



Università degli Studi di Firenze

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FISIologiche e NUTRIZIONALI**

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Dello Sbarba Persio

*Influenza dei trattamenti elettrochimici nella
stabilizzazione dei vini rossi*

Curriculum Controllo di Qualità dei Prodotti Alimentari
Settore Scientifico Disciplinare AGR15

Dottorando

Dott.ssa Salmi Monica

Tutore

Prof. Bertuccioli Mario

Anni 2010/2012

A Daniele

*e a tutte le persone che
hanno reso e renderanno
la mia vita speciale ed
unica*

Indice

INDICE	1
PREMESSA	4
CAPITOLO 1	6
INTRODUZIONE	6
1.1 RUOLO DELLE COMPONENTI FENOLICHE NEI VINI ROSSI	6
1.1.1. ANTOCIANI.....	6
<i>Effetti del biossido di zolfo</i>	8
<i>Origine dei piranoantociani</i>	9
<i>Degradazione degli antociani</i>	9
1.1.2. TANNINI.....	10
<i>Ossidazione mediata da ossigeno</i>	12
<i>Polimerizzazione</i>	13
1.1.3 REAZIONI DI CONDENSAZIONE TRA ANTOCIANI E TANNINI.....	13
1.2. RUOLO DELL'ACETALDEIDE NEL VINO	16
1.2.1 POLIMERIZZAZIONE MEDIATA DALL'ACETALDEIDE.....	18
1.2.2 ACETALDEIDE E FERMENTAZIONE MALOLATTICA (FML).....	21
1.2.3 LA SOGLIA DI PERCEZIONE.....	22
1.3 FATTORI CHE DETERMINANO IL COLORE DEI VINI ROSSI	23
1.3.1. MACERAZIONE/FERMENTAZIONE.....	23
1.3.2. FERMENTAZIONE MALOLATTICA.....	25
1.3.3. MATURAZIONE IN FUSTI DI ROVERE.....	25
1.3.4. EVOLUZIONE DEL COLORE NEL CORSO DELLA MATURAZIONE E DELL'AFFINAMENTO.....	26
1.3.5. IL RUOLO DEL POTENZIALE REDOX NELL'EVOLUZIONE DEI VINI.....	28
1.3.6. ELETTRICITÀ E AFFINAMENTO.....	30
1.3.7. MICRO-OSSIGENAZIONE (MOX).....	31
1.3.8. VANTAGGI E SVANTAGGI DELLA MICRO-OSSIGENAZIONE.....	33
1.3.9. UTILIZZO DELLA CORRENTE NELLA STABILIZZAZIONE DEL VINO.....	34
CAPITOLO 2	37
SCOPO	37
CAPITOLO 3	39
MATERIALI E METODI	39
3.1 IL PROGETTO DI RICERCA	39
3.1.1. LA CELLA ELETTROLITICA.....	39
3.1.2 STRUMENTAZIONE PER LA MISURA DEL POTENZIALE REDOX.....	40
3.1.3 STRUMENTAZIONE PER LA MISURA DELL'OSSIGENO DISCIOLTO.....	40

Conteggio del quantitativo di ossigeno equivalente	41
3.2 PRIMA PARTE: ANALISI MULTIFATTORIALE PER L'INDIVIDUAZIONE E L'OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI ELETTROCHIMICHE	41
3.2.1 A) SCREENING	42
<i>Piano Sperimentale</i>	42
Allestimento delle prove	43
3.2.2 B) OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO	44
Piano sperimentale	45
Allestimento delle prove	46
3.3 SECONDA PARTE: APPLICAZIONE DELLE CONDIZIONI DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO.	47
3.3.1 EFFETTO SULLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA	47
Piano sperimentale	47
Allestimento delle prove	50
3.4 METODICHE ANALITICHE.....	53
3.4.1 METODICA PER L'ESTRAZIONE DEGLI ANTOCIANI LIBERI DA ROSSISSIMO.	53
3.4.2 PARAMETRI ANALITICI MISURATI.....	53
3.4.3 ANALISI SENSORIALE.	54
3.4.4 ANALISI STATISTICA.	55
CAPITOLO 4.....	56
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	56
4.1 PRIMA PARTE: STUDIO DEI PRINCIPALI EFFETTI DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO SULLA STABILIZZAZIONE DELLA MATRICE FENOLICA	56
4.1.1 A) SCREENING	56
<i>Interpretazione dei risultati.</i>	57
<i>Stima degli effetti.</i>	57
4.1.2. B) OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO	61
<i>Trasformazione della concentrazione di acetaldeide in valori di qualità.</i>	61
<i>Ottimizzazione delle condizioni per la produzione di acetaldeide.</i>	64
4.2 SECONDA PARTE: APPLICAZIONE DELLE CONDIZIONI DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO	69
4.2.1 PRODUZIONE DEL VINO.	70
<i>Fermentazione e macerazione.</i>	70
<i>Caratterizzazione dei vini alla svinatura.</i>	71
4.2.2 EFFETTO DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO SULLE CARATTERISTICHE CROMATICHE DEI VINI VALUTATI SUBITO DOPO L'EROGAZIONE DELLA CORRENTE.	73
4.2.3 EFFETTO DEL TRATTAMENTO ELETTROCHIMICO SULLA COMPOSIZIONE DEI VINI.	77
<i>Analisi dei vini dopo il trattamento.</i>	77
4.2.4 ANALISI DEI VINI DOPO 90 GIORNI DI AFFINAMENTO IN BOTTIGLIA.	84

4.2.5 CONFRONTO DELLE CARATTERISTICHE DEI VINI DOPO FML E DOPO 90 GIORNI DI AFFINAMENTO IN BOTTIGLIA.	90
4.2.6 ANALISI SENSORIALE DOPO TRE MESI DI AFFINAMENTO IN BOTTIGLIA.	91
4.2.7 EFFETTO DEL PH SUL COLORE DEI VINI.	93
CAPITOLO 5.....	96
CONCLUSIONI	96
BIBLIOGRAFIA	98

Premessa

Nel processo di elaborazione dei vini, in particolare dei vini rossi, la fase di stabilizzazione/maturazione è senza dubbio la più critica per il raggiungimento di un adeguato profilo di qualità. I fattori che influenzano questa fase sono diversi, i più importanti sono la concentrazione di antociani e tannini, il pH, la concentrazione di ossigeno disciolto, la temperatura, la concentrazione di SO₂ e il tipo di contenitore (forma e materiale). Numerosi sono gli studi (Gòmez-Plaza and Cano-Lopez, 2011; Leigh et al., 2011; Bertuccioli et al., 2009) che hanno cercato di ottimizzare le condizioni operative per la stabilizzazione dei vini rossi. Alcune ricerche si sono focalizzate sullo studio dei meccanismi che sono alla base delle aggregazioni tra antociani e tannini nel determinare strutture colorate stabili (Gòmez-Plaza and Cano-Lopez, 2011). Gli studi condotti hanno chiaramente evidenziato il ruolo fondamentale dell'ossigeno nelle aggregazioni tra strutture fenoliche (Leigh et al., 2011; Atanasova et al., 2002). In relazione alle tipologie di vino da produrre, due approcci sono generalmente seguiti nello stabilizzare la matrice fenolica. Il primo approccio (quello più tradizionale) prevede l'impiego di contenitori di legno che permettono al vino di arricchirsi di ossigeno insieme a sensibili quantità di tannini idrolizzabili provenienti dal contenitore. Questi arricchimenti hanno un ruolo nel modulare il potenziale di ossidoriduzione che influenza la stabilità della matrice fenolica (Nevares and Del Alamo, 2008). E' ovvio che la permanenza del vino in questi contenitori è molto lunga (da uno a tre anni). Il secondo approccio prevede l'utilizzo di dispositivi in grado di erogare al vino, mantenuto in contenitori di acciaio, micro quantità di ossigeno (MOX) in tempi relativamente brevi (3-6 mesi), ma tali da favorire le reazioni di aggregazione della matrice fenolica con la conseguente stabilità del colore (Leigh et al., 2011). Questi due approcci, ampiamente seguiti nelle realtà produttive presentano alcune criticità collegate ad un controllo non regolare dell'operazione. Il trasferimento di ossigeno attraverso i contenitori di legno non può essere monitorato con sistematicità e solo controlli a posteriori permettono di verificare il reale effetto di questa ossigenazione. Un ruolo molto importante in questo trasferimento è dato dalla temperatura, dall'umidità e dalle caratteristiche del legno.

Per quanto riguarda l'applicazione della micro ossigenazione, le criticità sono rappresentate dalla temperatura del vino che non deve essere inferiore a 16-18 gradi e dal momento dell'erogazione. Infatti nei vini che non hanno avviato la fermentazione malo lattica (FML), la MOX è da sospendere per evitare innalzamenti sensibili dell'acidità volatile. La sospensione dell'erogazione di ossigeno durante la FML, non favorisce però l'aggregazione tra strutture fenoliche e quindi di impedire gli effetti sulla diminuzione del colore. Da alcuni anni sono in corso ricerche finalizzate alla gestione delle reazioni di ossidoriduzione senza l'intervento dell'ossigeno, ma impiegando microcorrenti con l'intento di sottrarre elettroni alle molecole (antociani e tannini) coinvolte nella stabilizzazione dei vini (Bertuccioli et al., 2007). L'uso di campi elettrici è stato proposto da diversi ricercatori come un sistema innovativo ed

introdotto per la gestione di alcune fasi del processo di produzione alimentare. La corrente elettrica può arrestare e diminuire l'attività del lievito durante la prima fase della fermentazione alcolica dei mosti d'uva (Ranalli et al., 2002) e può essere utilizzata come metodo alternativo alla consueta aggiunta di SO₂ (Lustrato et al., 2003). Lo sviluppo di micro bolle di O₂ e H₂ sulla superficie degli elettrodi immersi nel mosto (elettrolisi dell'acqua) può produrre un'elettroflottazione in grado di effettuare la chiarifica (Araya-Farias et al., 2008). Elevati voltaggi possono indurre la rottura dei tessuti cellulari creando canali percolativi (Lebovka et al., 2001) che vanno ad aumentare l'estrazione dei composti fenolici nella fase della macerazione prefermentativa rendendo così possibile la riduzione della macerazione o di aumentare la quantità di questi composti nel vino (López et al., 2008). Altri ricercatori (Puccioni et al., 2008) hanno evidenziato una diretta correlazione tra la diminuzione di astringenza nei vini, trattati con correnti a basso potenziale (LPC, low potential current, sempre inferiori a 1,2 V), e l'aumento del grado di polimerizzazione dei fenoli del vino attraverso la loro condensazione diretta.. Diversi dispositivi per erogare corrente sono stati proposti differenziandosi per la natura degli elettrodi usati (Fell et al., 2007, Bertuccioli 2009).

Allo scopo di procedere ad uno sviluppo pratico di questa tecnologia si è ritenuto di affrontare uno studio che permettesse, nella prima parte di ottimizzare le condizioni operative del trattamento elettrochimico e nella seconda parte di verificare gli effetti positivi del trattamento in una fase critica del processo di vinificazione: la fermentazione malolattica.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Ruolo delle componenti fenoliche nei vini rossi

1.1.1. Antociani.

Gli antociani sono i pigmenti rossi delle uve. Sono localizzati essenzialmente nella buccia, e nel caso di “varietà tintorie” nella polpa, e il loro profilo è una caratteristica varietale.

La molecola degli antociani è costituita da due anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, insaturo e dotato di carica positiva, lo ione flavilio.

Gli antociani sono derivati glucosilati di cinque agliconi o antocianidine: cianidina, peonidina, petunidina, delfinidina e malvidina in funzione dei loro due o tre sostituenti (OH e OCH₃) (Figura 1.1).

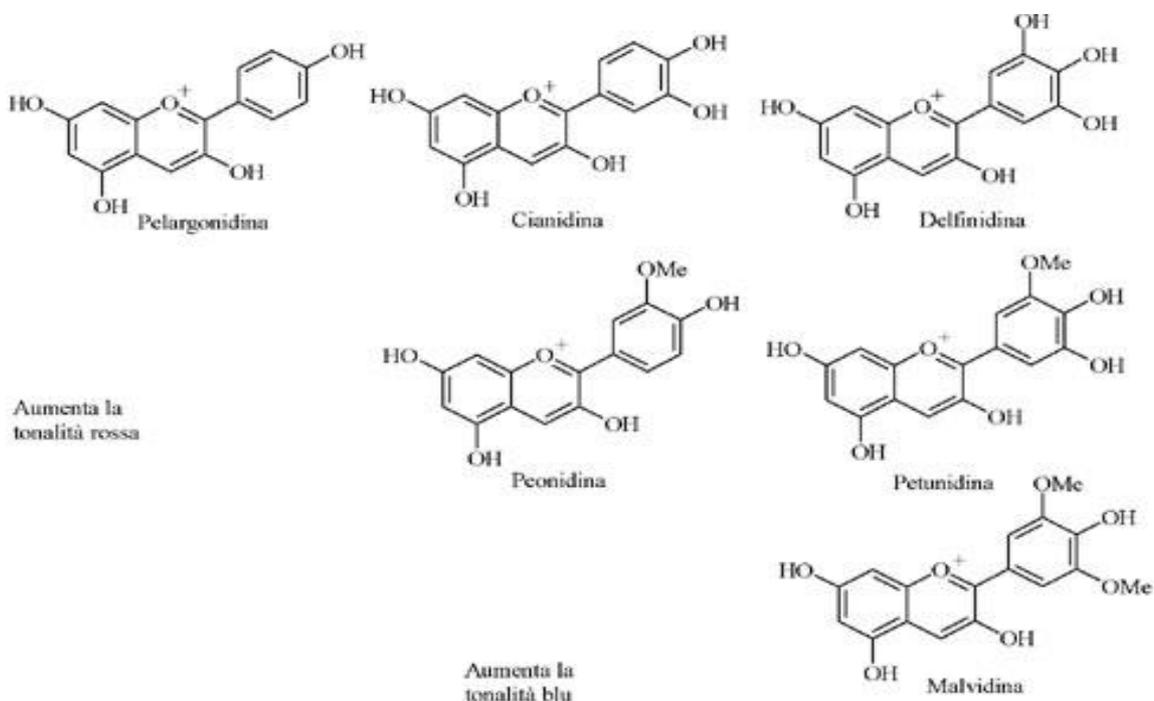


Figura 1.1. Struttura degli antociani in funzione dei sostituenti.

Il colore di questi pigmenti è funzione della composizione del mezzo (pH, SO₂). Infatti, le soluzioni acide contenenti queste sostanze sono di colore rosso e si decolorano man mano che il pH aumenta. La massima decolorazione si osserva per valori di pH compresi fra 3,2 e 3,5 (Ribéreau

Gayon et al., 2003). Il colore varia dal malva al blu per pH maggiori di 4; il giallo appare successivamente in mezzo neutro o alcalino (Figura 1.2).

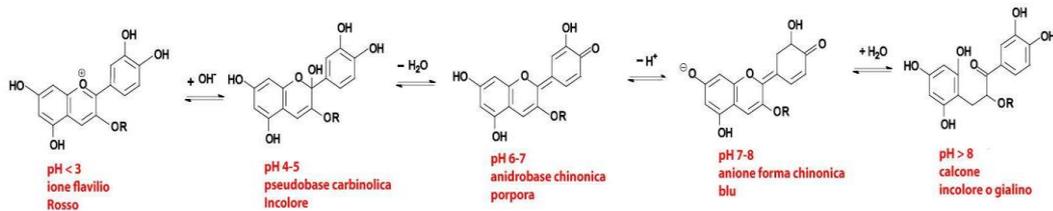


Figura 1.2. Colore degli antociani in funzione del pH.

Brouillard et al. (1978 e 1979) hanno mostrato che questi colori sono la risultante degli equilibri fra quattro gruppi di strutture: catione flavilio (rosso), base chinonica (blu), base carbinolo (incolore) e calconi (colore giallo pallido) (Figura 1.3).

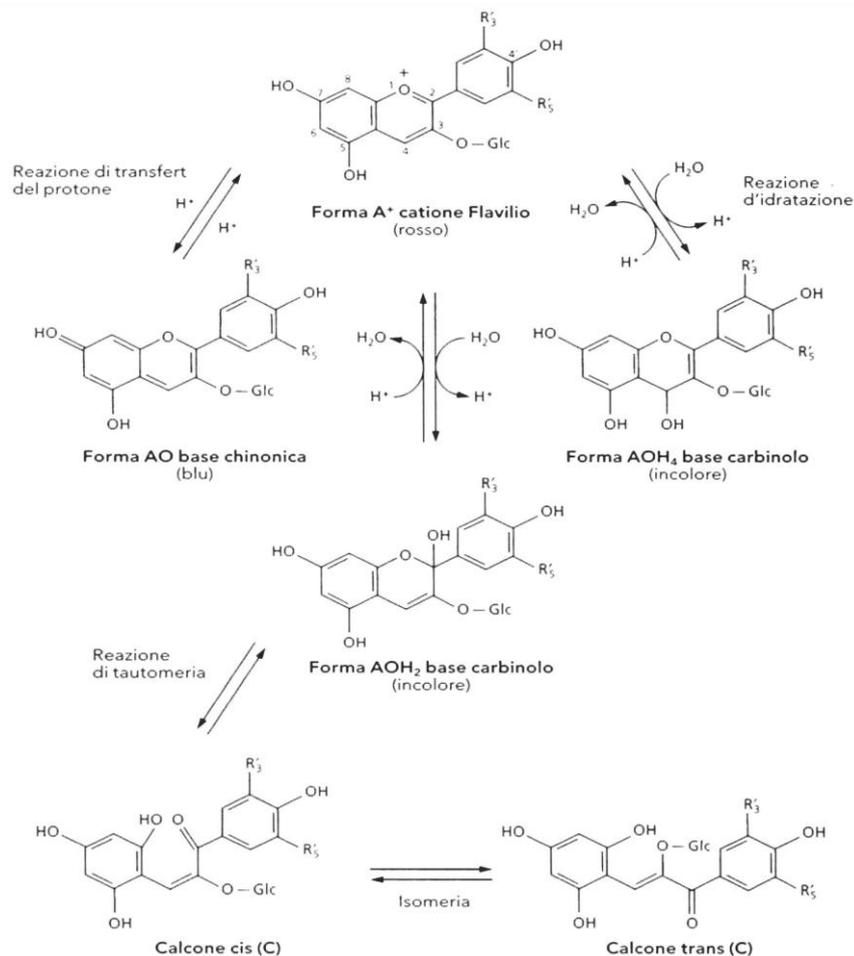


Figura 1.3. Colore degli antociani in funzione della loro struttura.

Questo è causato dal catione flavilio, che a causa della sua carica positiva non è molto stabile e può reagire in due modi:

1) Equilibrio acido base.

Avviene a causa di un trasferimento di protoni molto rapido (10^{-4} S) corrispondente all'equilibrio ROSSO \rightleftharpoons MALVA nel quale si ha il passaggio del catione flavilio (A^+) alla base chinonica (AO):



La proporzione tra catione e base dipende dal pH. Quindi la posizione di equilibrio caratteristica della "particolare" molecola di antocianina è descritta dalla costante di acidità pK_a :

$$K_a = [AO][H^+]/[A^+] \quad pK_a = pH + \log [A^+]/[AO]$$

2) Idratazione.

Questa reazione è un'addizione nucleofila di acqua al nucleo pirilio in posizione C2 (più spesso) oppure C4 (meno spesso) con successivo transfert di un protone. Operazione che corrisponde all'equilibrio tra ROSSO \rightleftharpoons INCOLORE nel quale si ha il passaggio del catione flavilio (A^+) a base carbinolo (AOH):



La posizione di equilibrio della reazione è descritta dalla costante di idratazione pK_h caratteristica della molecola di antocianina Brouillard et al. (1978)

$$K_h = [AOH][H^+]/[A^+] \quad pK_h = pH + \log [A^+]/[AOH]$$

Successivamente, una parte della base carbinolo (incolore) subisce un processo di tautomerizzazione che da origine a un calcone. In questo caso l'equilibrio è lento e per raggiungerlo sono necessarie molte ore:



Le due forme isomere sono in equilibrio tra loro poichè se il passaggio *cis* \rightarrow *trans* non pone particolari problemi, la reazione inversa è lenta e difficile.

La proporzione delle forme flavilio ed emichetone è determinata dalla costante di idratazione in base al pH. Per la malvidina-3-glucoside $pK_h = 2,6$ (Brouillard et al. 1977a,b), per pH maggiori di 2,6 la malvidina-3-glucoside è nella sua forma emichetale incolore. Al pH del vino (3,6) il 90% degli antociani sono sotto forma di cationi flavilio idratati AOH.

Effetti del biossido di zolfo.

Il biossido di zolfo è usato nella produzione del vino per proteggere il mosto e il vino stesso dallo sviluppo di microrganismi come batteri e funghi e per inibirne l'ossidazione chimica.

Tuttavia, a pH = 3,2, il 96% dell'acido solforico si trova sotto forma di anione HSO_3^- , il quale reagisce con il catione flavilio dando dei composti incolori (Jurd 1963):



La costante di dissociazione del solfito (pK_s) è 5. La formazione di questi addotti (composti incolori) è direttamente proporzionale alla quantità di bisolfito aggiunto al mosto, mentre il tipo di struttura incolore è stata confermata da Berke et al. (1998).

Origine dei piroantociani.

Alcuni costituenti dei vini e metaboliti dei lieviti, reagiscono con la porzione elettrofila del catione flavilico, dando origine a un nuovo pigmento stabile: si forma un anello supplementare di pirano tra l'idrossile legato all'atomo C5 e C4 dell'antociano originale generando, in questo modo, i piroantociani (figura 1.4).

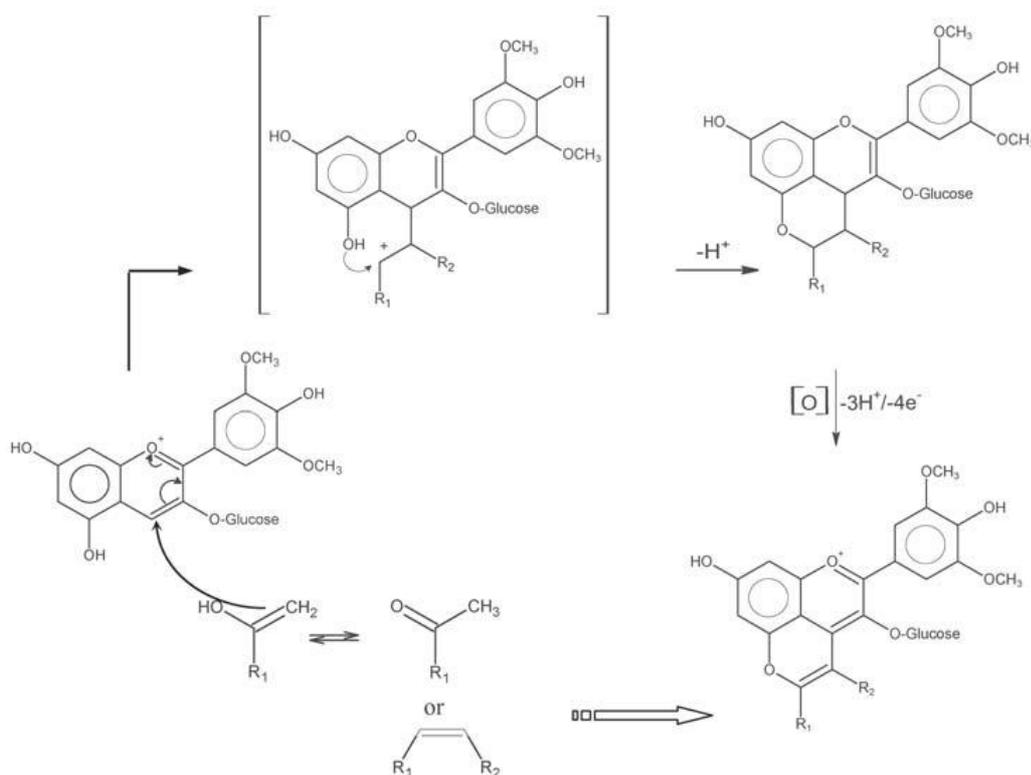


Figura 1.4. Formazione dei piroantociani.

Il nucleofilo deve avere un doppio legame polarizzabile, attivato da un gruppo donatore di elettroni, per poter prendere parte alla reazione. Il tipo di piroantociani formati dipende dal tipo di cultivar (Pozo-Bayon et al., 2004; Schwarz et al., 2003), dalle condizioni di produzione del vino e da quanto queste siano difficili per il metabolismo del lievito (Romero et al., 2000; Morata et al., 2003). Inoltre, questi pigmenti antociano-derivati risultano essere molto stabili in un ampio range di pH e resistenti alla decolorazione con SO₂ (Garcia Puent-Rivas et al., 2006).

Degradazione degli antociani.

Gli antociani non sono molecole molto stabili e quindi vanno incontro a fenomeni di degradazione quali:

- Termica: l'esposizione degli antociani a una temperatura intorno ai 100°C causa una decolorazione direttamente proporzionale al tempo

di esposizione. Tale decolorazione, è dovuta alla rottura della catena degli atomi di carbonio del calcone *trans*, con formazione dell'acido benzoico corrispondente, seguita dall'idrolisi dell'eteroside e formazione di idroflavanolo che può dare un acido cinnamico con diminuzione della malvidina (molto sensibile al calore) e relativo spostamento dell'equilibrio verso forme incolori.

- Ossidativi: gli antociani in soluzione alcolica acida (0,1 N HCl), esposti alla luce, si decolorano in qualche giorno. La reazione è influenzata dalla natura dell'alcol e dalla sua concentrazione con ossigeno e luce che agiscono da catalizzatori (Glories 1978).
- In presenza di acetone: in mezzo acido acquoso contenente acetone gli antociani danno origine a composti color arancio (Glories 1978).

1.1.2. Tannini.

I tannini sono molecole fenoliche relativamente voluminose, derivate dalla polimerizzazione di molecole monomeriche contenenti funzioni fenoliche. I tannini con massa molecolare compresa tra 600 e 3500 sono in grado di formare complessi stabili con le proteine e con altri polimeri vegetali quali i polisaccaridi. Inoltre, influenzano il gusto del vino legandosi con le glicoproteine della saliva provocando la sensazione di astringenza. Nel vino rosso giocano un ruolo fondamentale nella stabilità del colore.

I tannini si dividono in due famiglie:

- 1) Tannini idrolizzabili (*gallici ed ellagici*) presenti nelle botti di quercia e nelle *barriques* e sotto forma di prodotti commerciali (tannini esogeni).
- 2) Tannini condensati (*catechici*) tipici dell'uva e del vino.

I tannini condensati dell'uva e del vino sono polimeri di flavan-3-oli o catechine; la (+)-catechina e la (-)-epicatechina sono le unità monomeriche fondamentali (figura 1.5).

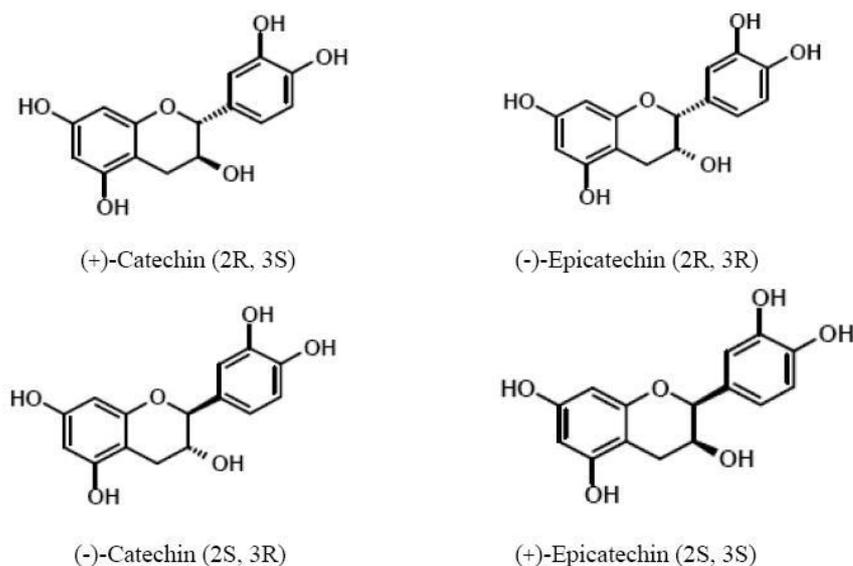


Figura 1.5. Struttura dei flavan-3oli, precursori delle procianidine e dei tannini.

Il riscaldamento di questi polimeri in ambiente acido, libera carbocationi fortemente instabili che si trasformano in prodotti di condensazione bruni e soprattutto in cianidina e delphinidina rossa, da cui il nome di proantocianidine.

Queste molecole si trovano nelle uve e nei vini sotto forma di un gran numero di strutture e dimensioni le quali spiegano le loro differenti proprietà, in particolare le loro qualità sensoriali.

Nell'uva e nel vino si trovano le seguenti molecole:

- (+)- catechina e (-)- epicatechina

Le catechine sono unità strutturali e non possono essere considerate tannini perché la loro massa molecolare è troppo piccola e la loro reattività nei confronti delle proteine è scarsa. La loro struttura è costituita da due cicli benzenici legati da un ciclo ossigenato saturo (fenil-2-cromano). Questa struttura presenta due carboni asimmetrici (C2 e C3) che sono all'origine dei quattro isomeri di cui la (+)-catechina e la (-)-epicatechina sono quelle più stabili e le uniche presenti nelle uve.

- *Procianidine dimere, trimere e oligomere*

a) Le procianidine dimere si possono dividere in due categorie:

1. Tipo B: dimeri risultanti dalla condensazione di flavan-3-oli legati tra loro per mezzo di legame C4-C8 o C4-C6.
2. Tipo A: oltre al legame precedente possiedono un legame di tipo etere tra i carboni C5 o C7 dell'unità terminale e il carbonio C2 dell'unità superiore
(Thompson et al., 1972; Vivas et al., 2007).

b) Le procianidine trimere si possono dividere in due categorie:

1. Tipo C: trimeri in cui vi sono due legami interflavanici tra i carboni

C4-C8 o C4-C6.

2. Tipo D: aventi due legami interflavanici; uno tra i carboni C5 o C7, l'altro tra i carboni C4-C8 o C4-C6.

c) *Procianidine oligomere*:

Sono polimeri di flavan-3-oli, in numero variabile da tre a dieci, legati per mezzo di legami C4-C8 o C4-C6 cosa che permette l'esistenza di un gran numero di isomeri.

- *proantocianidine condensate*:

Sono come le precedenti ma sono costituite da più di dieci polimeri di flavan-3-oli.

I tannini condensati sono presenti in tutte le parti solide dell'uva (bucchie, semi, raspo). La loro presenza nel vino dipende dalla varietà, dalle condizioni di vinificazione e in particolar modo di macerazione. La loro concentrazione nei vini rossi, è compresa tra 1 e 4 g/L (figura 1.6).

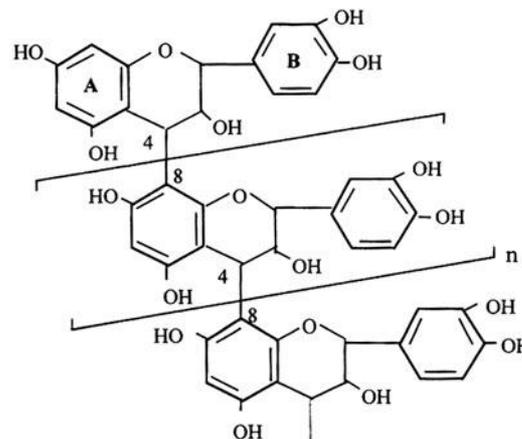
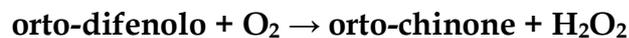


Figura 1.6. Struttura generale dei tannini condensati.

Ossidazione mediata da ossigeno.

I flavanoli nel vino subiscono un processo di auto ossidazione mediata dall'ossigeno (O₂). In condizioni di acidità come quelle del vino, ioni metallici come il Fe (III) sono efficienti catalizzatori di questo tipo di ossidazione (Hynes et al., 2001; Mochizuki et al., 2002).



Il decadimento del perossido di idrogeno grazie a piccole quantità di ioni radicali produce un radicale idrossile estremamente reattivo:



La rigenerazione del Fe (III) attraverso la reazione precedente permette al ciclo di continuare. Alternativamente, il perossido di idrogeno può ossidare l'etanolo ad acetaldeide (Wildenradt et al., 1974) in presenza di Fe(II) (Wildenradt et al., 1974) (figura 1.7):

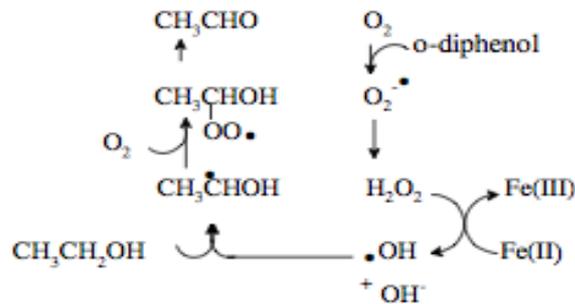


Figura 1.7. Reazione di ossidazione dell'etanolo a acetaldeide.

Anche se l'acetaldeide deriva dal metabolismo dei lieviti può essere considerata un marker dell'ossidazione (Atanasova et al. 2002b).

Similmente, l'acido tartarico viene ossidato in presenza di ferro e ossigeno molecolare formando acido gliossilico, il quale contiene una parte dell'aldeide. Conseguentemente, l'ossidazione genera due specie che reagiscono con i polifenoli:

- *Semichinoni e chinoni (prodotti da ossidazione diretta).*
- *Acetaldeide (aldeidi).*

Polimerizzazione.

Le soluzioni acide di procianidine dimere, oligomere e polimere non sono stabili al pH del vino ma subiscono dei processi di polimerizzazione. Tali processi dipendono dalla presenza di ossigeno e dalla temperatura (più è alta e più, a parità di condizioni, la reazione è veloce).

Nel vino vi sono due tipi di processi di polimerizzazione a carico di questi composti fenolici:

- *polimerizzazione ordinata:* in assenza di ossigeno e in mezzo acido, le procianidine formano un carbocatione che reagisce con le porzioni (-) di un'altra procianidina. Questo provoca l'aumento del loro grado di polimerizzazione attraverso un processo ordinato di tipo C4-C8 o C4-C6 che conduce a procianidine polimere (polimeri omogenei).
- *Polimerizzazione disordinata:* in caso di areazione debole e controllata, si ha la formazione di etanale, la cui funzione aldeidica è protonata in ambiente acido dando luogo ad un primo carbocatione che si stabilizza legandosi alle posizioni 6 o 8 negative dei flavanoli. Questo dà origine a un alcool benzilico caratterizzato da un legame C-OH polarizzato, che in mezzo acido viene rotto generando un ulteriore carbocatione, che reagirà a sua volta con un altro flavanolo, dando origine a polimeri eterogenei che possono raggiungere anche diametri di 400 nm e quindi precipitare con ingiallimento e imbrunimento del colore. (Galvin et al., 1993).

1.1.3 Reazioni di condensazione tra antociani e tannini.

Nel vino rosso la stabilizzazione del colore è dovuta a reazioni di condensazione tra antociani e tannini (proantocianidine) che danno origine a

pigmenti stabili, poco sensibili alle variazioni di SO₂ e pH. Le reazioni di condensazione possono avvenire secondo numerosi meccanismi e condurre, in funzione del tipo di legame che li caratterizza, a composti aventi caratteristiche differenti, il cui colore varia dall'arancio al malva (Ribéreau Gayon et al., 2003).

Si possono distinguere due tipi di condensazione:

- *Condensazione diretta:*

1. Antociano-Tannino (A-T): l'antociano sotto forma di catione flavilio (A⁺), elettrofilo, reagisce con la posizione nucleofila C6 o C8 delle procianidine per formare un flavene incolore, la cui ossidazione produce un flavene di colore rosso. Quest'ultimo, attraverso una disidratazione, forma un catione xantilio di colore giallo. Questa reazione è pH dipendente, infatti a pH 2.0 il flavene intermedio da origine a un dimero incolore, mentre con valori più elevati (3.2-6.0) da origine alla corrispondente forma flavilio che, a causa della sua instabilità, produce nuovi pigmenti xantilio (Duenas et al., 2006).
2. Tannino-Antociano (T-A): le posizioni nucleofile C6 e C8 dell'antociano, sotto forma di base carbinolo, reagiscono con il C4 del carbocatione elettrofilo del flavanolo. Il nuovo complesso formato è incolore e assume un colore rosso aranciato dopo la disidratazione. Perché questa reazione possa avvenire non è richiesta la presenza dell'aria e non è necessaria alcuna ossidazione (Ribéreau Gayon et al., 2003). Essa è favorita dalla temperatura per la formazione del carbocatione e dipende dalla quantità di antociani del mezzo. Il colore varia con la natura del carbocatione e con il suo grado di polimerizzazione. Anche questa reazione è pH dipendente, è stato infatti osservato che con valori superiori a 4.0 e in presenza di ossigeno la forma ossidata del flavanolo (orto-chinone) reagisce con la forma idrata (base carbinolo) dell'antociano dando origine a prodotti caratterizzati da un legame bifenilico o etere-bifenilico tra la struttura B (catecolo) del flavanolo e la struttura A (resorcinolo) dell'antociano (figura 1.8).

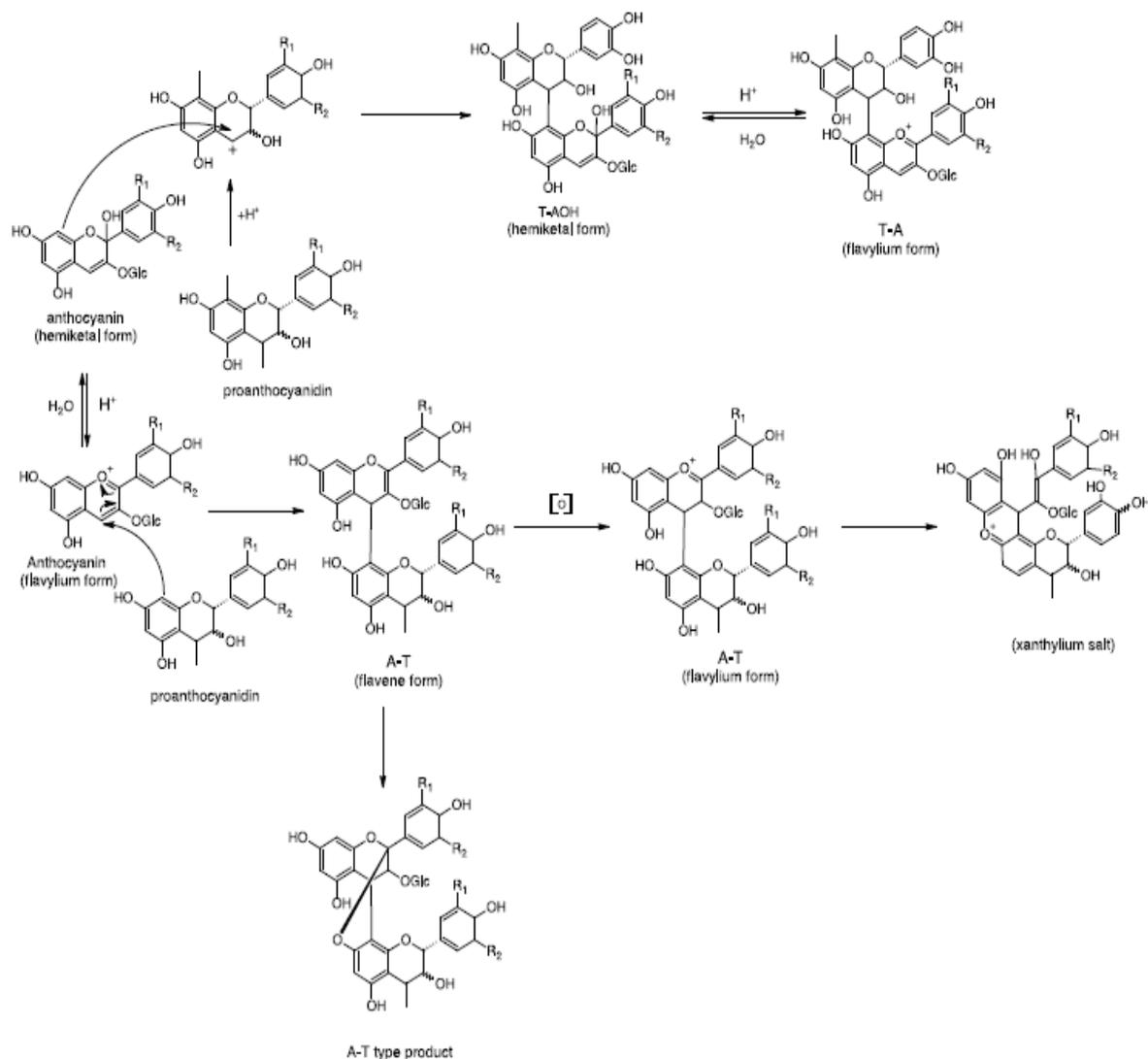


Figura 1.8. Meccanismi di condensazione diretta.

- *Condensazione indiretta (con ponte etilico).*

Come citato precedentemente, in mezzo acido, l'etanale genera un carbocatione che si lega per addizione nucleofila alle posizioni (-) (3 e 8) dei flavanoli. L'alcool derivato per disidratazione forma un nuovo carbocatione, che a sua volta reagisce con le posizioni nucleofile degli antociani sotto forma idrata (base carbinolo) per formare l'addotto antociano-etil-flavanolo. Allo stesso modo, l'addizione nucleofila, può avvenire con un altro flavanolo per produrre l'addotto flavanolo-etil-flavanolo (Sun et al., 2008). Tali reazioni dipendono dal contenuto in flavanoli e in antociani, così come dal pH del mezzo. Quest'ultimo incide sulla tonalità del prodotto di condensazione. Infatti, a pH 3.1 e in presenza di (+) catechina, il colore varia da rosso violetto all'arancio, quando il rapporto molare catechina/malvidina passa da 1 a 10 (Ribéreau Gayon et al., 2003). Con le procianidine dimere T-A il colore è più arancio mentre è malva quando la (-)-epicatechina reagisce con la malvidina monoglucoside. (Ribéreau Gayon et al., 2003). La reazione può proseguire per dare origine a pigmenti molto voluminosi.

1.2. Ruolo dell'acetaldeide nel vino.

Il vino contiene varie aldeidi volatili che contribuiscono in maniera significativa alle proprietà sensoriali. L'acetaldeide è quella più presente nei vini, essa influenza l'invecchiamento e la stabilità del colore, ma insieme all'esanale, *cis*-esen-3-olo e *trans*-esen-2-olo causano un aroma erbaceo che in eccesso provoca un difetto. In basse quantità può donare un piacevole aroma fruttato. Tradizionalmente nelle industrie del settore vinicolo per rimuovere l'eccesso di acetaldeide si adotta la solfitazione, recentemente è stato visto che i LAB (batteri lattici), siccome catabolizzano l'acetaldeide convertendola in etanolo e acetato, potrebbero essere utilizzati al posto dei solfiti. In particolare sono i batteri lattici oenococchi che hanno questa caratteristica infatti se si considerano i lactococchi ed i lactobacilli possono produrre l'acetaldeide quindi non possono essere utilizzati per rimuoverla.

L'acetaldeide (etanale, CH_3CHO) è un composto fortemente volatile ed è riscontrato nei vini in quantità variabile a seconda che si parli di rossi (30 mg/L) o bianchi (80 mg/L) (McCloskey et al., 1981). Per quanto riguarda i meccanismi di formazione si distinguono due vie una via microbiologica e una via ossidativa. Alla via microbiologica sono imputati i lieviti in fermentazione in quantità variabile sia in funzione della specie che del ceppo (fattori limitanti possono essere la temperatura e l'ossigeno) (Ough et al., 1958); i batteri acetici (AAB) poiché ossidano l'etanolo ad acetaldeide e successivamente ad acido acetico; i batteri lattici (LAB) probabilmente a partire da glucosio o treonina anche se non è ancora chiaro il motivo della sua formazione.

Per la via ossidativa abbiamo l'ossidazione accoppiata dell'etanolo e di composti fenolici. A tal proposito (Wildenradt & Singleton, 1974) hanno mostrato come l'ossidazione diretta dell'etanolo ad acetaldeide in una soluzione modello sia insignificante e pertanto tale reazione necessita di altri composti per avvenire nel vino. Per esempio un forte ossidante come il perossido d'idrogeno (H_2O_2), formato dall'ossidazione dei composti fenolici, è in grado di ossidare in maniera ottimale l'etanolo ad acetaldeide (Ribéreau-Gayon et al., 1983). L'acetaldeide esiste nella forma libera (FAL) e combinata (TAL). La determinazione della porzione libera avviene generalmente per via gas cromatografica o meno convenientemente tramite l'utilizzo di sostanze che si legano alla porzione combinata liberandola. La determinazione invece dell'acetaldeide totale avviene con metodi chimici (iodometrica) o enzimatica (aldeide deidrogenasi) anche se quest'ultimi risultano più specifici visto che l'etanale non è l'unica aldeide nel vino (Ough et al., 1988).

In alcune tipologie di vino (Porto) l'acetaldeide è in eccesso rispetto alla solforosa totale (rapporti molari): pertanto secondo alcuni autori (Bakker et al., 1986) è possibile risalire alla concentrazione di etanale libera tramite la seguente relazione:

$$\text{TAL} = 0,688 \text{ TSO}_2 * \text{FAL}$$

L'acetaldeide è inoltre responsabile della stabilità del colore come ponte di legame tra antociano e tannino.

L'acetaldeide, come già detto, nei vini può avere varie origini, dai lieviti, dai batteri acetici, dai batteri lattici e per ossidazione dell'etanolo.

- *Lieviti*

L'acetaldeide è un prodotto di scarto della fermentazione alcolica mediata dai lieviti. Il quantitativo formato dipende dalla specie del lievito e dalle condizioni del mezzo quali temperatura di fermentazione e SO₂: Cabranes et al. (1998) hanno osservato un aumento significativo di acetaldeide in vini fermentati con *Saccharomyces cerevisiae* alla temperatura di 12° rispetto al testimone fermentato a 18°. Anche la presenza di SO₂ induce la formazione dell'acetaldeide da parte dei lieviti (Rankine & Pocock, 1969; Weeks et al., 1969; Stratford et al., 1987; Pilkington & Rose, 1988) e i vini fermentati in sua presenza hanno livelli considerevolmente più alti di acetaldeide. Questo processo sembra essere legato al meccanismo di resistenza dei lieviti all'SO₂ (Stratford et al., 1987; Pilkington & Rose, 1988) tanto che anche altri fattori limitanti quali ambiente anaerobico, basso pH e alte concentrazioni di zucchero sembrano promuoverne la produzione da parte dei lieviti (Tabella 1.1)

Tabella 1.1. Produzione di acetaldeide dalle varie specie di lieviti.

Yeast	Acetaldehyde (mg L ⁻¹)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5-286
<i>Saccharomyces uvarum</i>	110-350
<i>Saccharomyces bayanus</i>	16-683
<i>Saccharomyces oviformis</i>	36-125
<i>Saccharomyces fructuum</i>	10-33
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	30
<i>Kloeckera apiculata</i>	6-66
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0.5-5
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	10.5-28
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	23-40

- *Batteri acetici*

I batteri acetici, provenienti dai mosti e dalle apparecchiature di cantina, possono generare acetaldeide (Joyeux et al., 1984; Drysdale & Fleet, 1985) ossidando l'etanolo con successiva generazione di acido acetico. La concentrazione di acetaldeide formata può superare i 250 mg/L⁻¹, quindi ben oltre la soglia di 100-125 mg/L⁻¹ che costituisce il limite oltre il quale si presenta il difetto. La produzione di acetaldeide da parte dei batteri acetici aumenta con bassi livelli di ossigeno e concentrazioni di etanolo superiori al 10% (v/v).

- *Batteri lattici*
Al momento non è chiaro se i batteri lattici del vino possano formare acetaldeide; certamente possono farlo i batteri lattici del latte a partire dal metabolismo del glucosio sfruttando due precursori: il 2-diossi-D-ribosio-5-fosfato (Lees & Jago, 1977) e la treonina (Wilkins et al., 1986a, 1986b; Marshall & Cole, 1983; Marranzini et al., 1989; Rystad et al., 1990; Grozeva et al., 1994) sempre presenti nel vino. Le quantità formate dipendono dalla specie e dal ceppo ma sono genericamente inferiori a 30 mg L⁻¹.
- *Ossidazione dell'etanolo e dei composti fenolici*
Wildenradt & Singleton (1974) hanno studiato la produzione di acetaldeide a partire dall'etanolo (in soluzioni modello) come conseguenza dell'ossidazione di composti fenolici. Hanno scoperto che la produzione di acetaldeide per ossidazione diretta dell'etanolo è insignificante e che in realtà questa ossidazione ad acetaldeide avviene grazie ad un'auto-ossidazione combinata di alcuni composti fenolici. Un forte ossidante (H₂O₂), derivante dall'ossidazione dei fenoli, ossida l'etanolo ad acetaldeide. Queste evidenze sono state poi verificate in soluzioni modello e in vini rossi da Ribéreau-Gayon et al. (1983).

1.2.1 Polimerizzazione mediata dall'acetaldeide.

Il colore del vino, inizialmente è caratterizzato da tinte blu-viola che con la maturazione e l'affinamento evolve in tinte rosso-arancio, questo è dovuto principalmente alla presenza degli antociani monomeri e loro derivati acilati, che nel tempo, diminuiscono andando incontro a degradazione o condensazione (trasformazione in composti più stabili). La condensazione tra antociani (in particolare la Malvidina 3 glucoside) e tannini in condizioni normali è molto lenta, ma in presenza dell'acetaldeide avviene molto più velocemente, questo comporta un aumento dell'intensità e della stabilità del colore oltre che ad un miglioramento da un punto di vista sensoriale dovuto ad una minore astringenza (diminuzione dei tannini liberi) (Somers, 1972; Timberlake & Bridle, 1976; Bakker et al., 1986; Dallas et al., 1996 b) La maggiore stabilità del colore, dovuta agli addotti antociani-tannini mediati dall'acetaldeide, è presumibilmente dovuta alla loro resistenza alla decolorazione con SO₂. Se la concentrazione di acetaldeide libera supera i 5 mg/L⁻¹ le reazioni di polimerizzazione continuano e portano a strutture troppo grandi che precipitano con la conseguente perdita del colore (Somers, 1998). La maggiore stabilità del colore degli addotti antociani-tannini via acetaldeide è presumibilmente dovuta alla loro resistenza alla decolorazione da SO₂.

A seconda della composizione del mezzo esistono due tipi di reazioni di condensazione:

- *Bassa concentrazione di ioni flavilio* in rapporto al pH. L'acetaldeide protonata si lega ai flavani e il catione che si forma attacca le posizioni 6 e 8 degli antociani in forma di pseudobase (AOH) con la formazione di un complesso monoglucosilato unito dal ponte CH₃CHO. Tale composto ha uno spostamento dell'assorbimento del colore verso il viola. (figura 1.9).

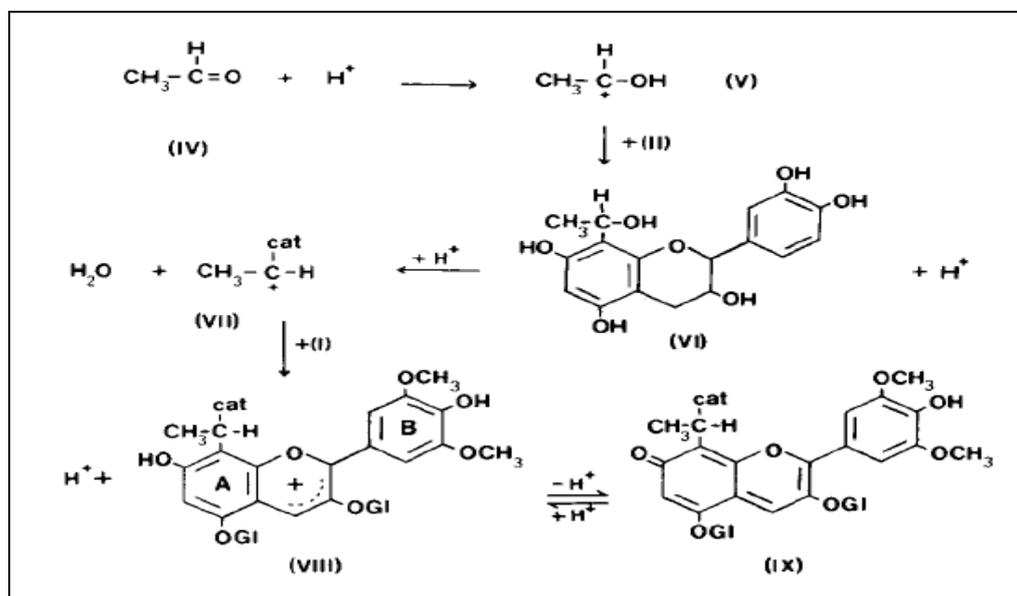


Figura 1.9. Reazione dell'acetaldeide (IV) con (+)-catechin (II) and Mv 3,5-diglucoside(I). (Timberlake et al. 1976).

- *Elevata concentrazione di ioni flavilio*. L'acetaldeide si lega attraverso un "attacco diretto" alla posizione 4 (o 2) dell'antociano con formazione di un carbocatione intermedio che può fissarsi alle posizioni 6 o 8 di altri flavonoidi.

L'interazione con l'acetaldeide aumenta l'intensità colorante delle soluzioni di antociani e la sposta verso il color rosso malva perché, quando l'acetaldeide fa da ponte etile (CH₃CH-), il numero dei doppi legami coniugati cambia rispetto all'antociano normale e si ha una leggera variazione della potenzialità espressiva del colore di quell'antociano. La temperatura e l'ossigeno (travasi, areazione) favoriscono la polimerizzazione ma tenori troppo alti di tale gas in soluzione, portano alla degradazione dei pigmenti; il pH acido, infine, ne favorisce la condensazione (Garcia-Viguera et al., 1994). Inoltre differenze statisticamente significative sul grado di polimerizzazione sono state osservate in funzione dell'antociano utilizzato. Infatti, la percentuale di reazione tra il polimero ottenuto con peonidina-3-glucoside (Pn) e quello con la cianidina-3-glucoside (Cn) è passata da 0,53 gg a 0,42 gg anche se i due antociani differiscono solo per il sostituito in posizione 3¹ (Cn=OH; Pn= OCH₃). La stessa cosa si è verificata per i polimeri ottenuti con la malvidina-3-glucoside e la Pn: in questo caso la percentuale di reazione è passata da 0,53 gg a 0,34

gg considerando l'unica differenza attribuibile al grado di metilazione dell'anello B dei due antociani (2 gruppi metilici in posizione 3^I/5^I per la Mv; un gruppo metilico in posizione 3^I per la Pn) (Dallas et al., 1996 a). I polimeri così ottenuti mostravano un effetto batocromico più o meno intenso rispetto all'antociano di riferimento: per esempio la MvA (Mv-3-glu-CH₃CHO) varia il suo massimo di assorbimento da 534 nm (Dallas et al., 1996 a) a 541 nm (MvBA₁=Mv-3-glu-CH₃CHO-B2) e 544 nm (MvBA₂=Mv-3-glu-CH₃CHO-B2) come nella seguente figura 1.10.

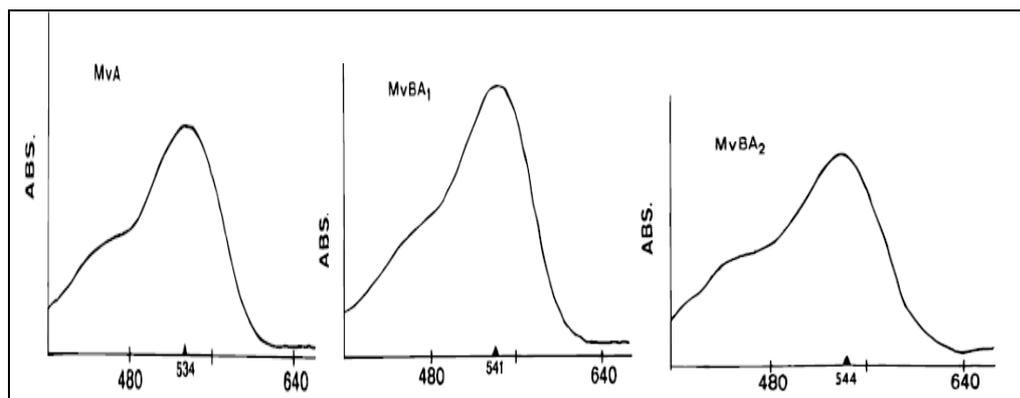


Figura 1.10. Effetto batocromico.

Con l'evoluzione della tiolisi è stato possibile identificare e caratterizzare le diverse strutture in cui può essere coinvolta l'acetaldeide.

Drinkine et al. (2007) infatti, riportano tutte le possibili reazioni a carico dell'etanale in un vino (figura 1.11).

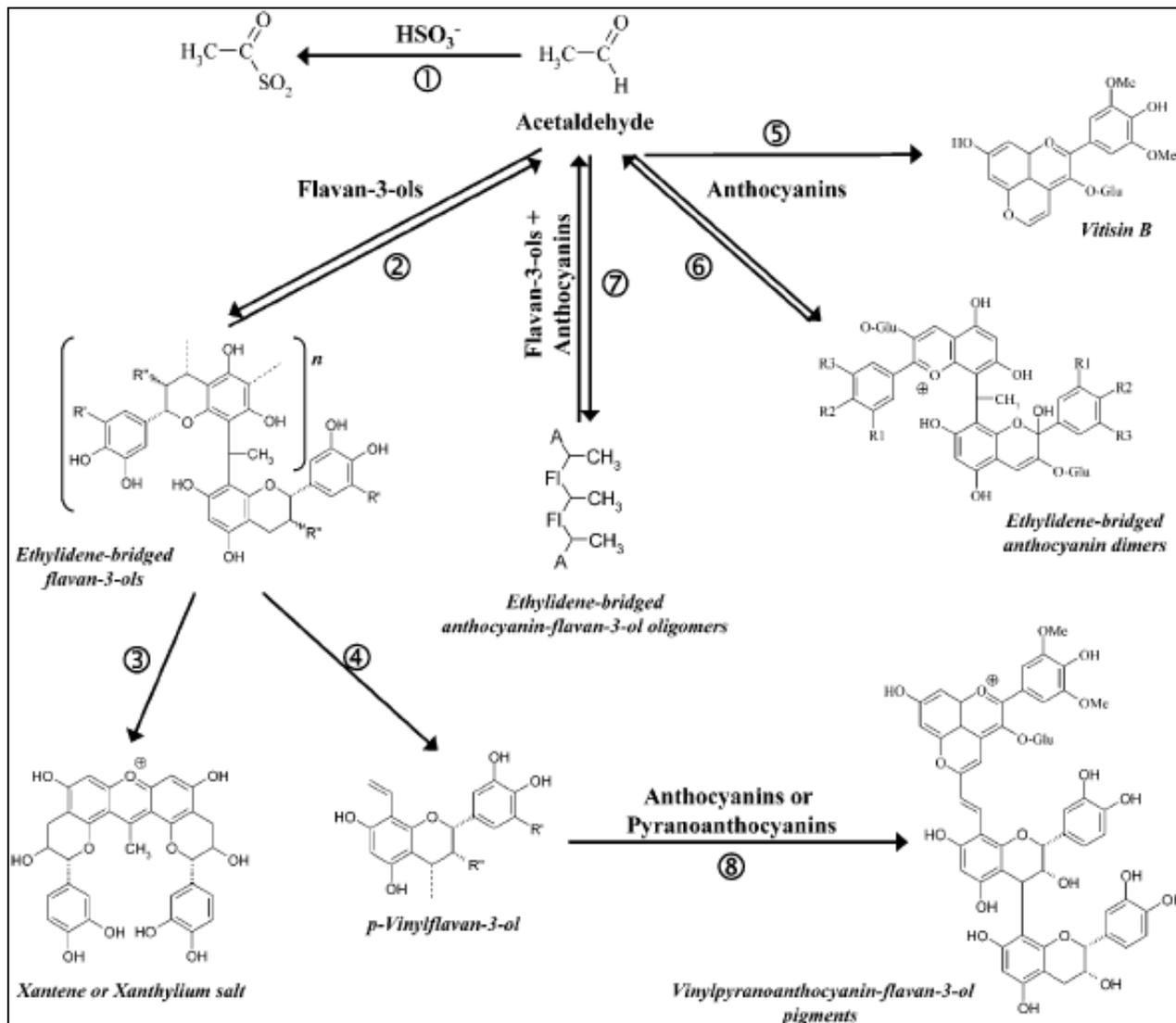


Figura 1.11. Reazione tra acetaldeide, flavan-3-oli ed antociani. FI \rightarrow R' = H/OH, R'' = OH, oppure O-gallata; O-glucosidata \rightarrow (O-Glu), R' = OH/OCH₃ ed R'' = H/OH/OCH₃ (Drinkine et al. 2007).

Anche se, in realtà, a oggi i meccanismi di reazione non sono ancora molto chiari.

1.2.2 Acetaldeide e Fermentazione Malolattica (FML).

Nel vino, l'aumento della concentrazione dell'acetaldeide durante la vinificazione, influenza in maniera negativa le proprietà sensoriali, portando a sentori di erbaceo, rancido e ossidato (Somers, 1998). Quindi, l'acetaldeide è un composto che deve essere tenuto sotto controllo, questo in teoria può essere fatto utilizzando SO_2 che oltre ad avere proprietà antiossidanti e antimicrobiche, ha la capacità di legarsi con l'acetaldeide e annullare i suoi effetti (Somers, 1998). Tuttavia, nella realtà, è la stessa SO_2 a indurre la formazione di acetaldeide a partire dal metabolismo dei lieviti durante la fermentazione, oltre ad essere indesiderabile dal punto di vista del colore (sbiancamento) e delle proprietà sensoriale del vino. Ad oggi, non è ancora stato fatto uno studio accurato sull'interazione tra acetaldeide e batteri lattici

(LAB) nel vino, anche se è stato osservato che durante la FML l'acetaldeide viene consumata rapidamente. Sarebbe quindi necessario studiare il metabolismo dell'acetaldeide da parte dei batteri lattici del vino, in modo da utilizzare questi ultimi per eliminare l'acetaldeide in eccesso e, conseguentemente, i sentori di ossidato/erbaceo che ne derivano.

I pochi studi pubblicati evidenziano che alcuni LAB del vino, in particolar modo gli eterofermentanti quali *L. Brevis* e *O. Oeni*, possono catabolizzare la porzione di acetaldeide legata all' SO_2 liberando quest'ultima che a sua volta va a limitare lo sviluppo dei LAB stessi (Fornachon, 1963; Hood, 1983).

Nel caso della fermentazione alcolica e malolattica gestite simultaneamente nel vino, si può avere l'inibizione dei batteri lattici da parte dell'acetaldeide prodotta dai lieviti. Inoltre, la presenza di un grande quantitativo di acetaldeide residua dopo la fine della normale fermentazione alcolica può inibire i batteri lattici e rendere la fermentazione malolattica lenta e difficoltosa. Viceversa, se il quantitativo di acetaldeide è ridotto, si può avere l'effetto contrario e la FML può risultarne stimolata.

1.2.3 La soglia di percezione.

La percezione rappresenta quel processo attraverso il quale un soggetto riesce a interpretare stimoli di natura chimica in termini sensoriali.

L'identificazione dei composti che determinano l'aroma di un vino, consentirebbe il controllo e l'ottimizzazione del processo in funzione della componente aromatica. In questo senso svolgono un'azione importante sia i composti di natura non volatile che quelli volatili, infatti, l'aroma risulta dall'interazione di numerosi composti che esplicano tra di loro azioni sia inibitorie che di esaltazione delle sensazioni generate, provocando di volta in volta responsi diversi.

Per valutare l'impatto di un odorante all'interno di un prodotto alimentare, è stata introdotta la soglia di riconoscibilità. Essa è definita come il valore al di sotto del quale uno stimolo olfattivo non viene riconosciuto. Può essere valutata all'interno di diverse matrici (aria, acqua, soluzione idroalcolica, vino) e pertanto può assumere valori diversi.

Il meccanismo della percezione è regolato dalla legge psicofisica che ha un andamento sigmoidale come mostrato nella seguente figura.

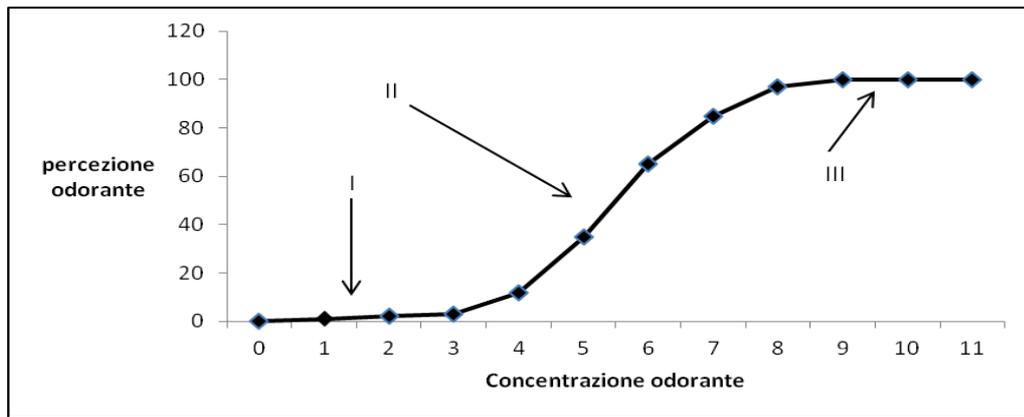


Figura 1.12. Andamento teorico della funzione psicofisica per la percezione di un odorante.

Si differenziano quindi tre diversi andamenti: il primo (I) in cui il soggetto non riesce a distinguere in maniera ottimale l'aumento di concentrazione dell'odorante, il secondo (II) in cui l'andamento risulta proporzionale ed il terzo (III) in cui si assiste al fenomeno dell'assuefazione e pertanto ogni responso è invalidato. Tale conoscenza appare fondamentale per l'approccio ai test sensoriali, che devono garantire l'ottenimento di responsi significativi. Per quanto riguarda l'acetaldeide i valori di riferimento presenti in letteratura sono compresi tra 40-100 ppm (Amerine et al., 1976; Peynaud et al., 1996).

1.3 Fattori che determinano il colore dei vini rossi

1.3.1. Macerazione/fermentazione.

I vini rossi sono ottenuti per macerazione, responsabile di buona parte delle loro caratteristiche, visive, olfattive e gustative.

Essa apporta essenzialmente composti fenolici (antociani e tannini) che partecipano al colore e alla struttura del vino, oltre a sostanze aromatiche, azotate, polisaccaridi, sostanze minerali ecc. L'estrazione di queste componenti inizia con la pigiatura dell'uva (lavorazioni troppo aggressive e macchine mal regolate possono dare gusti erbacei sgradevoli e vini molto fecciosi) e prosegue durante tutta fermentazione alcolica.

Il buon esito della macerazione, in funzione del tipo di vino da produrre, dipende da numerosi aspetti operativi:

- **Qualità delle uve e livello di maturazione:** se è scarsa, oppure se il livello di maturazione non è ottimale, la macerazione deve essere limitata per evitare la dissoluzione nel mosto di sostanze negative per la qualità. La ricchezza di sostanze di gusto gradevole, utili alla vinificazione, e l'assenza di quelle sgradevoli caratterizza invece le uve di grande qualità, che possono sopportare macerazioni più spinte in modo da conferire ai grandi vini la ricchezza tannica necessaria ad assicurare un lungo invecchiamento.

- **Pigiatura delle uve:** tanto più le uve vengono pressate energicamente, tanto più sarà accelerata la diffusione dei costituenti dalle parti solide. Tuttavia, la corrispondente frantumazione dei tessuti privilegia l'estrazione dei tannini meno buoni, quelli che trasmettono gusti erbacei e vegetali. Questo effetto negativo, dato da pigiature molto spinte, è funzione della natura delle uve e dell'intensità del loro carattere vegetale. È buona regola quindi, cercare di estrarre il maggior quantitativo di composti fenolici, senza stressare troppo le parti solide, onde evitare mosti fecciosi, vegetali e di difficile fermentazione.
- **Tempo di macerazione:** a parità della qualità dell'uva, la dissoluzione dei composti fenolici, contenuti nelle parti solide del mosto in fermentazione, varia in funzione del tempo, anche se non esiste proporzionalità tra la durata della macerazione e il tenore in fenoli, la cui concentrazione è in primis influenzata da quanto le uve ne sono ricche. La durata della macerazione dipende anche dal tipo di vino che vogliamo produrre: vini destinati a essere consumati giovani necessitano di una macerazione più corta rispetto ai vini destinati a un lungo invecchiamento dove la macerazione può proseguire per diverse settimane per cercare di apportare la struttura tannica necessaria.
- **Rimontaggi, follature, iniezione di gas carbonico ecc:** tutte queste tecniche hanno come scopo l'estrazione dei composti fenolici dal cappello delle vinacce attraverso liscivazione, immersione, rimescolamento dello stesso. Queste pratiche, se ben eseguite, consentono una buona estrazione unitamente a un'omogeneizzazione della vasca per quanto riguarda temperature e diminuzione della differenza in composti fenolici tra vino fiore e di pressa. Tuttavia, se protratte eccessivamente nel tempo, possono portare durezza e aggressività tanniche sgradevoli.
- **Temperatura:** il calore è un mezzo di distruzione dei tessuti che accentua la dissoluzione dei costituenti delle vinacce e accelera la macerazione. La diffusione nelle cantine di sistemi di riscaldamento delle vasche, ha permesso di trovare la perfetta regolazione della temperatura di macerazione, temperatura che all'inizio della fermentazione non deve essere troppo elevata (20°C circa) perché in fase di crescita il lievito è particolarmente sensibile. Successivamente, la temperatura deve essere portata in un range compreso tra i 25° e i 30°C, in funzione della tipologia del vino, della qualità delle uve e della struttura tannica che vogliamo conferire.
- **SO₂ e alcool** hanno un effetto solubilizzante nei confronti delle vinacce favorendo l'estrazione dei composti, anche se il loro contributo è

ridotto rispetto ad altri aspetti quali temperatura e rimontaggi. Inoltre SO₂ e alcool provocano una moderata decolorazione rispettivamente a causa dello sbiancamento degli antociani e della distruzione di polimeri antociani-tannini (Somers 1979).

1.3.2. Fermentazione malolattica.

La fermentazione malolattica consiste in una reazione di decarbossilazione che provoca la perdita di una funzione acida da acido malico a acido lattico.



Il rapporto stechiometrico è 1:0.67, cioè da un grammo di acido malico se ne forma 0,67 di acido lattico. (Figura 1.13)

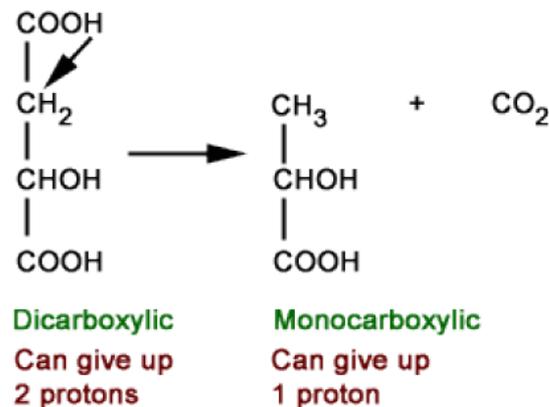


Figura 1.13. Decarbossilazione FML.

La reazione però, non spiega l'aumento di acidità volatile che accompagna sempre la fermentazione malolattica. Questo è dovuto almeno in parte alla degradazione dell'acido citrico che è presente nel vino in piccole quantità, e alla degradazione degli zuccheri pentosi (5 atomi di carbonio, non fermentescibili) che sono utilizzati per il metabolismo dei batteri. L'abbassamento dell'acidità, conseguente alla FML, è variabile in funzione del tenore di acido malico (quindi dalla maturità dell'uva). Il miglioramento dato dalla FML è notevole: i vini rossi attenuano il loro carattere acido, ruvido e diventano più morbidi, più corposi, più grassi e allo stesso tempo si nota una maggiore complessità aromatica. Tuttavia, la FML si accompagna sempre a una certa variazione del colore dei vini: esso perde in intensità e la tinta rosso vivo si attenua.

1.3.3. Maturazione in fusti di rovere.

Tradizionalmente, la maturazione dei grandi vini rossi, viene effettuata in piccoli fusti di rovere chiamati barriques, che permettono una lenta e leggera permeazione di O₂ all'interno del fusto. Nevares e Del Alamo (2008), hanno scoperto che il tasso naturale di permeazione di ossigeno in barriques nuove di quercia francese è compreso tra 1.66 e 2.5 mL/L/mese, mentre in quelle di quercia americana è più basso. Durante la maturazione nelle barriques, la

composizione fenolica del vino, risulta fortemente modificata a seguito di reazioni di ossidazione controllata: il colore diventa più intenso per effetto delle reazioni tra antociani e tannini in presenza di etanale, il tenore in antociani liberi diminuisce e la struttura dei tannini evolve riducendo al contempo la loro reattività e quindi l'astringenza. I vini dunque, rispetto a quelli posti in vasca, risultano più colorati, con un colore più stabile all'invecchiamento, hanno un sapore più gradevole e una maggiore complessità aromatica dovuta alle sostanze volatili estratte dal legno (che dipendono dall'origine del legno e dal livello di tostatura). Per contro le barriques sono costose, prendono molto spazio in cantina, la loro vita è breve e le operazioni da effettuare richiedono lunghi interventi manuali. Inoltre, l'età del contenitore interesserà il tasso di diffusione dell'ossigeno: più sarà vecchio e più sarà lenta perché la maggior parte dei pori saranno occlusi da residui del vino. Inoltre, con il tempo, la barriques diventa soggetta allo sviluppo di micro-organismi indesiderati quali ad esempio *Brettanomyces* che producono etilfenoli dall'odore sgradevole di medicinale e cavallo (Suarez et al., 2007).

1.3.4. Evoluzione del colore nel corso della maturazione e dell'affinamento

Durante la maturazione e l'affinamento, il colore dei vini rossi evolve dalle iniziali tinte blu-viola tipiche dei vini giovani, verso tinte di colore rosso-arancio. Nei vini rossi giovani, i principali composti responsabili del loro colore sono gli antociani monomeri ed i loro derivati acilati, il cui tenore tende a diminuire progressivamente nel tempo a causa della loro degradazione e trasformazione in altri pigmenti più stabili, responsabili del colore dei vini più evoluti. I pigmenti dei vini rossi costituiscono un gruppo eterogeneo di molecole, classificabili in quattro principali famiglie: antociani monomeri e loro derivati acilati, piranoantociani, pigmenti antociano-flavanolo da condensazione diretta e pigmenti antociano-flavanolo mediati da acetaldeide. Le reazioni coinvolte nella formazione di queste ultima tipologia di pigmenti causa uno spostamento del massimo di assorbimento nel visibile degli antociani verso lunghezze d'onda maggiori (effetto batocromico) che si traduce in evoluzione del colore verso tinte blu-viola. La cicloaddizione di un secondo anello piranico nella formazione dei piranoantociani invece, causa uno spostamento del massimo di assorbimento degli antociani verso lunghezze d'onda minori (effetto ipsocromico) che produce un'evoluzione del colore del vino verso tinte rosso-arancio (max di assorbimento a 510-515 nm per le vitisine di tipo-A, vinilguaiacolo e vinilcatecolo addotti e 500-503 nm per vinilfenolo addotti). Al contrario, le portisine hanno un massimo di assorbimento nel visibile a 575 nm e pertanto forniscono una tinta blu-viola ai vini (Mateus et al., 2003).

Un'analisi quantitativa e qualitativa dei cambiamenti prodotti nella composizione in pigmenti di un vino rosso nel corso della maturazione in

legno e dell'affinamento in bottiglia (Alcalde-Eon et al., 2006), mostra che tra i pigmenti antociano-derivati, quelli che maggiormente contribuiscono alla tinta di colore rosso-arancio sono i piranoantociani. Rappresentano infatti il 70% dei pigmenti antociano-derivati a 24 mesi dalla vendemmia. La loro formazione si evidenzia sin dai primi mesi di maturazione in legno e il loro contenuto aumenta nel corso dell'affinamento. Inoltre, le vitisine di tipo-A, gli antociani monomeri e i prodotti della condensazione diretta antociano-flavanolo sono i pigmenti che risentono maggiormente del trasferimento del vino in bottiglia nel corso dell'affinamento: gli ellagitannini rilasciati dal legno delle botti favoriscono la formazione dei due tipi di pigmenti antociano-derivati e proteggono gli antociani monomeri dalla loro degradazione. I cambiamenti prodotti nel resto dei pigmenti antociano-derivati sono influenzati per lo più dalle concentrazioni dei composti che intervengono nella loro formazione (figura 1.14).

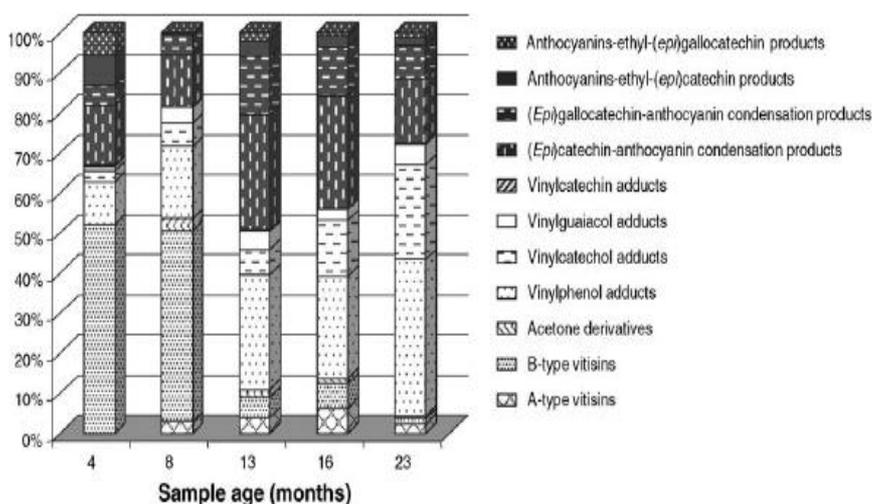


Figura 1.14. Contenuto relativo dei principali pigmenti antociano-derivati nel corso della maturazione e affinamento di un vino rosso.

Fra le quattro principali famiglie di pigmenti, gli antociani monomeri rappresentano il 70-80 % del totale, in tutti i campioni. Al pH del vino solo il 15% degli antociani è presente nella forma colorata di catione flavilio, mentre nel caso dei pigmenti antociano-derivati, anche se la loro percentuale è più bassa rispetto a quella degli antociani, sono presenti quasi tutti in forma colorata ed il loro contributo al colore del vino risulta essere importante come quello degli antociani (figura 1.15).

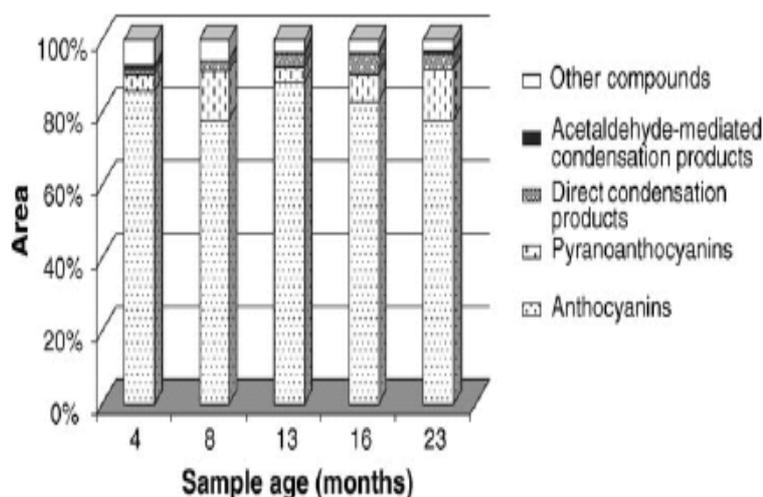


Figura 1.15. Contenuto relativo delle principali famiglie di pigmenti nel corso della maturazione e affinamento di un vino rosso.

1.3.5. Il ruolo del potenziale redox nell'evoluzione dei vini

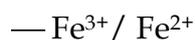
È ormai noto come le reazioni di ossidazione e riduzione giocano un ruolo fondamentale nell'evoluzione di un vino. Allo stesso modo il corretto bilanciamento di tali fenomeni è da considerarsi vitale per l'ottenimento di un buon prodotto. La misurazione di questo parametro potrebbe permettere all'enologo di ottimizzare le condizioni del processo produttivo.

Infatti, vi sono molte fasi in cui il potenziale redox (E_H) risulta coinvolto. La fermentazione degli zuccheri è un processo ossidativo come l'invecchiamento in legno; al contrario invece il vino in bottiglia subisce una reazione di riduzione.

La misura del potenziale redox di una soluzione è fatta tramite l'utilizzo di un elettrodo inerte. L'elettrodo ideale dovrebbe avere un comportamento reversibile e non interagire nelle reazioni elettrochimiche che avvengono nel liquido. In realtà molte sono le sostanze di natura organica che possono interagire con tale rilevazione: enzimi, microrganismi e ioni metallici.

Generalmente il potenziale redox è definito rispetto ad una singola coppia di carriers ma nel vino sono molteplici le coppie che possono causarne la variazione. Questo stato viene definito "potenziale misto" ed è caratterizzato dalla presenza in maggior parte delle seguenti coppie:

- O_2/H_2O
- O_2/H_2O_2
- Ossalacetato/malato
- Acetato/acetaldide
- Solfato/solfito
- Acetaldeide/etanolo
- Piruvato/lattato
- Fumarato/succinato
- Cu^{2+}/Cu^+



Il valore del potenziale varia anche con la concentrazione dei reagenti secondo l'equazione di Nerst (tabella 1.2)

Tabella 1.2. Equazione di Nerst.

$$E_H = E^0 + \frac{RT}{nF} \times \text{Log} \frac{\text{[ossidato]}}{\text{[ridotto]}}$$

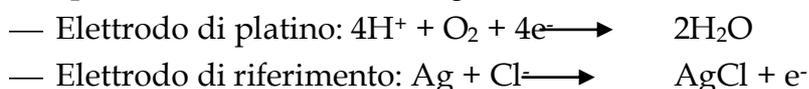
E^0 : potenziale normale del sistema;
 R : costante dei gas perfetti = 8,31 J/mole*K;
 T : temperatura di misurazione (in °K);
 n : numero di elettroni coinvolti nella semireazione;
 F : numero di Faraday = 96.500 coulombs.

Per soluzioni non troppo concentrate, la relazione si può esprimere attraverso le concentrazioni. Inoltre, raggruppando i termini costanti, tenendo conto del fattore di conversione dal logaritmo naturale a logaritmo decimale e riferendosi alla temperatura standard di 298,15 K (25 °C), si ottiene il coefficiente 0,05916, per cui l'espressione diventa:

Tabella 1.3. Equazione di Nerst per soluzioni non troppo concentrate.

$$E_H = E_0 + \frac{0,05916}{N} \times \text{Log} \frac{\text{[ossidato]}}{\text{[ridotto]}}$$

Per la misurazione del potenziale redox nel vino si utilizza un elettrodo combinato; esso è costituito da un elettrodo di misura in platino e da un elettrodo di riferimento Ag/AgCl, KCl, il cui potenziale, in rapporto all'elettrodo standard ad idrogeno, è costante e dell'ordine di 200mV a 25 °C. Questo potenziale è dovuto alle seguenti reazioni:



La concentrazione dell'acqua distillata a 25°C è di 55,55 mol/l e il suo potenziale standard $E_0 = 1,229$ V.

Sostituendo i dati nell'equazione di Nernst si ottiene:

$$E_H = E^0 + \frac{0.059}{4} \times \text{Log} \frac{[H^+]^2 [p_2^-]}{[H_2O]^2}$$

Dove scomponendo il logaritmo si ricava:

$$E_H (V) = 1,178 - 0,059 \cdot pH + 0,014 \cdot \text{Log} [p_2^-]$$

Il valore di E_H nel vino dipendono dal pH e dalla concentrazione di ossigeno disciolto: In particolare, per un tenore costante di ossigeno, gli aumenti di pH

determinano una diminuzione di E_H , al contrario, a pH costante, ad una dissoluzione di ossigeno, segue un aumento di E_H . (Ribéreau-Gayon, et al., 2003) L' r_h è il parametro che permette di valutare la capacità riducente od ossidante di una soluzione indipendentemente dal pH ed è calcolato come segue:

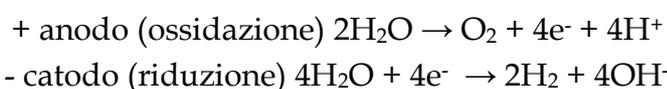
$$r_h = 2 * pH + E_H / 29.5$$

E_H = potenziale rispetto all'elettrodo ad idrogeno espresso in mV

I valori dell' r_h sono compresi in un range tra 0-41 in funzione del vino e dell'elettrodo utilizzato. Solitamente si attribuisce ad un vino in condizioni ottimali un valore compreso tra 18-20: tale valore è ritenuto da alcuni autori come capace di monitorare l'eccessivo stato di ossidazione ($r_h \leq 25$).

1.3.6. Elettrochimica e affinamento

Allo scopo di abbreviare la durata di conservazione dei vini, differenti tecniche di maturazione e affinamento che consentono di accelerare le trasformazioni nei confronti del colore e di altre proprietà sensoriali dei vini, rispetto a quelle ottenute con i procedimenti classici, sono state sperimentate. Queste impiegano procedimenti fisici differenti, quali gli ultrasuoni, i raggi infrarossi e ultravioletti, le alte pressioni e l'elettrolisi. Si definisce elettrolisi l'insieme dei fenomeni che avvengono in una soluzione elettrolitica e che trasformano l'energia elettrica in energia chimica. Contrariamente al caso delle pile, in cui si ha spontaneamente conversione di energia chimica in energia elettrica, si deve fornire energia per far avvenire una reazione redox che altrimenti si produrrebbe spontaneamente nel verso opposto. Applicando una differenza di potenziale ad un conduttore di seconda specie (a conduzione ionica, come nel caso di una soluzione elettrolitica), si osserva l'esistenza di una soglia di potenziale, al di sotto della quale non si ha passaggio di corrente. Tale soglia è in relazione con la forza elettromotrice della pila, che procede nel verso opposto rispetto alla reazione che si vuole realizzare ed è detta per questo forza contro elettromotrice. Tale forza, che si oppone alla ddp applicata, rappresenta il valore minimo da applicare perché si abbia elettrolisi. Nella pratica, si osserva che deve essere applicata una ddp superiore al valore-soglia: ciò è dovuto ad una serie di fattori di varia natura che determinano nel loro insieme la cosiddetta sovratensione. Le sovratensioni permettono di superare le interazioni sulla superficie dell'elettrodo e sono comuni quando alla reazione partecipano specie gassose. Facendo passare corrente tra due elettrodi immersi in una soluzione acquosa, si può scomporre l'acqua nei suoi componenti, secondo la reazione $2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$ con potenziale standard pari a 1,229 V, che produce O_2 all'anodo e H_2 al catodo:



Applicazioni industriali dell'elettrolisi includono la produzione di cloro, idrossido di sodio e vari metalli come l'alluminio e il rame. Il principio dell'elettrolisi è sfruttato in enologia nell'applicazione della microossigenazione ai vini per via elettrochimica (Fell et al., 2007) attraverso l'applicazione di una corrente di 6144 μA (pari a 3,1 mL/L/mese di O_2) a 300 litri di vino Cabernet Sauvignon per 12 settimane, evidenziano una maggiore formazione di pigmenti polimeri resistenti all' SO_2 nel vino così trattato, rispetto al vino testimone.

L'applicazione di microcorrenti di 300 $\mu\text{A/L}$ (pari a 60 mg/L/mese di O_2) per 10 giorni nel corso della maturazione di vini Sangiovese, mostra l'ottenimento di vini meno amari e astringenti e con maggiore intensità colorante rispetto agli stessi vini maturati in botte o microossigenati per via classica (Bertuccioli et al., 2009). Inoltre nello stesso studio, il mantenimento di potenziali elettrici inferiori a quelli necessari per l'elettrolisi dell' H_2O , grazie all'utilizzo di elettrodi in titanio con coating in platino in grado di ridurre il loro grado di polarizzazione (Bertuccioli et al., 2007), permette l'applicazione di microcorrenti a basso potenziale, tali da favorire la polimerizzazione e stabilizzazione degli antociani in assenza di ossigeno.

Un sistema completamente diverso è stato proposto da (Zeng et al., 2008), in questo caso non ci sono elettrodi a diretto contatto del vino. Il vino scorre in un tubo di teflon che è posto in mezzo a due piastre di metallo. Alle piastre viene applicato un fortissimo potenziale in modo da creare un campo elettrico di 600 V/cm. Dopo un passaggio di 3 minuti nel campo elettrico il vino risulta migliorato nelle caratteristiche sensoriali.

1.3.7. Micro-ossigenazione (MOX).

Questa tecnica è stata sviluppata a metà degli anni 90 in Francia presso l'INRA di Montpellier, grazie alle ricerche del prof. Moutounet. L'obiettivo della micro-ossigenazione è quello di riprodurre in grandi recipienti non permeabili al gas (tipicamente cemento e acciaio), i blandi fenomeni di ossidazione che avvengono nelle barriques. La MOX è una tecnica che consiste nell'introduzione di piccole e misurate quantità di ossigeno nei vini, con l'obiettivo di migliorarne il colore, l'aroma e la struttura (Gómez-Plaza and Cano-Lopez, 2011) (figura 1.16)

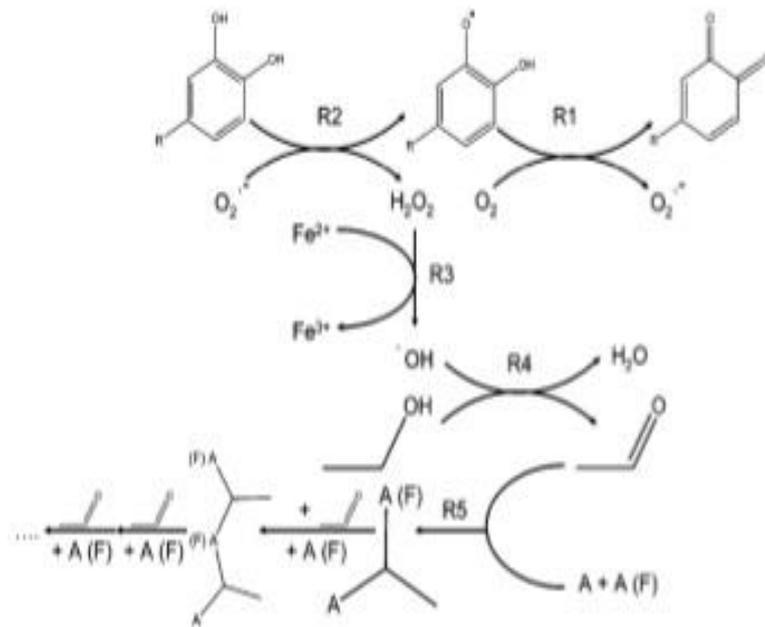


Figura 1.16. Meccanismo di reazione dell'ossigeno con i componenti del vino (A = antociani, F = flavanoli).

Un'importante caratteristica di questa tecnica, è che l'ossigeno viene aggiunto in modo tale che la velocità di apporto sia inferiore al suo consumo (Paul, 2002), così da evitare l'accumulo di O_2 disciolto. È per questo motivo che il successo di questo metodo dipende fortemente dal controllo del tasso di esposizione del vino all' O_2 . Il dosaggio tipico è relativamente piccolo e varia tra 2 e 90 mg di O_2/L per mese, a seconda del tipo di vino e della suo livello di maturazione (Leigh et al., 2011) e della temperatura di esercizio. A seconda della modalità di lavoro si ottengono i seguenti cambiamenti nel vino (Moutounet et al., 2001):

- *Strutturazione:* l'ossigeno permette la formazione di acetaldeide, a partire dall'etanolo e composti fenolici, con conseguente aumento delle reazioni di polimerizzazione, che conducono all'aumento della struttura tannica dei vini e ad un aumento dell'intensità colorante (Figura 17).

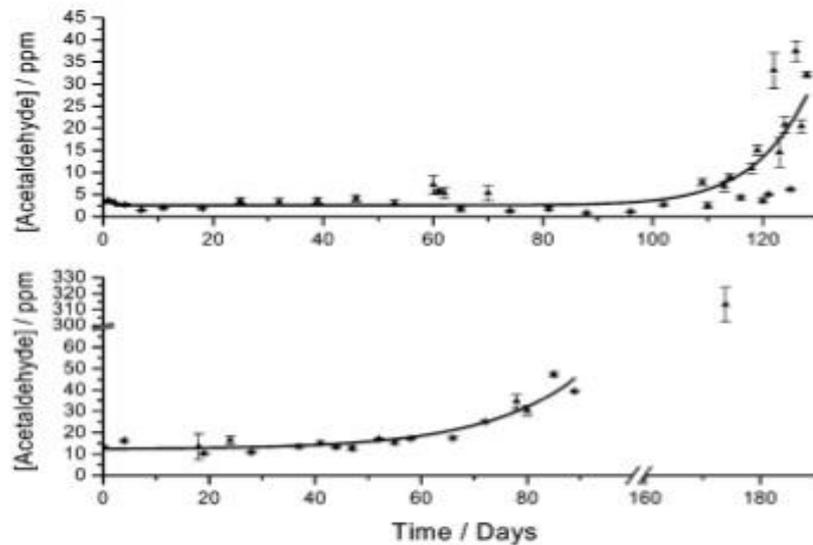


Figura 1.17. Concentrazione di acetaldeide durante la micro ossigenazione.

- *Armonizzazione*: l'intensità e la complessità aromatica aumentano e diminuiscono gli odori erbacei e la sensazione di astringenza.
- *Sur-ossigenazione*: in questo passaggio, si osservano condensazioni tannino-tannino, dovute alla mancanza di composti antocianici monomerici esauriti con le precedenti fasi; tutto ciò porta alla creazione di vini dalle caratteristiche tanniche estremamente spiccate e sgradevoli. In applicazioni tardive, si rischia anche di compromettere le caratteristiche aromatiche del prodotto a causa dell'ossidazione degli aromi varietali.

Generalmente la MOX viene applicata dopo il termine della fermentazione malolattica perché, da un punto di vista microbiologico, il vino è più stabile e meno soggetto allo sviluppo di specie indesiderate. In realtà lavori recenti (Pérez-Magarino et al., 2007) hanno testato con successo la MOX prima della FML con l'obiettivo di stabilizzare il colore prima che vi sia una perdita.

1.3.8. Vantaggi e svantaggi della micro-ossigenazione.

Un trattamento di micro-ossigenazione ben condotto permette un sensibile miglioramento delle caratteristiche di un vino: la stabilità e la conservabilità nel tempo, traggono vantaggio dall'aumento del grado di polimerizzazione (indice HCL) e dalla conseguente diminuzione delle forme libere dei tannini e degli antociani (Rybèreau-Gayon et al., 2003). Al livello sensoriale, si ha una diminuzione dell'amaro e dell'astringenza, un aumento della viscosità (su uve Sangiovese) (Bertuccioli et al., 2001) e un miglioramento del colore dovuto all'associazione dei tannini con gli antociani (Atanasova et al., 2002).

La tecnica presenta anche dei rischi: un'ossigenazione troppo intensa può provocare eccessiva polimerizzazione, astringenza dei tannini, perdita di colore, di freschezza, comparsa di aldeidi e di aromi ossidati (Blaauw, 2009).

Inoltre, si possono sviluppare micro-organismi aerobici come *Brettanomyces*, la cui presenza è associata alla produzione di fenoli volatili maleodoranti (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Infine tempi di erogazione troppo lunghi possono determinare una maturazione anticipata del vino e/o comparsa di sentori di “svanito”. (Culleré et al., 2007). I parametri da controllare durante la micro-ossigenazione sono:

1. Ossigeno disciolto
2. Quantitativo di acetaldeide
3. Controllo sensoriale
4. Misura dei parametri del colore
5. SO₂
6. pH
7. Acidità fissa e volatile.

1.3.9. Utilizzo della corrente nella stabilizzazione del vino.

Sono state fatte numerose sperimentazioni riguardanti l'uso di corrente nella stabilizzazione e nella lavorazione dei vini e altre sono attualmente in atto. Tra queste, i metodi che hanno riscontrato maggior successo nei processi di produzione, sono l'elettrolisi e l'elettrodialisi. L'elettrolisi è basata sulla trasformazione dell'energia elettrica in energia chimica con lo scopo di fornire energia al sistema (vino, pigiato). Questo fa avvenire una reazione redox che porta alla formazione di pigmenti stabili:

- Attraverso l'applicazione di una corrente di 6144 μA (pari a 3,1 ml/L/mese di O₂) su 300 litri di vino Cabernet Sauvignon per 12 settimane, è stato riscontrato nel vino una maggiore formazione di pigmenti polimeri resistenti all'SO₂ rispetto al vino testimone.
- L'applicazione di microcorrenti di 300 $\mu\text{A/L}$ (pari a 60 mg/L/mese di O₂) per dieci giorni nel corso della maturazione di vini Sangiovese, ha permesso di ottenere vini meno amari e astringenti e con maggiore intensità colorante rispetto agli stessi vini maturati in botte o micro-ossigenati per via classica (Bertuccioli et al., 2009). Inoltre nello stesso studio, il mantenimento di potenziali elettrici inferiori a quelli necessari per l'elettrolisi dell'H₂O, grazie all'utilizzo di elettrodi in titanio con coating in platino in grado di ridurre il loro grado di polarizzazione (Bertuccioli et al., 2007), ha permesso l'applicazione di microcorrenti a basso potenziale, tali da favorire la polimerizzazione e stabilizzazione degli antociani in assenza di ossigeno.
- Un sistema completamente diverso è stato proposto da Zeng et al. (2008), in questo caso non ci sono elettrodi a diretto contatto con il vino: quest'ultimo, infatti, viene fatto scorrere in un tubo di teflon

posto in mezzo a due piastre di metallo. Alle piastre viene applicato un fortissimo potenziale in modo da creare un campo elettrico di 600 V/cm. Dopo un passaggio di tre minuti nel campo elettrico il vino è risultato migliorato nelle sue caratteristiche sensoriali.

L'elettrodialisi, invece, ha come obiettivo la stabilizzazione tartarica. Questa viene ottenuta attraverso la creazione di un potenziale elettrico tra due elettrodi: il campo elettrico fa migrare gli ioni positivi verso l'elettrodo negativo (anodo) e viceversa. Lungo il percorso di migrazione degli ioni, vengono frapposte delle membrane ioniche, che permettono il passaggio solo dei cationi o degli anioni da rimuovere dal vino (Escudier et al., 1993). Con il passare degli anni, gli studiosi hanno proposto di utilizzare l'elettrodialisi non solo per la stabilizzazione tartarica, ma anche in altri aspetti della filiera enologica. Inoltre la corrente è stata utilizzata per:

- Arrestare o ridurre l'attività dei lieviti indigeni non-Saccharomyces nei primi stadi della fermentazione alcolica (Ranalli et al., 2002) e per questa capacità è stata proposta come metodo alternativo all'aggiunta di solfiti (Lustrado et al., 2003).
- Modificare gli strati della membrana cellulare condizionando il metabolismo dei lieviti promuovendo o inibendo le loro funzioni vitali. L'elettrostimolazione, applicata con piccoli campi galvanici a bassa tensione durante la fermentazione, porta a un tasso più veloce di formazione dell'etanolo, ed a una produzione maggiore dei sottoprodotti della fermentazione come alcool superiori, acidi organici e glicerolo (Berovic et al., 2008; Fiedler et al., 1995).
- Chiarificare e illimpidire i succhi di frutta (Aray-Farias et al., 2008).
- Creare canali percolativi nei tessuti cellulari dell'uva (Lebovka et al., 2001) migliorando l'estrazione dei composti fenolici negli stadi prefermentativi della vinificazione, ottenendo vini molto ricchi di polifenoli con tempi di macerazione ridotti (Lopez et al., 2008; Puértolas et al., 2010).
- Stabilizzare la matrice fenolica dei vini rossi aventi alla fine del trattamento un maggior quantitativo di etanale (Fell et al., 2007).
- Puértolas et al. (2010) hanno somministrato corrente elettrica con una media di cinquanta impulsi elettrici in un campo con forza di 5 kV/cm (energia specifica totale: 3.67 kJ/kg) ad una frequenza di 122 Hz su pigiato di uve Cabernet Sauvignon. Da tale trattamento si è ottenuto un prodotto che, alla fine della fermentazione alcolica, aveva una

maggiore intensità colorante, un indice di polifenoli totali maggiore e un contenuto in antociani superiore rispetto al controllo. La macerazione, per il pigiato trattato con PEF (pulsed electric field), è stata ridotta di 48h.

Dopo quattro mesi di affinamento in bottiglia l'intensità colorante, l'indice dei polifenoli totali e il contenuto in antociani, per i vini trattati con PEF, erano rispettivamente: 38%, 22% e 11% superiori rispetto al testimone. Inoltre non sono risultate differenze significative sul contenuto di antocianine monomere, ciò nonostante il contenuto in flavan-3-oli, flavanoli, acidi idrossicinnamici e derivati, è risultato superiore nei vini trattati con PEF. Infine, per entrambi i vini la maturazione non ha influenzato l'intensità colorante, mentre è diminuito l'indice di Folin-Ciocalteu.

Il costo economico di questo trattamento (inferiore a 10 KJ/Kg per migliorare il trasferimento di massa) dovrebbe essere approssimativamente di 0.33 €/ ton (1 ton = \approx 1000 kg) (Toepfl et al., 2006).

Capitolo 2

Scopo

L'ossigeno svolge un ruolo determinante in tutti i processi biologici e in tutte le trasformazioni chimiche durante la produzione del vino. Nel caso dei vini rossi, l'ossigeno è implicato nelle reazioni di stabilizzazione del colore, promuovendo la formazione di polimeri fenolici colorati e non. L'ossigeno svolge la funzione di accettore di elettroni, modulando quindi le reazioni di ossido-riduzione che si instaurano durante l'evoluzione del vino e che portano a variazioni importanti del potenziale redox. Da alcuni anni sono in corso ricerche finalizzate alla gestione delle reazioni di ossidoriduzione senza l'intervento dell'ossigeno, ma impiegando microcorrenti con l'intento di sottrarre elettroni alle molecole (antociani e tannini) coinvolte nella stabilizzazione dei vini. Gli studi effettuati relativi all'applicazione delle microcorrenti al vino in fase di maturazione, hanno permesso di evidenziare come le due componenti fenoliche (antociani e tannini), coinvolte nella stabilizzazione del colore, siano positivamente influenzate dalla corrente a bassa intensità, in assenza di ossigeno portando alla formazione di strutture polimeriche colorate. La formazione di questi pigmenti stabili è legata alla sottrazione di elettroni dalle molecole di antociani e tannini che si aggregano (condensazione diretta). Tuttavia questa condensazione risulta molto lenta e il suo effetto sulla stabilizzazione del colore risulta contenuto anche dopo alcune settimane dal trattamento elettrochimico. Una più rapida aggregazione si manifesta quando interviene l'acetaldeide che attraverso la formazione di un ponte etilico tra antociani e tannini stabilizza il complesso colorato. Numerosi sono gli studi che hanno evidenziato il ruolo chiave di questa aldeide nella stabilizzazione del colore dei vini rossi.

Allo scopo di procedere ad uno sviluppo pratico di questa tecnologia si è ritenuto di affrontare uno studio che permettesse, nella prima parte di ottimizzare le condizioni operative del trattamento elettrochimico e nella seconda parte di verificare gli effetti positivi del trattamento in una di fase critica del processo di vinificazione: la fermentazione malolattica.

Le attività previste nella prima parte dello studio sono state finalizzate alla messa in evidenza degli effetti più significativi nel determinare la stabilità del colore. L'impostazione della attività sperimentale deriva dal fatto, già ampiamente dimostrato, che per conseguire una stabilità del colore, siano necessarie concentrazioni appropriate di antociani e tannini che devono reagire per formare strutture molecolari colorate e stabili. Per verificare quanto la corrente influenzi il processo di stabilizzazione in campioni con concentrazioni differenti di fenoli, è stato deciso di allestire delle prove

secondo la logica dei disegni fattoriali frazionari multivariati che prevedono la variazione contemporanea di più variabili (effetti o fattori) che determinano una influenza su specifici responsi.

Le prove allestite hanno previsto la variazione contemporaneamente del contenuto in antociani e tannini, l'intensità di corrente applicata e il tempo di erogazione.

Gli effetti della variazione di questi fattori sono stati poi valutati determinando alcuni parametri (responsi) collegati all'evoluzione del vino: contenuto di antociani liberi, polimeri colorati, intensità colorante, e soprattutto l'acetaldeide formata, il vero motore delle aggregazioni fenoliche. Accertata l'influenza dei parametri più significativi sui responsi, è stata successivamente organizzata una sperimentazione per ottimizzare le condizioni di erogazione della corrente. A tale scopo è stato predisposto un disegno fattoriale completo (Central Composit Design: CCD) che prevede cinque livelli di variazione degli effetti più significativi verso la stabilizzazione del colore.. Gli effetti della variazione di questi fattori sono stati valutati determinando alcuni parametri collegati all'evoluzione del vino: polimeri colorati, intensità colorante e acetaldeide.

Nella seconda parte della ricerca, si è voluto verificare l'influenza dell'applicazione di microcorrenti sulla stabilità del colore del vino rosso prima e dopo la FML .Il disegno sperimentale, ha considerato la pratica dell'enzimaggio in macerazione e l'utilizzo di due ceppi diversi di batteri malolattici. Sui campioni predetti, sono stati valutati alcuni parametri collegati all'evoluzione del colore del vino, per evidenziare eventuali effetti del trattamento elettrochimico effettuato prima e dopo FML. Particolare attenzione è stata rivolta al ruolo dell'acetaldeide, prodotta per ossidazione dell'etanolo durante il trattamento elettrochimico, nella stabilità del colore dei vini per la precoce stabilizzazione del colore.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Il progetto di ricerca

Il progetto di ricerca è stato suddiviso in due parti: una prima parte divisa in (A) screening è servita a individuare le variabili più importanti [intensità della corrente, tempo (inteso come durata del trattamento elettrochimico), concentrazione degli antociani e dei tannini] perché legate direttamente alle variazioni dei responsi (intensità colorante, polimeri colorati ed acetaldeide), (B) ottimizzazione del trattamento elettrochimico; la seconda parte ha riguardato l'applicazione elettrochimica in una fase specifica del processo di vinificazione.

Prima parte: studio dei principali effetti sulla stabilizzazione della matrice fenolica

A) Screening: individuazione delle variabili (intensità di corrente, tempo, concentrazione di antociani e di tannini) più rilevanti per le variazioni dei responsi (intensità colorante, polimeri colorati, acetaldeide).

B) Ottimizzazione delle condizioni del trattamento elettrochimico.

Seconda parte: applicazione delle condizioni del trattamento elettrochimico

Riduzione degli effetti negativi della fermentazione malolattica sulla struttura del colore

3.1.1. La cella elettrolitica

La cellula elettrolitica impiegata nelle prove è costituita da due semicelle in vetro della capacità di 1,25 litri separate da una membrana ionica semipermeabile alle cariche elettriche. (Ionics, USA).



Figura 3.1. Cella elettrolitica.

Per l'erogazione della corrente (in regime galvanostatico) sono stati impiegati un elettrodo in rete di titanio con coating in platino ed un elettrodo in titanio (superficie di $0,1 \text{ m}^2$ ciascuno) per il comparto ossidante (anodo) e riducente (catodo) rispettivamente ed un alimentatore potenziostato-galvanostato (Amel instruments, general-purpose potentiostat, model 2049). Fornendo energia elettrica alla cella, all'interno del comparto ossidante gli elettroni sottratti ai diversi sistemi redox presenti nel vino, servono a ridurre la frazione di vino presente nel comparto riducente, dove sono trasferiti attraverso gli elettrodi. Il comparto ossidante della cella elettrolitica sostituisce l'ossigeno nel ruolo di accettore di elettroni.

3.1.2 Strumentazione per la misura del potenziale redox

La misura del potenziale di ossidoriduzione nel comparto ossidante è stata effettuata mediante un elettrodo combinato costituito da un elettrodo di misura in platino e da un elettrodo di riferimento Ag/AgCl collegato ad un misuratore con metcing-pin per l'eliminazione delle correnti di disturbo (Hanna instruments, realtime microprocessor-based process pH/mV meters, pH500/mV600 series). Il software HI92500 v.5.1. (Hanna instruments, 2004) è stato utilizzato per la registrazione dei valori del potenziale redox ogni 180 s. Un elettrodo al calomelano è stato impiegato per il monitoraggio del potenziale di cella durante le prove con microcorrenti. I valori del potenziale di cella registrati sono stati sempre inferiori ai 1,2 V necessari per evitare l'elettrolisi dell'acqua e quindi la formazione di ossigeno permettendo l'ossidazione diretta di tutti gli altri composti del vino.

3.1.3 Strumentazione per la misura dell'ossigeno disciolto

Per la misura dell'ossigeno disciolto è stato utilizzato un ossimetro (Micro Logger 3650), collegato alla cella elettrolitica tramite una pompa peristaltica. I dati sono stati registrati mediante software Winlog 97E (V.1.06).

Conteggio del quantitativo di ossigeno equivalente

Gli aspetti quantitativi dell'elettrolisi sono descritti da alcune leggi, che mettono in relazione la quantità di elettricità che attraversa una cella elettrolitica con le quantità di specie chimiche che si formano o scompaiono per effetto delle reazioni che avvengono agli elettrodi. Le leggi di Faraday possono essere riassunte nel modo seguente:

- la massa di un certo elemento ridotta (o ossidata) agli elettrodi durante un'elettrolisi è proporzionale alla quantità di elettricità che è passata attraverso la soluzione.
- le masse di diversi elementi ridotti (o ossidati) dalla stessa quantità di elettricità sono proporzionali ai loro pesi equivalenti.

Partendo dalla carica dell'elettrone e dal numero di elettroni contenuti in una mole, si può calcolare che per decomporre agli elettrodi un equivalente di sostanza (definito come la quantità in peso di sostanza che in una certa reazione redox cede o acquista una mole di elettroni) occorrono 96500 Coulomb; questa quantità viene definita Faraday:

$$1 \text{ Faraday} = 96500 \text{ Coulomb}$$

Se consideriamo la reazione di riduzione ad acqua dell'ossigeno molecolare ($\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$), allora sono necessarie 4 moli di elettroni per ridurre una mole di O_2 , ossia 4 Faraday e 1 Faraday riduce una quantità in peso pari ad un equivalente di Ossigeno (8 grammi). Inoltre considerando che $1 \text{ Coulomb} = 1\text{A} \times 1\text{s}$ è la quantità di carica elettrica trasportata in un secondo applicando un corrente elettrica di 1 Ampere di intensità, è possibile calcolare attraverso la formula seguente, le moli di ossigeno equivalente corrispondenti, applicando una data intensità di corrente per un periodo di tempo stabilito:

$$Q = I \times t = n\text{e}^- \times F = 4 \times n\text{O}_2 \times F$$

Q = quantità di carica elettrica in Coulomb

3.2 Prima parte: studio dei principali effetti del trattamento elettrochimico sulla stabilizzazione della matrice fenolica

3.2 Prima parte: analisi multifattoriale per l'individuazione e l'ottimizzazione delle condizioni elettrochimiche

Gli studi multifattoriali si svolgono in genere in due fasi (Box et al., 1997, 1998). Nella prima fase (A) si individuano le variabili più rilevanti perché più strettamente legate alla variazione del responso, nella seconda fase (B) si ha l'ottimizzazione delle condizioni. Questa fase viene condotta utilizzando un disegno fattoriale frazionario (FFD) che consente di valutare, allestendo il più piccolo numero possibile di esperimenti, un numero molto grande di variabili. Ovviamente, utilizzando un disegno frazionario anziché un disegno fattoriale completo (Central Composite Design) in cui si costruiscono

esperimenti con tutte le possibili combinazioni delle variabili esaminate, non si riesce ad avere informazioni sufficienti a distinguere in maniera completa l'importanza delle singole variabili rispetto alle loro interazioni.

Per **fattore** o **variabile** si intende un qualsiasi parametro, qualitativo o quantitativo, del quale viene valutata l'influenza esercitata su un determinato evento; il disegno utilizzato è detto fattoriale proprio perché consente la valutazione simultanea di più variabili o fattori rispetto ad un processo produttivo, ad una reazione chimica ecc....

Per **risponso** si intende il risultato di una reazione o di un processo in ciascuna delle prove sperimentali previste dal disegno fattoriale e condotte nelle condizioni determinate dalla combinazione dei vari livelli associati alle variabili.

Il termine **livello** è riferito ai fattori o variabili. Nel caso di una variabile quantitativa i livelli ad essa associati ne definiscono l'ordine di grandezza; un disegno fattoriale viene definito ad n livelli dagli n livelli associati a ciascuna delle sue variabili.

3.2.1 A) Screening

In questa parte dello studio sono state studiate le variabili che potevano influire sull'evoluzione della maturazione del vino, in particolare: concentrazione iniziale di antociani liberi, tannini, quantità di corrente e il tempo di erogazione della corrente. I livelli di queste variabili sono mostrati in tabella 3.1.

Tabella 3.1. Livelli delle variabili considerate.

Variabile	Valore basso	Valore alto
Intensità di corrente (A)	0.1	0.9
Tempo di erogazione (minuti)	30	120
Antociani (mg/l di malvidina 3-glucoside)	71	263
Tannini (mg/l catechina)	600	1136

I livelli utilizzati sono stati scelti in modo da essere compatibili con i valori normalmente ritrovati nei vini.

Piano Sperimentale

Lo studio per verificare l'influenza di alcuni fattori sulla maturazione del vino, ha previsto un piano sperimentale ottenuto attraverso l'elaborazione di un disegno fattoriale frazionario con quattro fattori, ciascuno a due livelli (tabella 3.1), per un totale di undici trattamenti (3 repliche del punto centrale) come riportato in tabella 3.2.

Tabella 3.2. Disegno frazionario fattoriale

n. esp	Intensità Corrente (A)	Tempo (min)	Antociani (mg/l malvidina 3- glucoside)	Tannini (mg/l catechina)
	A	B	C	D
1	0.05	75	167	868
2	0.09	120	263	1136
3	0.01	30	263	1136
4	0.01	120	263	600
5	0.09	30	263	600
6	0.05	75	167	868
7	0.09	120	71	600
8	0.05	75	167	868
9	0.09	30	71	1136
10	0.01	30	71	600
11	0.01	120	71	1136

I due livelli di concentrazione (basso e alto) in antociani e tannini delle diverse prove sono state ottenute attraverso l'aggiunta di uno svinato di vino "rossissimo" e tannino di vinacciolo Grap'tan E (Ferco, Intec) ad un vino bianco da tavola con 11 % v/v di alcol. Per ogni prova è stato misurato l'ossigeno disciolto e il potenziale redox nel comparto ossidante della cella, alla temperatura di 20°C, all'inizio ed alla fine di ogni trattamento.

Allestimento delle prove

Il vino "rossissimo" impiegato presentava le seguenti caratteristiche chimiche (tabella 3.3).

Tabella 3.3. Caratteristiche chimiche del vino "rossissimo" impiegato.

alcol (% v/v)	11,6
Ac.volatile lorda (g/ L ac.acetico)	0,94
Ac. volatile corretta (g/L ac.acetico)	0,52
SO ₂ libera (mg/L)	6
SO ₂ totale (mg/L)	167
Ac. totale (g/L ac.tartarico)	6,26
Indice di Fenoli totali (d.o.280nm)	118,8
Intensità colorante (d.o.420+ d.o.520+ d.o.620)	25,32
Antociani liberi (mg/L malvidina)	715
Polimeri colorati (mg/L malvidina)	38
Tannini (mg/L cianidina)	920

In base ai valori di antociani liberi riportati in tabella 3.1, le percentuali di vino "rossissimo", aggiunte ad un vino bianco per ottenere le due concentrazioni in antociani liberi stabilite per le prove, sono state dell'8, 25 e 45 %. La concentrazione in proantocianidine corrispondente a queste tre

percentuali ed il grado di purezza del tannino (50%), sono stati impiegati nel calcolo del dosaggio di quest'ultimo per ottenere le concentrazioni in tannini stabilite. Le prove di 1,5 L ognuna, sono state allestite come riportato nella tabella 3.4.

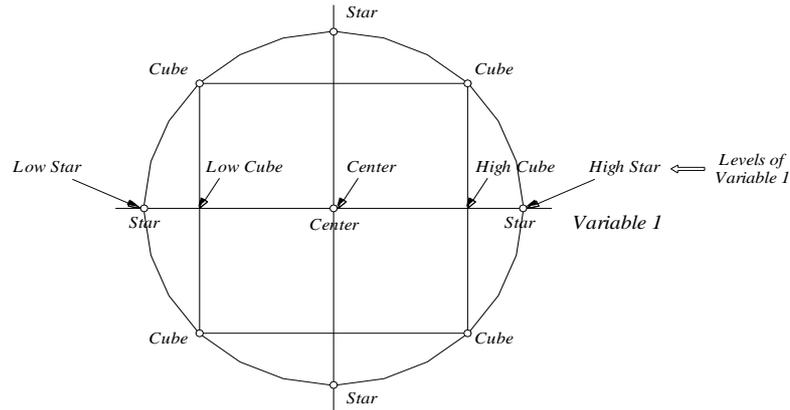
Tabella 3.4. Tabella riassuntiva delle prove allestite.

Prove	Antociani mg/L	Tannini mg/L	% Rossissimo	mL Ross/1,5 L	mL Bianco/1,5 L	gr GraptanE/1,5 L
1-6-8	167	868	25	375	1125	3,62
2-3	263	1136	45	675	825	4,46
4-5	263	600	45	675	825	1,46
7-10	71	600	8	120	1380	2,61
9-11	71	1136	8	120	1380	5,61

Alla fine di ogni trattamento, condotto alla temperatura di 20°C, i vini sono stati imbottigliati in bottiglie di vetro da 0,5 litri sotto un flusso di azoto e conservati alla stessa temperatura di trattamento.

3.2.2 B) Ottimizzazione delle condizioni del trattamento elettrochimico

Questa parte dello studio è stato finalizzato per trovare le migliori condizioni sperimentali del piano di ottimizzazione (definizione dell'intervallo di valori delle variabili significative per ottenere un dato valore del responso) mediante calcolo delle superfici di responso e per esso è stato adottato un disegno sperimentale detto Central Composite Design (CCD). Un CCD consiste in uno schema fattoriale che comprende tre tipi di esperimenti: esperimenti cubici ("cube"): incrociano il più basso e il più alto livello delle variabili del disegno sperimentale e sono la parte fattoriale del disegno; esperimenti centrali ("central"): sono le repliche del disegno sperimentale che intercettano il centro (il livello mediano) delle variabili e sono la parte integrante del piano sperimentale; esperimenti a stella ("star"): sono specifici del CCD. Per un disegno sperimentale di due variabili a due livelli, gli esperimenti sono distribuiti secondo questo schema:



Come si può vedere, ogni variabile del disegno ha cinque livelli: Low star, Low cube, Center, High cube, High star. Low cube e High cube sono rispettivamente il più basso e il più alto livello che si specifica quando si definiscono le variabili del disegno sperimentale. I quattro punti "cube" sono localizzati ai vertici del quadrato, il punto "central" al centro del quadrato, i quattro punti "star" sono localizzati al di fuori del quadrato, ma la distanza di questi dal centro è uguale alla distanza dei punti "cube" dal centro. Da ciò ne risulta che sia i punti "cube" che i punti "star" sono localizzati nella stessa circonferenza (o sfera se si hanno tre variabili), con la conseguenza che l'informazione che deriva da ciascuno degli esperimenti ha un uguale peso nell'analisi. Nel nostro caso il disegno sperimentale risulta essere il seguente (Figura.3.2):

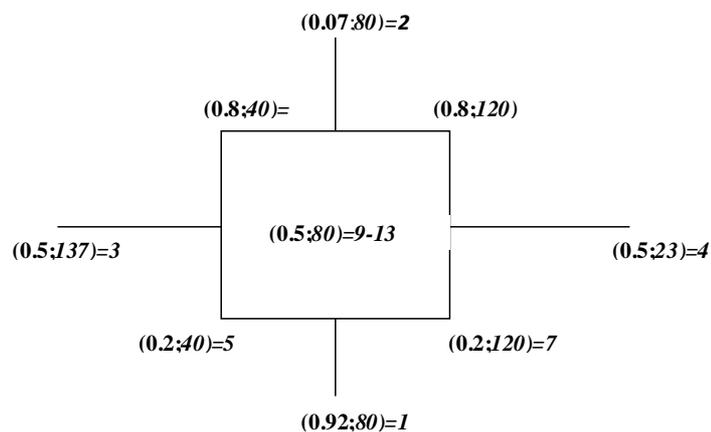


Figura 3.2: Disegno sperimentale (CCD) (primo numero voltaggio (volt); secondo numero tempo (h) = n. esperimento).

Piano sperimentale

Il piano sperimentale è stato ottenuto attraverso l'elaborazione di un disegno fattoriale frazionario a due fattori (tempo del trattamento e intensità di corrente), derivante da un totale di tredici trattamenti (5 repliche del punto centrale) come riportato in tabella 3.5.

Tabella 3.5: piano sperimentale.

n. esp	Intensità di corrente (A)	Tempo del trattamento (min)
1	0,92	80
2	0,07	80
3	0,5	137
4	0,5	23
5	0,2	40
6	0,8	40
7	0,2	120
8	0,8	120
9	0,5	80
10	0,5	80
11	0,5	80
12	0,5	80
13	0,5	80

Le prove sono state allestite attraverso la matrice in cui sono riportati: vino bianco da tavola, vino "rossissimo", polvere di antociani (purezza $\approx 21\%$, estratto dal medesimo rossissimo con la metodica di Di Stefano) e tannino di vinacciolo Grap'tan E (Ferco, Intec). Per ogni prova sono stati misurati nel comparto ossidante della cella, alla temperatura di 18°C , all'inizio e alla fine del trattamento, l'ossigeno disciolto (mg/l), il potenziale redox (mV) e l'intensità (mA).

Allestimento delle prove

Il vino "rossissimo" e il vino bianco impiegato, avevano, in origine, le seguenti caratteristiche chimiche (Tabella 3.6)

Tabella 3.6. Caratteristiche chimiche del vino “rossissimo” e del vino bianco impiegato.

Vino rossissimo	
Alcol (% v/v)	12,23
Ac. Volatile lorda (g/l ac. acetico)	0,59
Ac. Volatile corretta (g/l ac. Acetico)	0,44
SO2 libera (mg/l)	9
SO2 totale (mg/l)	115
Ac. Totale (g/l ac. Tartarico)	5,5
pH	3,8
Indice di fenoli totali (d.o. 280 nm)	107
Intensità colorante (d.o. 420 + 520+ 620 nm)	43
Antociani liberi (mg/l malvidina)	1193
Polimeri colorati (mg/l malvidina)	54,77
Tannini (mg/l catechina)	77,75
Vino bianco	
Alcol (% v/v)	10,88
Ac. Volatile lorda (g/l ac. acetico)	0,33
Ac. Volatile corretta (g/l ac. Acetico)	0,10
SO2 libera (mg/l)	13
SO2 totale (mg/l)	60
Ac. Totale (g/l ac. Tartarico)	5,13
pH	3,13

Per lo sviluppo del processo di analisi sopra descritto, sono stati preparati, prima di ogni trattamento elettrochimico, 4 l di vino ripartiti secondo lo schema riportato di seguito (Tabella 3.7):

Tabella 3.7. Dosi per la preparazione del vino per le 13 prove.

Vino bianco	3200ml
Vino rossissimo	800 ml
Polvere di antociani	4 g
Tannino di vinacciolo	8 g

3.3 Seconda parte: applicazione delle condizioni del trattamento elettrochimico.

3.3.1 Effetto sulla fermentazione malolattica

Piano sperimentale

Il piano sperimentale ha previsto la vinificazione di quattro lotti di 45 kg di uve Sangiovese congelate, provenienti dalla zona del Chianti. Le uve sono state pigiate e diraspate (1kg di raspi per ciascun lotto) e il mosto così ottenuto è stato posto in contenitori di acciaio inox (50 L) ottenendo i campioni C1, C2, E1, E2. Ai campioni E1-E2 è stato aggiunto l’enzima di macerazione *Vinozym vintage FCE* (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France) nella

dose di 3g/100kg di uva in modo da verificare l'impatto di una maggiore estrazione fenolica sul trattamento in esame. I mosti sono stati solfitati (100 mg/L di $K_2S_2O_5$), portati alla temperatura di 20° C gradi e inoculati con lieviti secchi attivi *Saccharomyces cerevisiae* ceppo *Excellence XR* nella dose di 20 g/HL (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France), reidratati come da protocollo fornito dalla casa produttrice. La fermentazione alcolica e la macerazione sono state condotte per dieci giorni alla temperatura di 25° C eseguendo due follature al giorno fino al raggiungimento di una concentrazione inferiore a 2g/L di zucchero residuo. Nella figura 3.3 è riportato il flowsheet delle prove.

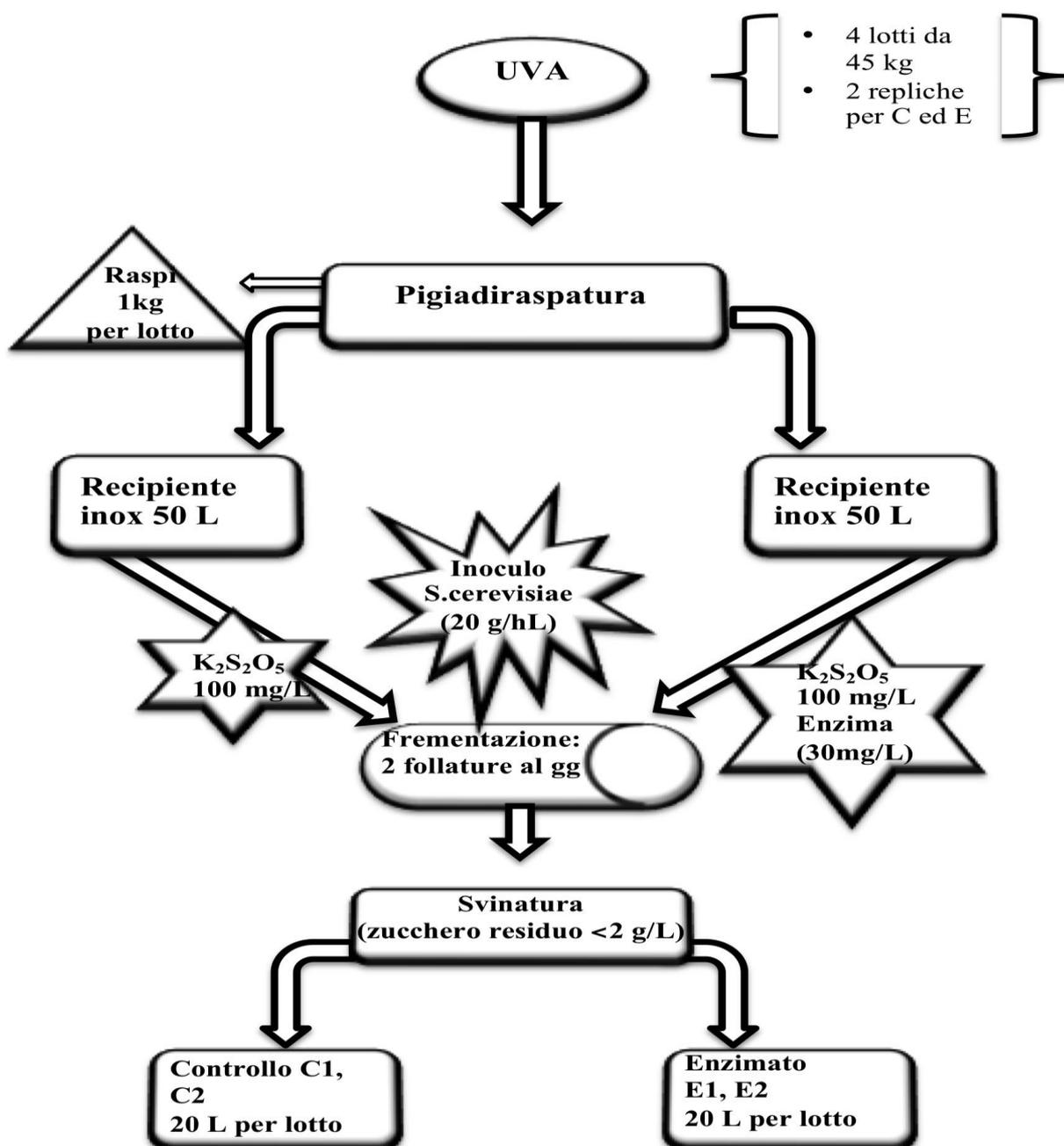


Figura 3.3. Flowsheet: allestimento delle vinificazioni per l'ottenimento dei vini C ed E.

La seguente tabella 3.8 riassume le condizioni operative adottate per le due fermentazioni (alcolica e malolattica), i materiali utilizzati e le analisi sui mosti.

Tabella 3.8. Allestimento delle fermentazioni: uve, condizioni operative, prodotti utilizzati, caratteristiche mosto, contenitori, fermentazioni alcolica e malolattica.

FERMENTAZIONE ALCOLICA				
Lotto	C		E	
Quantità Kg	45		45	
Varietà	Sangiovese		Sangiovese	
Vigneto/area	Chianti		Chianti	
Temperatura conferimento uve (°C)	congelate		congelate	
Temperatura pigiato (°C)	16		16	
Pressa: tempo (min) x pressione (bar)	2 x 2,3		2 x 2,3	
Ciclo di pressatura	1		1	
Peso raspi (kg)	1		1	
Sosta del pigiato per riscaldare il mosto (min)	10		10	
Sosta del pigiato per enzimaggio (min)	-		30	
Temperatura del pigiato per enzimaggio e inoculo lievito (°C)	20		20	
PRODOTTI UTILIZZATI				
S ₀₂	K ₂ S ₂ O ₅		K ₂ S ₂ O ₅	
S ₀₂ (mg/L)	100		100	
Enzima	<i>Vinozym vintage FCE</i> (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France)		<i>Vinozym vintage FCE</i> (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France)	
Enzima (g/kg uva)	30		30	
Lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Excellence XR</i> (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France)		<i>Excellence XR</i> (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France)	
Lievito (g/HL)	20		20	
LAB	A	B	A	B
	<i>Oeno2</i> (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France)	<i>VP14</i> (Lallemmand, Canada)	<i>Oeno2</i> (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France)	<i>VP14</i> (Lallemmand, Canada)
LAB (g/HL)	1		1	
CARATTERISTICHE MOSTO				
pH	3,59		3,62	
Acidità totale (g/L acido tartarico)	4,7		4,9	
°Babo	17		18	
S ₀₂ libera	28		21	
S ₀₂ totale	56		56	
Zuccheri (kg/HL)	19,1		20,4	
Alcool potenziale (% v/v)	11,46		12,24	
CONTENITORI				
Materiale	acciaio inox		acciaio inox	
Capacità (L)	50		50	
FERMENTAZIONE				
Durata (giorni)	10		10	
Zuccheri residui (g/L)	0,36		0,47	

Allestimento delle prove

Una volta terminata la fermentazione alcolica, i vini sono stati svinati ottenendo un volume di 20 L per ciascun lotto (C1, C2, E1, E2). Ciascun lotto è stato a sua volta suddiviso in due parti uguali di 10 L e inoculate con due differenti ceppi di *Oenococcus oeni*: *OENO2* (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France) (codificato con la lettera "a") e *VP41* (Lallemand, Canada) (codificato con la lettera "b"), entrambi nella dose di 1 g/HL, reidratati come da protocollo fornito dalla casa produttrice. Ogni lotto di vino è stato ulteriormente diviso e sottoposto a trattamento elettrolitico come illustrato in figura 3.4. Per il trattamento con microcorrenti, i vini sono stati posti nella cella elettrolitica ed è stata data corrente con voltaggio e tempo costante (0,750 ampere per 60 minuti). La macchina utilizzata per dare tensione è *General-purpose potentiostat model 2049* (Amel instrument). La FML ha avuto durata variabile in funzione del ceppo utilizzato (tabella 3.9). Terminata la fermentazione malolattica, i vini sono stati travasati, imbottigliati e conservati in cella termostata alla temperatura di 15°C. Il contenuto di SO₂ è stato portato a 50mg/L di SO₂ totale.

Tabella 3.9. Durata in giorni della fermentazione malolattica per le varie tesi (C ed E) in funzione dei differenti ceppi di batteri lattici e acido malico residuo (g/L).

FERMENTAZIONE MALOLATTICA				
Lotto	C		E	
	A	B	A	B
Ceppo	A	B	A	B
Durata (giorni)	14	30	14	30
Acido malico residuo (g/L)	0	0	0	0,12

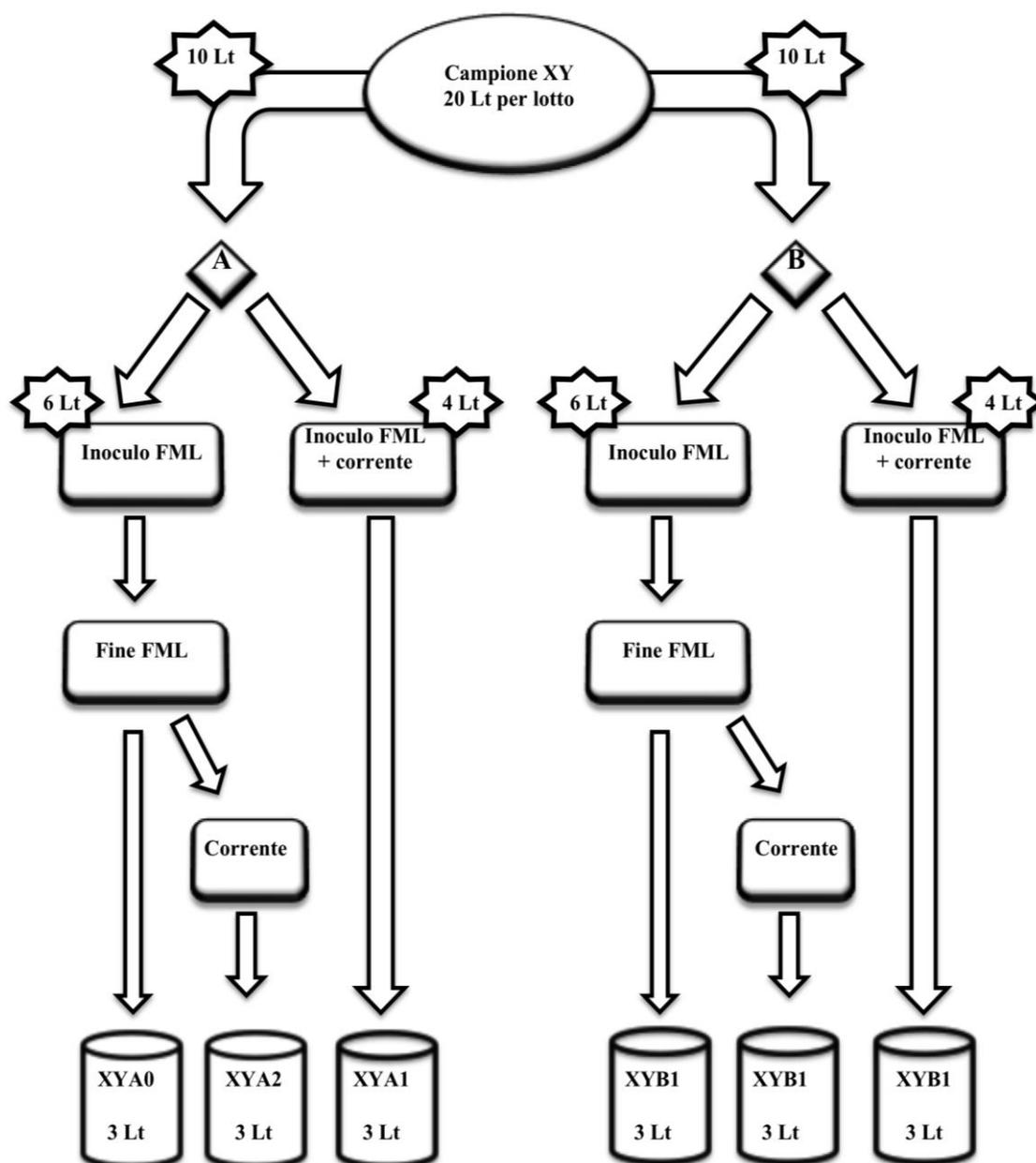


Figura 3.4. Piano sperimentale: allestimento delle tesi.

Il seguente diagramma ad albero (figura 3.5) illustra la codifica di tutti i campioni di vino ottenuti per le varie tesi.

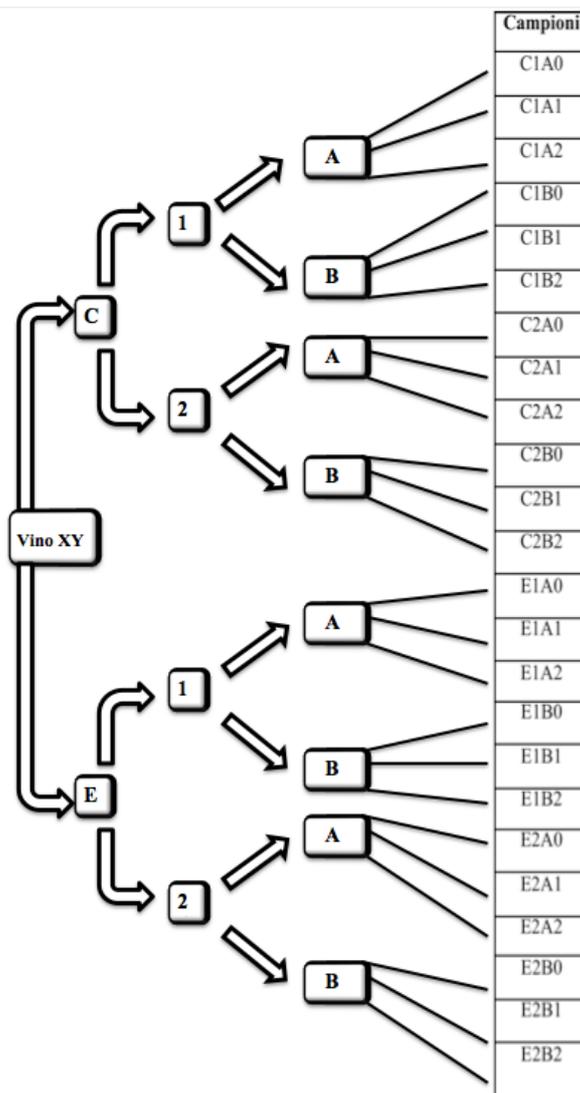


Figura 3.5. Codifica dei campioni di vino ottenuti.

In sintesi, la tabella 3.10 illustra ancora più nel dettaglio la codifica dei campioni di vino delle varie tesi, in funzione dei trattamenti subiti.

Tabella 3.10. Codifica campioni.

Nomenclatura							
1° digit		2° digit		3° digit		4° digit	
X	C = controllo	Y	1 = campione	Ceppo batterio malolattico	A	Modalità di applicazione della corrente	0 = no corrente
	E = enzima		2 = replica		B		1 = inoculo + corrente
							2 = corrente a fine FML

3.4 Metodiche analitiche

3.4.1 Metodica per l'estrazione degli antociani liberi da rossissimo.

Materiali: 3 cilindri da 100 ml, 1 matraccio da 40 ml, cartuccia C₁₈- 10g (Waters Sep-Pak Vac 35cc), rotovapor, liofilizzatore.

Reattivi: metanolo, H₂SO₄ 0,01 N, soluzione di acetonitrile: H₂SO₄ 0,01 N: H₂O (16:10:74), H₂O.

Procedura:

- Dealcolare 600 ml di vino rossissimo al rotovapor (2h a 30-32°C).
- Attivare la cartuccia C₁₈ con 40 ml di metanolo e 100ml di H₂O.

I° estratto:

- Prelevare 40 ml di vino dealcolato (la quantità di prelievo dipende dalla concentrazione iniziale di antociani liberi nel vino di partenza) e portarlo a volume in un cilindro da 100 ml.
- Far attraversare la resina con il vino diluito per adsorbire i composti fenolici.
- Lavare la cartuccia con 40 ml di H₂SO₄ 0,01 N per allontanare gli interferenti.
- Eluire gli antociani monomeri facendo fluire lentamente nella cartuccia 100ml di soluzione di acetonitrile.

II° estratto:

- Attivare nuovamente la cartuccia C₁₈ come descritto precedentemente.
- Prelevare 50 ml del I° **estratto** e portarlo a volume in un cilindro da 100 ml.
- Far attraversare la resina con il I° estratto diluito per allontanare la soluzione di acetonitrile.
- Eluire gli antociani monomeri con 40 ml di metanolo.
- Essiccare l'eluato al rotovapor (≈ 30 min. a 32°C)
- Sciogliere l'estratto con poca H₂O.
- Porre la soluzione in un vassoio per liofilizzatore e congelare il tutto.

Porre il vassoio congelato nel liofilizzatore e liofilizzare.

3.4.2 Parametri analitici misurati

Al fine di caratterizzare tutti i vini nei vari momenti delle sperimentazioni, sono stati valutati (Tabella 3.11):

Tabella 3.11. Parametri analitici controllati.

Momento dell'analisi	Analisi effettuate
Prima del trattamento	pH
	acidità totale
	acidità volatile netta
	SO ₂ totale e libera
	titolo alcolometrico indice fenoli totali (IFT)
	intensità colorante (IC) tonalità
	antociani liberi
Dopo il trattamento	polimeri
Durante la maturazione in bottiglia	acetaldeide

Le metodiche utilizzate per le varie analisi sono riportate in tabella 3.12.

Tabella 3.12. Metodiche analitiche utilizzate per le analisi sui vini.

Analisi	Metodica
Analisi standard	UE, Reg. 440/2003
Dosaggio titolo alcolometrico	
Dosaggio acidità totale	
Dosaggio acidità volatile	
Dosaggio solforosa libera e totale	
Nozione di pH	
Analisi componente fenolica	
Intensità colorante e tonalità	Glories, 1984
Indice di polifenoli totali	Glories, 1984
nte fenolica (antociani liberi e polime	Peng et al. 2002
Analisi componenti volatili	
Acetaldeide	Bertuccioli, 1982

3.4.3 Analisi sensoriale.

I vini ottenuti dalle varie prove sono stati sottoposti ad analisi sensoriale dopo tre mesi di affinamento in bottiglia. Per l'identificazione delle differenze tra i vini prodotti è stata adottata la tecnica del [®]Napping (Perrin et al, 2008).

Il [®]Napping è stato effettuato separatamente sulle serie di campioni C ed E. I campioni sono stati identificati con codici a tre cifre e presentati secondo uno schema randomizzato in bicchieri a calice ISO. I dodici vini sono stati presentati simultaneamente a ciascun giudice (panel di 8 giudici addestrati), la richiesta era quella di posizionare su un foglio di carta (40cm x 60cm) i vari campioni tenendo conto che il criterio di vicinanza e lontananza dei campioni doveva rispecchiare similarità e differenze tra i campioni. Con

questa logica, vini con caratteristiche diverse dovrebbero essere posizionati a distanza maggiore da vini con caratteristiche sensoriali simili.

Dal posizionamento di ciascun campione sul foglio, sono state ricavate due coordinate X ed Y che costituiscono il set di dati per l'elaborazione dei risultati. I dati sono stati elaborati utilizzando l'Analisi Procastica Generalizzata (GPA).

3.4.4 Analisi statistica.

Tutti i dati analitici sono stati processati utilizzando il software Stargraphics Centurion (Versione XV, Statpoint Inc., USA) sottoponendoli ad analisi multifattoriale ANOVA. Inoltre l'interpretazione dei dati con la Principal Component Analyses (PCA) è stata eseguita utilizzando il software Unscrambler (V9.1, CAMO Process AS, Oslo, Norway). Per l'elaborazione grafica relativa ai dati sensoriali è stato utilizzato il pacchetto statistico Senstools (OP&P Product research and BV, The Netherlands).

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1 Prima parte: studio dei principali effetti del trattamento elettrochimico sulla stabilizzazione della matrice fenolica

Le condizioni ottimali di un processo o le proprietà ottimali di un prodotto sono di solito determinate misurando il responso, variando le variabili causali una alla volta. Questa strategia non è sufficiente per esplorare la situazione nella realtà, dal momento che non fornisce alcuna informazione sugli effetti dell'interazione tra le variabili esaminate. Il disegno fattoriale completo (Central Composite Design) o quello frazionario (Box et al, 1978) possono essere utilizzati con successo, per ottenere le informazioni richieste, con il numero minimo di esperimenti e considerando le variazioni del responso utilizzando un modello di superficie di responso. Matematicamente parlando, una superficie di responso ha la forma di una equazione polinomiale in cui gli elementi sono presenti nei loro termini lineari e quadratici così come i loro prodotti incrociati. Di seguito è riportata l'equazione polinomiale di tre variabili casuali:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

I coefficienti polinomiali sono di solito calcolati come coefficienti di regressione ottenuti mediante l'analisi della regressione multipla (MRA) su un appropriato insieme di dati. Questo insieme di dati sono ortogonali, cioè raccolti secondo un disegno fattoriale completo (Central Composite Design) o quello frazionario, e abbracciano il dominio in modo simmetrico rispetto al suo centro (Box et al, 1978). Quando questo è il caso, la superficie di risposta può essere studiata mediante analisi canonica (Mardia et al, 1979).

Nella parte preliminare di ogni studio, le variabili casuali sono numerose e non è nota la loro rilevanza sul responso. Se n è il numero delle variabili causali avremmo $2^n + 2n + 1$ esperimenti in un disegno fattoriale completo (Central Composite Design). Di conseguenza, uno studio preliminare viene spesso eseguito con un disegno fattoriale frazionario, che permette di utilizzare un ampio numero di variabili ma con un numero minore di esperimenti.

4.1.1 A) Screening

I risultati ottenuti con un disegno fattoriale frazionario però non ci forniscono informazioni sufficienti per distinguere tra l'effetto di una variabile individuale e l'effetto dovuto all'interazione tra queste

(confoundings), comunque essendo una procedura conservativa può essere utilizzata validamente per selezionare gli effetti più importanti. La prima parte della ricerca è stata incentrata sull'identificazione delle variabili più strettamente legate alla maturazione del vino mediante l'applicazione delle micro correnti. Le variabili prese in esame sono state riportate in tabella 3.1 di materiali e metodi e i responsi che sono stati misurati sono l'intensità di corrente (IC), i polimeri colorati (PC) e la concentrazione di acetaldeide. Il disegno sperimentale (FFD) che è stato usato è riportato nella tabella 3.2 di materiali e metodi.

Interpretazione dei risultati.

Dopo aver effettuato gli esperimenti secondo il disegno sperimentale (tabella 3.2 di materiali e metodi) si è proceduto all'interpretazione dei risultati. La tabella 4.1 riepiloga la variazione dei tre responsi misurati valutati prima e dopo il trattamento elettrochimico con le relative differenze .

Tabella 4.1 Responsi misurati prima e dopo il trattamento elettrochimico

n. Esp	Intensità colorante (IC)			Acetaldeide (mg/l)			Polimeri colorati		
	a	b	Δ	a	b	Δ	a	c	Δ
1	12.06	12.34	0.28	62	50	12	32	16	16
2	0,984028	1,019444	0,063194	90	51	39	90	20	70
3	21.49	0,929167	0.29	51	48	2	39	15	24
4	0,88125	0,899306	0.26	54	53	1	43	16	27
5	20.06	0,895139	0.29	93	51	7	49	18	31
6	12.03	0,542361	0.31	60	49	11	31	15	16
7	0,222222	0,251389	0,056944	88	47	41	80	15	65
8	0,510417	12.05	0.03	59	46	13	31	16	15
9	0,219444	5.01	0.25	53	48	2	18	15	3
10	3.07	0,181944	0.12	52	51	1	16	14	2
11	4.03	4.58	0.28	65	59	6	18	16	2
a = valutazione effettuata prima del trattamento									
b = valutazione effettuata subito dopo il trattamento									
c = valutazione effettuata dopo 30 gg dal trattamento									
Δ = differenze tra prima e dopo il trattamento									

Stima degli effetti.

Le tabelle 4.2 e 4.3 relative all'analisi della varianza (ANOVA) permettono di controllare la validità del modello per i tre responsi misurati. Il valore di probabilità per la significatività del modello deve essere minore di $p=0.05$. La tabella 4.2 riporta i risultati dell'analisi della varianza relativa all'intensità colorante (IC), all'acetaldeide e alla formazione dei polimeri colorati. La tabella 4.3 riepiloga i valori dei residui tra i valori sperimentali e predetti nei

differenti campioni. Più i valori dei residui sono bassi più il modello è appropriato.

Tabella 4.2 Riepilogo dell'analisi della varianza (ANOVA) per i responsi IC^a, acetaldeide^b e polimeri colorati^c

ANOVA	SS			DF			MS			F-ratio			p-value		
	Responso			Responso			Responso			Responso			Responso		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Summary															
Model	4,1361111	2072	5136	7	7	7	0,085	296	733,71	10,24	384,9	6,62	0,041	2E-04	0,074
Error	0,0249	2,307	332,54	3	3	7	0,008	0,77	110,84	384,9					
Corr tot	0,6205	2075	5468,5	10	10	10									
Variable															
Corrente(A=BCD)	0,2178	780,1	1624,5	1	1	1	0,218	780,1	1624,5	26,23	1015	14,65	0,014	1E-04	0,031
Tempo(B=ACD)	0,2178	703,1	1352	1	1	1	0,218	703,1	1352	26,23	914,4	12,2	0,014	1E-04	0,04
Antociani (C=ABD)	0,0098	0,125	800	1	1	1	0,01	0,125	800	1,18	0,16	7,22	0,357	0,714	0,075
Tannini (D=ABC)	0,0072	0,125	84,5	1	1	1	0,007	0,125	84,5	0,87	0,16	0,76	0,42	0,714	0,447
Corrente* Tempo (AB=CD)	0,1405	561,1	1200,5	1	1	1	0,141	561,1	1200,5	19,92	729,4	10,83	0,026	1E-04	0,046
Corrente* Antociani (AC=BD)	0	6,125	24,5	1	1	1	0	6,125	24,5	0,01	7,96	0,22	0,943	0,067	0,67
Tempo* Antociani (BC=AC)	0,0024	21,13	50	1	1	1	0,002	21,13	50	0,29	27,47	0,45	0,625	0,014	0,55
Model Check															
Mean															
Linear	0,4526	1484	3861	4	4	4	0,113	370,9	965,25	13,63	482,3	8,71	0,029	2E-04	0,053
Interaction 2	0,143	58,38	1275	3	3	3	0,048	196,1	425	5,74	255,1	3,83	0,093	4E-04	0,149
Lack of Fit															
Lack of fit	0,0244	0,307	331,88	1	1	1	0,024	0,307	331,88	104,7	0,31	995,6	0,009	0,635	0,001
Pure Error	0,0005	2	0,6667	2	2	2	2E-04	1	0,3333						
Total Error	0,0249	2,307	332,55	3	3	3	0,008	0,769	110,85						

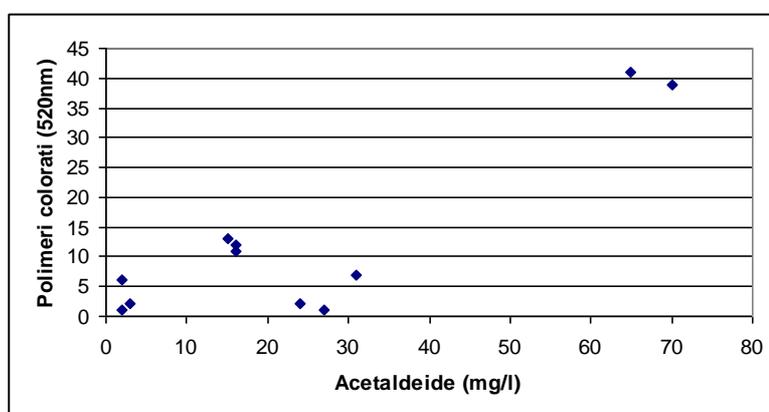
Tabella 4.3 Diagnostica per la verifica della bontà del modello per i responsi IC ^a,acetaldeide ^b e polimeri colorati ^c.

n. esperimenti	Valori misurati			Valori predetti			Residui			Leverage (hii)			Student Residual			Cook Distance		
	Responso			Responso			Responso			Responso			Responso			Responso		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	0,2500	11,0000	16,0000	0,2211	12,273	24,6364	0,0289	-1,2727	-8,6364	0,9659	0,0909	0,0909	1,7157	-1,5222	-0,8603	10,4259	0,0290	0,0093
2	0,2900	2,0000	2,0000	0,2611	1,8977	-1,3636	0,0289	0,1023	3,3636	0,9659	0,9659	0,9659	1,7157	0,6317	1,7303	10,4259	1,4132	10,6037
3	0,2800	12,0000	65,0000	0,2511	12,273	61,6364	0,0289	-0,2727	3,3636	0,9659	0,0909	0,9659	1,7157	-0,3262	1,7303	10,4259	0,0013	10,6037
4	0,9100	2,0000	16,0000	0,8811	1,8977	24,6364	0,0289	0,1023	-8,6364	0,9659	0,9659	0,0909	1,7157	0,6317	-0,8603	10,4259	1,4132	0,0093
5	0,1200	6,0000	70,0000	0,0911	5,8977	66,6364	0,0289	0,1023	3,3636	0,9659	0,9659	0,9659	1,7157	0,6317	1,7303	10,4259	1,4132	10,6037
6	0,3100	1,0000	24,0000	0,3736	0,8977	20,6364	-0,0636	0,1023	3,3636	0,0909	0,9659	0,9659	-0,7325	0,6317	1,7303	0,0067	1,4132	10,6037
7	0,3000	39,0000	27,0000	0,3736	38,898	23,6364	-0,074	0,1023	3,3636	0,0909	0,9659	0,9659	-0,848	0,6317	1,7303	0,0090	1,4132	10,6037
8	0,8200	7,0000	31,0000	0,7911	6,8977	27,6364	0,0289	0,1023	3,3636	0,9659	0,9659	0,9659	1,7157	0,6317	1,7303	10,4259	1,4132	10,6037
9	0,2600	13,0000	2,0000	0,2311	12,273	-1,3636	0,0289	0,7273	3,3636	0,9659	0,0909	0,9659	1,7157	0,8699	1,7303	10,4259	0,0095	10,6037
10	0,2900	1,0000	3,0000	0,2611	0,8977	-0,3636	0,0289	0,1023	3,3636	0,9659	0,9659	0,9659	1,7157	0,6317	1,7303	10,4259	1,4132	10,6037
11	0,2800	41,0000	15,0000	0,3736	40,898	24,6364	-0,0936	0,1023	-9,6364	0,0909	0,9659	0,0909	-1,0779	0,6317	-9599	0,0145	1,4132	0,0115

Le conclusioni finali dello screening possono essere così riassunte:

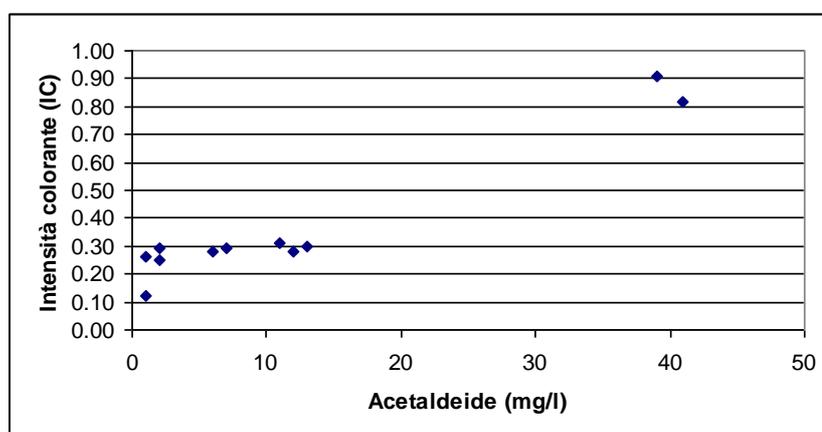
I tre responsi sono influenzati solo dall'intensità di corrente applicata e dal tempo di erogazione. La concentrazione di antociani e tannini non ha influenzato la variazione dei responsi. I tre responsi sono fortemente correlati, in particolare la formazione di polimeri colorati è direttamente influenzata dalla formazione di acetaldeide durante il processo elettrochimico. Anche la variazione dell'intensità colorante è correlata positivamente alla variazione di concentrazione dell'acetaldeide. La figura 4.1 riporta la relazione tra polimeri colorati e concentrazione di acetaldeide nei vari campioni. Dal grafico risulta evidente che i campioni dove si sono formati più polimeri colorati sono quelli dove si è formata più acetaldeide.

Figura 4.1. Evoluzione della variazione di polimeri colorati in funzione della variazione della concentrazione di acetaldeide.



La figura 4.2 riporta la relazione tra intensità colorante e concentrazione di acetaldeide nei vari campioni. Dal grafico risulta evidente che i campioni dove l'intensità colorante ha subito un maggiore incremento sono quelli dove si è formata più acetaldeide.

Figura 4.2 Evoluzione della variazione dell'intensità colorante in funzione della variazione della concentrazione di acetaldeide



Questi risultati confermano quanto già ampiamente riportato in bibliografia (Somers, 1972; Timberlake & Bridle, 1976; Bakker et al., 1986; Dallas et al., 1996 b) circa il ruolo dell'acetaldeide nella stabilizzazione del colore collegato alla formazione di polimeri colorati stabili.

La fase successiva della ricerca ha quindi preso in considerazione l'ottimizzazione delle condizioni di produzione di acetaldeide in funzione dell'intensità della corrente e del tempo di erogazione.

4.1.2. B) Ottimizzazione delle condizioni del trattamento elettrochimico

Trasformazione della concentrazione di acetaldeide in valori di qualità.

Prima di procedere all'organizzazione del disegno sperimentale finalizzato ad identificare i migliori valori di intensità di corrente e del relativo tempo di erogazione per la produzione ottimale di acetaldeide è stato effettuato un test sensoriali per stabilire la soglia di percezione del carattere ossidato nel vino. Come riportato in bibliografia (Mc Closkey et al., 1981) a certe concentrazioni di acetaldeide, nel vino si manifesta il difetto di ossidato che porta al rifiuto del prodotto. La tabella 4.4 riporta i risultati dell'analisi della varianza effettuata sulle intensità del difetto di ossidato valutato nei vini aggiunti di quantità variabili di acetaldeide. La figura 4.3 riporta i valori medi delle intensità del carattere ossidato con il relativo intervallo di variabilità (LSD).

Tabella 4.4. Analisi della Varianza per il difetto di ossidato

<i>Sorgente di variabilità</i>	<i>Somma dei quadrati</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Campione	1216,43	6	202.739	1273.71	0.0000
B:Giudice	1,47991	7	0.211416	1.33	0,2453
C:Replica	0.502232	1	0.502232	3.16	0,0788
RESIDUAL	15,4397	97	0.159172		
TOTAL (CORRECTE D)	1233.85	111			

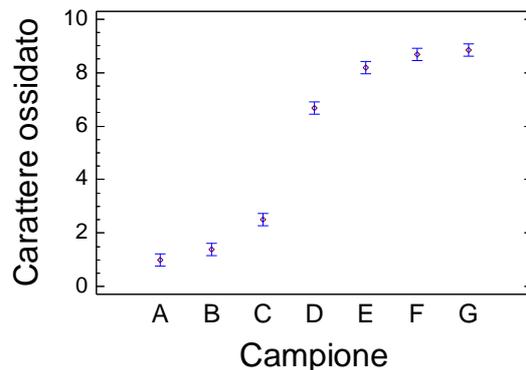


Figura 4.3 Valori medi del difetto di ossidato valutato nei vini e il relativo intervallo di variabilità (LSD 99.9%)

Inoltre, elevate concentrazioni di acetaldeide stimolano la formazione di polimeri colorati ad alto peso molecolare che nel corso della conservazione del vino precipitano, determinando una forte diminuzione dell'intensità colorante. La tabella 4.5 riporta per i valori di concentrazione di acetaldeide i corrispettivi valori di intensità colorante misurati subito dopo l'aggiunta dell'acetaldeide e dopo 30 giorni di conservazioni dei vini. La tabella riporta anche l'intensità del difetto di ossidato valutato dopo 30 giorni di conservazione dei vini.

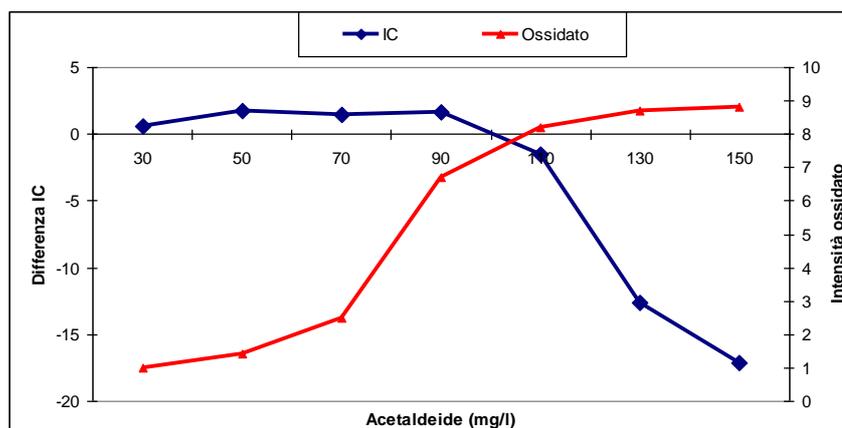
Tabella 4.5 Valori misurati dell'intensità colorante in funzione della quantità di acetaldeide aggiunta ad un vino.

n. Campione	Acetaldeide (mg/l)	Intensità colorante (IC)			Difetto di ossidato*
		a	b	Δ	
A	30	13.12	13.75	0.63	1.0±0.47
B	50	14.96	16.71	1.75	1.4±0.47
C	70	15.74	17.16	1.42	2.5±0.47
D	90	17.18	18.81	1.63	6.7±0.47
E	110	18.84	17.3	-1.54	8.2±0.47
F	130	19.73	7.08	-12.65	8.7±0.47
G	150	21.25	4.11	-17.14	8.8±0.47

a = valutazione effettuata all'aggiunta di aldeide acetica
b = valutazione effettuata subito dopo 30 g
 Δ = differenze
*intensità sensoriale media (scala intensità 1= no ossidato; 9= molto ossidato i) e valore di LSD (99.9%)

Per meglio comprendere l'effetto dell'aggiunta di acetaldeide al vino i dati della tabella 4.5 sono stati utilizzati per costruire il grafico (figura 4.4) che illustra l'evoluzione delle differenze di colore e dell'intensità del difetto di ossidato.

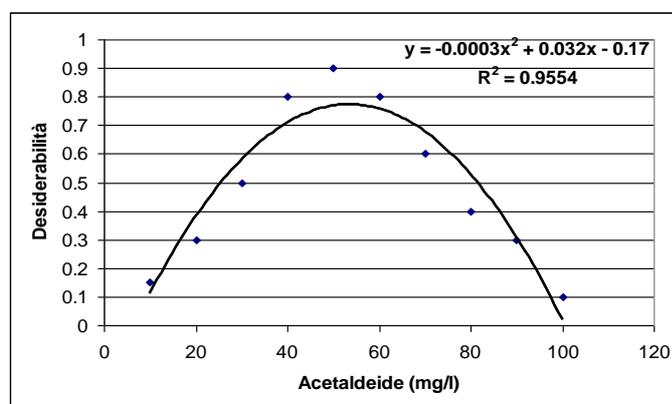
Figura 4.4 Relazione tra in contenuto di acetaldeide e la variazione dell'intensità colorante e l'intensità del difetto di ossidato.



Verificata l'influenza della concentrazione di acetaldeide sulla stabilità del colore (figura 4.4) nella fase di ottimizzazione delle condizioni per la sua formazione si è ritenuto di trasformare la quantità di acetaldeide presente nel vino, dopo trattamento elettrochimico, in un corrispondente valore di qualità. Questa trasformazione tiene conto sia del difetto di ossidato, che della variazione (positiva e negativa) dell'intensità colorante in seguito a modifica della concentrazione dei polimeri colorati.

Il grafico di figura 4.5 riporta la trasformazione della concentrazione di acetaldeide in punteggi di desiderabilità, collegato alla percezione del difetto di ossidato, che variano tra 0 valore assolutamente non desiderabile (forte difetto di ossidato) e 1 valore molto desiderabile (assenza di difetto di ossidato). Inoltre questo valore di desiderabilità tiene conto anche della variazione dell'intensità colorante. (Bertuccioli and Rosi , 1994).

Figura 4.5 Trasformazione della concentrazione di aldeide acetica in valori di desiderabilità



Ottimizzazione delle condizioni per la produzione di acetaldeide.

Questa fase dello studio ha previsto la costruzione di un disegno sperimentale basato sulla logica del Central Composite Design (CCD) che permette, mediante il calcolo della superficie di responso di ricavare la produzione ottimale di acetaldeide. La tabella 4.6 riporta il CCD adottato per questa sperimentazione e la formazione, nei vari campioni sottoposti a trattamento elettrochimico, di acetaldeide. La tabella riporta anche i valori di desiderabilità calcolati utilizzando la funzione riportata nella figura 4.7.

Tabella 4.6 Central Composite Design e quantità di acetaldeide formata

n. esp	Intensità di corrente (A)	Tempo del trattamento (min)	Acetaldeide	
			mg/L	Desiderabilità
1	0,92	80	85	0,30
2	0,07	80	15	0,22
3	0,5	137	80	0,18
4	0,5	23	28	0,40
5	0,2	40	14	0,12
6	0,8	40	48	0,59
7	0,2	120	26	0,43
8	0,8	120	95	0,09
9	0,5	80	53	0,76
10	0,5	80	48	0,71
11	0,5	80	51	0,73
12	0,5	80	46	0,70
13	0,5	80	55	0,77

Eseguiti gli esperimenti e valutata la quantità di acetaldeide nei vari campioni, si è proceduto ad analizzare i risultati per la ricerca del valore ottimale.

La tabella 4.7 riepiloga i risultati dell'analisi della varianza per il modello relativo alla superficie di responso. Il riepilogo (Summary) mostra che il modello è globalmente significativo per una probabilità superiore al 99.9% ($p=0.0000$). I valori di significatività per le variabili indipendenti (intensità di corrente, tempo di erogazione loro quadrati e prodotto di interazione sono tutti significativi oltre il 99 % tranne per il responso intensità di corrente il cui valore di significatività è minore di 95.0%

Il valore relativo alla abilità del modello di predire (lack of fit test) non è significativo (p value = 0.3589) e pertanto il modello descrive correttamente la variazione del responso (acetaldeide) in funzione della variazione dell'intensità di corrente e del tempo di erogazione.

Tabella 4.7 - Riepilogo dell'analisi della varianza (ANOVA) per il responso acetaldeide

ANOVA	SS	DF	MS	F-ratio	p-value
Summary					
Model	0.8069	5	0.1614	146.6648	0.0000
Error	0.0077	7	0.0011		
Corr tot	0.8146	12			
Variable					
Corrente(A=BCD)	0.0074	1	0.0074	6.7159	0.0359
Tempo(B=ACD)	0.0314	1	0.0314	28.5298	0.0011
Antociani (C=ABD)	0.1640	1	0.1640	149.0747	0.0000
Tannini (D=ABC)	0.3644	1	0.3644	331.1942	0.0000
Corrente* Tempo (AB=CD)	0.3182	1	0.3182	289.2051	0.0000
Model Check					
Mean	2.7692	1	2.7692	2516.8250	0.0000
Linear	0.0388	2	0.0194	17.6229	0.0019
Interaction 2	0.1640	1	0.1640	149.0747	0.0000
Quadratic	0.6826	2	0.3413	310.1996	0.0000
Lack of Fit					
Lack of fit	0.0040	3	0.0013	1.4272	0.3589
Pure Error	0.0037	4	0.0009		
Total Error	0.0077	7	0.0011		

La qualità del “fitting” del modello per il responso acetaldeide è valutata dai valori di alcuni parametri riportati nella tabella 4.8. In particolare i valori osservati (actual value) e i valori predetti dal modello (predicted value) sono molto simili a conferma della bontà del fitting. I valori riportati nella colonna *Leverage* indicano che non siamo in presenza di campioni outlier (i campioni hanno valori compresi tra 0.2 e 0.6) e quindi tutti concorrono alla costruzione del modello. La colonna che riporta i valori della Cook's distance, confermano l'assenza di outlier. Infatti per tutti i campioni il valore di questo parametro è molto inferiore a 1.

Tabella 4.8 Diagnostica per la verifica della bontà del modello

n.esperimento	Valori Misurati	Valori Predetti	Residui	Leverage (hii)	Student Residual	Cook Distance
1	0,1200	0,1210	-0,0010	0,6250	-0,0492	0,0007
2	0,5900	0,5868	0,0032	0,6250	0,1584	0,0070
3	0,4300	0,4007	0,0293	0,6250	1,4416	0,5773
4	0,0900	0,0565	0,0335	0,6250	1,6491	0,7555
5	0,2200	0,2333	-0,0133	0,6250	-0,6532	0,1185
6	0,3000	0,3192	-0,0192	0,6250	-0,9467	0,2490
7	0,4000	0,3948	0,0052	0,6250	0,2541	0,0179
8	0,1800	0,2177	-0,0377	0,6250	-1,8541	0,9549
9	0,7600	0,7340	0,0260	0,2000	0,8763	0,0320
10	0,7100	0,7340	-0,0240	0,2000	-0,8089	0,0273
11	0,7300	0,7340	-0,0040	0,2000	-0,1348	0,0008
12	0,7000	0,7340	-0,0340	0,2000	-1,1460	0,0547
13	0,7700	0,7340	0,0360	0,2000	1,2134	0,0613

I grafici riportati nelle figure 4.6 e 4.7 illustrano l'andamento della formazione dell'acetaldeide in funzione della variazione (bassa, media e alta) dell'intensità di corrente (figura 4.6) e del tempo di erogazione (figura 4.7). Queste variazioni del responso sono importanti perché permettono di visualizzare la curvatura del modello se, come in questo caso, si presenta un massimo passando dai valori bassi ai valori alti delle variabili corrente e tempo.

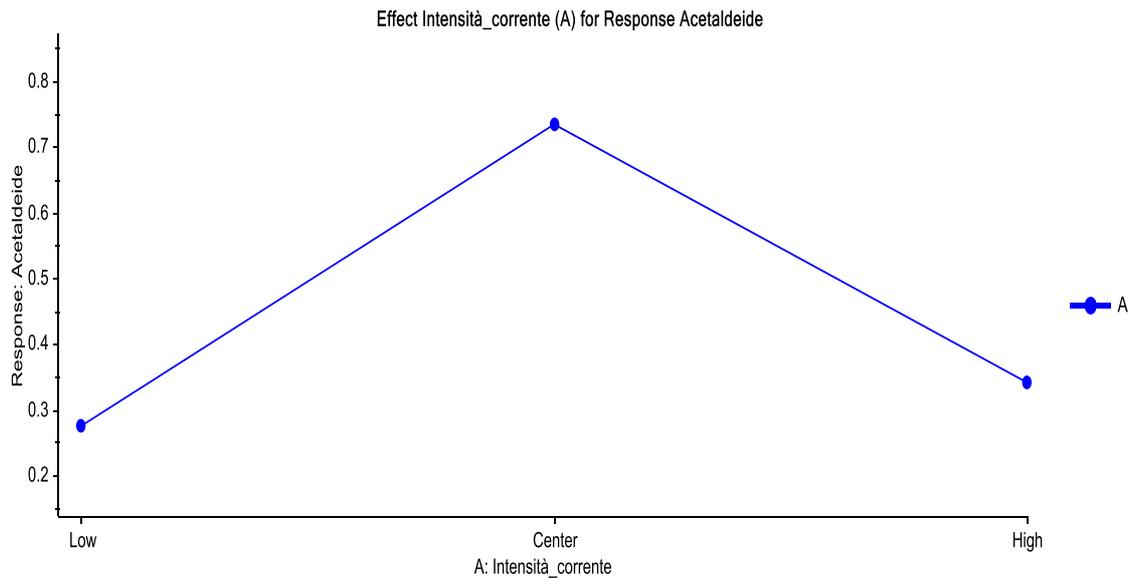


Figura 4.6 Evoluzione della formazione dell'acetaldeide in funzione dell'intensità di corrente

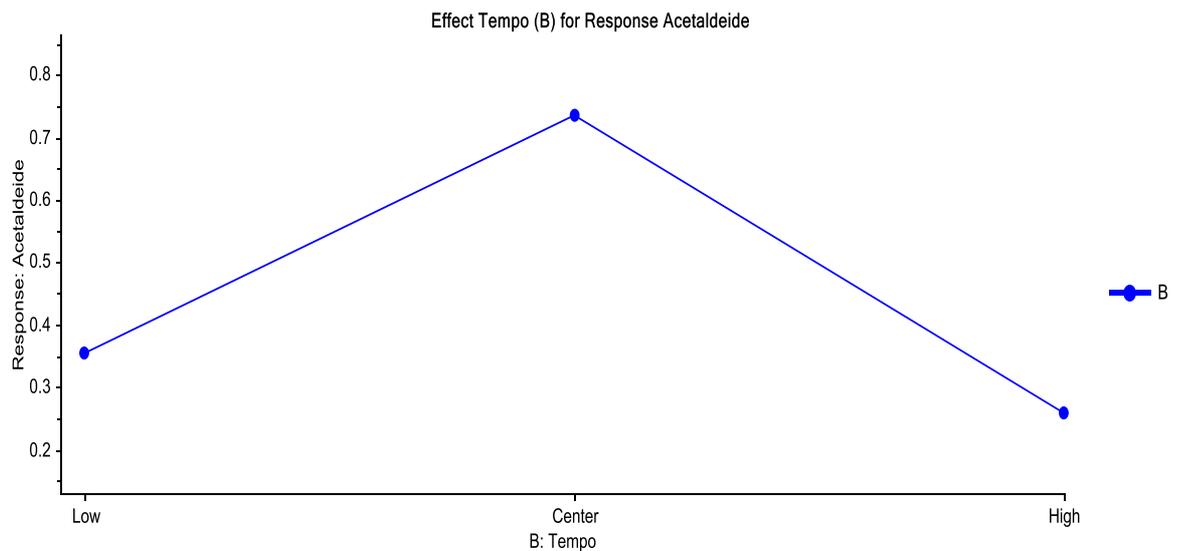


Figura 4.7 Evoluzione della formazione dell'acetaldeide in funzione del tempo di erogazione della corrente

La figura 4.8 illustra in forma grafica i valori dei coefficienti di regressione del modello con il loro intervallo di confidenza. La tabella 4.9 riepiloga i parametri statistici per valutare la significatività dei coefficienti. Tutti i coefficienti sono significativi a livelli di probabilità inferiori al 99.9 %. Il coefficiente dell'intensità di corrente è invece significativo al 95%

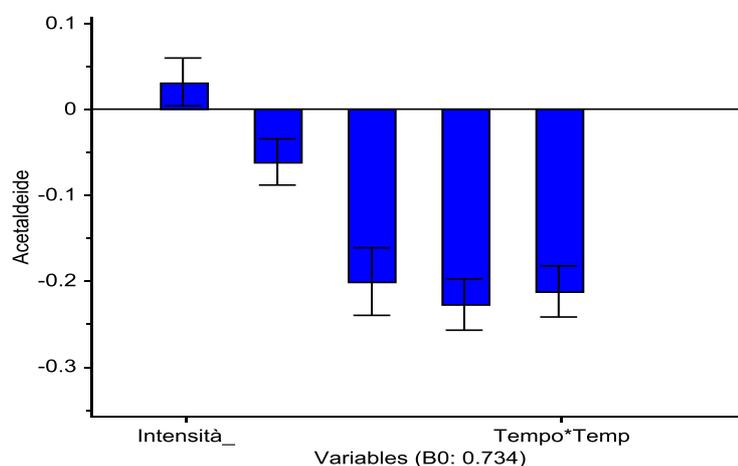


Figura 4.8 Coefficienti di regressione del modello e loro intervallo di confidenza per il responso acetaldeide.

Tabella 4.9 Significatività dei coefficienti di regressione del modello

	Acetaldeide				
	<i>Coefficiente di regressione</i>	<i>Minimo</i>	<i>Massimo</i>	<i>p-value</i>	<i>t-value</i>
BO	0,7340				
Intensità corrente (A)	0,0304	0,0027	0,0581	0,0359	2,0488
Tempo (B)	-0,0626	-0,0904	-0,0349	0,0011	-4,2227
Intensità corrente x Tempo	-0,2025	-0,2417	-0,1633	0,0000	-13,6508
Intensità corrente ²	-0,2289	-0,2586	-0,1991	0,0000	-15,4287
Tempo ²	-0,2139	-0,2436	-0,1841	0,0000	-14,4176

Lo studio della distribuzione equilibrata dei residui (*normal probability plot*) permette di evidenziare se la loro variazione è dipendente da fattori casuali e non da qualche campione. In questo caso la distribuzione dei residui, riportata nella figura 4.9 è equilibrata e si distribuisce in modo simmetrico intorno al valore zero.

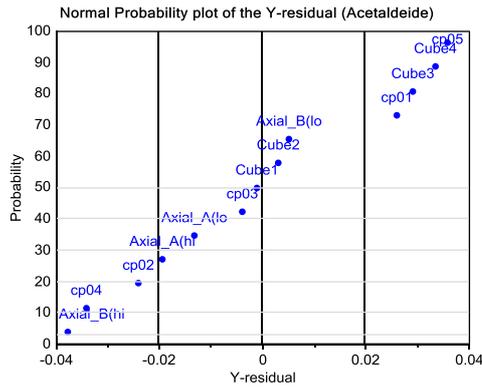


Figura 4.9 Normal probability plot dei residui per il responso acetaldeide.

La figura 4.10 illustra l'andamento dei valori osservati e predetti nei vari campioni utilizzati per la costruzione del modello. Com'è possibile osservare dal grafico i campioni si distribuiscono lungo una linea retta, confermando la capacità predittiva del modello calcolato.

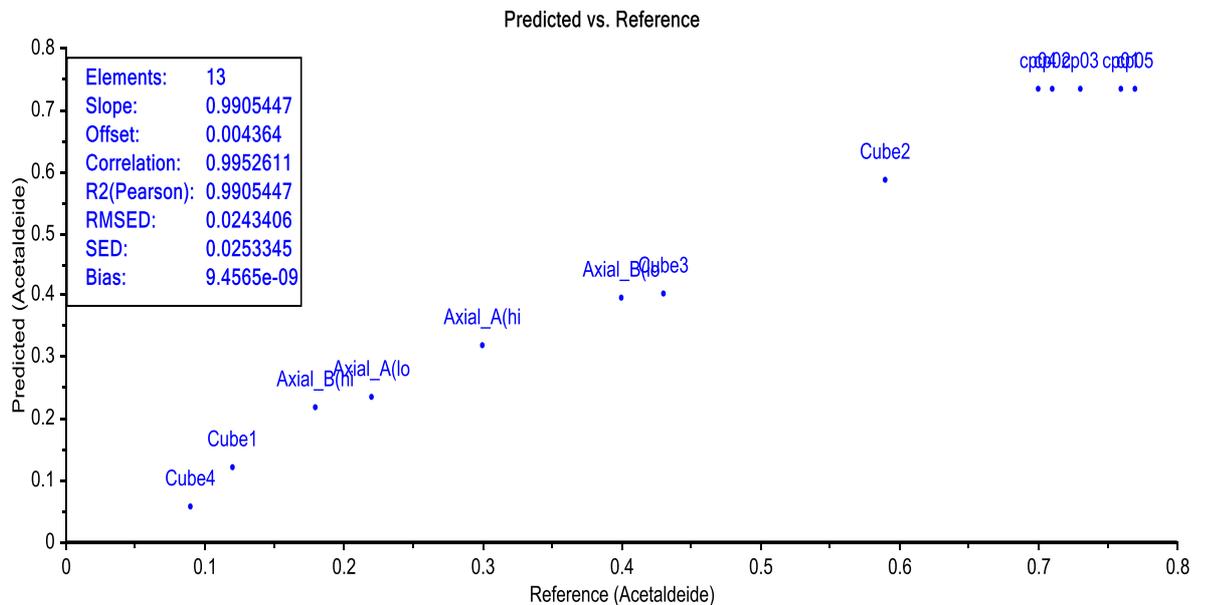


Figura 4.10 Relazione tra i valori osservati e predetti dal modello.

La figura 4.11 mostra la rappresentazione grafica del modello [superficie di responso (a) e diagramma di isoresponso(b)] ottenuti utilizzando l'equazione di regressione i cui coefficienti sono riportati nella tabella 4.9 I diagrammi sono utili, in particolare l'isoresponso (figura 4.11b) per predire i valori dell'intensità di corrente ed il tempo di erogazione per ottenere un adeguato valore di desiderabilità per il responso acetaldeide. L'area che si ritiene più adeguata per l'applicazione delle micro correnti ai vini rossi viene evidenziata da un asterisco nel diagramma di figura 4.11b. I valori identificati sono un buon compromesso tra l'intensità di corrente e il minor tempo di erogazione. Per le successive applicazioni sono stati scelti per

l'intensità di corrente un valore di 0.75 A e per il tempo di erogazione un valore di 60 minuti.

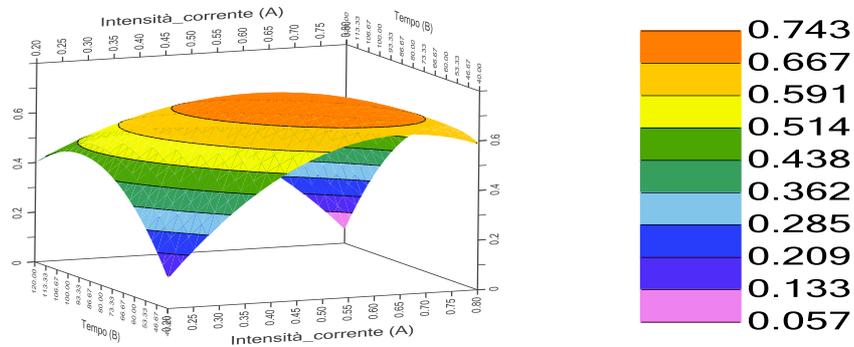


Figura 4.11a Superficie di responso relativa alla modellazione della produzione (desiderabilità) dell'acetaldeide.

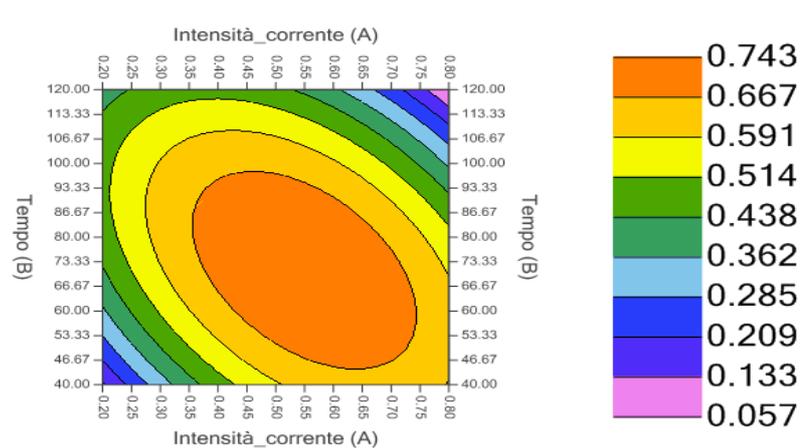


Figura 4.11b - Diagramma di iso-responso relativa alla modellazione della produzione (desiderabilità) dell'acetaldeide.

4.2 Seconda parte: applicazione delle condizioni del trattamento elettrochimico

In questa parte della ricerca abbiamo applicato le condizioni del trattamento elettrochimico, che sono emerse dalla prima parte dello studio. Abbiamo deciso di applicare le microcorrenti in una particolare fase della produzione del vino cioè prima e dopo la fermentazione malolattica(FML), con lo scopo di ridurre gli effetti negativi della FML sulla struttura del colore

4.2.1 Produzione del vino.

Fermentazione e macerazione.

La fermentazione alcolica relativa alle tesi C ed E, condotta alla temperatura di 25°C, si è conclusa al decimo giorno (zuccheri < 2g/L) per entrambe le tesi (figura 4.12).

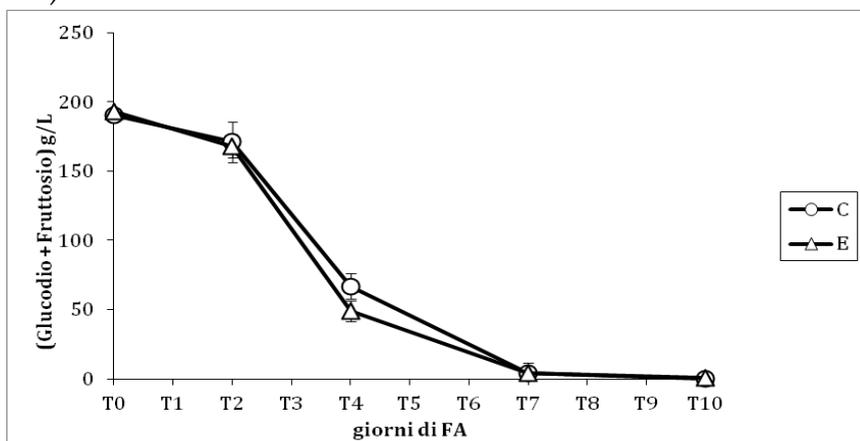


Figura 4.12 Consumo degli zuccheri (glucosio e fruttosio) durante la fermentazione alcolica delle tesi C ed E.

Per verificare l'efficacia dell'enzima di macerazione sono stati misurati alcuni parametri relativi alla matrice fenolica quali l'indice dei fenoli totali (IFT) e intensità colorante (IC) (figura 4.13 e 4.14) durante la fermentazione alcolica /macerazione.

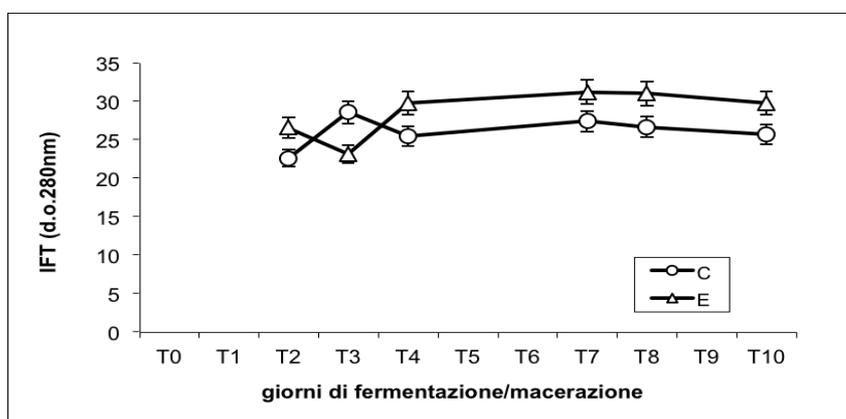


Figura 4.13. Evoluzione dell'indice dei fenoli totali dei vini durante la fermentazione/macerazione delle tesi C ed E.

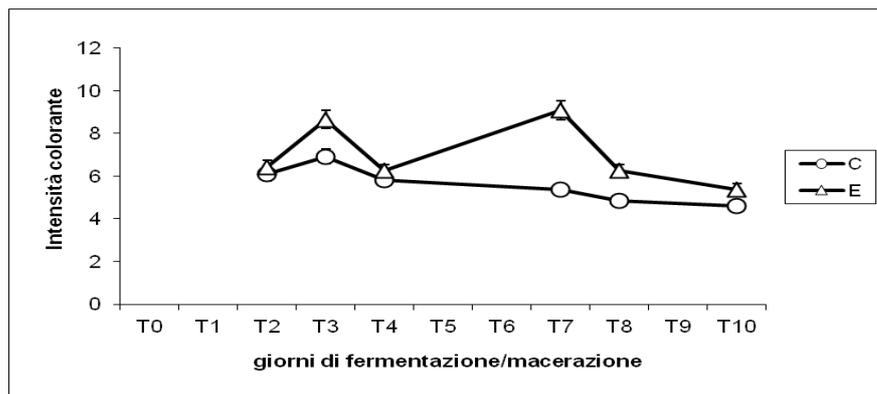


Figura 4.14. Evoluzione dell'intensità colorante totali dei vini durante la fermentazione/macerazione delle tesi C ed E.

Dalle figure 4.13 e 4.14 è possibile evidenziare che, il vino della tesi E, oltre ad avere una matrice fenolica più importante (IFT più alto per tutta la durata della macerazione), risulta anche più colorato rispetto a quello della tesi C. Possiamo quindi dedurre che l'enzima ha favorito una maggiore estrazione di composti fenolici dalle parti solide dell'acino. Questi risultati sono in linea con quanto trovato da altri autori (Bautista-Ortín et al., 2005) in quanto, in vinificazioni effettuate con e senza aggiunta di enzimi di macerazione, i mosti enzimati risultavano con un contenuto in fenoli totali più alto già dalle prime fasi della fermentazione/macerazione, tale incremento si manteneva anche sul vino alla svinatura. Lo stesso si osserva per l'IC (figura 4.14) e questo potrebbe essere dovuto a gli effetti di polimerizzazione degli antociani causato da una maggiore estrazione di altre frazioni fenoliche (Watson et al., 1999).

Caratterizzazione dei vini alla svinatura.

Alla svinatura i prodotti (tesi C ed E) sono stati analizzati ed i dati sono stati sottoposti all'analisi multifattoriale della varianza (*campione, replica, trattamento C/E*) (livello di confidenza al 95%) al fine di determinare quale fattore avesse un significativo effetto sulle singole variabili. Il test verifica inoltre, le interazioni significative tra i fattori (*campione, replica, trattamento*). I risultati sono mostrati in tabella 4.10.

Tabella 4.10. Composizione dei vini delle tesi C ed E alla svinatura: valori medi, F-value, interazioni e LSD (least significant difference) ^a

		pH	Acidità totale (g/L ac.tartarico)	Acidità volatile netta (g/L ac.acetico)	SO ₂ totale (mg/L)	SO ₂ libera (mg/L)	Alcool	IFT	IC	Tonalità	Antociani liberi (mg/L malvidina)	Polimeri colorati (mg/L malvidina)	Acetaldeide (mg/L)
Vino	C	3,57 a	5,86 a	0,19 a	34 a	16 a	14,90 a	25,72 a	4,60 a	0,68 a	109 a	5,59 a	15,70 a
	E	3,58 a	6,00 b	0,22 b	36 a	10 a	15,42 b	29,84 b	5,38 b	0,72 a	130 b	8,09 a	16,59 a
	<i>v</i>	0,44 ns	196,00*	225,00*	1,65 ns	4,08 ns	1747,24*	18860,44**	13637,05*	142,90 ns	10359,69*	3,74 ns	0,84 ns
	<i>r</i>	1,00 ns	0,25 ns	9,00 ns	0,02 ns	52,26 ns	0,36 ns	78,03 ns	7,31 ns	0,00 ns	55,21 ns	1,48 ns	2,57 ns
	<i>t</i>	36,00 ns	240,25*	1849,00*	429,08*	0,00 ns	1521,00*	756,25*	535,84*	8,61 ns	1581,50*	1,70 ns	0,31 ns
F (Fisher)	<i>v x r</i>	0,11 ns	1,00 ns	9,00 ns	0,02 ns	0,00 ns	0,36 ns	51,36 ns	1,49 ns	0,01 ns	55,46 ns	1,55 ns	0,03 ns
	<i>v x t</i>	36,00 ns	196,00*	361,00*	0,02 ns	10,03 ns	1814,76*	684,69*	6717,93**	384,82*	2107,50*	1,32 ns	4,49 ns
	<i>r x t</i>	1,00 ns	0,25 ns	9,00 ns	0,02 ns	0,00 ns	0,36 ns	0,11 ns	0,23 ns	0,47 ns	36,57 ns	1,20ns	0,98 ns
	<i>LSD vino</i>	0,190 ns	0,127*	0,032*	22,23 ns	6,09 ns	0,159*	0,381**	0,086*	0,05 ns	2,51*	16,40 ns	12,24 ns

^aLettere diverse stanno a indicare differenze significative tra i valori medi (livello di confidenza al 95%), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$ *** $p \leq 0,001$; ns, non significativo; *v*, campioni vino tesi C ed E; *r*, replica; *t*, trattamento in fermentazione alcolica C/E.

L'analisi statistica evidenzia che i fattori significativi sono: acidità totale e volatile, alcool, IFT, IC e antociani liberi. I primi tre parametri, non legati al colore, presentano differenze significative (al 95%) che sembrano essere dovute all'azione dell'enzima (*v x t*, 95%). L'indice dei fenoli totali, l'intensità colorante e gli antociani liberi sono significativamente diversi tra le due tesi (C ed E) (rispettivamente al 99,5%, e al 95% i restanti due); tale differenza sembra dovuta in tutti e tre i casi all'azione dell'enzima (*v x t*) il cui trattamento risulta significativo (rispettivamente al 95%, 99,5% e 95%). Quindi, è evidente che l'enzima ha raggiunto il suo scopo, risultando i vini della tesi E più colorati e più ricchi di sostanze fenoliche rispetto ai vini della tesi C (controllo). Inoltre, la maggiore estrazione durante la macerazione ha coinvolto anche gli zuccheri, l'acido tartarico e acetico dato che i vini della tesi E hanno un grado alcolico più elevato e una maggiore acidità. Dalla tabella emerge anche che le repliche delle vinificazioni sono state eseguite correttamente poiché il valore di F riguardante il campione per la replica (*v x r*) non è mai significativo.

4.2.2 Effetto del trattamento elettrochimico sulle caratteristiche cromatiche dei vini valutati subito dopo l'erogazione della corrente.

Per verificare l'effetto del trattamento con le microcorrenti, e come questo abbia influenzato l'evoluzione del colore dei vini in base al momento di erogazione, l'analisi della varianza è stata effettuata sui vini subito dopo il trattamento, per quanto riguarda i parametri relativi al colore (IFT, IC, tonalità, antociani liberi, polimeri colorati), il contenuto in acetaldeide ed il pH. I risultati dell'analisi statistica sono riportati nelle figure 4.15-4.16, dove con 0 si indica il vino prima del trattamento e con 1 lo stesso vino dopo il trattamento.

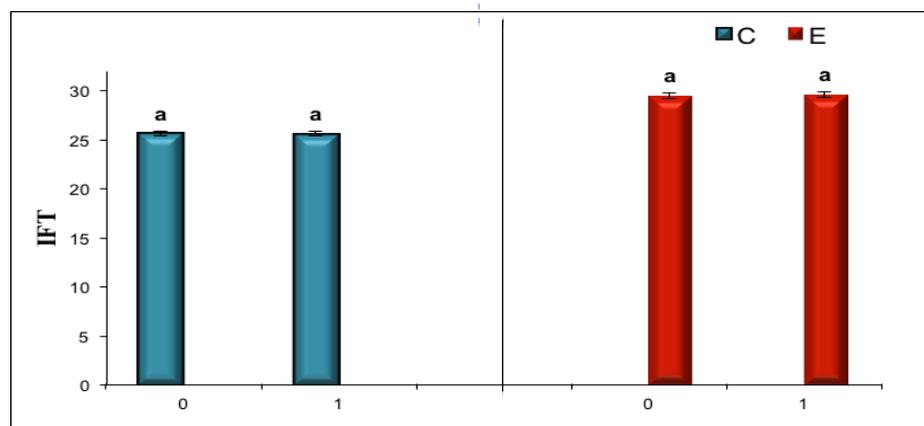


Figura 4.15. IFT dei vini delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

Come vediamo in figura 4.15, non vi è variazione dell'indice dei fenoli totali a seguito del trattamento con corrente: non vi sono differenze significative tra le tesi che non hanno subito il trattamento elettrochimico (0) e le tesi che invece lo hanno subito (1), sia per i vini della tesi C che per E.

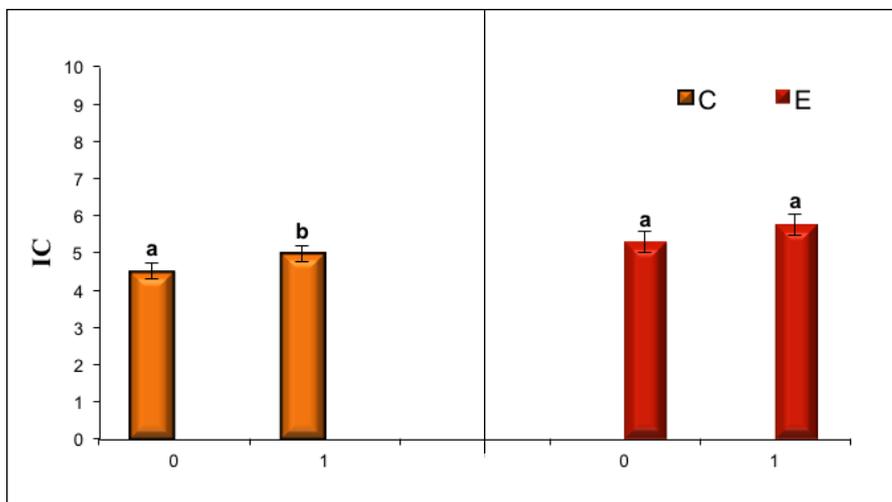


Figura 4.16. Intensità colorante dei vini delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La figura 4.16 mostra come, immediatamente dopo il trattamento, l'intensità colorante sia già aumentata in valore assoluto rispetto ai vini non trattati. Questo avviene in maniera significativa per la tesi C e in maniera non significativa per la E, probabilmente a causa della maggior concentrazione fenolica di partenza causata dal trattamento con l'enzima di macerazione.

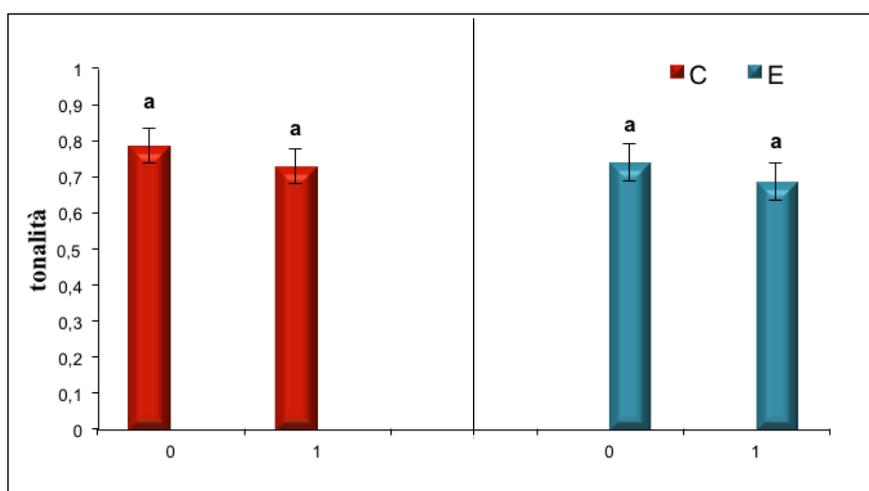


Figura 4.17 Tonalità dei vini delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La tonalità (figura 4.17), il contenuto in antociani liberi (figura 4.18) e di polimeri colorati (figura 4.19) non subiscono significative differenze in seguito al trattamento elettrochimico.

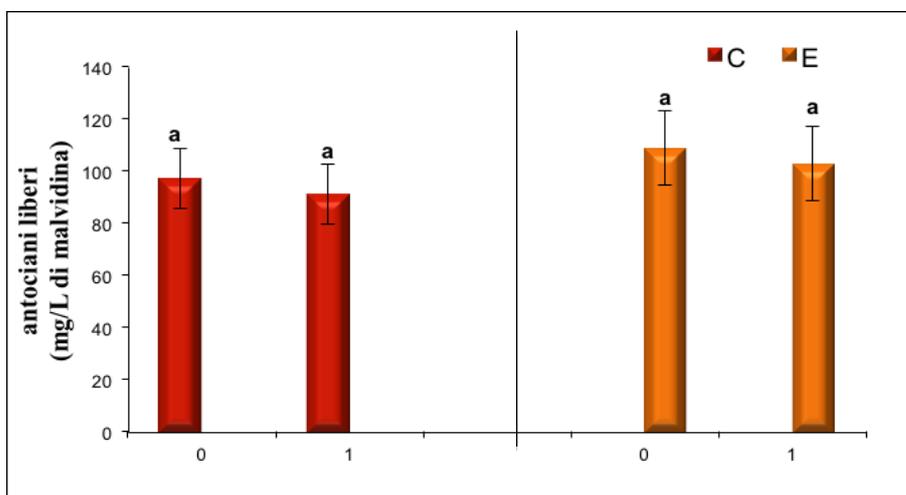


Figura 4.18. Contenuto in antociani liberi dei vini delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

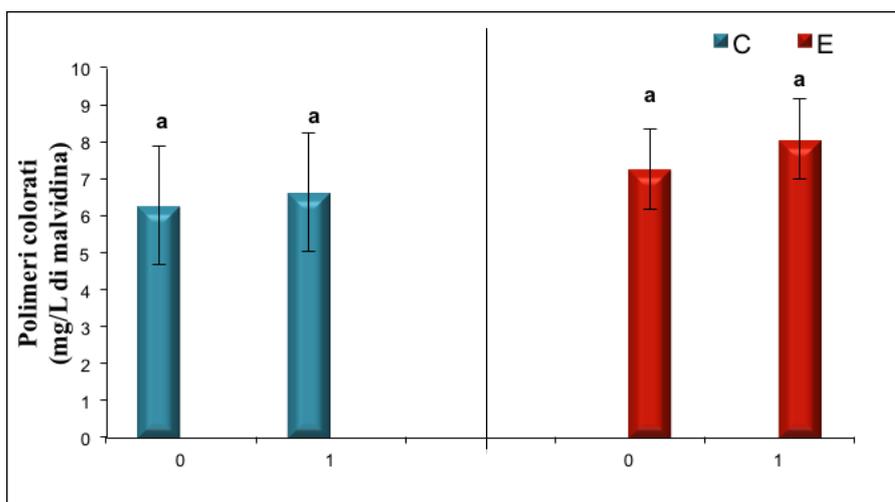


Figura 4.19. Contenuto in polimeri colorati dei vini delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

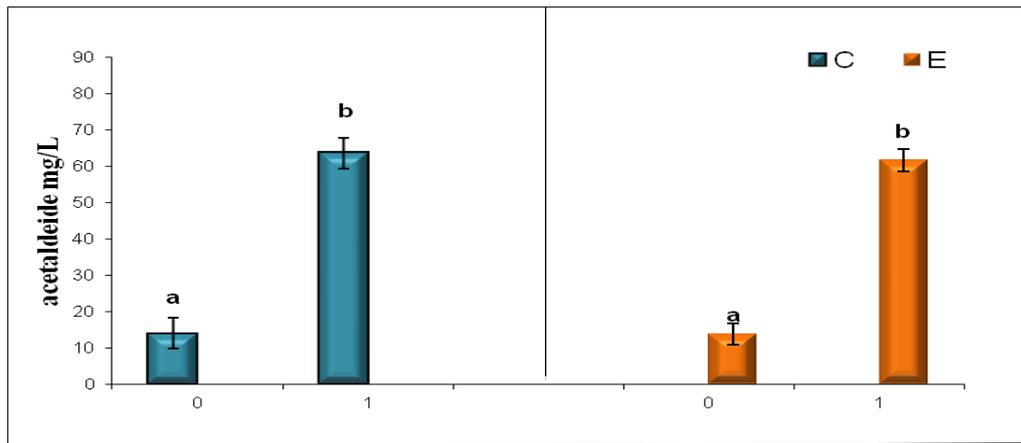


Figura 4.20. Contenuto in acetaldeide delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

L'obiettivo del trattamento con microcorrenti è la produzione di acetaldeide, la quale favorisce la formazione di polimeri antociano-tannino via ponte etile. La figura 4.20 mostra come il trattamento con corrente provochi un'immediata e significativa produzione di acetaldeide che, per entrambi i vini delle tesi (C ed E), passa da valori inferiori a 15 mg/L a circa 60 mg/L.

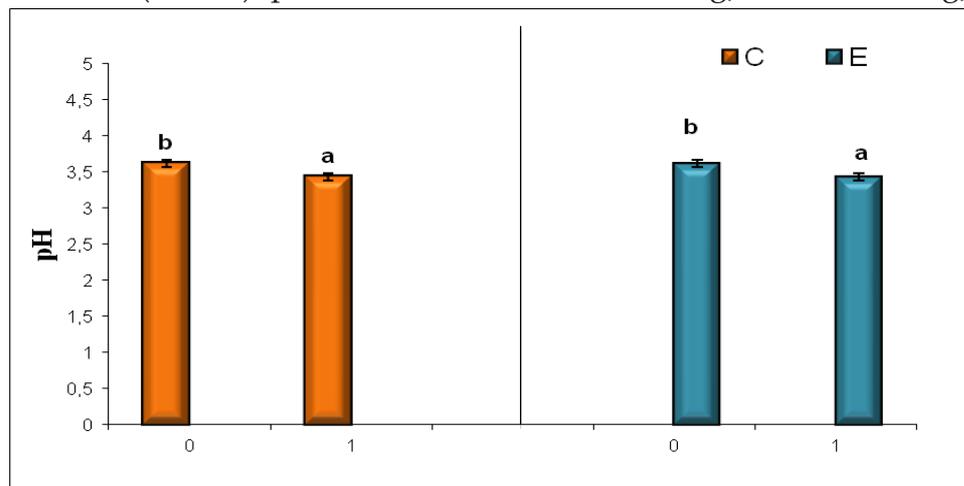


Figura 4.21. Valori del pH delle tesi C ed E subito dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La figura 4.21 mostra come il trattamento con corrente provochi, nei vini di entrambe le tesi C ed E, una diminuzione significativa del pH, probabilmente dovuta alla migrazione di ioni H⁺ nel comparto anodico.

4.2.3 Effetto del trattamento elettrochimico sulla composizione dei vini.

Analisi dei vini dopo il trattamento.

Per verificare l'effetto del trattamento con le microcorrenti, e come questo abbia influenzato l'evoluzione del colore dei vini in base alla scelta del momento di erogazione, abbiamo analizzato i dati ottenuti dalle analisi, svolte al termine dei trattamenti (a fine FML di tutti i vini sia quelli trattati prima della fermentazione che dopo), mediante l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) (figura 4.22). Il modello ottenuto spiega il 67% della varianza totale: 43% la prima componente e 24% la seconda. Le differenze tra i campioni, per la cui nomenclatura si rimanda al capitolo tre (figura 3.3; tabella 3.3), sono descritte in funzione di cinque variabili relative al colore (antociani liberi, IFT, IC, tonalità, polimeri colorati) e al quantitativo di acetaldeide, in quanto direttamente legata alla strutturazione del colore dei vini. I campioni sono rappresentati sulla mappa da tre colori che rappresentano le tre modalità di trattamento:

- Viola: *campioni non trattati con microcorrenti (0)*
- Rosso: *campioni trattati con microcorrenti prima della FML (1)*
- Arancione: *campioni trattati con microcorrenti dopo FML (2)*

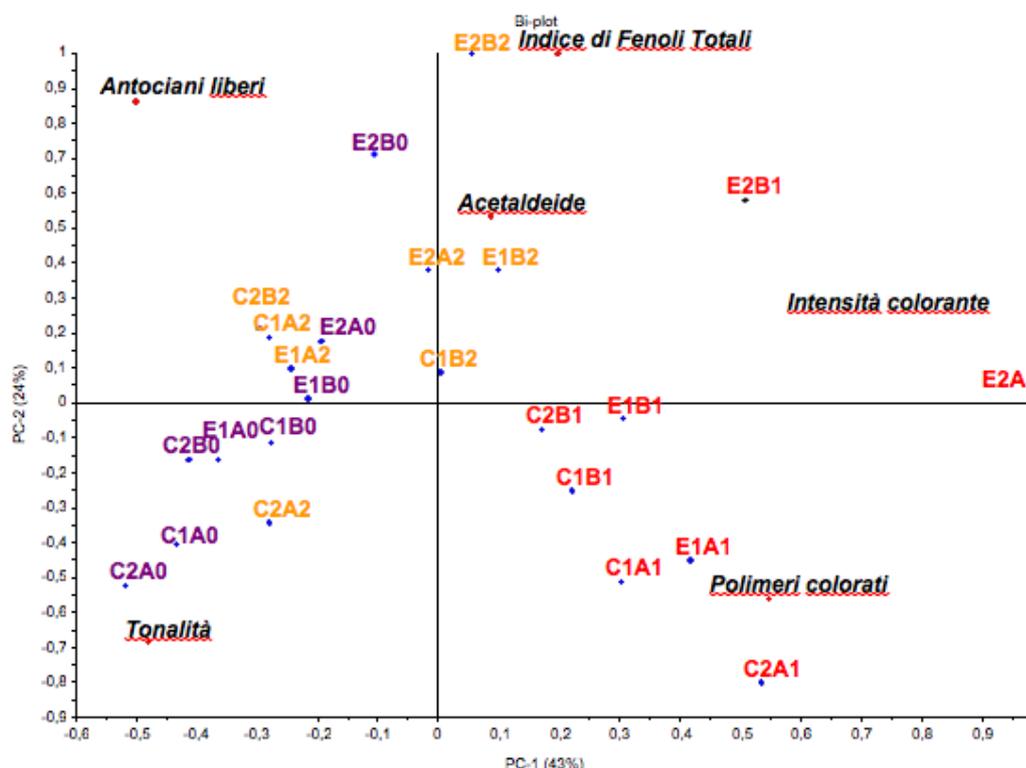


Figura 4.22. Analisi delle componenti principali (biplot). Distribuzione dei vini delle differenti tesi in funzione dei parametri del colore e del contenuto di acetaldeide (vettori).

Osservando la figura 4.22 è possibile individuare due gruppi distinti di campioni: un primo gruppo composto dai vini non trattati e da quelli trattati dopo FML ed un secondo dai vini trattati prima della FML. Per quanto riguarda i campioni del primo gruppo, possiamo dedurre che tra i vini che non hanno subito il trattamento con microcorrenti, e quelli che invece lo hanno subito dopo FML, non vi siano grandi differenze per le variabili valutate. Inoltre, questo gruppo risulta essere più legato alle variabili "antociani liberi" e "tonalità" che indicano rispettivamente una scarsa strutturazione del colore (meno polimeri colorati) e una tendenza del colore verso tinte gialle. Seguendo la prima componente da sinistra verso destra, troviamo il secondo gruppo di campioni composto dai vini che hanno subito il trattamento prima della FML, i quali risultano più legati alle variabili "polimeri colorati" e "intensità colorante".

Da questa analisi possiamo dedurre che, dal punto di vista del colore, il momento migliore per eseguire il trattamento con le microcorrenti è prima della FML. Questo perché durante lo svolgimento della FML, si ha sempre una perdita di colore (che può raggiungere il 30%) dovuta a diversi fattori tra cui l'incremento del pH e la liberazione di SO₂ a partire da composti contenenti solfiti (Davis et al., 1985). In questo caso invece, gli antociani sono già stati stabilizzati dal trattamento, infatti la figura 4.19 evidenzia che il secondo gruppo di campioni è molto lontano dalla variabile "antociani liberi". Quindi, dopo il trattamento, i vini trattati con microcorrenti prima della FML, risultano più colorati rispetto al testimone e a quelli trattati dopo FML, per i quali non si evidenziano differenze apprezzabili rispetto ai vini non trattati. La figura 4.22 mette anche in evidenza che le tesi derivate dal trattamento del pigiato con enzima (E) sono più legati alle variabili IFT a causa della maggior estrazione data dallo stesso.

I parametri valutati sui vini delle diverse tesi sono stati successivamente sottoposti a un'analisi multifattoriale della varianza (*trattamento C/E, replica, ceppo BML a/b, trattamento con corrente*) (livello di confidenza al 95%), al fine di determinare quale fattore avesse un significativo effetto sulle singole variabili. Il test verifica inoltre, le interazioni significative tra i fattori (*trattamento C/E, replica, ceppo BML A/B, trattamento con corrente*). I risultati sono mostrati in tabella 4.11

Tabella 4.11. Valori di F (F di Fisher) e interazioni per i parametri chimici misurati sui vini di tutte le tesi (trattamento con corrente e non) alla fine della fermentazione malolattica.^a

	F (Fisher)									
	<i>t</i>	<i>r</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>t x r</i>	<i>t x b</i>	<i>t x c</i>	<i>r x b</i>	<i>r x c</i>	<i>b x c</i>
pH	1,12 ns	0,00 ns	1,37 ns	66,79***	70,64***	0,70 ns	0,24 ns	13,09 *	0,08 ns	0,18 ns
Acidità totale	6,99*	3,82 ns	49,18***	42,94***	11,11**	1,60 ns	0,01 ns	1,60 ns	0,65 ns	6,99*
Acidità volatile	1,44 ns	4,36 ns	3,37 ns	0,48 ns	0,48 ns	2,12 ns	0,20 ns	8,10 ns	0,32 ns	0,48 ns
SO₂tot	4,41 ns	51,84***	7,29*	3,24 ns	0,09 ns	0,36 ns	0,36 ns	7,29*	0,81 ns	0,81 ns
SO₂lib	4,59 ns	279,37***	41,33***	22,22***	14,88**	0,18 ns	0,18 ns	53,08***	14,88**	1,65 ns
alcool	8616,13***	6984,19***	0,13 ns	0,54 ns	8272,86***	2,35 ns	0,45 ns	0,01 ns	0,77 ns	2,12 ns
IFT	196,95***	72,96***	0,60 ns	0,76 ns	15,92**	0,40 ns	0,24 ns	0,08 ns	2,34 ns	0,66 ns
IC	156,99***	15,21**	24,35***	328,44***	53,54***	0,00 ns	6,09*	2,65 ns	3,94 ns	24,14***
Tonalità	62,06***	9,77*	274,24***	135,37***	205,08***	1,11 ns	0,14 ns	8,41*	5,96*	41,65***
Antociani liberi	1,00 ns	16,17**	59,34***	125,13***	4,40 ns	0,00 ns	2,27 ns	24,43***	0,86 ns	0,86 ns
Polimeri	0,04 ns	8,92*	8,64*	25,39***	0,93 ns	0,39 ns	0,56 ns	9,44*	3,53 ns	7,40*
Acetaldeide	0,06 ns	0,36 ns	0,14 ns	93,42***	0,39 ns	0,06 ns	1,34 ns	0,02 ns	1,66 ns	7,39*

^aLettere diverse stanno a indicare differenze significative tra i valori medi (livello di confidenza al 95%), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$; ns, non significativo; *t*, trattamento C/E; *r*, replica; *b*, ceppo BML A/B; *c*, trattamento con corrente.

L'analisi statistica (tabella 4.11) mette in evidenza in particolar modo l'effetto della corrente sulle variabili analizzate. I parametri significativi rispetto al trattamento con corrente sono: IC, tonalità, antociani liberi, polimeri colorati, acetaldeide, pH e acidità totale. La variabile ceppo di LAB (A/B) risulta significativa all'uso di corrente ($b \times c$) per quanto riguarda intensità colorante e tonalità al 99% e acidità totale, polimeri e acetaldeide (al 95%). La tabella 4.11 mostra anche come l'effetto della maggior estrazione degli enzimi si mantenga dopo il trattamento di stabilizzazione del colore con valori significativi per quanto riguarda acidità totale (95%), alcool, IFT, IC e tonalità (al 99.9%). Per analizzare meglio le differenze sul colore dovute al trattamento con corrente nei diversi momenti (prima e dopo FML), sono state messe a confronto le tesi C ed E subito dopo il trattamento per i parametri IFT, IC, tonalità, antociani liberi, polimeri colorati, acetaldeide e pH.

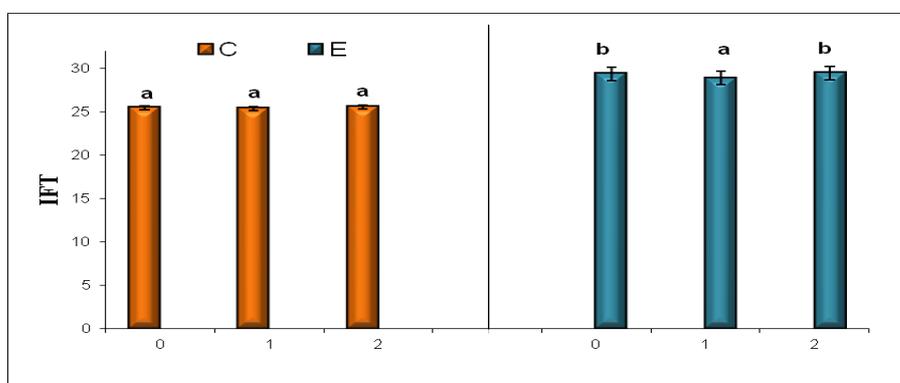


Figura 4.23. Indice di fenoli totali delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

I campioni E, per effetto dell'enzima, hanno un indice di fenoli totali leggermente più elevato dei C (figura 4.23). Non ci sono invece, differenze dovute al trattamento elettrochimico né per le tesi C che E.

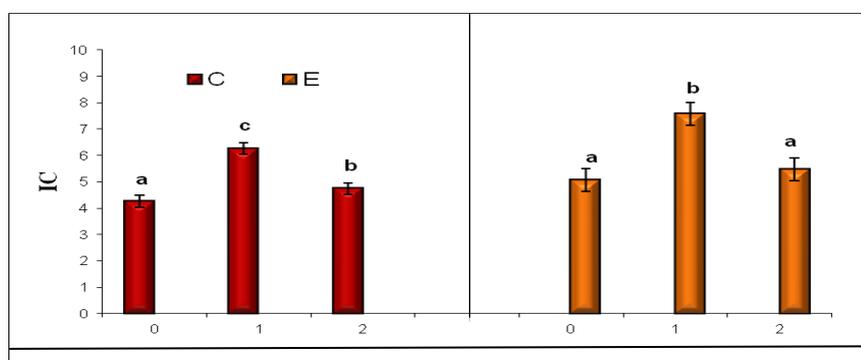


Figura 4.24. Intensità colorante delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La figura 4.24 mostra che i vini con l'intensità colorante più alta sono quelli trattati con microcorrenti prima della FML (1), sia per la tesi C che E. Per le tesi C, anche il trattamento dopo FML (2), porta ad avere vini significativamente più colorati rispetto al non trattato, anche se inferiore a quelli trattati prima della FML. Questo non si verifica però per le tesi E. Da queste prime evidenze, possiamo affermare che trattare il vino tempestivamente subito dopo la svinatura, permette la stabilizzazione del colore già da queste prime fasi, con una perdita minore dello stesso dopo la fine della FML.

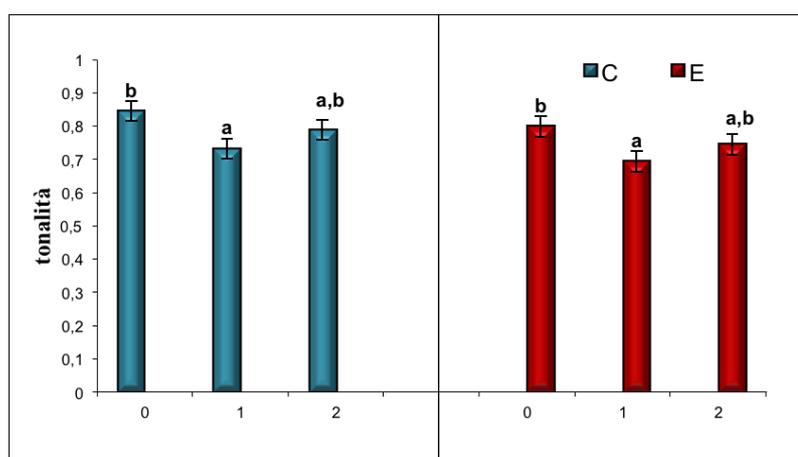


Figura 4.25. Tonalità delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La variabile "tonalità" è riferita a tinte giallo-marrone che caratterizzano i campioni meno colorati. La figura 4.25 riconferma quanto detto in precedenza: le tesi C, in questo caso, hanno valori di tonalità leggermente più elevati delle E in quanto non hanno subito il trattamento con l'enzima. Tra le tesi trattate con corrente, è possibile evidenziare che i vini trattati prima della FML (1), essendo più colorati, hanno anche meno tinte giallo/marrone. I vini che hanno effettuato il trattamento elettrochimico dopo FML (2) hanno valori intermedie tra i vini che hanno subito il trattamento con corrente prima della FML (1) e quelli non trattati (0). Questi ultimi, non avendo eseguito il trattamento, sono i meno colorati in assoluto e i più legati alla variabile tonalità.

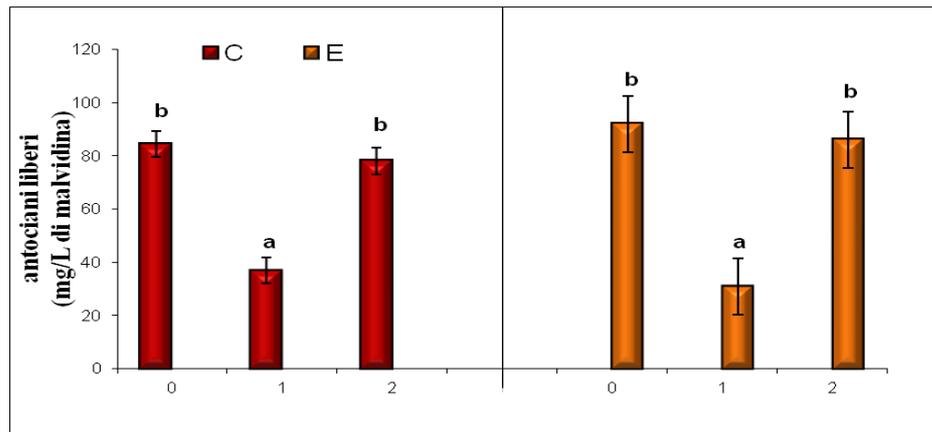


Figura 4.26. Contenuto in antociani liberi delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

Gli antociani liberi sono molto ridotti nei vini che hanno subito il trattamento con corrente prima della FML (1) (figura 4.26) in quanto, come si vede dalla figura 4.27, si sono formati molti più complessi stabili antociani/tannini (polimeri colorati). Il contenuto in antociani liberi dei vini trattati dopo FML (2) non è significativamente differente da quello dei vini non trattati con microcorrenti (0). Infatti, solo i vini che hanno subito il trattamento con corrente prima della FML (1) sono significativamente diversi dagli altri per il contenuto in polimeri colorati (Figura 4.27)

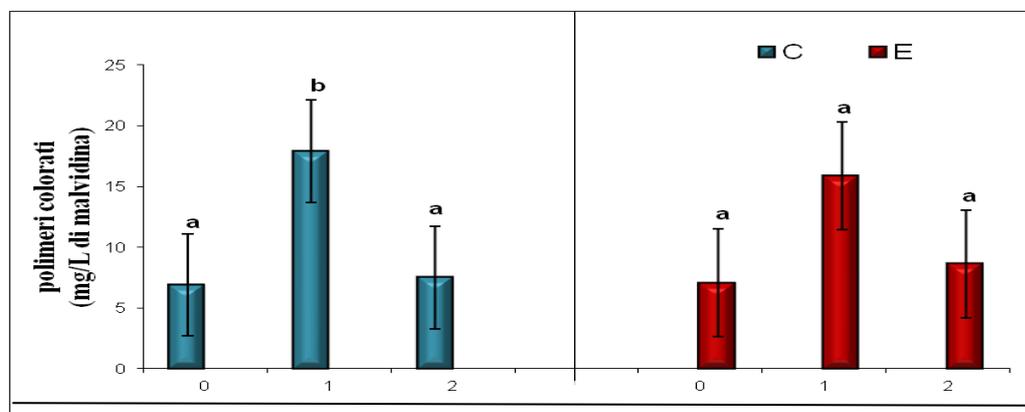


Figura 4.27. Contenuto in polimeri colorati delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

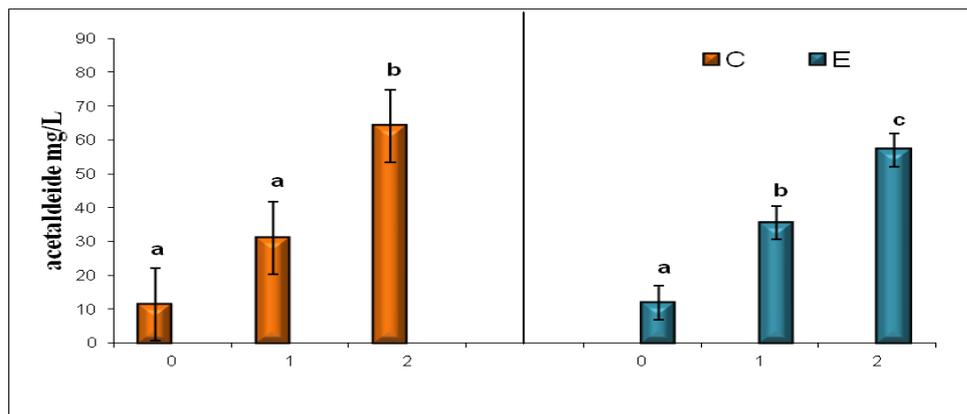


Figura 4.28 Contenuto in acetaldeide delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

Il trattamento dei vini con microcorrenti porta alla produzione di acetaldeide per ossidazione dell'etanolo. L'acetaldeide, per la tesi C, come si vede dalla figura 4.28, è significativamente più alta nei vini trattati dopo FML (2) rispetto a quelli non trattati (0) e trattati prima della FML (1). Per quanto riguarda la tesi E, entrambi i trattamenti con corrente danno vini significativamente più ricchi in acetaldeide rispetto ai vini non trattati. L'acetaldeide svolge un ruolo fondamentale nell'aggregazione degli antociani e dei tannini ma non si deve eccedere con il contenuto nel vino, per evitare un'eccessiva polimerizzazione, la quale può portare ad aggregati che possono diventare insolubili, con conseguente perdita del colore del vino. Inoltre, un eccesso di acetaldeide apporta il difetto di ossidato ed una nota erbacea al vino che è considerata un difetto.

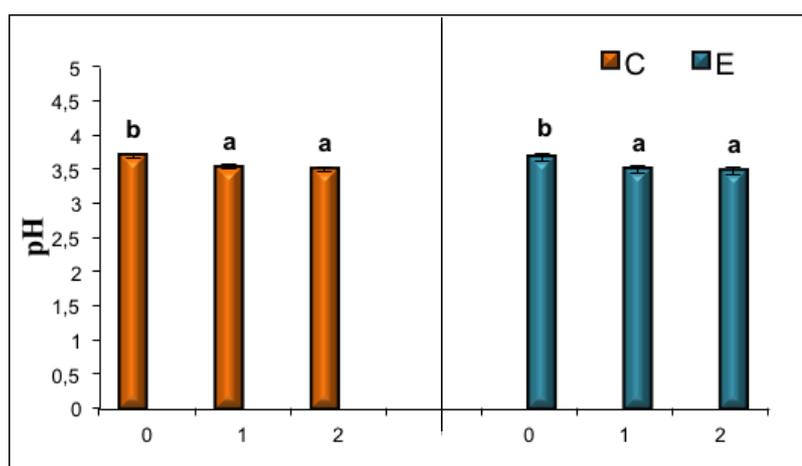


Figura 4.29. Valori del pH delle tesi C ed E dopo il trattamento in funzione della corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

Il trattamento con microcorrenti ha determinato una diminuzione significativa del pH sui vini trattati rispetto ai non trattati (figura 4.29), probabilmente dovuta alla migrazione di ioni H^+ nel comparto anodico.

Da queste analisi emerge che, il vino trattato prima della FML risulta più colorato, con una tonalità più bassa e un maggior quantitativo di addotti colorati stabili, molto importanti per la sua conservazione. Anche il vino trattato dopo FML è più colorato e stabile rispetto al testimone anche se in maniera meno marcata; viceversa conserva un alto quantitativo di acetaldeide che potrebbe essere considerata negativa a livello sensoriale.

4.2.4 Analisi dei vini dopo 90 giorni di affinamento in bottiglia.

Per verificare l'evoluzione dei vini dopo 90 giorni dal trattamento, sono stati di nuovo analizzati e i dati interpretati utilizzando l'analisi delle Componenti Principali (PCA) (figura 4.30). Il modello ottenuto spiega l'84% della varianza totale: 65% la prima componente e 19% la seconda. I campioni, per la cui nomenclatura si rimanda al capitolo tre (figura 3.5; tabella 3.10 di materiali e metodi), sono descritti in funzione di cinque variabili relative al colore (antociani liberi, IFT, IC, tonalità, polimeri colorati) e al quantitativo di acetaldeide, in quanto direttamente legata alla strutturazione del colore dei vini. I campioni sono rappresentati sulla mappa da tre colori che rappresentano le tre modalità di trattamento: viola: *campioni non trattati con microcorrenti (0)*, rosso: *campioni trattati con microcorrenti prima della FML (1)*, arancione: *campioni trattati con microcorrenti dopo FML (2)*

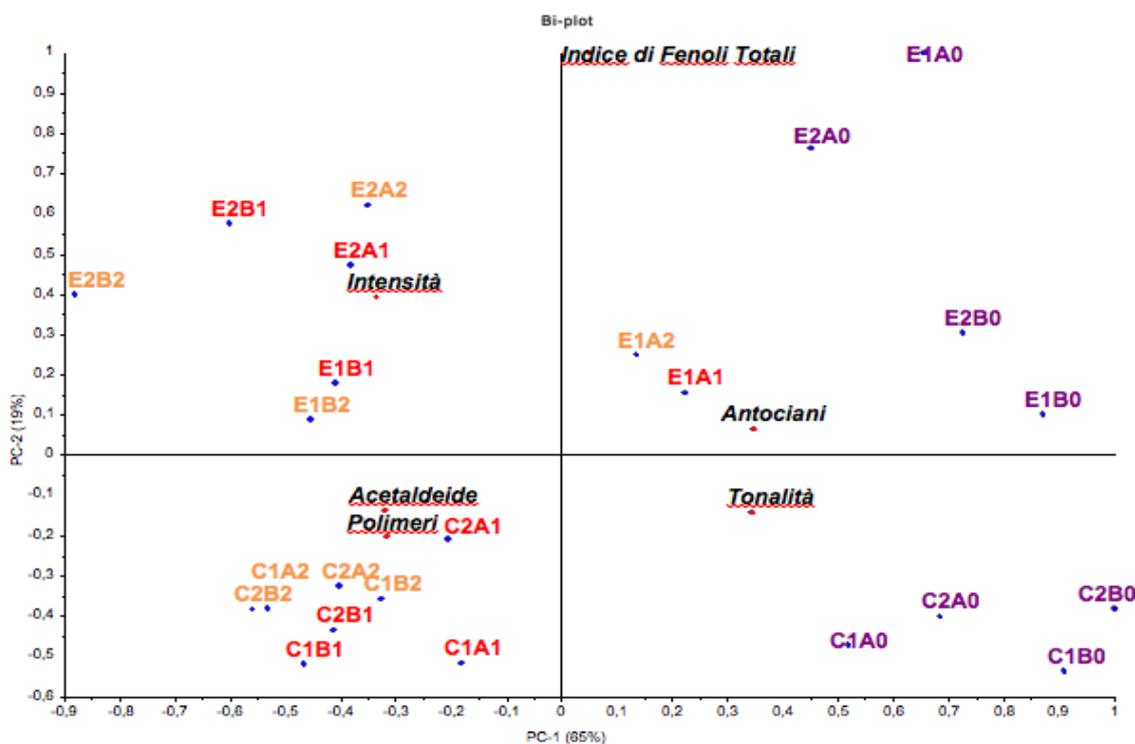


Figura 4.30. Analisi delle componenti principali (biplot). Distribuzione dei vini delle differenti tesi in funzione dei parametri del colore e del contenuto di acetaldeide (vettori).

Dopo 90 giorni, la differenza tra i due diversi momenti del trattamento (corrente prima della FML e dopo) diminuiscono. E' possibile infatti, evidenziare che i campioni trattati si distinguono nettamente dai non trattati. I primi sono più legati alle variabili intensità colorante, polimeri colorati ed acetaldeide, mentre i non trattati a tonalità e antociani liberi, segno di un colore meno intenso e meno stabile. Allo stesso tempo, i vini trattati prima e dopo FML si sono avvicinati tra loro in funzione dei polimeri colorati: la produzione di acetaldeide prima della FML ha favorito l'immediata formazione di pigmenti stabili per i vini che hanno subito il trattamento con corrente prima della FML (1) che, dopo FML, si sono dimostrati notevolmente più colorati. Invece, i vini sottoposti al trattamento elettrochimico dopo FML (2) hanno necessitato di un periodo di affinamento in bottiglia affinché l'acetaldeide potesse contribuire alla formazione dei pigmenti polimeri a partire dagli antociani. Anche in questo caso, i vini della tesi E, trattati con enzima, si dimostrano più vicini alle variabili IFT e IC, grazie alla maggiore estrazione in fase di macerazione. I parametri valutati sui vini delle diverse tesi dopo 90 giorni di maturazione in bottiglia sono stati successivamente sottoposti a un'analisi multifattoriale della varianza (*trattamento C/E, replica, ceppo BML A/B, trattamento con corrente*) (livello di confidenza al 95%) al fine di determinare quale fattore avesse un significativo effetto sulle singole variabili. Il test verifica inoltre le interazioni significative tra i fattori (*trattamento C/E, replica, ceppo BML A/B, trattamento con corrente*). I risultati sono mostrati in tabella 4.12.

Tabella 4.12. Valori di F (F di Fisher) e interazioni per i parametri chimici misurati sui vini di tutte le tesi (trattamento con corrente e non) dopo 90 giorni di maturazione in bottiglia.^a

	F (Fisher)									
	<i>t</i>	<i>r</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>t x r</i>	<i>t x b</i>	<i>t x c</i>	<i>r x b</i>	<i>r x c</i>	<i>b x c</i>
pH	3,73 ns	1,53 ns	5,88*	51,92***	42,05***	0,02 ns	0,46 ns	10,35*	0,55 ns	2,25 ns
Acidità totale	6,99*	3,82 ns	49,18***	42,94***	11,11*	1,60 ns	0,01 ns	1,60 ns	0,65 ns	6,99*
Acidità volatile	1,44 ns	4,36 ns	3,37 ns	0,48 ns	26,26***	2,12 ns	0,20 ns	8,10*	0,32 ns	0,48 ns
SO₂tot	1,27ns	0,62 ns	11,47*	4,57*	0,73 ns	0,26 ns	0,11ns	3,29 ns	5,64*	0,64 ns
SO₂lib	0,31ns	15,21**	89,69***	438,52***	2,79 ns	2,79 ns	2,17 ns	0,31ns	100,86***	145,55***
alcool	8616,13***	6984,19***	0,13 ns	0,54 ns	8272,86***	2,35 ns	0,45 ns	0,01 ns	0,77ns	2,12 ns
IFT	59,97***	6,17*	2,40 ns	2,8 ns	0,13 ns	0,40 ns	1,99 ns	0,15 ns	0,53 ns	0,98 ns
IC	59,29***	10,51*	0,83 ns	126,48***	21,57**	0,09 ns	0,53 ns	0,64 ns	1,33 ns	12,69**
Tonalità	17,6**	2,54 ns	0,01ns	197,06***	57,55***	0,59 ns	0,74 ns	2,15 ns	1,86 ns	11,47**
Antociani liberi	1,95 ns	1,36 ns	1,89 ns	53,88***	0,06 ns	1,45 ns	0,26 ns	3,06 ns	0,52 ns	6,91*
Polimeri	10,31*	22,94***	3,44 ns	38,8***	1,22 ns	15,79**	2,92 ns	1,38 ns	1,09 ns	0,74 ns
Acetaldeide	0,60 ns	0,62 ns	7,99*	27,02***	0,10 ns	0,86 ns	1,02 ns	0,01ns	0,50 ns	3,18 ns

^aLettere diverse stanno a indicare differenze significative tra i valori medi (livello di confidenza al 95%), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$; ns, non significativo; *t*, trattamento C/E; *r*, replica; *b*, ceppo BML A/B; *c*, trattamento con corrente.

L'analisi statistica (tabella 4.12 mette in evidenza l'effetto della corrente sulle variabile analizzate. I parametri significativi rispetto al trattamento con corrente, dopo 90 giorni di maturazione in bottiglia, sono: IC, tonalità, antociani liberi, polimeri colorati, acetaldeide, pH e acidità totale. La variabile ceppo di LAB (*b*) risulta significativa per i parametri: pH, acetaldeide (al 95%) e acidità totale (99%), segno evidente che c'è stata una differenza nel modo di operare dei due ceppi (la FML è durata 14 giorni per A e 30 per B). Tale differenza viene confermata dall'interazione *b x c* dove vediamo che i diversi ceppi di LAB influenzano il trattamento con corrente per i seguenti valori significativi: acidità volatile e antociani liberi (al 95%), IC, tonalità (99.5%). La tabella 4.12 mostra anche come l'effetto della maggior estrazione degli enzimi, si mantenga anche dopo 90 giorni dal trattamento di stabilizzazione del colore, con valori significativi per quanto riguarda acidità totale e i polimeri (95%), alcool, IFT, IC (al 99,9%) e tonalità (al 99.5%). Per analizzare meglio l'evoluzione del colore dei vini a 90 giorni dal trattamento con corrente nei diversi momenti (prima e dopo FML), sono stati messi a confronto i vini delle tesi C ed E per i parametri IFT, IC, tonalità, antociani liberi, polimeri colorati, acetaldeide e pH.

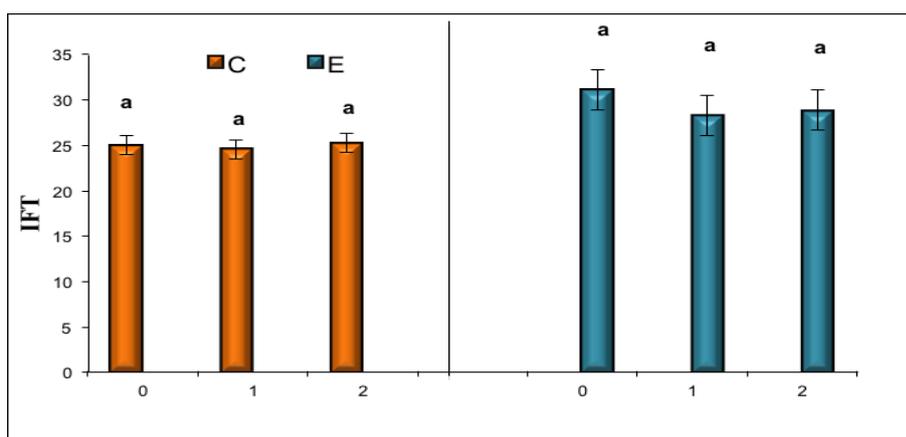


Figura 4.31. Indice di fenoli totali delle tesi C ed E dopo 90 giorni di maturazione in funzione del trattamento con corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

I vini delle tesi E, per effetto dell'enzima, hanno un indice di fenoli totali molto più elevato dei C (figura 4.31). Non ci sono invece differenze dovute al trattamento elettrochimico né per le tesi C che E.

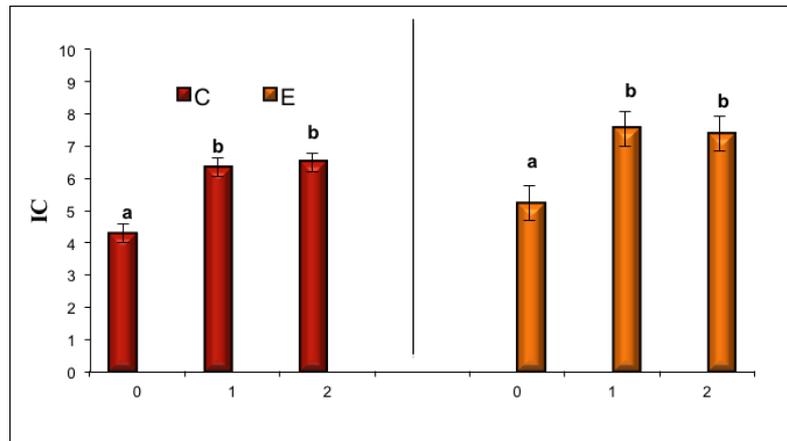


Figura 4.32. Intensità colorante delle tesi C ed E dopo 90 giorni di maturazione in funzione del trattamento con corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La figura 4.32 mostra che, dopo 90 giorni di maturazione, non vi sono differenze significative tra i vini trattati sia per le tesi C che E, mentre vi è una grande differenza rispetto al controllo. Questo risultato sta ad indicare che l'applicazione di microcorrenti sui vini dopo la FML porta comunque ad un incremento dell'IC dopo un periodo di maturazione del vino.

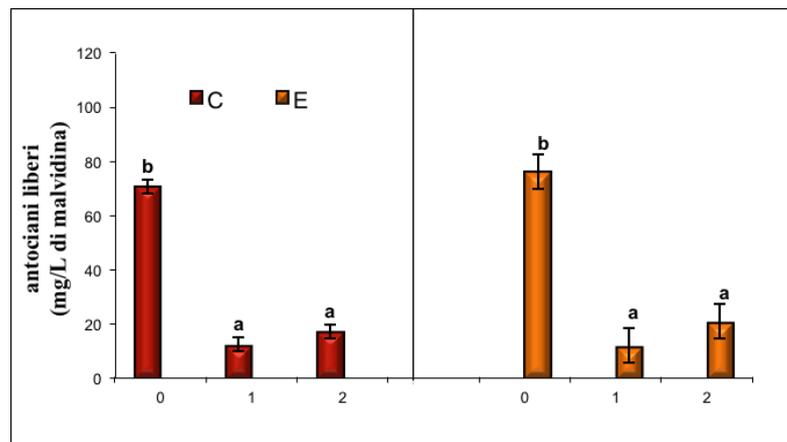


Figura 4.33. Contenuto in antociani liberi delle tesi C ed E dopo 90 giorni di maturazione in funzione del trattamento con corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative

Gli antociani liberi sono molto ridotti nei vini che hanno subito il trattamento elettrochimico (figura 4.33), segno di un buon grado di stabilità del colore. Tuttavia, proprio come per l'intensità colorante, rispetto all'analisi precedente, non vi sono più differenze significative tra i vini che hanno subito il trattamento con corrente prima della FML (1) e quelli che lo hanno subito dopo FML (2). La differenza con i vini non trattati (0) risulta invece, significativa oltre che molto grande, segno del buon esito del trattamento.

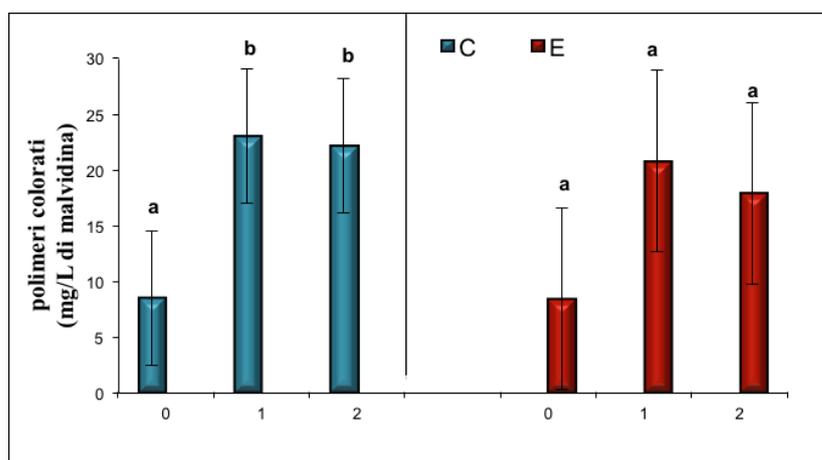


Figura 4.34 Contenuto in polimeri colorati delle tesi C ed E dopo 90 giorni di maturazione in funzione del trattamento con corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

La figura 4.34 ci mostra come i vini trattati, sia prima che dopo FML, siano caratterizzati da quantitativi più elevati di polimeri colorati rispetto ai controllo (0). Questa differenza è significativa per le tesi C mentre non lo è per le E, dove la maggiore estrazione data dall'enzima, può aver in parte ridotto le differenze. All'interno dei vini trattati, le differenze invece non sono significative e ridotte rispetto all'analisi precedente anche in valore assoluto.

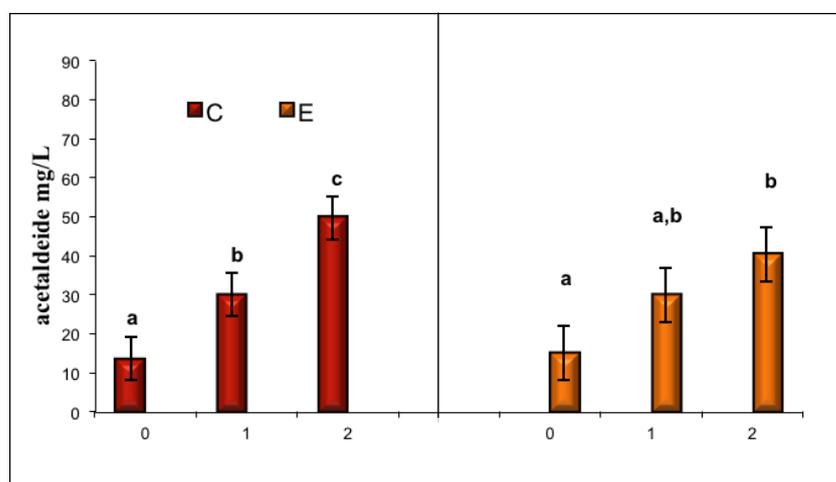


Figura 4.35. Contenuto in acetaldeide delle tesi C ed E dopo 90 giorni di maturazione in funzione del trattamento con corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

Il contenuto di acetaldeide delle tesi C, come si vede dalla figura 4.35, è significativamente più alta nei vini trattati dopo FML rispetto a quelli non trattati e a quelli trattati prima della FML. Per quanto riguarda le tesi E, entrambi i trattamenti con corrente danno vini più ricchi in acetaldeide, anche se la tesi E1 non è significativamente diversa dalle altre due. Rispetto all'analisi

precedente, non vi sono grandi differenze legate all'evoluzione dei vini in bottiglia.

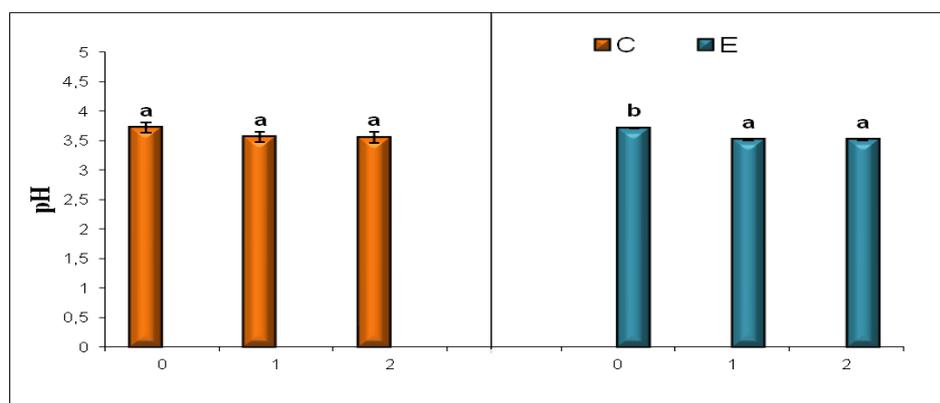


Figura 4.36. Valori del pH delle tesi C ed E dopo 90 giorni di maturazione in funzione del trattamento con corrente (0, no corrente; 1, corrente prima della FML; 2, corrente dopo la FML). Lettere diverse stanno a indicare differenze significative.

Dopo 90 giorni di maturazione in bottiglia, non si registra un'ulteriore evoluzione del pH nei vini trattati rispetto ai non trattati (figura 4.36). Il valore di pH dei trattati con microcorrenti prima e dopo FML rimane inferiore rispetto ai controllo (0), a causa della migrazione di ioni H^+ nel comparto anodico. L'unica differenza rispetto all'analisi precedente è che nella tesi C la differenza tra i vini non trattati ed i trattati non è più significativa.

Da queste analisi emerge che i vini trattati con corrente sono più colorati, con una più bassa tonalità e un maggior quantitativo di polimeri colorati rispetto al testimone (0). Inoltre, le differenze tra i trattamenti prima e dopo FML (1 e 2) si sono ridotte, tanto da non essere quasi mai significative per quanto riguarda i parametri del colore. Per contro, i vini trattati dopo FML conservano comunque un più alto quantitativo di acetaldeide che potrebbe essere considerata negativa a livello sensoriale.

4.2.5 Confronto delle caratteristiche dei vini dopo FML e dopo 90 giorni di affinamento in bottiglia.

Per fare un confronto tra i vini nei due momenti, dopo il trattamento e dopo 90 giorni di maturazione, abbiamo re-interpretato i dati utilizzando l'analisi delle Componenti Principali (PCA) (figura 4.37). Il modello ottenuto spiega il 69% della varianza totale: 49% la prima componente e 20% la seconda. I vini sono stati posizionati in base alle variabili relative al colore (antociani liberi, IFT, IC, tonalità, polimeri colorati) e al quantitativo di acetaldeide. I campioni sono rappresentati sulla mappa da due colori che rappresentano i momenti di analisi dei campioni:

- Arancione: *dopo il trattamento (0)*
- Rosso: *90 giorni dopo il trattamento (3).*

La nomenclatura dei campioni (figura 3.5; tabella 3.10 di materiali e metodi) è preceduta dal numero 0- (arancione) e 3- (rosso).

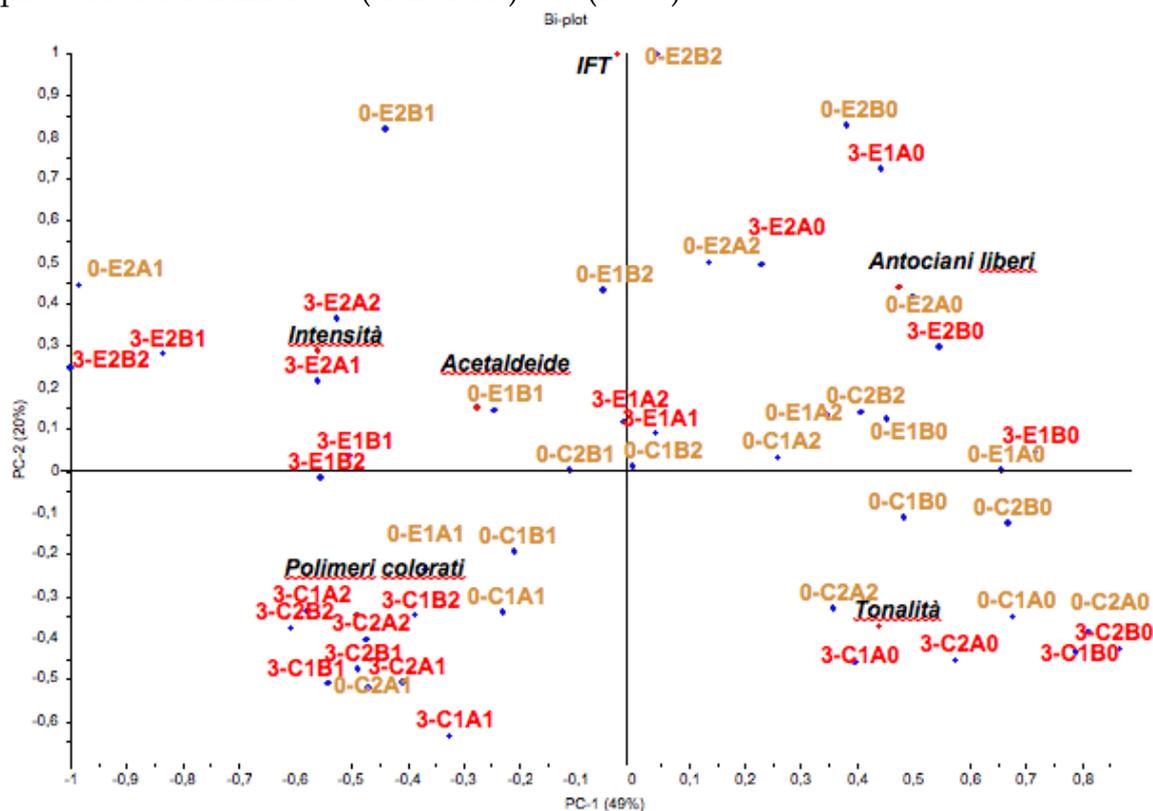


Figura 4.37 Analisi delle componenti principali (biplot). Distribuzione dei vini delle differenti tesi in funzione dei parametri del colore e del contenuto di acetaldeide (vettori).

Confrontando la posizione dei campioni in funzione delle variabili dopo il trattamento e dopo 90 giorni dallo stesso, si evince come i vini non trattati siano sempre legati alle variabili antociani liberi e tonalità, risultando di fatto invariati come posizione nei 90 giorni di maturazione. I vini che hanno subito il trattamento prima della FML, mostrano una leggera evoluzione, avvicinandosi ulteriormente alle variabili più legate al colore quali intensità colorante e polimeri colorati. Quelli che hanno subito una maggiore evoluzione sono i vini trattati dopo FML: dopo il trattamento, questi campioni si posizionavano nel lato sinistro del *biplot* (figura 4.37) (rispetto alla seconda componente) legati alle variabili antociani liberi e tonalità (come quelli che non avevano subito il trattamento); nei 90 giorni trascorsi, l'acetaldeide, che dopo il trattamento si era appena formata, ha agito sulle componenti fenoliche provocando la loro stabilizzazione e la formazione di polimeri colorati. Infatti, tali vini, dopo 90 giorni, si sono spostati verso le variabili "polimeri colorati" e "intensità colorante" avvicinandosi ai vini trattati prima della FML.

4.2.6 Analisi sensoriale dopo tre mesi di affinamento in bottiglia.

Al fine di differenziare sensorialmente i vini prodotti è stata condotta un'analisi utilizzando la tecnica del Napping. I dati sono stati elaborati e interpretati con

l'Analisi Procastica Generalizzata (GPA). Le mappe di consenso così ottenute, separatamente per i campioni delle tesi C ed E, spiegano rispettivamente il 39,73% e il 38,11% di varianza totale di cui il 29,27% e il 27,23% la prima componente e il 10,46, 10,87% la seconda (figure 4.38-4.39). La varianza spiegata totale è bassa ma comunque sufficiente per avere un'idea di come i campioni sono stati percepiti dai giudici.

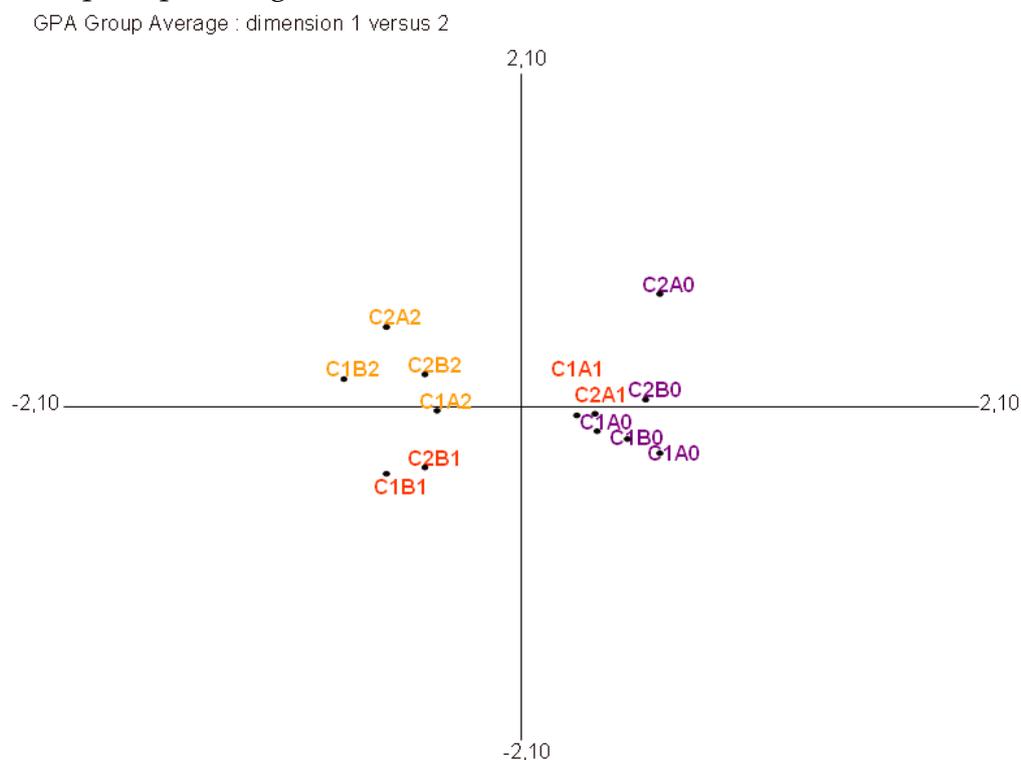


Figura 4.38. GPA; mappa di consenso dei campioni delle tesi C.

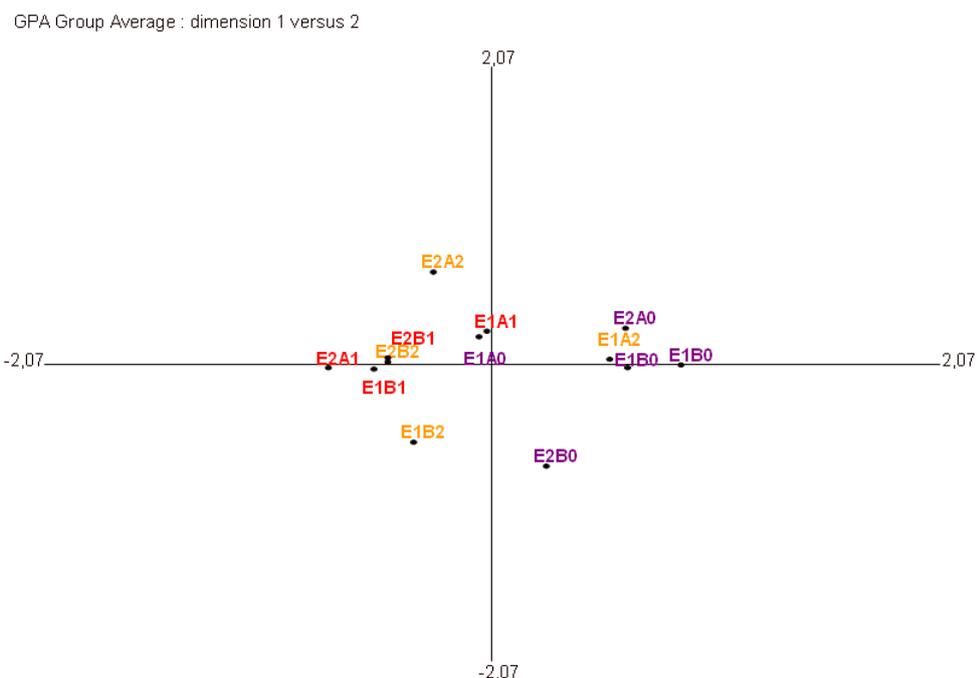


Figura 4.39. GPA; mappa di consenso dei campioni delle tesi E.

Dalle figure (4.38 e 4.39) si può osservare come i giudici abbiano suddiviso i campioni, relativi alle tesi C ed E, in due gruppi separando i vini trattati dai non

trattati, cosa che conferma quanto precedentemente evidenziato con l'analisi multifattoriale della varianza. Questa differenza è stata percepita chiaramente per tutti i vini tranne il C1A1, la sua replica C2A1 (figura 4.35) e l'E1A2 (figura 4.36). Questi vini, infatti, si trovano nel gruppo dei campioni non trattati.

4.2.7 Effetto del pH sul colore dei vini.

La figura 4.40 mostra l'effetto della variazione del pH sul colore del vino (come descritto in Materiali e metodi). Il pH di due vini M e P sono stati abbassati con aggiunta di HCl rispettivamente di 0,20 e 0,40 punti di pH ed il colore del vino misurato.

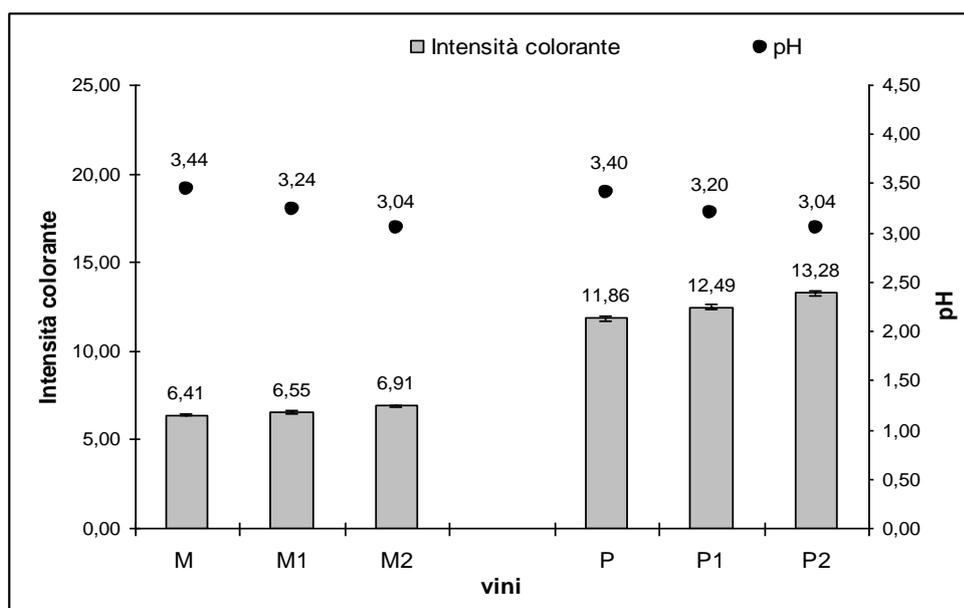


Figura 4.40. Valori di intensità colorante sui vini M e P misurati al variare del pH (M1 e M2, vino M con pH abbassato rispettivamente di 0,20 e 0,40 punti pH; P1 e P2, vino P con pH abbassato rispettivamente di 0,20 e 0,40 punti pH).

Dalla figura 4.40 emerge che all'abbassarsi del pH si ha un conseguente aumento dell'intensità colorante dei vini. Nel caso del vino M si ha una variazione di 0,14 sull'intensità colorante, passando da un pH 3,44 a pH 3,24, per il vino P invece, passando da pH 3,40 a 3,20 si ha un incremento di 0,69 sull'intensità colorante. Il trattamento elettrochimico sui vini rossi ha come conseguenza l'immediato abbassamento del pH (figura 4.40) con conseguente incremento dell'intensità colorante, come riscontrato nei vini di figura 4.40. La produzione di acetaldeide non ha un immediato effetto sulla stabilizzazione del colore del vino (intesa come formazione di pigmenti polimeri colorati) ma è necessario che il vino maturi per un periodo affinché si attivino tali reazioni (figura 4.41).

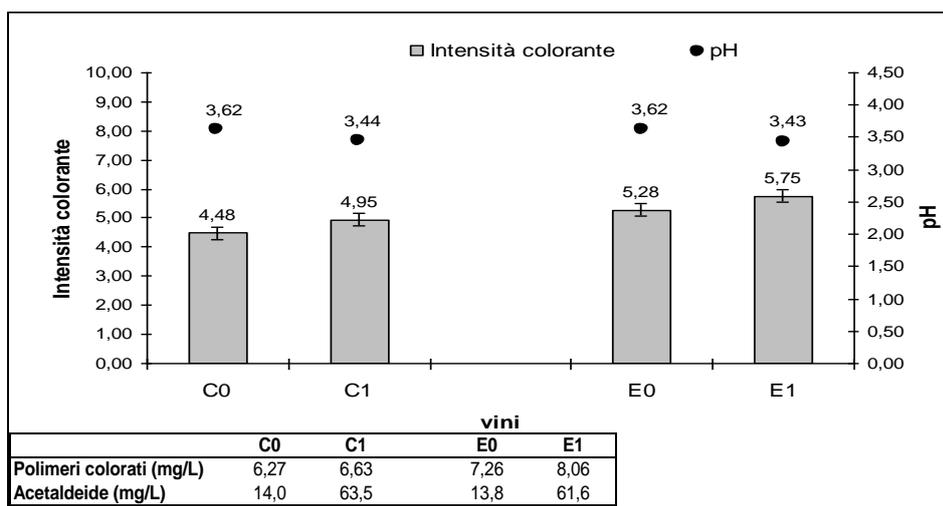


Figura 4.41. Valori di intensità colorante, di polimeri colorati e di acetaldeide sui vini delle tesi C ed E misurati al variare del pH subito dopo il trattamento con microcorrenti.

Analizzando i vini dopo il trattamento, al termine della FML, è possibile evidenziare che l'incremento del colore non è più solo a carico della variazione di pH (che con la FML subisce un incremento) ma è dovuto alla formazione di polimeri colorati (figura 4.41). Si evidenzia infatti, come i vini trattati prima della FML (C1 ed E1) siano significativamente differenti dagli altri vini. È possibile anche evidenziare che l'acetaldeide formatasi a seguito del trattamento (per i vini 1, cioè quelli trattati prima della FML) sia diminuita per effetto del metabolismo dei batteri lattici e soprattutto perché ha preso parte alle reazioni di polimerizzazione del colore.

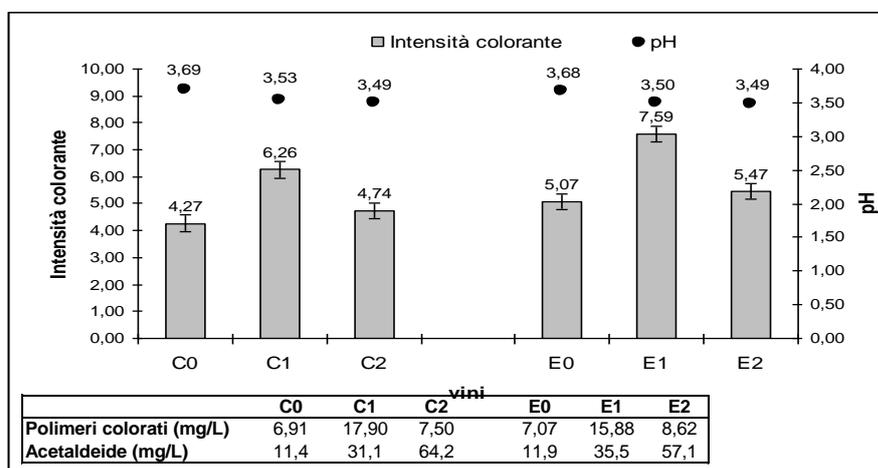


Figura 4.42. Valori di intensità colorante, di polimeri colorati e di acetaldeide sui vini delle tesi C ed E misurati al variare del pH dopo il trattamento con microcorrenti e FML.

Il fenomeno si accentua ulteriormente dopo 90 giorni di maturazione dei vini in bottiglia (figura 4.43). In questo caso anche i vini trattati dopo FML hanno un'intensità colorante come i vini trattati prima della FML e, significativamente diversa e maggiore rispetto ai vini controllo.

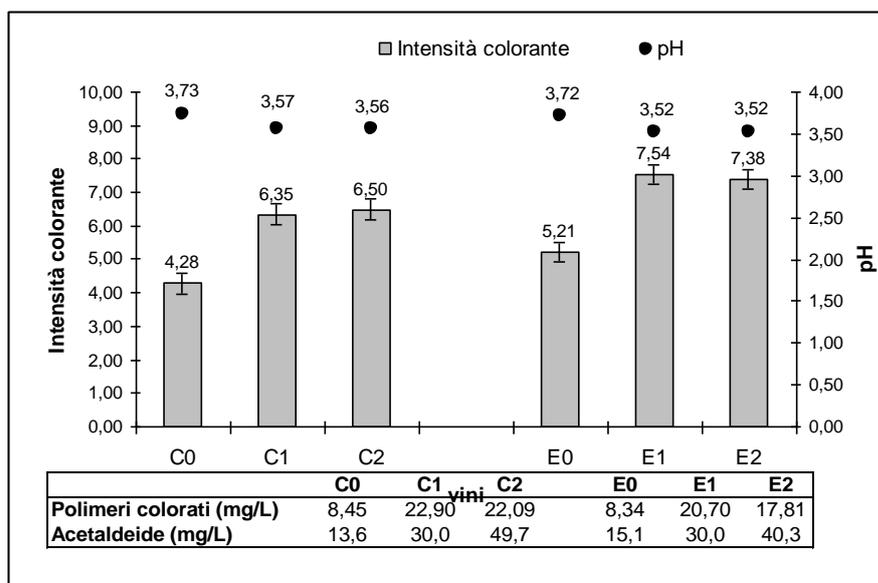


Figura 4.43 Valori di intensità colorante, di polimeri colorati e di acetaldeide sui vini delle tesi C ed E misurati al variare del pH dopo 90 giorni di maturazione in bottiglia.

L'abbassamento del pH, dovuto al trattamento elettrochimico, può essere un aspetto molto interessante nel caso di vini con pH alti. Infatti, tale processo potrebbe essere sfruttato per abbassare in modo naturale il pH del vino. La figura 4.44 mostra come il pH dei vini delle diverse tesi varia nelle varie fasi di produzione, trattamento e maturazione. È evidente come i vini trattati con corrente mantengano pH più bassi anche dopo la fermentazione malolattica (i valori di pH riportati nella figura 4.44 sono stati misurati per i campioni delle varie tesi alla fine della FML, fatta eccezione per i campioni C0 ed E0 per cui si riporta anche il valore prima della FML come termine di paragone).

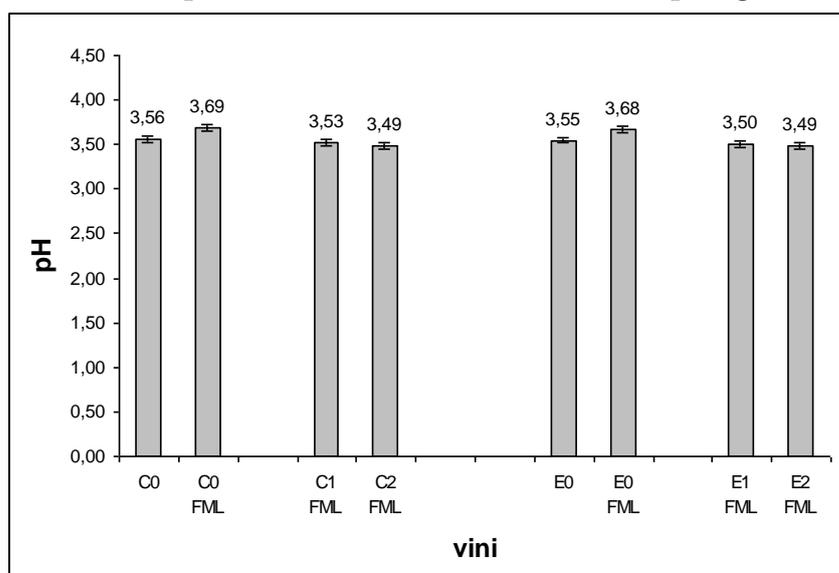


Figura 4.44 Valori di pH dei vini delle tesi C ed E nelle diverse fasi di produzione dei vini (C0 ed E0, vini non trattati prima della FML; C0 FML, E0 FML, vini non trattati analizzati dopo FML; C1 FML, E1 FML, vini trattati prima della FML; C2 FML, E2 FML, vini trattati dopo FML).

Capitolo 5

Conclusioni

Con la presente ricerca è possibile trarre le seguenti considerazioni e conclusioni:

- dalla prima parte dello studio è emersa l'importanza della concentrazione di acetaldeide sulla stabilità del colore e che è possibile applicare le micro correnti a vini con strutture fenoliche diverse. Con l'ottimizzazione delle condizioni si sono identificati gli intervalli di variazione dell'intensità di corrente e del tempo di erogazione per una adeguata produzione di acetaldeide (dosi di desiderabilità). Nella seconda parte della ricerca si è applicato le micro correnti in una fase critica del processo di vinificazione cioè la fermentazione malolattica ed è emerso che:
- il trattamento con microcorrenti effettuato prima dell'avvio della fermentazione malolattica non ha avuto nessun effetto sul metabolismo dei batteri lattici, in quanto, indipendentemente dal ceppo utilizzato, i vini hanno concluso la fermentazione.
- Il momento ottimale per il trattamento dei vini con microcorrenti è alla svinatura, ovvero prima dell'inoculo ed avvio della fermentazione malolattica. La conseguenza è una tempestiva stabilizzazione del colore, con l'incentivazione della formazione dei complessi stabili antociani/tannini. Infatti, durante lo svolgimento della FML si può perdere fino ad un 30% del colore del vino, cosa che non si è verificata nei vini prontamente trattati con microcorrenti. La stabilizzazione del colore è dovuta alla formazione di acetaldeide come conseguenza del trattamento e dall'attivazione delle reazioni dovuta all'applicazione delle correnti stesse.
- L'acetaldeide, prodotta dal trattamento con microcorrenti, subisce una sensibile diminuzione nei vini trattati prima della FML dopo che questa si è conclusa. Questo aspetto è importante per i caratteri sensoriali del vino perché il rischio è che, con contenuti di acetaldeide superiori a 60mg/L (Amerine et al., 1976; Peynaud et al., 1996), il vino presenti carattere di ossidato, ovviamente questa soglia dipende dalla tipologia del vino. La diminuzione del contenuto di acetaldeide può essere spiegata in due modi: l'acetaldeide viene utilizzata per la formazione dei pigmenti polimeri colorati e metabolizzata da parte dei batteri malolattici durante la fermentazione (Jackowetz and Mira de Orduña, 2012).
- I vini delle tesi trattate dopo FML mostrano un'intensità colorante inferiore ai vini trattati prima della FML, come conseguenza della perdita di colore durante la fermentazione. Anche subito dopo il trattamento con correnti

hanno caratteristiche cromatiche simili ai vini non trattati. Un incremento dei pigmenti polimeri, e quindi anche del colore, si manifesta solo dopo 90 giorni di affinamento in bottiglia. Il contenuto di acetaldeide resta comunque superiore a quello dei vini che hanno subito il trattamento prima della FML anche dopo 90 giorni di maturazione.

- Dall'analisi sensoriale dei vini delle tesi trattate sia prima che dopo FML emerge che essi si differenziano da quelli delle tesi non trattate con micro correnti, in particolare, i vini che hanno subito il trattamento dopo FML presentano un lieve carattere di ossidato dovuto alla presenza di quantitativi più elevati di acetaldeide rispetto ai vini trattati prima della FML.

Bibliografia

- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2006) *Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing*, A comprehensive study, *Analytica Chimica Acta*, 563, pp. 238–254.
- Amerine, M. A.; Roessler, E. B. (1976) *Wines, their sensory evaluation*,
- Araya-Farias, M., Mondor, M.; Lamarche, F., Tajchakavit, S, Makhlouf, J. (2008) *Clarification of apple juice by electrofloatation*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, pp. 320-327.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. (2002) *Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making*, *Analytica Chimica Acta*, 458, pp. 15–27.
- Bakker, J. & Timberlake, C.F. (1986) *The mechanism of color changes in aging port wine*, *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, pp. 288–292.
- Bautista-Ortin, A.B., Martinez-Cutillas, A., Ros-Garcia, J.M., Lopez-Roca, J.M., (2005) *Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins*. *International journal of Food Science and Technology* 40; 867-878.
- Berke, B., Chèze, C., Vercauteren, J. and Deffieux, G. (1998) *Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts*, *Tetrahedron Lett.* 39, pp. 5771-5774.
- Berovic, M., Potocnik, M. and Strus, J. (2008) *The influence of galvanic field on *Saccharomyces cerevisiae* in grape must fermentation*, *Vitis*, 47 (2), pp. 117- 122.
- Bertuccioli, M. (1982) *Determinazione gas-cromatografica diretta di alcuni composti volatili nei vini*, *Vini d'Italia*, 24, 149–156.
- Bertuccioli, M. and Rosi, I. (1994) *Product optimization*. In *Understanding Natural Flavors*, London, Blackie Academic & Professional, pp.77-96.
- Bertuccioli, M., Rosi, I., Lencioni, L., Zini, S., Siliani, A. (2001) *Influenza dell'ossigeno sul profilo sensoriale: l'esempio del vino da uve Sangiovese*, *Industrie delle Bevande-XXX ottobre*.
- Bertuccioli, M., Martelli, G.N., Iacopetti, N., Orlandi, D., Perugine, S. and Simoncelli, C. (2007) *Process for wine electrochemical evolution at controlled potential and relevant reactor*, *International Patent* W02007/110396 A1.
- Bertuccioli, M., Puccioni, S., Canuti, V., Siliani, A., Simoncelli, C. (2007) *Control of Wine Redox potential by electrochemical applications*. In: *Oenologie 2007*. 8th International Symposium of Oenologie. (A. Lonvaud-Funel et al.Eds.) Edition TEC&DOC, Paris.
- Bertuccioli, M., Rosi, I., Puccioni, S., Giovani, G. and Canuti, V.(2009) *Effects of electric micro-current on wine characteristics*, *BFE 2009 Proceedings of international Conference on Bio and Food Electrotechnologies*, 22-23 October, Compiègne, France.
- Blaauw, D. (2009) *Micro-oxygenation in contemporary winemaking*, Thesis, Cape Wine Academy, Stellenbosch, South Africa.

- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Unter, S. (1978) *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*, John Wiley & Sons, New York, p. 639.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. (1997) *Empirical model-building and responses surface*, Wiley J. And Sons, New York
- Box, G.E.P, Hunter, W.G.; Hunter, J.S. (1998) *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building*, Wiley J. And Sons, New York.
- Brouillard, R. and Delaporte, B. (1977a) *Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside*, J. Am. Chem. Soc. 99, pp. 8461-8468.
- Brouillard, R. and Dubois, J.E. (1977b) *Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media*, J. Am. Chem. Soc. 99, pp. 1359-1364.
- Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J.E. (1978) J. Am. Chem. Soc., 100, p. 6202.
- Brouillard, R., El Hage Chahine, J. M. (1979) C.R de l'assemblée générale du Groupe Polyphénols, 9, Narbonne.
- Cabranes, C., Moreno, J. & Mangas, J.J. (1998) *Cider production with immobilized Leuconostoc oenos*, Journal of the Institute of Brewing, 104, pp. 127-130.
- Culleré, L., Cacho, j., and Ferreira, V. (2007) *An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma*, J. Agrid. Food Chem., 55, pp. 876-881.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (1996 a) *Polymeric pigments formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B₂, and acetaldehyde*, J Agric Food Chem., 44 (8), pp 2402-2407.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (1996 b) *Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing Malvidin-3-Glucoside and Acetaldehyde*, J Sci Food Agric, 70, pp. 493-500.
- Drinkine, J., Lopez, P., Kennedy J.A., Teissendré, P.L., Saucier C. (2007) *Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age*, J. Agric. Food Chem., 55 (15), pp. 6292-6299.
- Drysdale, G.S. & Fleet, G.H. (1985) *Acetic acid bacteria in some Australian wines*, Food Technology in Australia, 37, pp. 17-20.
- Dueñas, M., Fulcrand, H., Cheynier, V. (2006) *Formation of anthocyanin adducts in model solutions*, Analytica Chimica Acta, 563, pp. 15-25.
- Escudier, J. L., Saint Pierre, B., Batlle J. L., Moutounet, M. (1993) *Procedé et dispositif automatique de stabilisation tartrique de vins*, French Patent FR 2709308-A1.
- Fell, A.J., Dykes, S.I., Nicolau, L. and Kilmartin, P.A. (2007) *Electrochemical Microoxidation of Red Wine*, Am. J. Enol. Vitic., 58:4, pp. 443-450.
- Fiedler, U., Gröbner, U. and Berg, H. (1995) *Electrostimulation of yeast proliferation*, Bioelectrochemistry and Biotechnology, 38, pp. 423-425.
- Fornachon, J.C.M. (1963) *Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 14, pp. 857-862.

- Galvin, C. (1993) - *Tesi di Dottorato in Enologia-Ampelologia*, Université de Bordeaux II.
- Garcia-Puente Rivas, E., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailon, M.T. (2006). *Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation*, *Analytica Chimica Acta*, 563, pp. 215-222.
- Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Bakker, J. (1994) *The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde*, *Vitis*, 33, pp. 37-40.
- Glories, Y. (1978) *Recherches sur la matière colorante des vins rouges*, Tesi di dottorato in scienze, Université de Bordeaux II.
- Glories, Y. (1984-a) *La couleur des vines rouges I Partie. Les equilibres des anthocyanes et des tanins*, *Conn. Vigne Vin*, 18(3),195-217.
- Glories, Y. (1984-b) *La couleur des vines rouges II Partie. Mesure, origine et interpretation*, *Conn. Vigne Vin*, 18(4), 253-271.
- Gómez-Plaza, E., Cano-López, M. (2011) *A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry*, *Food Chem.* 125, pp. 1131-1140.
- Grozeva, L., Tchorbanov, B. & Gyosheva, B. (1994) *Effect of crude extracts of Lactobacillus in increasing the amino N and acetaldehyde levels in yogurt*, *Journal of Dairy Research*, 61, pp. 581-585.
- Hood, A. (1983) *Inhibition of growth of wine lactic-acid bacteria by acetaldehyde-bound sulphur dioxide*, *The Australian Grapegrower & Winemaker*, April, pp. 34, 37-38, 40, 42-43.
- Hynes, M.J., and Coinceanainn, M.O. (2001) *The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin*, *J. Inorg. Biochem.* 85, pp. 131-142
- Jackowitz, J.N. and Mira de Orduña, R. (2012) *Metabolism of SO₂ binding compounds by Oenococcus oeni during and after malolactic fermentation in white wine*. *International Journal of Food Microbiology.* 155:153-157.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon, P. (1984) *Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, pp. 153-156.
- Jurd, L. (1963). *Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins*, *Food Chem.* 33, pp. 225-237.
- Lebovka, N.I., Bazhal, M.I. and Vorobiev, E. (2001) *Pulsed electric field breakage of cellular tissues: visualization of percolative properties*, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, pp. 113-125.
- Lees, G.J. & Jago, G.R. (1977) *Formation of acetaldehyde from 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate in lactic acid bacteria*, *Journal of Dairy Research*, 44, pp. 139-144.
- Leigh, M. S., Andrew, C.C., Geoff, R.S. (2011) *Micro-Oxygenation of Red Wine: Techniques, Applications, and Outcomes*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (2).
- Lòpez, N., Puértolas, E., Condòn, S., Alavarez, I. and Raso, J. (2008) *Effect of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation*

of must of Tempranillo grapes, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, pp. 477-482.

- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Maturo, L., Massarella, F., Zanardini, E. and Ranalli, G. (2003) *Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: the role of electrochemical treatment*, *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp. 1087-1095.
- Mardia, K.V., Kent, J.T. and Bibby, J.M. (1979) *Multivariate analysis*, Academic Press, London, p. 452.
- Marranzini, R.M., Schmidt, R.H., Shireman, R.B., Marshall, M.R. & Cornell, J.A. (1989) *Effect of threonine and glycine concentrations on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in a modified milk prepared by ultrafiltration*, *Journal of Dairy Science*, 72, pp. 1142-1148.
- Marshall, V.M. & Cole, W.M. (1983) *Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus acidophilus and their contribution to flavour production in fermented milks*, *Journal of Dairy Research*, 50, pp. 375-379.
- Mateus, N., Silva, A. M. S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. (2003) *A New Class of Blue Anthocyanin-Derived Pigments Isolated from Red Wines*, *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp. 1919-1923.
- McCloskey, L.P. & Mahaney, P. (1981) *An enzymatic assay for acetaldehyde in grape juice and wine*, *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, pp.159-162.
- Mochizuki, M., Yamazaki, S.I., Kano, K., and Ikeda, T. (2002) *Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1569, pp. 35-44.
- Morata, A., Gómez Cordovés, M.C., Colomo B. and Suarez, J.A. (2003) *Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of Saccharomyces cerevisiae: Relationship with vitisin A and B formation in red wines*, *J. Agric. Food Chem.* 51, pp. 7402- 7409.
- Moutounet, M., Mazauric, j. P., Ducournau, P., Lemaire, T. (2001) *Micro-oxygénation des vins*, Principe at applications technologiques, *Industria delle bevande-xxx giugno*.
- Nevares, I., & Del Alamo, M. (2008) *Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation*, *Analytica Chimica Acta*, 621, pp. 68-78.
- Ough, C.S. & Amerine, M.A. (1958). *Studies on aldehyde production under pressure, oxygen, and agitation*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 9, 111-122.
- Ough, C.S. & Amerine, M.A. (1988) *Methods for Analysis of Musts and Wines*, New York: John Wiley & Sons, pp. 141-148
- Paul, R. (2002) *Micro-oxygenation – Where now? In Proceedings of the ASVO seminar uses of gases in winemaking*, Adelaide, Australian Society of Viticulture and Oenologie, pp. 23-27.
- Peng Z., Iland P.G., Oberholster A., Sefton M. A. Waters E.J.(2002) *Analysis of pigmented polymers in red wines by reversed phase HPLC*, *Australian Journal of Grape and wines research*, 8, 70-75.

- Pérez-Magarino, S., Sanchez-Iglesias, M., Ortega-Heras, M., Gonzalez_Huerta, C., Gonzalez-Sanjosé, M. L. (2007) *Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation*, Food Chemistry, 101, pp. 881-893.
- Perrin, L., Symoneaux, R., Maitre, I., Asselin, C., Jourjon, F., Pages, J., (2008) *Comparison of three sensory methods for use with the Napping® procedure: Case of ten wines from Loire valley*, Food quality and preference, 19,1,1-11.
- Peynaud, E. (1996) *The Taste of Wine*, Wiley: New York.
- Pilkington, B. & Rose, A.H. (1988) *Reactions of Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii to sulphite*. Journal of General Microbiology, 134, pp. 2823-2830.
- Pozo-Bayon, M., M. Monagas, M. Polo, and C. Gómez Cordovés. (2004) *Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red wine varieties*, J. Agric. Food Chem. 52, pp. 1300-1306.
- Puccioni, S., Recchia, A., Fia, A., Dinnella, C., Monteleone E. and Bertuccioli M. (2008) *Micro-current treatments: Effect on the intensità of perceived astringency in red wine*. In "Wine Active Compounds" Proceedings of WAC2008 International Conferente, Edited by David Chassagne, University of Bourgogne, Published by Oeni Pluri Media, pp. 259-260.
- Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Sladaña, G., Álvarez, I., Raso, J. (2010) *Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines*, Food Research International, 43, pp. 761-766.
- Puértolas, E., Sladaña, G., Álvarez, I., Raso, J. (2010) *Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle*, Food Chemistry, 119, pp. 1063-1070.
- Ranalli, G., Iorizzo, M., Lustrato, G., Zanardini, E. and Grazia, L. (2002) *Effects of low electric treatment on yeast microflora*, Journal of Applied Microbiology, 93, pp. 877-883.
- Rankine, B.C. & Pocock, K.F. (1969) *Influence of yeast strains on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 20, pp. 104-109.
- Regolamento (CE) N.440/2003 della commissione del 10 Marzo 2003 (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea 11.3.2003 IT I 66/15)
- Regolamento CEE n 2676/90 della Commissione del 17 Settembre1990 (Gazzetta Ufficiale L 272 3/10/1990).
- Ribèreau-Gayon, P., Pontallier, P. & Glories, Y. (1983) *Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 34, pp. 505-516.
- Ribèreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., (2003). *Trattato di Enologia II, Chimica del vino, Stabilizzazione, Trattamenti, Edagricole*, Bologna. Cap. 6.
- Ribèreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D., (2006) *The chemistry of wine stabilization and treatments*, Handbook of enology Vol. 2, pp.

141-203.

- Romero, C., and Bakker, J. (2000) *Effect of storage temperature and pyruvate on kinetics of anthocyanin degradation, vitisin A. formation and color characteristics of model solution*, J. Agric. Food Chem., 48, pp. 2135-2141
- Rosi, I., Bertuccioli, M., Giovani, G., Bencini, P., Canuti, V., Puccioni, S., Recchia, A. (2008) *Effetto delle micro correnti sulla fermentazione di uve Sangiovese*. In: Atti del Terzo Simposio Internazionale del Sangiovese "Modelli di terroir per vini d'eccellenza", 3-5 dicembre 2008, Palazzo dei Congressi, Firenze.
- Rysstad, G., Knutsen, W.J. & Abrahamsen, R.K. (1990) *Effect of threonine and glycine on acetaldehyde formation in goats' milk yogurt*, Journal of Dairy Research, 57, pp. 401-411.
- Schwarz, M., Wabnitz, T. C., Winterhalter, P. (2003) *Pathway Leading to the Formation of Anthocyanin-Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wines*, J. Agric. Food Chem., 51, pp. 3682-3687
- Somers, T.C. (1972) *The nature of colour in wines*. Food Technology in Australia, 24, pp. 10-12.
- Somers, T.C. (1979) J. Sci. Food Agri., 30, p.133.
- Somers, T.C. (1998) *The Wine Spectrum: an approach towards objective definition of wine quality*, Adelaide, Australia, Winetitles, pp. 80-87
- Stratford, M., Morgan, P. & Rose, A.H. (1987) *Sulphur dioxide resistance in Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces ludwigii*. Journal of General Microbiology, 133, pp. 2173-2179.
- Suarez, R., Suarez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007) *The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera, A review*. Food Chemistry, 102, pp. 10-21.
- Sun, B., Barradas, T., Conceição, L., Santos, C., Spranger, I. (2008) *Formation of new stable pigments from condensation reaction between malvidin 3- glucoside and (-)-epicatechin mediated by acetaldehyde: Effect of tartaric acid concentration*, Food Chemistry, 110, pp. 344-351.
- Thompson, R.S., Jaques, D., Haslam, E., Tanner, R.J.K. (1972) Part I, J.Chem.Soc.Perkins Trans. I, p. 1387.
- Timberlake C.F. & Bridle P. (1976) *Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines*, American Journal of Enology and Viticulture, 27, pp. 97-105.
- Toepfl, S., Heinz, V, Knorr, D. (2007) *High intensity pulsed electric fields technology for the food industry*, In J. Raso & V. Heinz (Eds). Pulsed electric fields technology for the food industry, New York: Springer, pp.197-222.
- Vivas, N., Nonier, M.F., (2007) *L'élevage en barrique sur lies des vins rouges; Intéret des oxydations en conditions de reduction*, Revue des Enologues , 125S pp. 9-15.
- Watson, B., Goldberg, N., Chen, H. P., McDaniel M., (1999) *Effects of macerating pectinase enzymes on color, phenolic profile and sensory characteristics of Pinot Noir wines*. Burgundy-California-Oregon Winemaking Symposium: American Vineyard Foundation, 24-6.
- Weeks, C. (1969) *Production of sulfur dioxide-binding compounds and of sulfur dioxide by two Saccharomyces yeasts*, American Journal of Enology and

Viticulture, 20, pp. 32–39.

- Wildenradt, H.L. & Singleton, V.L. (1974) *The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging*, American Journal of Enology and Viticulture, 25, pp. 119–126.
- Wilkins, D.W., Schmidt, R.H. & Kennedy, L.B. (1986a) *Threonine aldolase activity in yoghurt bacteria as determined by headspace gas chromatography*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, pp. 150–152.
- Wilkins, D.W., Schmidt, R.H., Shireman, R.B., Smith, K.L. & Jezeski, J.J. (1986b). *Evaluating acetaldehyde synthesis from L-[14C(U)] threonine by Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus*, Journal of Dairy Science, 69, 1219–1224.
- Zeng, X. A., Yu, S. J., Zhang, L. and Chen, X. D. (2008) *The effects of AC electric field on wine maturation*, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 9, pp. 463–468.