerata come composta da un campo elettrico alternato che, interagendo con gli elettroni delle particelle, li fa oscillare alla medesima frequenza. Vengono così definiti "polarizzabili". Tale frequenza genera la formazione di un nuovo campo elettrico oscillante che irradia la luce diffusa in tutte le direzioni. La diffusione dinamica della luce laser (DLS) misura l'intensità della luce ad un determinato angolo. Essa varia con il tempo a causa dei movimenti Browniani, responsabili dei movimenti delle particelle (Feltrin, 2011). Il sistema è in grado di fornire la distribuzione del diametro delle particelle colloidali e determinare il diametro principale della particella espresso in nanometri. I risultati sono visualizzabili sottoforma di distribuzione Gaussiana o Nicomp. I campioni, in cuvette usa e getta, sono stati sottoposti ad una lettura di 5 minuti all'angolo di 90°.

DPPH• : valuta l'attività antiossidante di specifici composti o estratti, che vengono fatti reagire con un radicale stabile ($6.1x10^{-5}$M di 2,2-difenil-1-pieridrazil idrato), in una soluzione di 3 ml metanolo. La reazione ha inizio con l'addizione di 10µL di campione .L'andamento del DPPH viene seguito monitorando la diminuzione dell'assorbanza ad una specifica lunghezza d'onda, a 25°C, in 20

minuti, fino al raggiungimento di un plateau. La forma radicale del DPPH• assorbe a 515 nm, ma attraverso la riduzione di un antiossidante(AH) o di una specie radicale(R•), l'assorbimento tende via via a diminuire.

$$DPPH\bullet + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A\bullet$$

$$DPPH\bullet + R\bullet \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

Preparazione: la soluzione di DPPH• in metanolo deve avere un' $Abs_{515\ nm} = 0.760$; se il valore è maggiore si diluisce con metanolo, nel caso contrario si aggiunge ulteriore DPPH•. La concentrazione iniziale si determina attraverso la legge seguente:

$$Abs_{515nm} = 12.509 \times (C_{DPPH}) - 2.58 \times 10^{-3}$$

Dalla concentrazione iniziale si traccia la reazione cinetica. La percentuale di DPPH• rimanente viene determinata alla fase stazionaria ed i valori ottenuti sono trasferiti in un grafico mostrante la percentuale residuale. L'attività antiradicalica si definisce dalla quantità di antiossidante necessario per diminuire la concentrazione iniziale di DPPH• del 50%(Brand-Wiliams W.,1994) .

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I primi campioni oggetto della sperimentazione, costituiti da 20g di vinaccioli freschi in 100 mL di tampone tartarico, sono stati sottoposti a trattamento in maniera randomizzata, come previsto dal piano sperimentale. Undici campioni differenziati in base al tempo di trattamento e all'amplitudine impostata, il cui punto medio (il trattamento di 3 minuti al 60%) replicato tre volte (indicato con "rip.1";"rip.2";"rip.3"). L'elaborazione dei primi dati ha offerto indicazioni generali sulle capacità estrattive dei composti polifenolici. Sono state successivamente ripetute le stesse prove, su campioni diversi, valutando ulteriori parametri al fine di confermare quanto visto nella prova preliminare. I grafici seguenti (Grafico 2;3...) riportano i risultati ottenuti dalle varie prove:

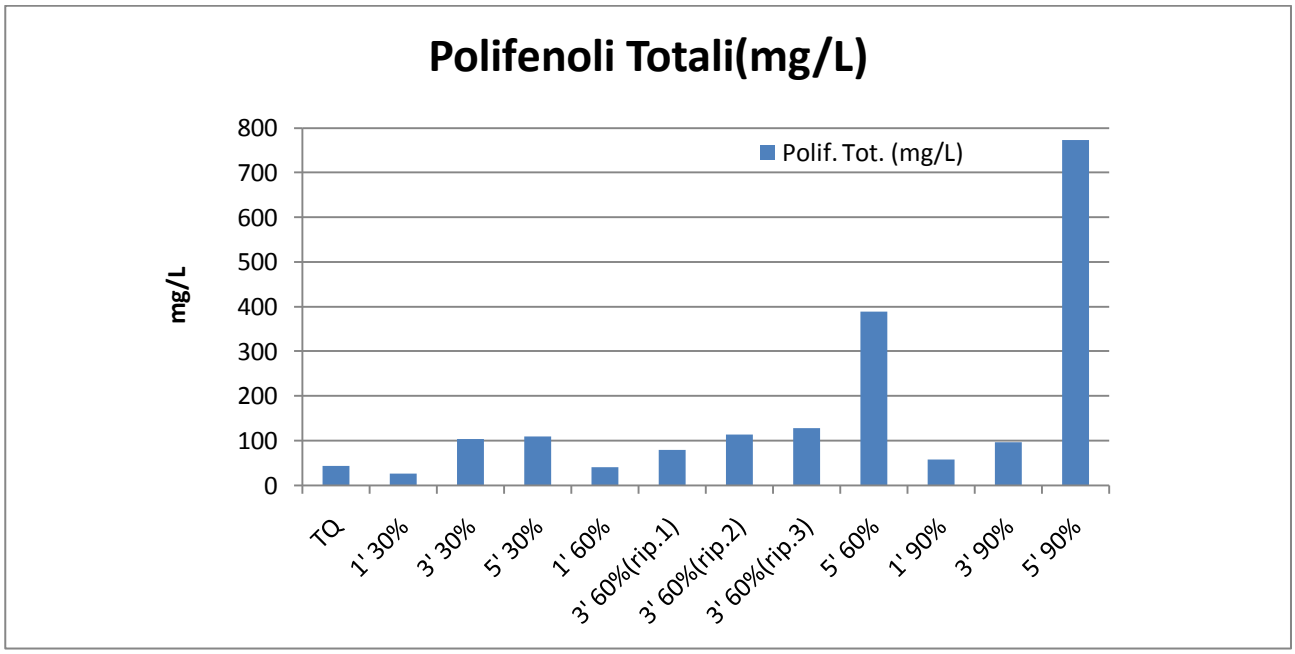


Grafico 2: rappresentazione grafica del contenuto dei polifenoli totali (mg/L) dei campioni sottoposti a trattamento ad US.

Dal grafico 2 si osserva un aumento di estrazione nei confronti del TQ, all'aumentare delle variabili in gioco. I trattamenti ad 1 minuto risultano meno efficaci rispetto quelli a 3 e 5 minuti. Analoga la considerazione al variare dell'amplitudine dove si nota un maggior effetto estraente per amplitudini del 90% rispetto a quelle del 30%.

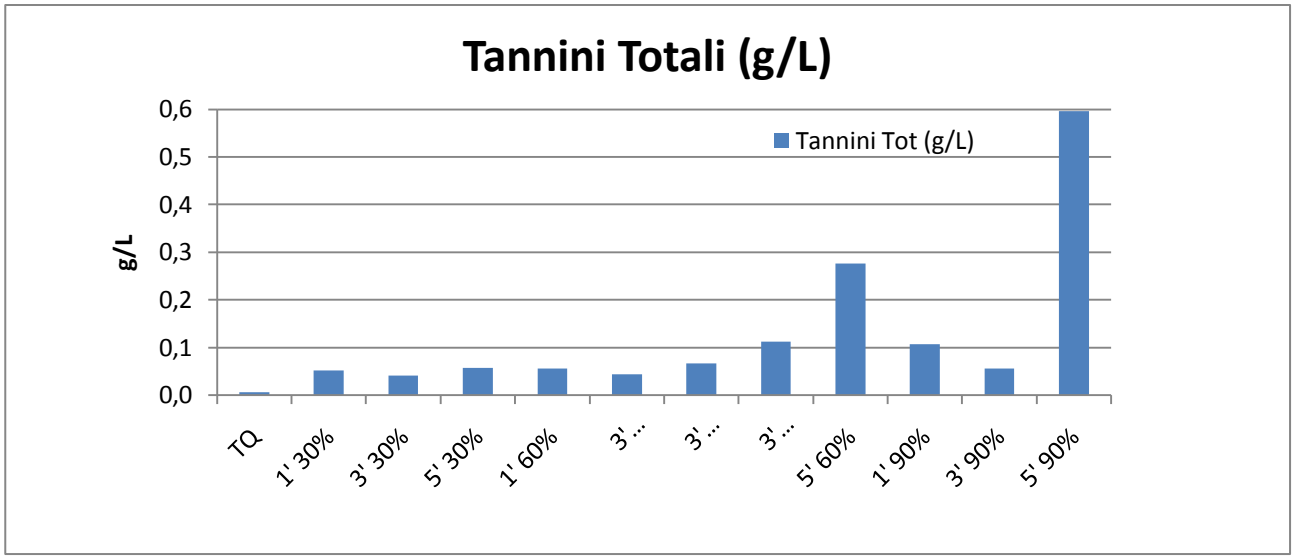


Grafico 3: istogramma rappresentante la quantità di tannini totali, espresso in g/L.

Dal grafico 3 si nota come il trattamento abbia comportato un effetto estrattivo sul contenuto di tannini totali per tutti i campioni. L'efficacia aumenta per amplitudini e tempi di esposizione maggiori (particolarmente interessanti risultano le condizioni 5' 60% e 5'90%).

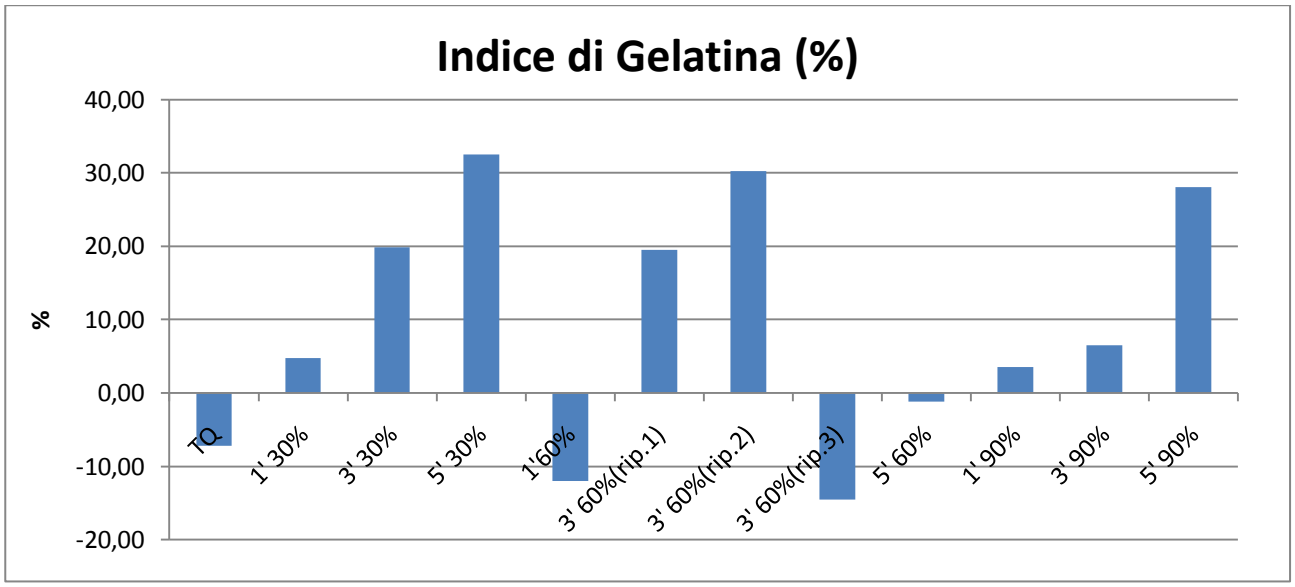


Grafico 4: istogramma rappresentante l'indice di Gelatina, espresso in percentuale(%).

Dal grafico 4 si evince un aumento dell'indice di gelatina nelle prove trattate con amplitudine del 30%, che nel complesso risultano maggiormente efficaci. Un andamento analogo si riscontra anche nei campioni trattati al 90% di amplitudine. I valori negativi riscontrati risultano poco significativi e potrebbero essere legati ad una mancata estrazione di tannini, da verificare con

ulteriori analisi. Fra questi il TQ, assumendo valori prossimi allo zero dal momento che il contenuto di polifenoli risultava molto basso, potrebbe rispondere all'indice con un dato negativo.

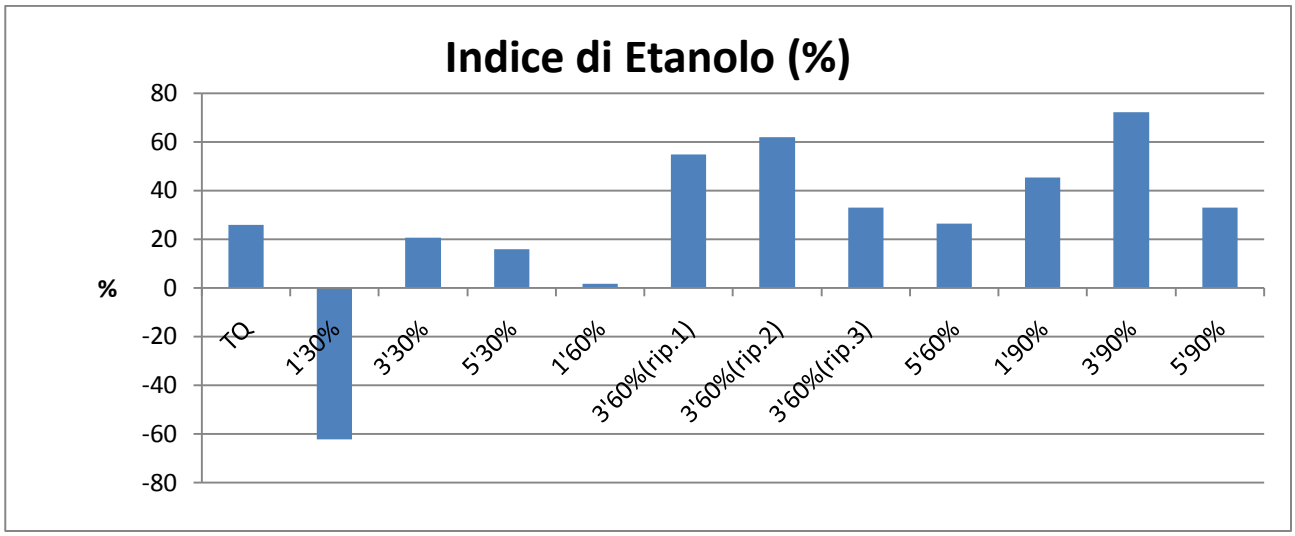


Grafico 5: istogramma rappresentante l'indice di Etanolo, espresso in percentuale(%).

Per quanto riguarda l'indice di Etanolo (Grafico 5), è possibile che la scarsa rappresentatività sia dovuta al fatto che non vengano estratti tannini legati a polisaccaridi.

La seconda prova è stata condotta su campioni preparati con 45g di vinaccioli provenienti dall' oleificio in 150 mL di tampone. A fine trattamento è stata rilevata la temperatura raggiunta nel campione, il riferimento è stato conservato a temperatura ambiente (20°C), ed effettuata la lettura dell'assorbanza a 280 nm per la determinazione dell'indice dei polifenoli totali (Tabella 3).

TEMPO (min) E AMPLITUDINI (%)	TEMPERATURA (°C)	Abs 280nm
1' 30%	28,4	0,2738
3'30%	34,3	0,3841
5'30%	40,7	0,4549
1'60%	30,7	0,3628
3'60%(rip.1)	39	0,378
3'60%(rip.2)	38,5	0,4408
3'60%(rip.3)	39,5	0,3994
5'60%	45,8	0,4181
1'90%	31	0,3625
3'90%	44,7	0,3658
5'90%	52,5	0,3836
TQ		0,0423

Tabella 3: vengono presentate le temperature e l'assorbanza a 280nm di tutti i trattamenti.

I grafici seguenti (Grafico 6;7;8;9;10;11) rappresentano i dati ottenuti relativamente al contenuto in tannini totali, polifenoli totali, indice d'etanolo, indice di gelatina, torbidità, particle size.

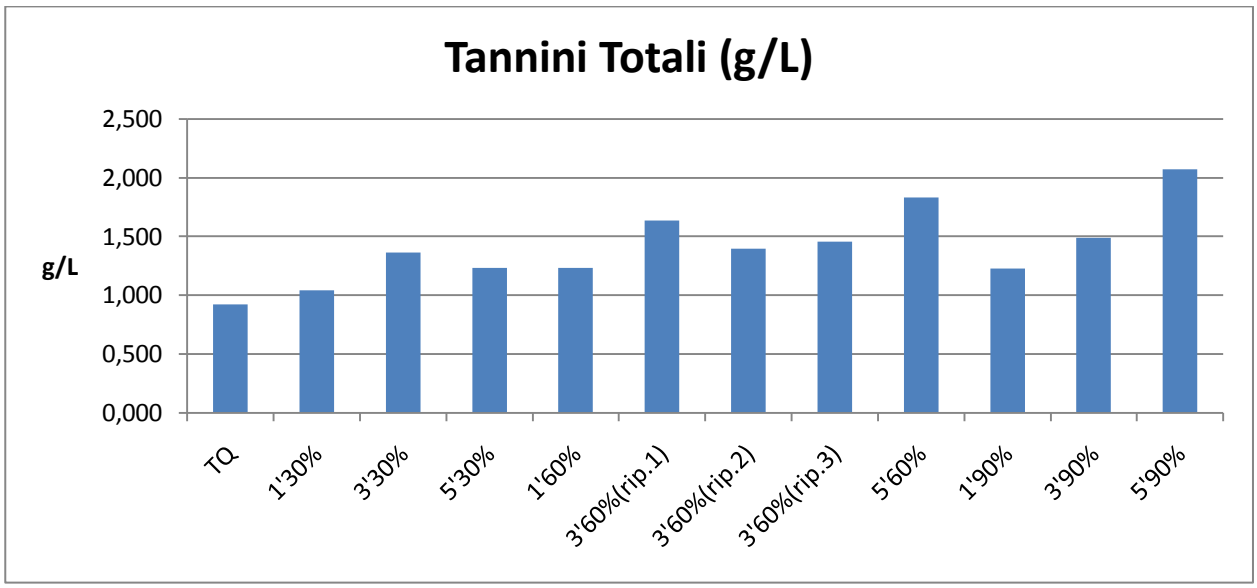


Grafico 6: istogramma rappresentante il contenuto di tannini totali, espresso in g/L.

Dal grafico 6 si osserva un andamento crescente della concentrazione dei tannini totali estratti all'aumentare sia dei tempi di applicazione che dell'amplitudine, a conferma di quanto previsto. Le repliche del punto medio (3' 60%) hanno dato valori simili tra di loro. Tutti i campioni trattati presentano un contenuto in g/L superiore al TQ evidenziando pertanto il ruolo attivo degli ultrasuoni nei confronti dei fenomeni estrattivi di tali sostanze.

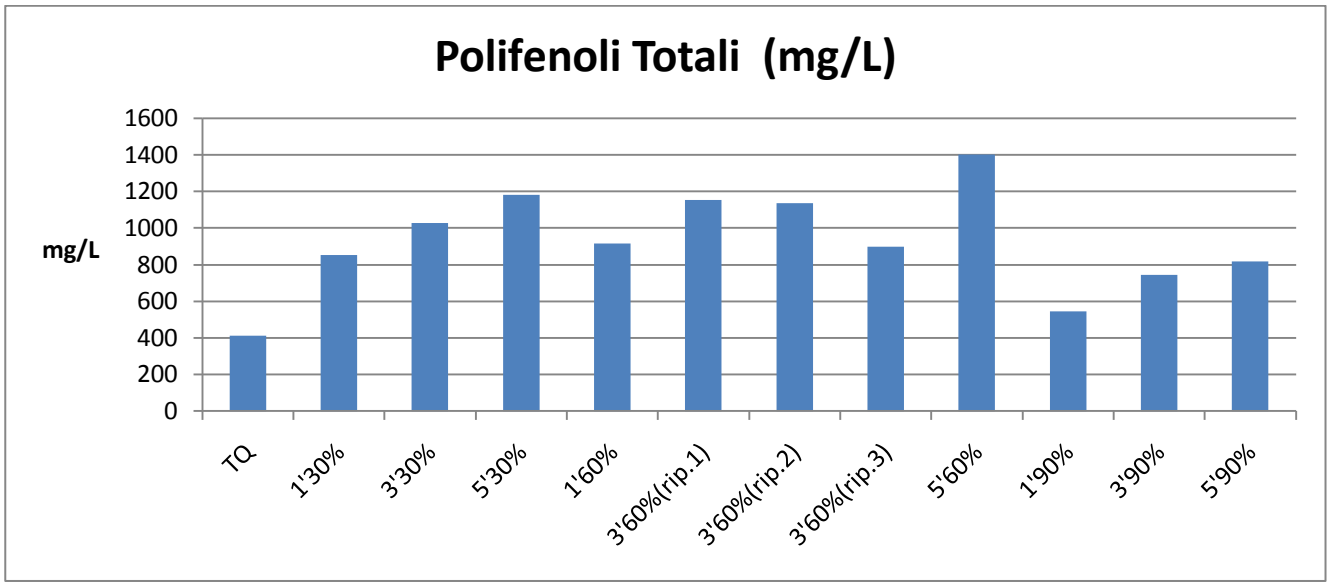


Grafico 7: polifenoli (mg/L) estratti in seguito a trattamento ad US.

Il grafico 7 denota un andamento significativo del contenuto di polifenoli estratti dai campioni sottoposti a trattamento al variare del tempo: più lunghi sono i tempi di trattamento, maggiori i quantitativi delle sostanze estratte. Non vi sono correlazioni con la diversa percentuale di amplitudine, si nota infatti che I trattamenti condotti al 30% di amplitudine risultano essere maggiormente estrattivi rispetto ai campioni sottoposti ad una amplitudine del 90%. La ripetibilità è buona, la "rip.3" si discosta solo leggermente dai valori delle altre due repliche. Nel complesso, i risultati ottenuti confermano la cinetica già evidenziata nei campioni preparati con vinaccioli freschi anche se la significatività è diversa: nei vinaccioli da oleificio questa risulta minore a causa dello stress delle condizioni di lavorazione a cui i vinaccioli sono stati precedentemente sottoposti.

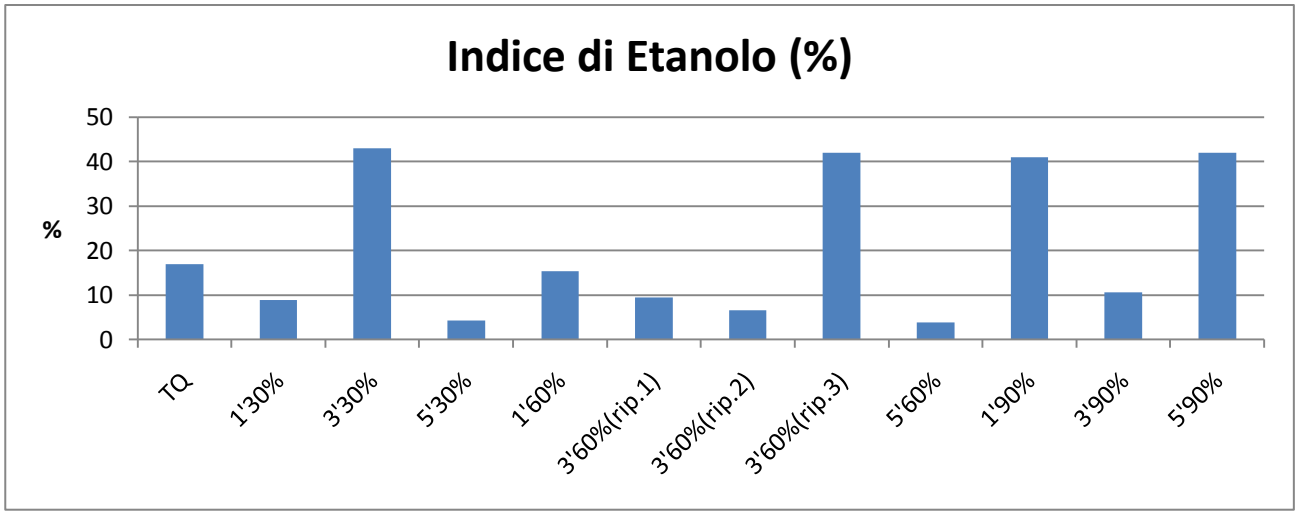


Grafico 8: Rappresentazione grafica dell' Indice di etanolo (%).

L'indice di Etanolo (Grafico 8) ha mostrato valori in parte discordanti rispetto a quelli determinati precedentemente, non tutti i trattamenti infatti hanno dato la risposta attesa, probabilmente per la natura della materia prima che, avendo già subito delle lavorazioni, potrebbe risultare parzialmente alterata.

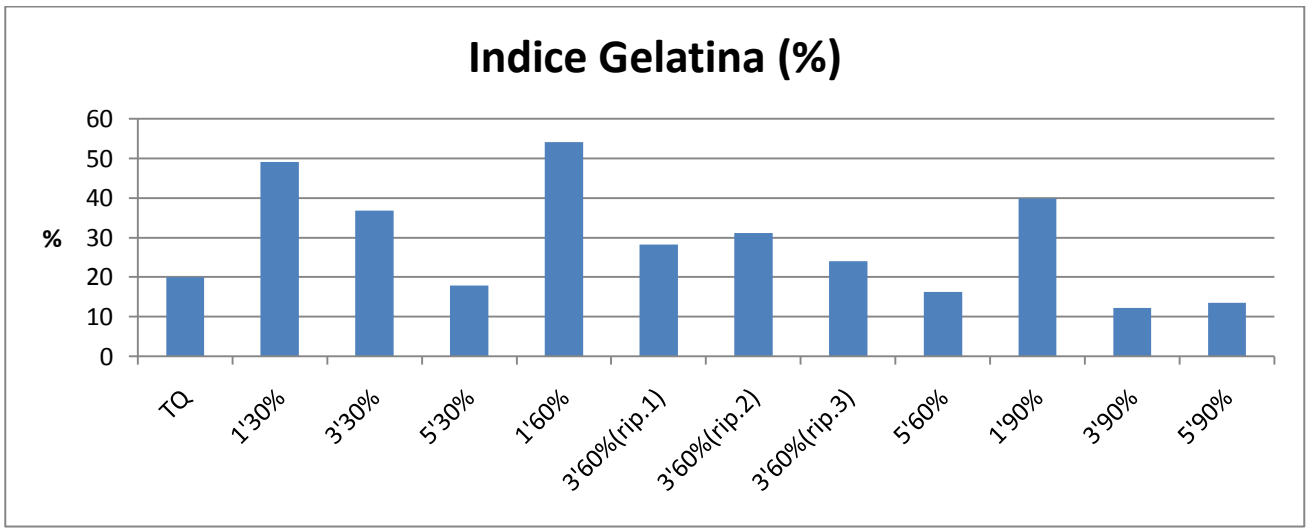


Grafico 9: Indice di gelatina (%) dei campioni sottoposti a trattamento.

I valori dell' indice di gelatina (Grafico 9) più alti sono stati registrati per i trattamenti più brevi per poi diminuire con l'aumentare del tempo e della percentuale di amplitudine come riscontrato per i trattamenti 5'60%, 3'90%, 5'90%. La ripetitività dei campioni triplicati (3' 60%) risulta ben rappresentata.

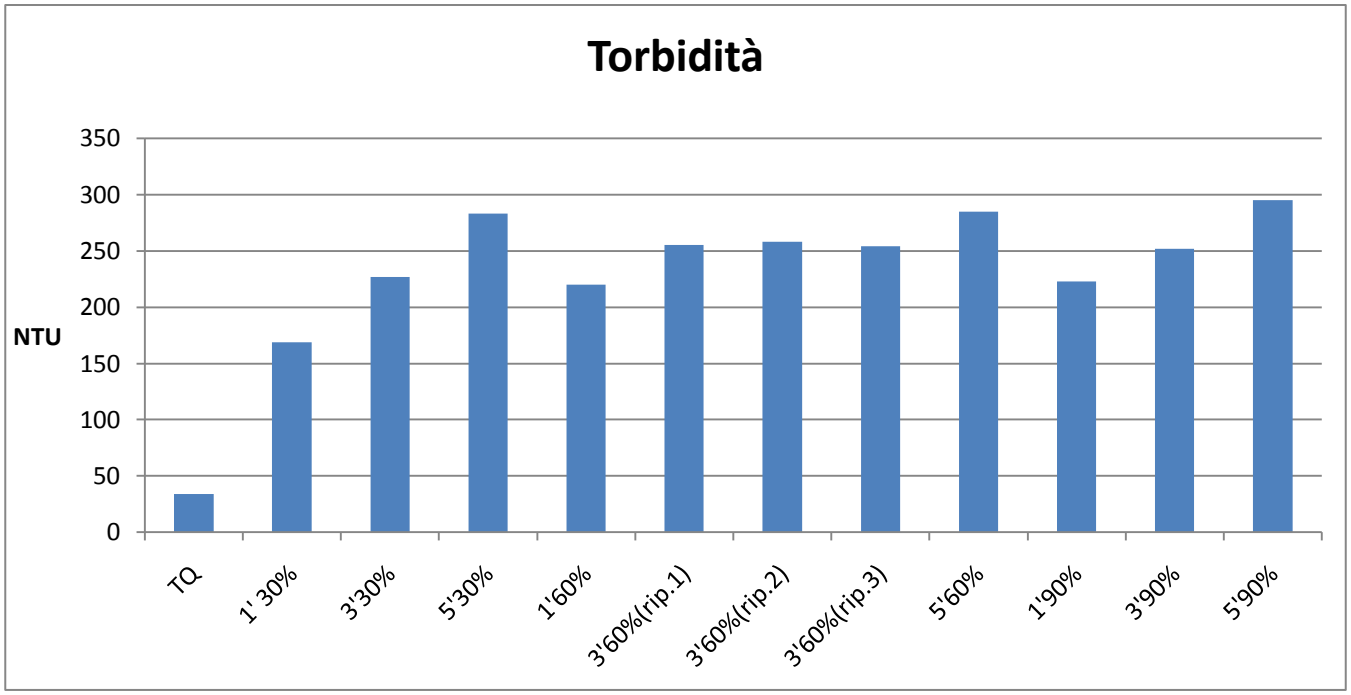


Grafico 10: Torbidità (NTU) dei campioni oggetto di studio.

Relativamente alla torbidità (Grafico 10) è stato riscontrato un aumento relativo ai campioni sottoposti alle condizioni di trattamento più intense rispetto al campione di riferimento. Come conseguenza di tali trattamenti si registra quindi una maggiore concentrazione di particelle in sospensione. Si notano valori costanti per i campioni in triplo (3' 60%).

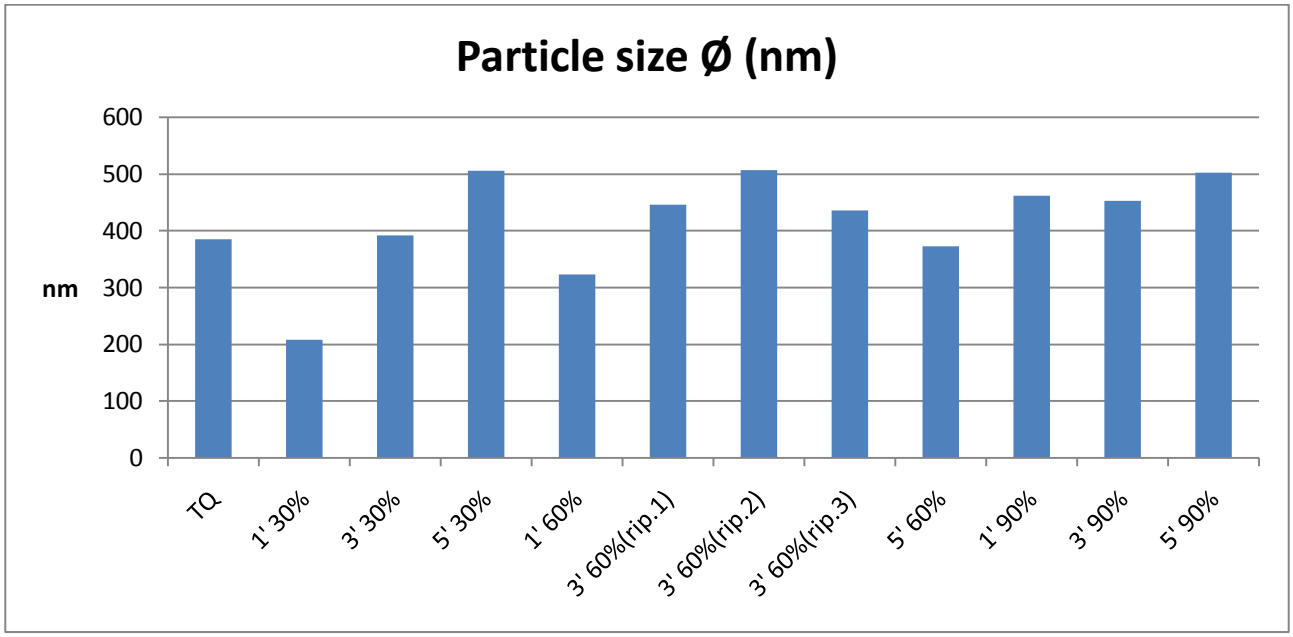


Grafico 11: istogramma rappresentante il diametro delle particelle in sospensione (nm).

La variazione del diametro delle particelle è riportato nel grafico 11: all'aumentare del tempo di trattamento, aumenta il diametro delle particelle disperse. A parità di tempo di trattamento, al variare dell'amplitudine si riscontra un aumento del diametro delle particelle proporzionale per i campioni ad 1', poche differenze nei campioni a 3' ed una situazione diversa per i trattamenti a 5' che presentano valori correlabili per le amplitudini del 30% ed 90% ,ma più bassi per quelli trattati al 60%.

L'ultima prova è stata effettuata su vinaccioli da oleificio (20 g) in 200 mL di vino Bianco Friulano. In questo caso sia i trattamenti che le analisi sono state effettuate in triplo. Le analisi sono state eseguite anche sul VINO (in modo da valutare il suo corredo polifenolico) e sul TQ (vino + vinaccioli non sottoposti a trattamento).

TRATTAMENTI	TEMPERATURA °C
1'30%	27,7
3'30%	38,2
5'30%	46,8
1'60%	30,7
3'60%	43,6
5'60%	54,3
1'90%	34,7
3'90%	53,8
5'90%	63,6

Tabella 4: Media delle temperature (°C) rilevate nei campioni dopo trattamento.

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

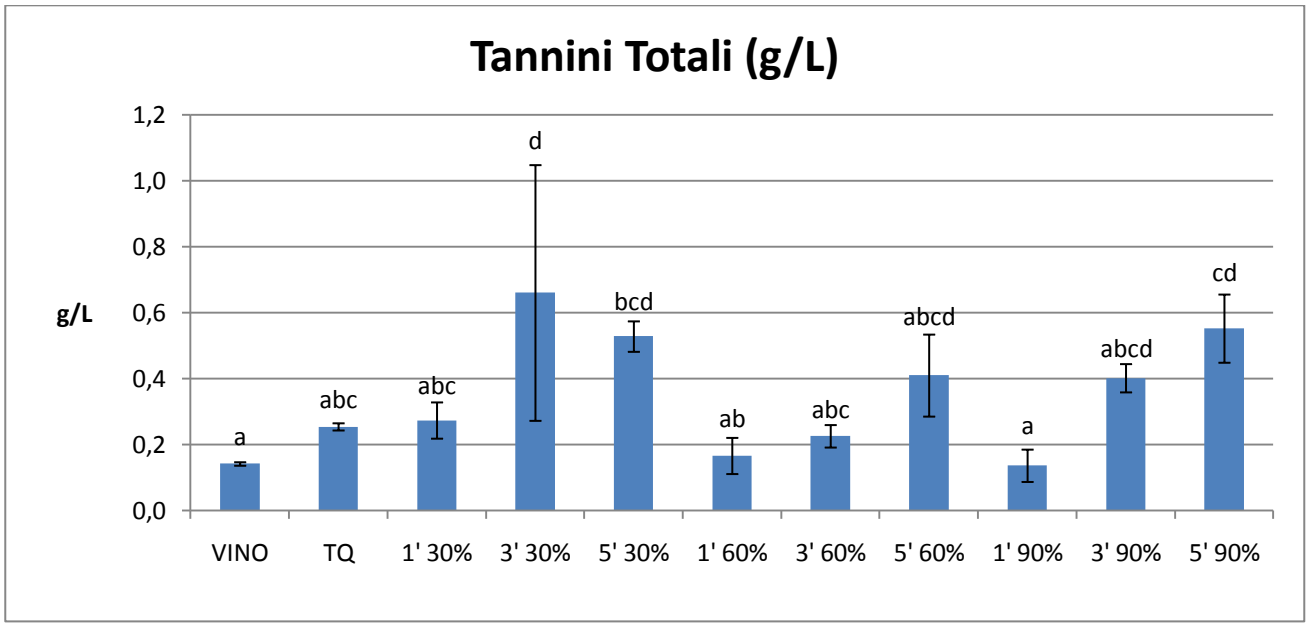


Grafico 12: Media dell' Indice dei tannini totali (g/L), sulla base del valore medio dei campioni analizzati.

Dal grafico 12 si nota un andamento estrattivo del contenuto di tannini totali crescente, al variare del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento. L'estrazione non risulta proporzionale per amplitudini diverse ad uguali tempi di trattamento. In linea generale, sono stati riscontrati gli stessi andamenti visti per i campioni trattati in tampone.

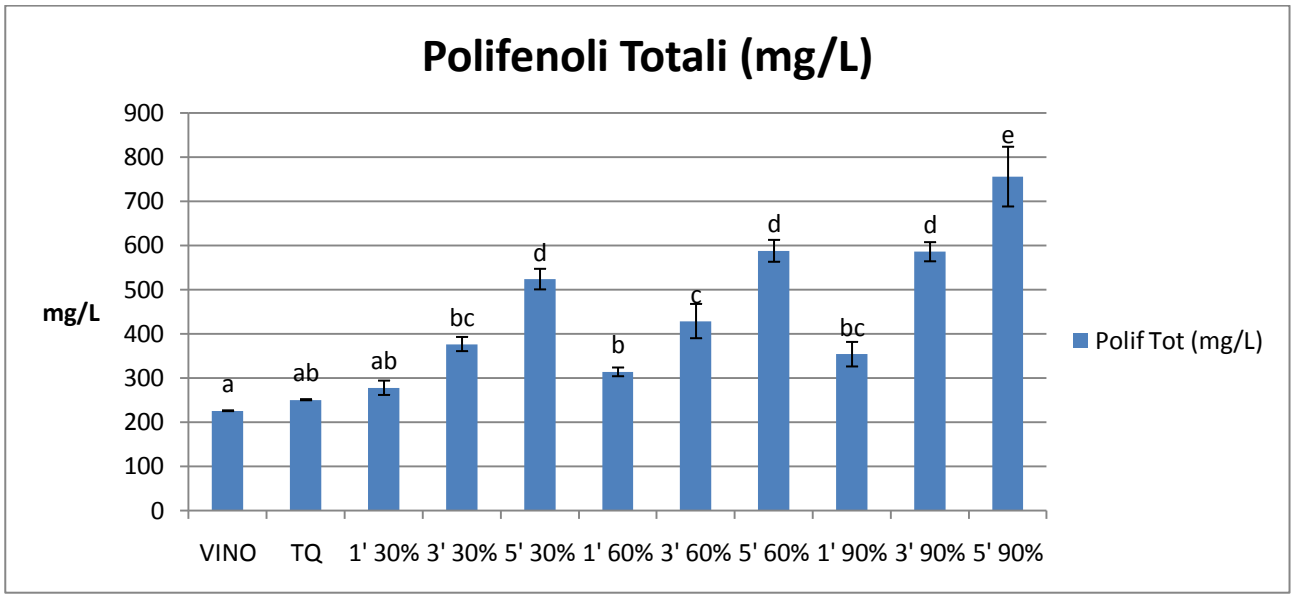


Grafico 13: Media dei valori dei polifenoli totali (mg/L) rilevati sul vino, sul TQ e sui campioni sottoposti a trattamento.

I valori dei polifenoli totali determinati (Grafico 13) confermano le aspettative iniziali: è stato registrato un aumento del contenuto di polifenoli estratti al variare sia del tempo di trattamento che della percentuale di amplitudine applicata. Le estrazioni maggiori si sono avute per i campioni sottoposti a trattamenti con tempi e amplitudini più elevate.

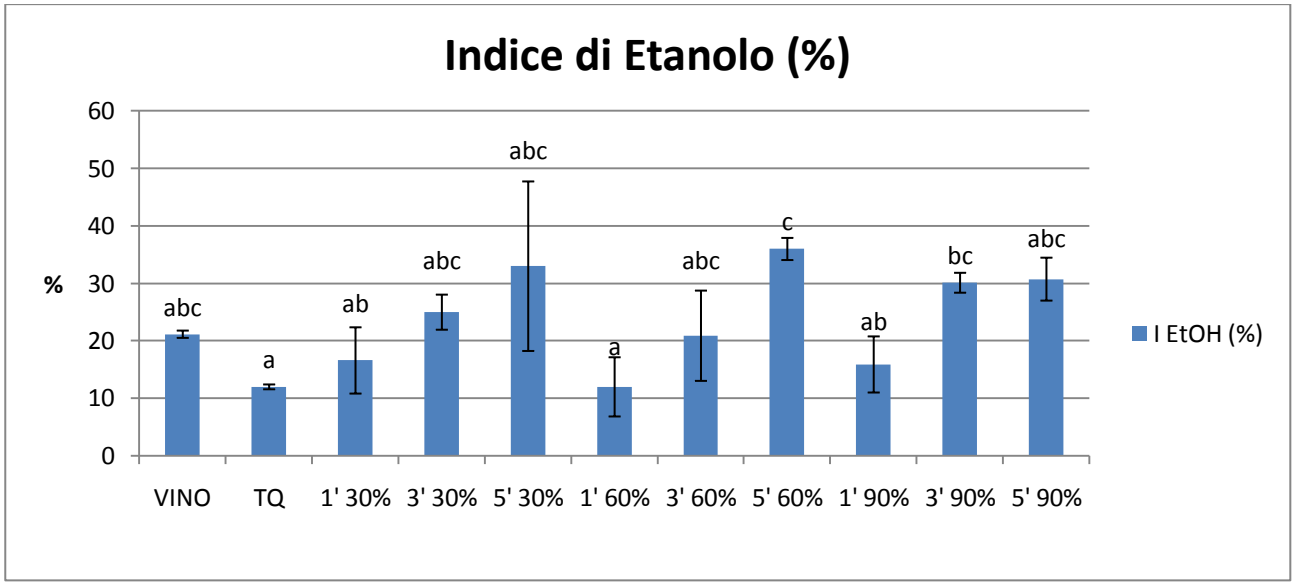


Grafico 14: Media dei valori dell'indice di Etanolo (%).

I dati dell'indice di Etanolo (Grafico 14) mostrano andamenti crescenti all'aumentare del tempo di trattamento rispetto al campione di riferimento. Il valore del VINO piuttosto elevato, poco confrontabile con il TQ e con i trattamenti più brevi, potrebbe essere dovuto ad un errore operativo.

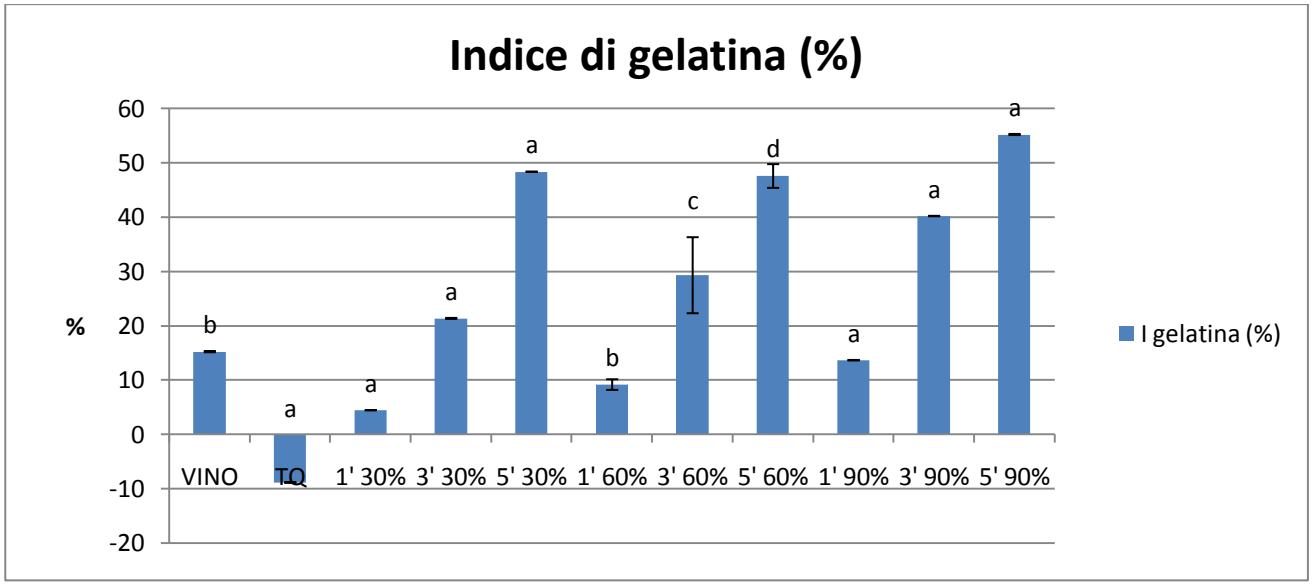


Grafico 15: Media dell'indice di gelatina (%).

I valori dell'indice di gelatina (Grafico 15) hanno mostrato un andamento positivo, proporzionale alle aspettative. Tali valori indicano che per trattamenti più spinti si ottiene un'estrazione maggiore e di conseguenza una maggiore percentuale di tannini astringenti.

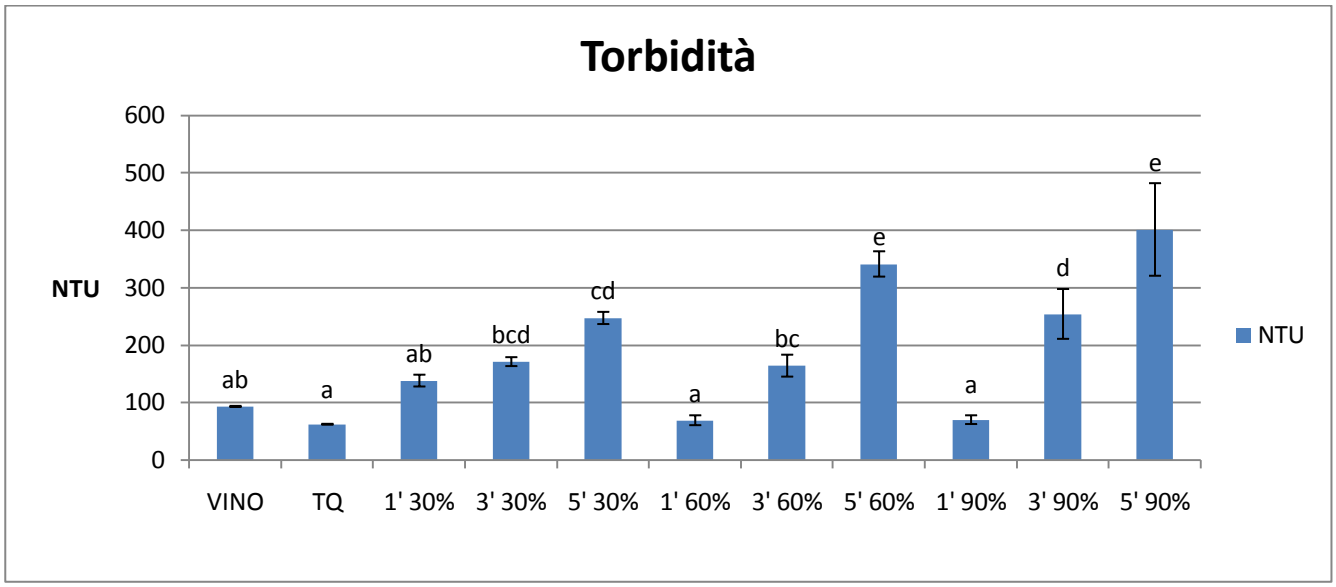


Grafico 16: Media delle torbidità (NTU).

I valori di torbidità (Grafico 16) aumentano all'aumentare dell'intensità e dei tempi di trattamento.

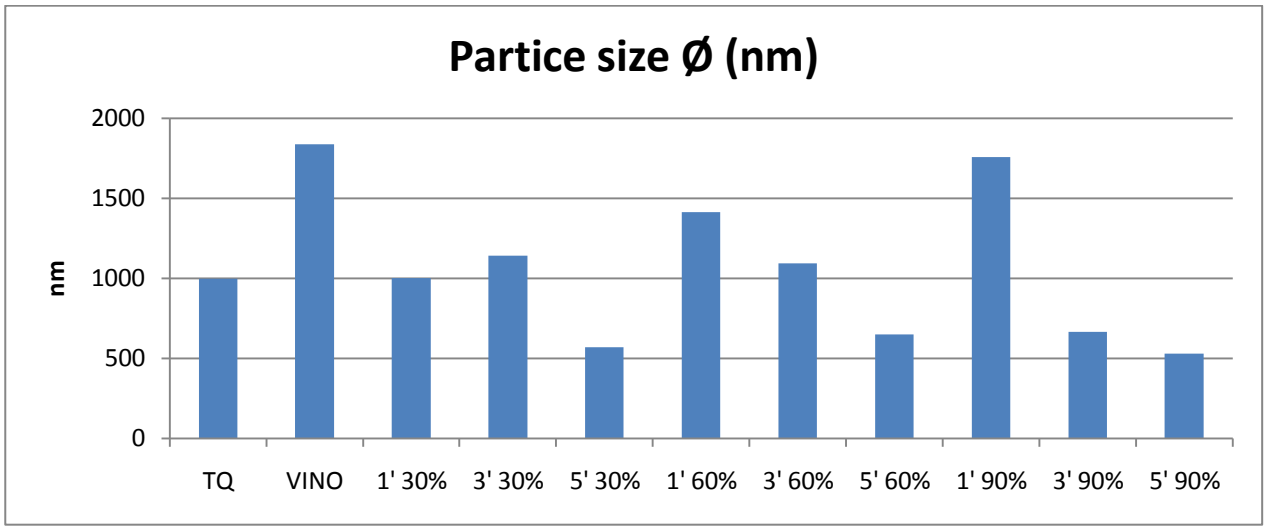


Grafico 17: Media dei diametri delle particelle disperse (nm).

In linea generale si nota una diminuzione del diametro delle particelle (Grafico 17) all'aumentare della percentuale di amplitudine e dei tempi di trattamento, interpretabile ad un possibile effetto di disgregazione cellulare della matrice solida.

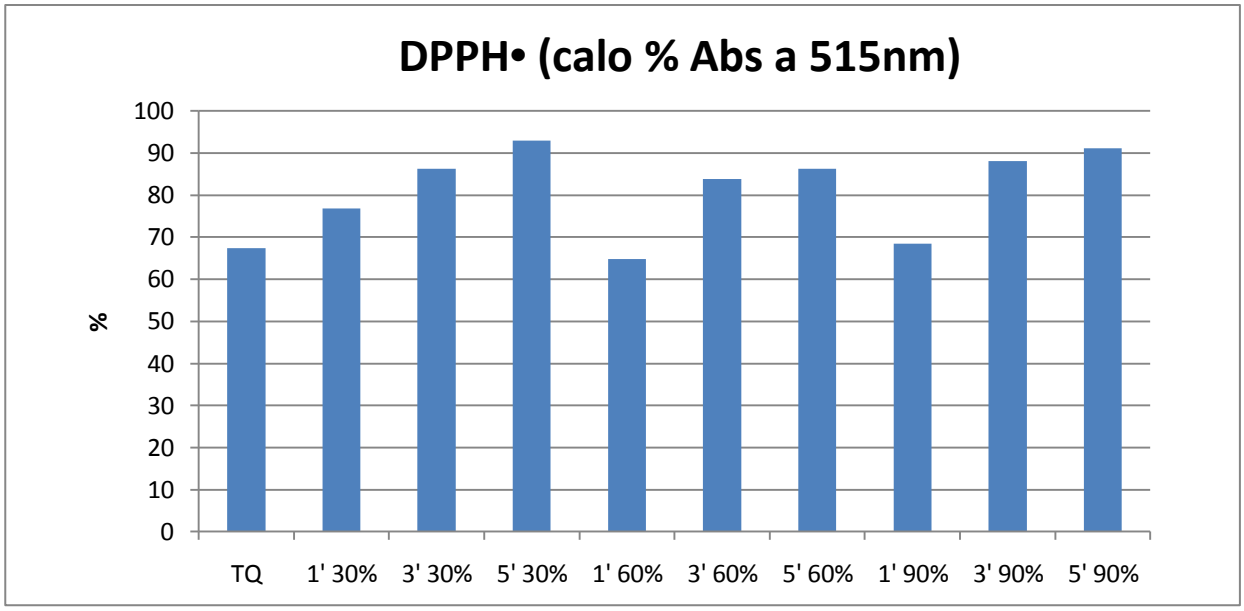


Grafico 18: Diminuzione percentuale Abs 515 nm.

Rispetto al TQ si riscontra un aumento del potere antiossidante (Grafico 17) di tutti i campioni sottoposti a trattamento, soprattutto per i campioni trattati all'amplitudine del 30%.L'andamento è proporzionale se considerate le tre diverse amplitudini.

CONCLUSIONI

Lo studio effettuato ha fornito dei risultati interessanti e può offrire degli spunti per un possibile risvolto applicativo. Nello specifico la ricerca si è posta come obiettivo l'estrazione dei tannini da vinaccioli tramite gli ultrasuoni.

Le sperimentazioni hanno provato l'efficacia estrattiva sia al variare delle condizioni tecniche legate alla modalità di trattamento sia al variare della materia prima.

Analizzando i risultati nel complesso, si evince una diretta proporzionalità con le variabili considerate(tempo ed amplitudine), facendo registrare quantitativi crescenti per trattamenti dal 30% al 90% e per applicazioni da 1 a 5 minuti.

Altre situazioni, al contrario, offrono risultati migliori per trattamenti al 30% che probabilmente risultano essere meno invasivi grazie a temperature più contenute, che si aggirano fra un minimo di 27°C ed un massimo di 45°C.

Le prime analisi hanno offerto un'indicazione generale necessaria per il proseguimento della sperimentazione stessa. Nel confronto fra vinaccioli da oleificio e freschi è stata osservata una significatività maggiore negli ultimi, probabilmente dovuta alla natura della materia prima.

Come già riscontrato da studi precedenti, l'efficacia dei trattamenti con ultrasuoni è stata dimostrata con una diminuzione progressiva della durata della macerazione, comportando in termini pratici, una migliore gestione della vinificazione. Inoltre, il trattamento sulle fecce di fermentazione ha favorito la lisi dei lieviti, rendendo possibile la riduzione dei tempi di affinamento dei vini sulle fecce fini.

Una prospettiva futura potrebbe essere l'impiego degli ultrasuoni come ausilio tecnologico, per la produzione industriale di tannini attraverso condizioni che rispettino maggiormente l'integrità e che favoriscano la lavorazione con operazioni più semplici e maggiormente ripetibili.

Un altro aspetto molto importante che deve essere tenuto in considerazione è la riduzione del fabbisogno energetico dei processi, in modo da ridurre sia i costi ambientali che economici.

BIBLIOGRAFIA

- Abramov OV(1998). High-Intensity Utrasound: Theory and industrial applications. London: Gordon and breach.
- Aron, P. M.; Kennedy, J. A., Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 2008, 52, (1), 79-104.
- Brand-Williams W.,Cuvelier M.E.,Berset C.,1994.Use of a free radcal method to evaluate antioxidant activity. Laboratoire de chimie des substances naturelles, départment science de l'aliment.
- Canselier, J. P., Delmas, H., Wilhelm, A. M., & Abismail, B. (2002). Ultrasound emulsification—Anoverview. Journal ofDispersion Science and Technology, 23, 333−349.
- Càstino M. 1991. Caratteristiche sensoriali dei polifenoli flavonici dei vini,Pnews.1,4-7.
- Dalmasso G., Eynard I. 2005. Viticoltura moderna(manuale pratico). Hoepli.
- Dubois P.1993. Les aromes des vins et leur defauts, R.f.Oen. 144,63-72.
- Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cheynier, V., Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (19), 7331-7338.
- Fregoni M. 2005. Viticoltura di qualità. Phytoline edizioni.
- Freudenberg K., *Die Chemie der Naturlichen Gerbstoffe*. J. Springer: Berlin, 1920.
- Gallego-Juárez, J. A. (1998). Some applications of air-borne power ultrasound to food processing. InM. J.W. Povey&T. J. Mason (Eds.), Ultrasound in Food Processing (pp. 127−143). London: Blackie Academic & Professional.
- Glombitza k:W., Koch M.,Eckhardt G.,Chlorierte phlorethole aus Laminaria ochroleuca. Phytochemistry 1977,16,(6),796-798.
- Hielscher, T. (2005). Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions, paper presented at 1st Workshop on Nano Technology Transfer, ENS Paris, 14–16 December, Paris France.
- Kenneth S. Suslick. The Chemistry of ultrasound(from The Yearbook of science and the Future 1994). Encyclopedia Britannica:Chicago,1994 pp 138-155.

- Khanbabaee k., Van Ree T., Tannins: Classification and definition. Natural product reports 2001, 18,(6),641-649.
- Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (1987). Sonochemistry Part 1. The Physical Aspects. Chemical Society Reviews, 16, 239−274.
- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound assisted crystalization (sonocrystallization). Ultrasonics Sonochemistry, 14, 717−724.
- M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason, (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, Ultrason. Sonochem.8 137-142.
- M. Vinatoru,(2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, Ultrasound. Sonochem. 8 303–313.
- Marchiori U.(2005). Studi sulla tecnologia ad ultrasuoni applicata in enologia. Tesi di laurea magistrale. Università degli studi di Padova, Udine e Verona.
- Mason TJ,(2000).Large scale sonochemical processing: aspiration and actuality. Ultrasonics sonochemistry,7,145-149.
- Mason TJ,Lorimer(2002).Applied sonochemistry. Weinheim: Wiley VCH.
- Mason, T. J., & Luche, J. L. (1996). Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. In R. van Eldik, & C. D. Hubbard (Eds.), Chemistry under extreme or non classical conditions (pp. 317– 380). New York: John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akade mischer Verlag.
- Mason,(1998).Power ultrasound in food processing. In ultrasound in food processing(Povey MJW, Mason TJ, eds). London: Blackie academic and professional,pp.105-150.
- Matsuura, K., Hirotsune, M., Nunokawa, Y., Satoh, M., & Honda, K. (1994). Acceleration of Cell Growth and Ester Formation by Ultrasonic Wave Irradiation. Journal of Fermentation and Bioengineering, 77, 36−40.
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. Trends in Food Sci., 6, 293–299.
- Mueller-Harvey, I., Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 2001, 91, (1-2), 3-20.
- Muthukumaran, S., Kentish, S. E., Stevens, G. W., & Ashokkumar, M. (2006). Application of ultrasound in membrane separation processes: A review. Reviews in Chemical Engineering, 22, 155−194.
- Nitin Rana,(2010). Ultrasonication:emerging and promising technology for food processing industry. M.Tech-food and nutritional biotechnology SRM University.

- Pangu, G. D., & Feke, D. L. (2004). Acoustically aided separation of oil droplets from aqueous emulsions. Chem Eng. Sci., 59, 3183−3193.
- Parys, S.; Rosenbaum, A.; Kehraus, S.; Reher, G.; Glombitza, K. W.; Kaning, G. M., Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. *Journal of Natural Products* 2007, 70, (12), 1865-1870.
- Pitt,W. G., & Rodd, A. (2003). Ultrasound increases the rate of bacterial growth. Biotechnology Progress, 19, 1030−1044.
- Quideau, S.; Feldman, K. S., Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews* 1996, 96, (1), 475-503.
- Ragan, M. A.; Glombitza, K. W., Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* 1986, 4, 129-241.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2007. *Trattato di enologia II (chimica del vino – stabilizzazione – trattamenti)*. (3° ed.), Edagricole.
- Richards WT, Loomis AL (1927). Chemical effects of high frequency sound waves. Journal of the American chemical society,49,3086-3100.
- Roberts, R. T. (1993). High intensity ultrasonics in food processing. Chemistry & Industry, 15(February), 119–121.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., & Raso, J. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In G.W. Gould (Ed.), New Methods of Food Preparation (pp. 176−204). London: Blackie Academic and Professional.
- Sinisterra, J. V. (1992). Application of ultrasound to biotechnology: An overview. Ultrasonics, 30, 180−185.
- Telsonic Group (2007). Ultrasonic screening technology, Bronschhofen, Switzerland.
- Thakur, B. R., & Nelson, P. E. (1997). Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. Nahrung, 41, 299–301.
- Ubigli M.,2009.I profili del vino(alla scoperta dell'analisi sensoriale).(3°ed.).Edagricole.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. a review. Innovative Food Science and Emerging Technologies 9, 161–169.
- Villamiel, M., & de Jong, P. (2000b). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. Agriculture and Food Chemistry, 48, 472–478.

- Virone, C., Kramer,H. J. M., van Rosmalen, G. M., Stoop, A. H.,&Bakker, T.W. (2006). Primary nucleation induced by ultrasonic cavitation. Journal of Crystal Growth, 1, 9−15.
- Wu, H., Hulbert, G. J., & Mount, J. R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 1, 211−218.
- Zheng, L., & Sun, D. W. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes — A review. Trends in Food Science & Technology, 17, 16−23.
- Grégory Schmauch (2010). Doctorat de l'université Bordeaux 2. Interactions tannins proteins en oenologie.

RINGRAZIAMENTI