



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari

Scuola di Dottorato di Ricerca

Scienze e biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni alimentari

Direttore: Prof. Giuseppe Pulina

Indirizzo

Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Coordinatore: Prof.ssa Marilena Budroni

XXIII Ciclo – Triennio Accademico 2008-2010

EVOLUZIONE DEI COMPOSTI POLIFENOLICI IN VINI BIANCHI DELLA SARDEGNA
DURANTE LA CONSERVAZIONE IN BOTTIGLIA E CARATTERIZZAZIONE AROMATICA

Tesi di dottorato:

Dott.ssa Cinzia Fanara

Docenti Tutor: Prof. Antonio Piga e Dott.ssa Alessandra Del Caro

A Fabio

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 I vini della Sardegna.....	5
1.2 I vini bianchi sardi.....	6
2. Principali classi di composti fenolici coinvolte nell'invecchiamento dei vini bianchi.....	12
2.1 Polifenoli: sintesi e metabolismo.....	12
2.1.1 Il metabolismo fenilpropanoidico.....	12
2.1.2 Biosintesi dei flavonoidi.....	22
3. Classificazione dei polifenoli.....	29
3.1 Flavonoidi	31
3.1.1 Antociani.....	33
3.1.2 Flavanoli.....	34
3.1.3 Flavanoli e diidroflavanoli.....	39
3.2 Acidi fenoli non-flavonoidi.....	43
3.2.1 Acidi idrossibenzoici (HBA)	43
3.2.2 Acidi idrossicinnamici (HCA)	45
3.2.3 Fenoli volatili	48
3.2.4 Stilbeni.....	49

4. Componente volatile del vino	53
4.1 Gli aromi delle uve e dei vini	55
4.1.1 Aromi varietali	58
4.1.1.1 Terpen.....i.....	60
4.1.1.2 Norisoprenoidi.....	63
4.1.1.3 Le metossipirazine	71
4.1.1.4 Composti solforati che possiedono una funzione tiolica	72
4.2 Aromi di fermentazione (o secondari).....	73
4.3 Aromi terziari.....	84
5. Evoluzione composti polifenolici durante la conservazione	86
5.1 Imbrunimento enzimatico del vino	88
6. Evoluzione degli aromi varietali durante la conservazione del vino	95
7. Materiali e metodi	102
7.1 Analisi chimico-fisiche	103
7.1.1 Determinazione del pH.....	103
7.1.2 Determinazione del contenuto di solidi solubili.....	104
7.1.3 Determinazione dell'acidità totale	104
7.1.4 Determinazione del grado alcolico.....	105
7.1.5 Determinazione della SO ₂ libera e totale	106
7.1.6 Determinazione del colore.....	107

7.2 Analisi spettrofotometriche dei composti fenolici.....	110
7.2.1 Protocollo di estrazione dei composti polifenolici da uve Bianche.....	110
7.2.2 Determinazione dei polifenoli totali	111
7.2.3 Determinazione dei flavani reattivi alla vanillina	112
7.2.4 Determinazione delle proantocianidine	113
7.3 Determinazione della componente polifenolica attraverso HPLC-DAD.....	114
7.4 Estrazione ed analisi dei componenti volatili liberi e degli agliconi	116
8. Risultati e discussione.....	118
8.1 Dati chimici.....	118
8.1.1 Moscato.....	118
8.1.2 Malvasia.....	125
8.2 Composizione polifenolica.....	131
8.2.1 Moscato.....	131
8.2.1.1 Acidi Fenolici.....	131
8.2.1.2 Flavonoidi	133
8.2.2 Malvasia.....	135
8.2.1 Acidi Fenolici.....	135
8.2.2 Flavonoidi.....	137

8.3 Profilo aromatico	138
8.4 Evoluzione aromatica dopo un anno di conservazione in bottiglia.....	147
8.4.1 Alcoli C-6 e alcoli superiori	147
8.4.2 Esteri.....	151
8.4.3 Terpeni	155
8.4.4 Acidi, lattoni, fenoli, aldeidi e altri composti.....	158
9. Conclusioni.....	164
Bibliografia.....	170
Ringraziamenti.....	199

1. INTRODUZIONE

1.1 Tradizione Vitivinicola in Sardegna

In Sardegna il vigneto è parte integrante del paesaggio. E' presente quasi ovunque, dalle pianure più fertili vicino al mare sino all'alta collina e alle zone più interne, dove spesso la coltivazione della vite è ancora magicamente legata ad antiche tradizioni. La vitivinicoltura ha sempre svolto un ruolo importante nell'economia agricola sarda, la particolare conformazione orogenetica e territoriale di questa regione consente una viticoltura moderatamente intensiva, caratterizzata da una produzione enologica di elevata qualità che in alcune aree particolarmente favorite raggiunge spesso l'eccellenza. I reperti archeologici rinvenuti in alcuni siti nuragici propongono l'affascinante tesi della presenza di attività enologiche già in epoca nuragica. Altri studi definiscono l'importante ruolo svolto dalla Sardegna nella domesticazione della vite selvatica, a cui contribuirono i popoli che, giungendo nell'isola nel corso dei secoli, introdussero pratiche agronomiche fino ad allora sconosciute. Infatti, è quasi certo che la *Vitis vinifera*, al pari dell'olivo, sia in Sardegna una pianta indigena, selvatica, e che i popoli sopraggiunti non portarono tanto il ceppo o il sarmento, bensì l'arte dell'innesto, della coltivazione, e le tecniche di produzione e di conservazione del vino. Dai fenici ai bizantini arriva un prezioso contributo allo sviluppo della vitivinicoltura. La Sardegna ha visto il susseguirsi di numerose dominazioni: popolazioni semitiche, cretesi e fenicie crearono le loro basi di appoggio in diversi punti della costa; tra queste Tharros e Kalaris che divennero importanti e prosperose colonie. Seguirono i punici, i romani e i bizantini. I fenici, grandi viticoltori, ma anche esperti navigatori, nell'intento di dare maggiori opportunità di sviluppo ai loro commerci nel

Mediterraneo centro-occidentale, diffusero la coltura della vite proprio nelle aree attorno alle colonie. I punici troveranno una viticoltura già impostata che, in virtù di rapporti più intensi con il popolo sardo, diventerà coltura dominante nelle colonie di Kalaris, Tharros, Cornus, Nora e Olbia. Con la violenta estromissione dei punici da parte dei romani inizia, per la Sardegna, un lungo periodo di dominazione, di cui sono rimaste numerose testimonianze archeologiche, relative alla vitivinicoltura praticata in quell'epoca. Di particolare evidenza i ritrovamenti nel grande e importante complesso del nuraghe Arrubiu ad Orroli, in cui sono state rinvenute delle zone adibite a veri e propri laboratori enologici datati tra il II e IV sec d.C, provvisti di vasche per la pigiatura dell'uva, basi di torchi e contenitori vari. Ma la scoperta più sorprendente è forse quella dei numerosi vinaccioli, risalenti allo stesso periodo, ritrovati negli strati sottostanti dello stesso nuraghe e riconducibili a vitigni autoctoni ancora oggi largamente diffusi. Numerosi riferimenti all'epoca romana imperiale si riscontrano un pò ovunque: necropoli e tombe con decorazioni e suppellettili di evidente riferimento enologico, termini agronomici di origine latina e tecniche di allevamento delle vigne ancora oggi in uso. L'epoca romana finì verso la metà del V secolo con le invasioni vandaliche; all'abbandono delle colture che accompagnò questo periodo seguì una successiva ripresa dell'intensa attività agraria ad opera dei bizantini, ai quali si deve, oltre alla normativa colturale piuttosto rigorosa e dettagliata, l'introduzione di nuovi vitigni. La Sardegna bizantina faceva parte di una delle sette provincie d'Africa, e quando nel sec.VII le popolazioni arabe convertite all'islamismo invasero i territori affacciati sul Mediterraneo, la Sardegna fu coinvolta solo marginalmente, attraversando quasi indenne il periodo delle imposizioni musulmane di

divieto nel consumo del vino, così che l'attività vitivinicola sarda non subì interruzioni. Nel periodo dei giudicati si ha il primo esempio di legislazione moderna. A seguito del declino dell'Impero bizantino nasceranno i Giudicati di Cagliari, Arborea, Torres e Gallura. Durante il periodo Giudicale la Sardegna fu interessata a consolidare e incrementare le produzioni vitivinicole, proteggendo la coltura della vite e il commercio del vino attraverso una regolamentazione esemplare, codificata nella "Carta De Logu", promulgata da Eleonora di Arborea alla fine del 1300. Tale documento prevedeva pene severe, in genere pecuniarie, ma che potevano arrivare sino al taglio della mano destra, per chi sradicava la vigna altrui o vi appiccava fuoco. Nel "Codice degli Statuti del Libero Comune di Sassari", risalente alla fine del 1200, all'art. 128 si disciplina l'esuberanza della vite nel nord dell'isola, introducendo già in quell'epoca il moderno e attuale sistema di regolamentazione d'impianto dei nuovi vigneti:

("De non pastinare vigna: Non sia lecito a nessuna persona, maschio o femmina, piantare o far piantare vigna nel territorio di Sassari e nel suo distretto, salvo che qualcuno che abbia della vigna e la voglia estirpare dal fondo, potrà piantarne quanto ne avrà estirpata, e se qualcuno avesse del territorio incolto entro i limiti della sua vigna, potrà piantare tale terreno, e ciascuno potrà piantare "tricla" o uva simile che non venga trasformata in vino.....").

Tra il XIII° e XVIII° secolo, con la dominazione aragonese e spagnola, vennero introdotte nell'isola nuove cultivar sia a bacca bianca che nera, ancora oggi largamente coltivate.

Alcuni storici attribuiscono a questo periodo anche l'introduzione di un nuovo sistema di allevamento della vite detto "alla catalana", cioè senza sostegno, diverso dalla forma "alla sardisca", in cui la pianta si appoggiava a sostegni morti. Altri storici sostengono però che questo sistema fosse già praticato in Sardegna in epoca romana da cui il termine "alberello latino" ancora oggi largamente utilizzato. Alla fine dell'Ottocento, cioè prima che la fillossera decimasse gli impianti viticoli, in Sardegna erano presenti circa 80 mila ettari di vigneto specializzato. Dopo la ricostruzione degli impianti, applicando l'innesto su "piede" americano, la viticoltura in Sardegna riprese via via ad espandersi fino ad investire una superficie di circa 75 mila ettari. Alla crescita viticola, programmata con gli incentivi della Regione Sarda, ha fatto seguito lo sviluppo cooperativo per la trasformazione delle uve in moderni stabilimenti enologici. La struttura vitivinicola, ben articolata e sempre in costante aggiornamento affianca oggi stabilimenti cooperativi e strutture private, rappresentate da piccole e medie aziende, modernamente attrezzate, all'avanguardia nell'organizzazione della produzione e della commercializzazione dei vini. Con l'applicazione di nuove e avanzate tecnologie, la Sardegna si eleva finalmente nella produzione e commercializzazione di vini di alta qualità, in grado di competere con le migliori produzioni europee. In quest'isola ospitale e generosa, il clima, il suolo e i vitigni sapientemente valorizzati dall'uomo, danno vita a vini di grande qualità, alcuni vigorosi e dalla forte personalità, altri eleganti e aristocratici, sempre concepiti in armonia tra produzione e ambiente. L'equilibrio e le singolari sensazioni olfattive e gustative che questi vini sanno dare, riportano inevitabilmente l'immaginazione verso questa straordinaria terra, profumata di macchia mediterranea, sferzata dal maestrale e cullata dalle brezze marine,

ricca di antiche e suggestive tradizioni rimaste immutate nel tempo (Casu *et al.*, 2007; Di Felice *et.al*, 1999)

1.2 I Vini della Sardegna

La Sardegna vanta una DOCG (Denominazione di Origine Controllata e Garantita), ossia il Vermentino di Gallura, 19 DOC (Denominazione di Origine Controllata) e 15 IGT (Indicazione Geografica Tipica). Le DOC in alcuni casi coprono l'intero territorio regionale e dunque accanto al nome del vitigno compare quello della regione (Cannonau di Sardegna, Monica di Sardegna, Moscato di Sardegna, Vermentino di Sardegna e Sardegna Semidano). In altri casi, invece, l'area è più ristretta e dunque si hanno ad esempio il Nasco di Cagliari, il Monica di Cagliari, la Vernaccia di Oristano, la Malvasia di Bosa, il Carignano del Sulcis, ecc. Ma la gamma dei vini sardi è assai vasta. Nell'ultimo ventennio molti dei più importanti produttori di vino della Sardegna si sono impegnati nel recupero e rivalorizzazione dei vitigni autoctoni presenti in Sardegna. La crisi del settore vinicolo e la concorrenza dei paesi emergenti come l'Australia e il Cile spinge a lavorare in questa direzione. Infatti, solo con l'utilizzo di vitigni storicamente legati a un territorio si può arrivare alla produzione diversificata di vini di qualità difficilmente imitabili da altri paesi. In questo senso la Sardegna è avvantaggiata in quanto sono presenti molti vitigni autoctoni che solo in Sardegna hanno trovato il loro habitat naturale e che utilizzati in particolari uvaggi hanno dato vita a vini di altissima qualità.

1.2.1 Vitigni Sardi Bianchi

La produzione dei vini bianchi si concentra nel nord e nel centro dell'isola mentre quella dei vini rossi è più diffusa al sud. I vitigni bianchi della Sardegna sono i seguenti:

Albaranzeuli Bianco - Questo vitigno sardo a bacca bianca, denominato pure Albillo ed Albicello, ha delle omologie genetiche con l'Albanello/a marchigiano o siciliano. Si tratta di un vitigno rustico, piuttosto produttivo, resistente alle crittogame, in grado di dare buoni risultati enologici soprattutto se vinificato in uvaggio con altre varietà locali. La sua origine è alquanto incerta, probabilmente di lontana provenienza spagnola, è attualmente in via di estinzione. La sua diffusione, estremamente limitata, riguarda alcuni comuni dell'Oristanese, dove viene denominato Lacconargiu o Lacconarzu, e qualche vecchio vigneto del Nuorese. Non sono note le caratteristiche organolettiche dei vini ricavati dalla sua vinificazione in purezza.

Arvesiniadu - Questo vitigno probabilmente autoctono sardo è anch'esso a rischio di estinzione. Conosciuto anche con il nome di Arvu Siniadu, Argu Ingiannau o Uva Oschirese, è diffuso sporadicamente in provincia di Sassari, talvolta in Campidano. È un vitigno molto vigoroso, con grappoli grossi ed allungati, molto spargoli, acini piccoli, ben adattato a terreni leggeri di collina, preferibilmente granitici. Attualmente alcune piccole aziende lo stanno vinificando in purezza.

Malvasia- Il Malvasia è un vino DOC ed è uno dei vitigni bianchi maggiormente diffusi in tutte le zone viticole del Mediterraneo e la cui origine si perde nei secoli, anche se il suo nome viene fatto risalire al porto greco di Monemvasia, nel Peloponneso; tra l'altro i vitigni

denominati Malvasia sono molto numerosi e non sempre simili: il Bruni descrivendo il Malvasia coltivato in Sardegna, ad evitare equivoci lo chiama giustamente Malvasia di Sardegna. L'origine del vitigno Malvasia sarda si fa risalire all'epoca bizantina e certamente arrivò in Sardegna tramite gli approdi di Karalis e di Bosa; infatti, ha la sua maggiore diffusione nel Campidano di Cagliari e nelle colline della Planargia che si affacciano sulla foce del Temo, l'unico fiume navigabile sardo, anche se per un breve tratto. Tutti gli studiosi dell'enologia sarda concordano nel rilevare la netta differenza tra il vino Malvasia ottenuto nel Campidano e quello ottenuto a Bosa, differenza certamente non del tutto imputabile alle diverse condizioni pedoclimatiche ed anche ciò conferma l'esistenza di due diversi cloni di un'unica varietà giunti in Sardegna nelle due differenti zone. L'origine greca del vitigno Malvasia viene confermata dalla voce dialettale con cui esso viene indicato nel Nuorese Alvaréga, cioè bianca greca, assieme agli altri sinonimi Malvagia, Marnaxia, Manusia, mentre il Moris la definisce Uva malvatica. Il Gemelli testualmente riporta: “Nella classe dei vini potenti ripongo la Malvagia di Cagliari, più potente di ogni altra, la più famosa di Bosa, e quella di Sorso e quella pure di Alghero e ciò conferma che nel XVIII secolo ormai questo vitigno era diffuso in tutta l'Isola”. Dalla vinificazione del vitigno Malvasia si ottengono in Sardegna due vini DOC, Malvasia di Cagliari e Malvasia di Bosa, ognuno dei quali con diverse tipologie e completamente differenti: senz'altro più caratterizzato il secondo che necessita di un certo periodo di invecchiamento per esprimere il meglio; nella Planargia vengono anche commercializzati dei pregevoli vini Malvasia non sottoposti ad invecchiamento ed un ottimo spumante demi-sec, ottenuto anch'esso dalla vinificazione di Malvasia. (Crespan *et. al.*, 2006)

Moscato - Il vitigno bianco Moscato, come del resto il vitigno Malvasia, ha origini antichissime: diffuso in tutte le regioni viticole si caratterizza per il tipico aroma primario, detto appunto di moscato. Il Moscato era molto noto ai tempi dei Romani che lo chiamavano *Vitis apiana*, cioè vite delle api, in quanto facilmente questi insetti vengono attirati dal dolcissimo sapore, ma data la sua diffusione potrebbe essere arrivato in Sardegna anche in epoca pre-romana.

La prima denominazione di moscato risale agli inizi del 1300, viene citata nel trattato di Pier de' Crescenzi e potrebbe, in analogia al nome latino, essere dovuta alla facilità con cui quest'uva attrae le mosche per la sua dolcezza. Nella nostra regione si ottengono tre vini Moscato, dalla diversa tipologia, nel Campidano, nella Romangia e in Gallura: è evidente che i vitigni interessati siano derivati da diversi cloni di Moscato, giunti, con tutta probabilità, tramite i porti di Karalis, Turrus e Olbia, e che abbiano trovato il loro habitat ideale nelle zone circostanti, differenziandosi leggermente. In Sardegna è conosciuto anche con le voci dialettali Muscadella, riportata dal Manca dell'Arca e Muscadeddu o Muscau dal Moris. Le condizioni pedoclimatiche influenzano decisamente la qualità dell'uva e quindi quella del vino ottenibile: nei terreni su substrato calcareo tipici del Campidano e della Romangia l'uva si presenta molto zuccherina, ricca di aromi, ma povera di acidi, mentre nei terreni granitici della Gallura si ottiene un'uva meno zuccherina, ma più acidula e con un caratteristico delicato aroma, che si presta ottimamente per ottenere il rinomato vino spumante. Con il vitigno Moscato coltivato in Sardegna si producono tre distinti vini DOC: il Moscato di Cagliari, dolce naturale o liquoroso, il Moscato di Sorso-Sennori,

caratterizzato dall'essere un liquoroso dolce naturale, ed infine il Moscato di Sardegna spumante, in cui si identifica la sottodenominazione Tempio o Gallura.

Nasco - Già conosciuto in epoca romana, questo vitigno a bacca bianca deriva il suo nome dal latino *quotmuscus* ovvero "muschio", per via del caratteristico aroma avvertibile specialmente nell'uva matura e nel vino invecchiato. La sua diffusione, limitata all'entroterra di Cagliari, avvalorerebbe l'ipotesi di una sua introduzione attraverso l'approdo di Karalis. Mediamente vigoroso e produttivo, esprime le sue migliori caratteristiche su terreni piuttosto sciolti, in aree a clima caldo e asciutto, dove esprime una mediocre resistenza alle avversità climatiche ed ai principali patogeni. Attualmente la sua coltivazione, ridotta a pochi ettari, è circoscritta alle aree viticole di alcuni comuni in provincia di Cagliari, dove è alla base della DOC Nasco di Cagliari, prodotto nelle province di Cagliari e Oristano. Il vino che se ne ricava è liquoroso, di colore giallo dorato, con delicati aromi di moscato e di mandorla amara, di media struttura, con fin di bocca piacevolmente amarognolo.

Nuragus - L'origine del vitigno Nuragus si perde nell'arco dei tempi: è certamente uno dei primi vitigni introdotti in Sardegna, con molta probabilità dai navigatori fenici all'atto della fondazione della città di Nora, i cui ruderi si trovano ai margini meridionali della pianura del Campidano. Questa ipotesi è basata oltre che sul nome (il prefisso *quotnur* è di derivazione fenicia), anche sull'area di diffusione, limitata appunto alla pianura retrostante l'approdo. Questo vitigno non ha particolari esigenze pedoclimatiche, resiste abbastanza bene alle crittogame e ha un'ottima produttività: infatti raggiunge nei vigneti tradizionali ad alberello anche i 100 q/ettaro, quando in analoghe circostanze altri vitigni difficilmente

arrivano ai 50 q/ettaro. Questa è una delle ragioni per cui all'atto della ricostituzione dei vigneti fillosserati si è preferito il Nuragus al senz'altro migliore, ma più delicato, Semidano. Dalla vinificazione del Nuragus si ottiene l'omonimo vino DOC Nuragus di Cagliari nelle tipologie frizzante e amabile; inoltre l'uva raccolta anticipatamente viene utilizzata per la produzione di base di spumante brut. Il vino comune ottenuto dai vigneti tradizionali, di facile maderizzazione, viene usato come vino da taglio o vino base per la preparazione di vermouth.

Retagliado - Chiamato anche Bianca Lucida, Retagliadu, Rechilliau o Retellau, a seconda della zona nella quale è coltivato, questo vitigno a bacca bianca si ritiene autoctono sardo per le numerose citazioni da parte di diversi Autori. È un vitigno molto vigoroso e produttivo che predilige terreni calcareo-argillosi, ben esposti ed asciutti. Attualmente, esso è sporadicamente diffuso in Gallura, dove viene utilizzato solo in uvaggio con il Vermentino o con altre varietà locali, per l'ottenimento di vini di ottima qualità.

Semidano - La zona di produzione del Semidano comprende l'intero territorio delle province di Cagliari, Sassari, Nuoro e Oristano. Il vino che qui si produce è ottenuto con le uve del vitigno Semidano (minimo 85%) a cui possono essere aggiunte altre varietà a bacca bianca della zona, non aromatiche. Il Semidano è un vitigno diffuso nell'isola fin dal XVIII secolo. Molto apprezzato per la sua versatilità, vinificato in purezza regala vini freschi e beverini, mentre in uvaggio con altre uve ingentilisce i vini bianchi sardi. Del vino Semidano esiste la variante Superiore, con una gradazione minima del 13%, Spumante e versione Passito. È ottenuto da uve provenienti dai vigneti situati nel territorio del comune di Logoro e di altri otto comuni in provincia di Oristano e in quello dei comuni di Collinas,

Sardara e Villanovaforru, in provincia di Cagliari, che si fregiano in etichetta dell'indicazione della sottozona Mogoro.

Vernaccia di Oristano - La denominazione quot Vernaccia viene spiegata come derivante dal latino *quotvernaculus*, che significa "del posto". Secondo l'ipotesi più accreditata, l'introduzione di questo vitigno in Sardegna sarebbe dovuta ai Fenici che l'avrebbero introdotta attraverso il porto di Tharros. La Vernaccia di Oristano, da non confondersi con la Vernaccia di San Gimignano, è diffusa e coltivata esclusivamente in Sardegna, nella Valle del Tirso da sempre famosa per la coltivazione pressoché esclusiva di questo straordinario vitigno sardo (uno dei pochi a potersi definire realmente autoctono). Dallo stesso si ricava l'omonimo vino DOC, dal colore giallo, dorato e ambrato, dal profumo delicato, alcolico, con sfumature di fiori di mandorlo e un sapore fino, sottile, caldo, con leggero e gradevole retrogusto di mandorle amare. Grado alcolico minimo di 15,5 e invecchiamento obbligatorio di due anni in botti di castagno o di rovere. È un buon vino da fine pasto. Con una grado alcolico di 15,5 e tre anni di invecchiamento la Vernaccia può portare la qualifica superiore; per la riserva occorrono, invece, quattro anni di invecchiamento. Si produce anche nei tipi Liquoroso dolce e Liquoroso secco o dry, con un invecchiamento di due anni e un grado alcolico di 16,5 nel tipo dolce e di 18 nel tipo secco o dry, tipologie indicate come vino da dessert e da meditazione. Particolarmente interessante è il metodo di produzione: il vino viene affinato in botti di castagno o di rovere tenute in parte scolme, in ambienti soggetti a forti sbalzi termici.

2. Principali classi di composti fenolici coinvolte nell'invecchiamento dei vini bianchi

Il vino è un sistema assai complesso capace di subire una serie di innumerevoli cambiamenti durante la conservazione e affinamento in bottiglia. L'affinamento contribuisce ad arricchire e valorizzare la qualità dei vini rossi (Somers *et al.*, 1990), nei vini bianchi invece può causare alterazioni del colore (imbrunimento) e dell'aroma con perdita di qualità ed economica (Singleton *et al.*, 1982). Comunque, in alcuni vini bianchi, l'affinamento in bottiglia, può contribuire alla formazione di una serie di aromi caratteristici derivanti dai processi fermentativi secondari (aromi secondari). (Marais *et al.*, 1980).

2.1 Polifenoli: biosintesi e metabolismo

2.1.1 Il metabolismo fenilpropanoidico

I fenilpropanoidi rappresentano un gruppo molto numeroso di prodotti naturali, derivati dall'acido shikimico, tra i quali le classi di composti più importanti sono gli acidi idrossicinnamici e le cumarine (Fig 1).

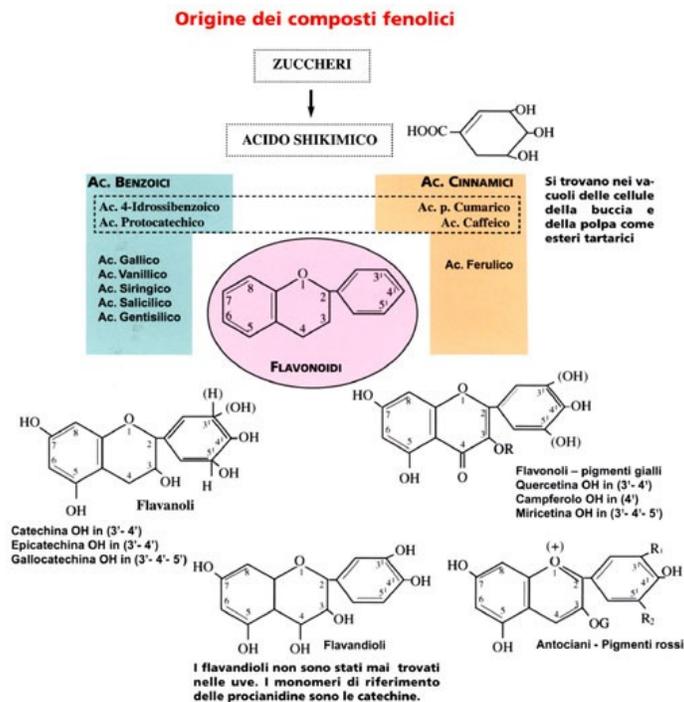


Fig. 1 Schema biosintesi composti fenolici

Il metabolismo fenilpropanoide comprende una sequenza di reazioni che porta alla formazione di derivati attivati dell'acido cinnamico a partire da fenilalanina e/o tirosina (Fig. 2).

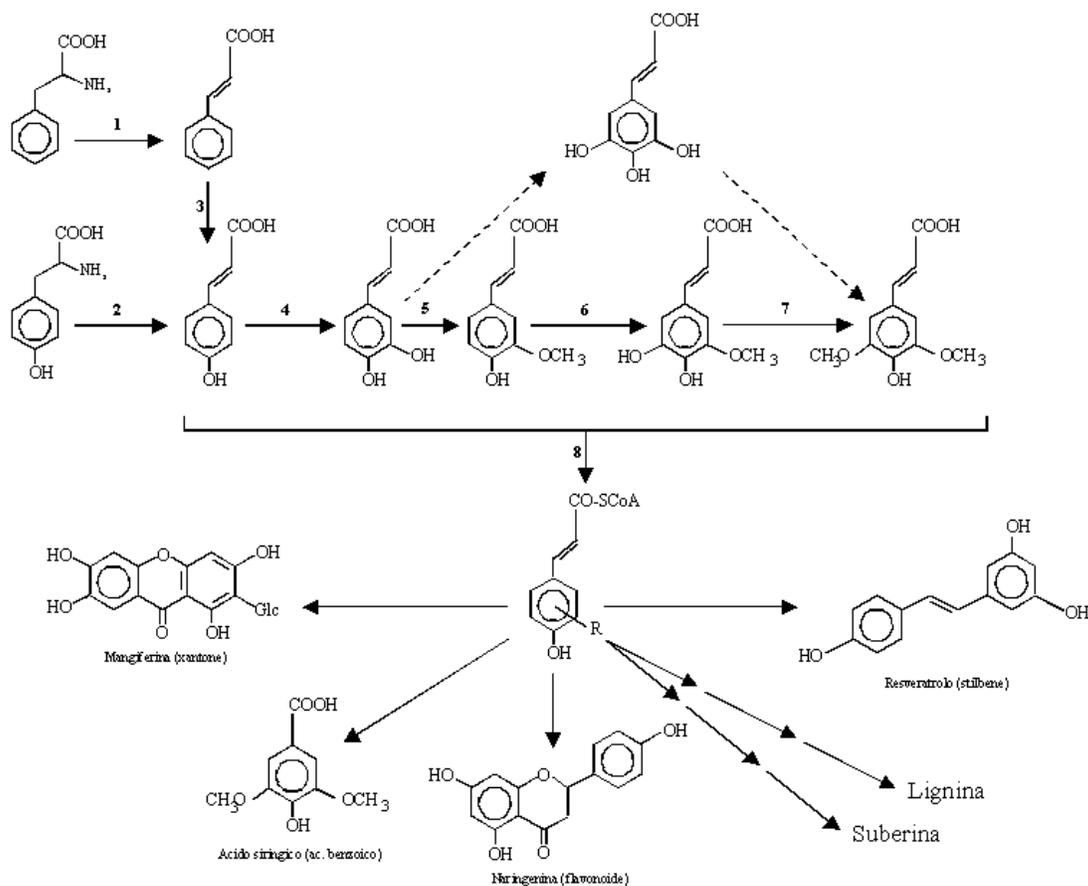


Fig. 2 Metabolismo fenilpropanoico e principali strutture derivate dagli acidi cinnamici. Gli enzimi sono: 1= fenilalanina ammonio liasi; 2= tirosina ammonio liasi; 3= acido cinnamico 4-idrossilasi; 4= *p*cumarato 3-idrossilasi (fenolasi); 5 e 7= catecolo *O*-metiltransferasi; 6= ferulato 5-idrossilasi.

L'enzima chiave di questo pathway biosintetico è la fenilalanina ammonio liasi (PAL), il quale catalizza la deaminazione della L-fenilalanina con conseguente formazione di quantità equimolari di acido *trans*-cinnamico e ione ammonio, il quale fornisce un legame

tra metabolismo primario e metabolismo fenilpropanoidico. Lo ione ammonio generato dalla PAL viene incorporato in glutammina via glutammina sintetasi (GS) e, successivamente, in glutammato via glutammina: 2-ossiglutarato amminotrasferasi (GOGAT). Il glutammato così formatosi funge da donatore di azoto nella biosintesi degli amminoacidi aromatici, in particolare viene utilizzato nella formazione di arogenato a partire da p-fenilalanina ed, in seguito, trasformato in fenilalanina e tirosina, viene reimmesso nel metabolismo fenilpropanoidico. In mancanza di un efficiente riciclaggio dello ione ammonio possono osservarsi sintomi di deficienza di azoto e/o di tossicità da ione ammonio. Un enzima analogo alla PAL, la tirosina ammonio liasi (TAL), ritrovato essenzialmente nelle *Graminaceae*, catalizza in maniera analoga la deaminazione della tirosina con formazione dell'acido *trans*-p-cumarico. La biosintesi dei composti C6-C3 ha, quindi, origine a partire da un amminoacido aromatico, la L-fenilalanina o la L-tirosina, e comprende una serie di reazioni in cui, dopo la deaminazione dell'amminoacido, si susseguono una serie di sostituzioni sull'anello aromatico, idrossilazioni e metossilazioni, che portano alla formazione dei vari derivati dell'acido 4-idrossicinnamico (acido p-cumarico). L'attività PAL è stata purificata e caratterizzata in numerosissime specie vegetali. L'enzima presenta una certa omogeneità nelle diverse preparazioni: l'enzima estratto dalle piante superiori ha un peso molecolare di circa 330.000 Da, più grande di quello estratto da *Streptomyces verticillatus* che ha un peso di 226.000 Da, ed è composto da 4 subunità, probabilmente identiche (PM circa 83.000 Da). Nel sito attivo, due o quattro per tetramero, è stata identificata una deidroalanina quale costituente essenziale del centro catalitico. Molte preparazioni enzimatiche si sono rivelate in grado di catalizzare

l'eliminazione di ammoniaca da diversi derivati o-, m- e p-sostituiti della fenilalanina, inclusa la tirosina. Questi dati hanno sollevato la questione relativa all'esistenza di un unico enzima responsabile di tutte le attività osservate o, alternativamente, di più enzimi responsabili della catalisi nelle diverse reazioni. E' stato proposto che PAL e TAL possano essere due distinti enzimi presenti in alcune specie vegetali, ma di fatto non sono stati ritrovati casi di specie vegetali in cui fosse presente la sola attività TAL disgiunta dall'attività PAL. Al contrario, esistono numerosissimi casi di preparazioni enzimatiche in cui è presente la sola attività PAL, pertanto l'unica generalizzazione possibile è che alcune preparazioni di PAL presentano un'attività catalitica nei confronti della tirosina. Il prodotto della deaminazione della fenilalanina, l'acido trans-cinnamico, viene, successivamente, convertito in acido 4-idrossicinnamico sotto l'azione catalitica dell'acido cinnamico 4-idrossilasi (CA4H), un'ossidasi che richiede ossigeno molecolare ed NADPH come cofattori. L'acido p-cumarico, a sua volta, viene convertito nel suo corrispondente derivato attivato, il p-cumaroil-coenzima a tioestere, ad opera di una idrossicinnamato: CoA ligasi (4CL), un enzima con una pronunciata specificità nei confronti dei derivati dell'acido cinnamico caratterizzati dalla presenza di un gruppo OH libero sull'anello benzenico ed il quale richiede ATP e CoASH come cofattori. Il derivato attivato dell'acido p-cumarico, oltre che da prodotto finale del metabolismo fenilpropanoidico, funge da precursore nella biosintesi di altri composti fenolici. Oltre alla CA4H, una mono-ossigenasi citocromo P-450-dipendente legata a membrana, che utilizza NADPH come agente riducente mentre il ferro del citocromo si combina con l'O₂ prima che questo si combini con il substrato, nel pathway C6-C3 sono coinvolte altre idrossilasi: la cinnamato-2-idrossilasi, un enzima non

ben caratterizzato il quale produce acido o-cumarico, ed una fenolasi che catalizza la conversione dell'acido p-cumarico in acido caffeico (acido 3,4-diidrossicinnamico) con l'introduzione di un secondo gruppo -OH in un monofenolo in posizione orto rispetto al gruppo -OH preesistente ed, usualmente, in posizione meta rispetto alla catena laterale di atomi di carbonio (C3). Quest'ultimo enzima, una mono-ossigenasi contenente rame in grado di accettare equivalenti riducenti da un ampio raggio di donatori di idrogeno, presenta una specificità piuttosto bassa per il substrato, ma molto elevata per quanto concerne la posizione dell'idrossilazione. Alcune preparazioni enzimatiche, infatti, sono in grado di catalizzare l'idrossilazione in posizione 3' dei flavonoidi naringenina, diidrokampferolo e kampferolo (Fig. 3), utilizzando come cofattori NADPH ed O₂.

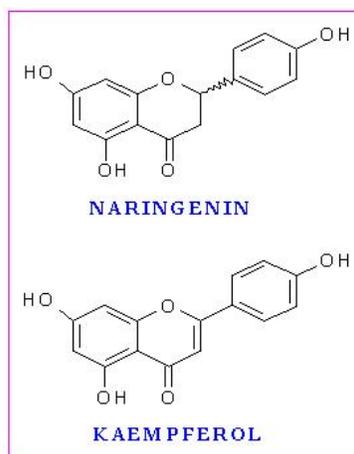


Fig. 3 Naringenina e Kampferolo

Molte fenolasi, inoltre, oltre a partecipare alla reazione di idrossilazione, sono in grado di catalizzare una successiva ossidazione degli orto-difenoli ad orto-chinoni (quest'attività viene chiamata in vari modi a seconda del substrato utilizzato: polifenolossidasi, o-difenolossidasi, DOPA-ossidasi, catecolossidasi, attività catecolasica). L'accumulo dei chinoni può essere soppresso aggiungendo dei riducenti, tra i quali l'acido ascorbico è uno dei più efficaci, in assenza dei quali i chinoni possono subire una serie di reazioni di polimerizzazione. Altre idrossilasi coinvolte nel pathway fenilpropanoidico sono quelle che portano alla sintesi dell'acido sinapico a partire dall'acido caffeico. Esistono due vie biosintetiche, l'ossidrilazione dell'acido caffeico e l'ossidrilazione dell'acido ferulico: risultati basati sulla specificità delle metiltransferasi coinvolte in questo pathway fanno ritenere più probabile la via che passa attraverso la metilazione dell'acido 5-idrossiferulico, anche se la via dell'acido triidrossicinnamico non può essere esclusa. Sono state ipotizzate due attività idrossilasiche citocromo P450-dipendenti in grado di catalizzare, rispettivamente, l'ossidrilazione dall'acido caffeico ad acido 3,4,5-triidrossicinnamico e l'ossidrilazione dell'acido ferulico ad acido 5-idrossiferulico. Finora, comunque, non sono state identificate inequivocabilmente le proteine responsabili di tali attività. Sono state, invece, identificate un'acido caffeico-O-metiltransferasi (COMT), che utilizza S-adenosilmetionina come donatore di un gruppo metilico, in grado di metilare l'ossidrile in posizione meta dell'acido caffeico con formazione dell'acido ferulico, ed un'analogo O-metiltransferasi (OMT) in grado di catalizzare la metilazione dell'ossidrile in posizione meta dell'acido 5-idrossiferulico con formazione dell'acido sinapico. Queste reazioni di metilazione rivestono una particolare importanza nella biosintesi della lignina: nelle

angiosperme sono state identificate O-metiltransferasi in grado di catalizzare la metilazione sia dell'acido caffeico che dell'acido 5-idrossiferulico e, conseguentemente i precursori guaiacilico e siringilico della lignina, mentre la metiltransferasi estratta dalle gimnosperme è attiva con l'acido caffeico e scarsamente attiva con l'acido 5-idrossiferulico. La scarsità di residui siringilici nella lignina delle gimnosperme può essere, pertanto, almeno in parte attribuita alla scarsa affinità di questa metiltransferasi nei confronti del 5-idrossiferulato. Va, infine, detto che queste catecolo-O-metiltransferasi sono degli enzimi distinti da quelli coinvolti nella metilazione dei flavonoidi. L'ultimo stadio nel metabolismo fenilpropanoidico è l'attivazione dei derivati dell'acido cinnamico con conseguente formazione dei CoA tioesteri. In particolare, i cinnamoil-CoA tioesteri vengono proposti come precursori nella biosintesi di lignina, flavonoidi, acidi benzoici e vari esteri ed ammidi. Attualmente sono stati identificati almeno due tipi di idrossicinnamato:CoA ligasi: un isoenzima cosiddetto di tipo I, inizialmente identificato in soia, con un'affinità più elevata nei confronti di acido p-cumarico, acido ferulico ed acido sinapico, i cui CoA tioesteri sono coinvolti nel pathway della lignina, ed un isoenzima di tipo II, inizialmente purificato da prezzemolo e soia, con una maggiore affinità nei confronti di acido p-cumarico ed acido caffeico, implicato nella biosintesi dei flavonoidi. In alcuni casi il numero di isoenzimi isolati è stato più elevato, ma tutte le isoforme presentano caratteristiche di specificità piuttosto differenziate nei confronti del substrato e, pertanto, si ritiene che presiedano a differenti vie biosintetiche. Molto diffusi nel regno vegetale sono gli esteri dell'acido cinnamico, derivati in cui il gruppo alcolico viene fornito da una grande varietà di composti ossidrilati, inclusi zuccheri, alcoli alifatici ed aromatici ed idrossiacidi. La

biosintesi di questi composti coinvolge la partecipazione di derivati attivati dell'acido cinnamico. Ad esempio, l'esterificazione del caffeil-CoA con acido chinico porta alla formazione di acido clorogenico (acido 5-O caffeilchinico). Questa reazione viene catalizzata da una idrossicinnamoil-CoA:chinato idrossicinnamoil transferasi, un enzima in grado di utilizzare come substrato, anche, il p-cumaroil-CoA: in effetti l'acido clorogenico può formarsi direttamente da acido caffeico oppure via acido p-cumaroilchinico. Della riduzione del gruppo carbossilico degli acidi cinnamici con formazione dei corrispondenti alcoli, via aldeide, si parlerà in seguito trattando la biosintesi della lignina. Un'altra reazione importante è l'allungamento della catena laterale dei derivati cinnamici tramite reazioni di condensazione, con simultanea liberazione di CO₂, dei derivati attivati dell'acido cinnamico con malonil-CoA. Questo tipo di reazione è coinvolta nella biosintesi, oltre che dei flavonoidi, degli stilbeni e degli xantoni. Al contrario, la degradazione della catena riveste un significato importante nella biosintesi degli acidi benzoici, il cui pattern di sostituzione dell'anello benzenico può riflettere quello del corrispondente acido cinnamico, oppure può essere determinato da reazioni di ossidrilazione e metilazione analoghe a quelle che si verificano nello scheletro degli acidi cinnamici. La formazione degli acidi benzoici può avvenire per allontanamento di una unità acetato ovvero con una sequenza di reazioni analoghe a quelle coinvolte nella β -degradazione degli acidi grassi. Esistono indicazioni che la formazione degli acidi benzoici può partire anche da derivati non-attivati degli acidi cinnamici ovvero direttamente dal pathway dell'acido shikimico per aromatizzazione, ad esempio, dell'acido deidroshikimico (Fig. 4).

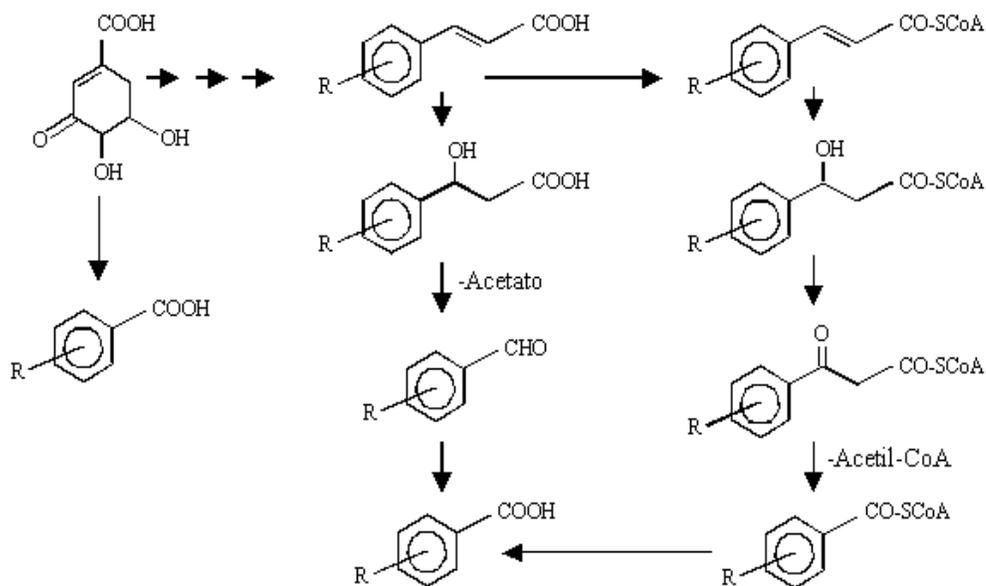


Fig. 4 Vie biosintetiche degli acidi benzoici nelle piante e nei microrganismi

Altra classe di composti, la cui biosintesi può essere in senso lato collegata al generale metabolismo fenilpropanoidico, è quella degli acidi fenilacetici (C₆-C₂) i quali si formano per decarbossilazione ossidativa degli α -chetoacidi derivanti da fenilalanina e tirosina. Infine, le cumarine sono dei composti C₆-C₃ che da un punto di vista strutturale vengono visti come dei derivati lattonici dell'acido *o*-idrossicinnamico e che, fatta eccezione per le fenil-cumarine, vengono considerate un prodotto del metabolismo fenilpropanoidico. La formazione dell'anello lattonico a partire dall'acido *trans*-cinnamico viene preceduta dall'introduzione di un gruppo ossidrilico in posizione *orto*, segue una isomerizzazione *trans-cis* del doppio legame a-b nella catena laterale e quindi si verifica un processo di lattonizzazione, il quale avviene spontaneamente, probabilmente con un meccanismo

fotochimico catalizzato da lunghezze d'onda al di sotto dei 360 nm. In molti casi la formazione dell'acido *o*-cumarico viene preceduta dall'introduzione di un ossidrilico in posizione *para*, ricavando in tal modo la serie delle cumarine ossigenate in posizione 7, come nel caso dell'umbelliferone. Spesso il nucleo cumarinico è caratterizzato dalla presenza di sostituenti ossigenati sia sull'anello lattonico che, molto più spesso, sull'anello benzenico. Allo stato attuale non esistono prove definitive che un tale pattern di sostituzione dell'anello benzenico si possa formare prima della reazione di lattonizzazione, anche se in alcuni casi è stato dimostrato che l'acido ferulico può fungere da precursore della scopoletina nel tabacco, presumibilmente in seguito ad una *orto* ossidrilazione analoga a quella che si verifica con l'acido *p*-cumarico, o che l'acido caffeico possa essere trasformato in esculetina dall'attività di una fenolasi estratta da *Saxifraga stolonifera* (Torssell *et al.*, 1997).

2.1.2 Biosintesi dei flavonoidi

Tutti i flavonoidi, normalmente, posseggono uno scheletro C6-C3-C6, composto da una unità C6 (anello A) e da una unità C6-C3 (anello B ed atomi di carbonio 2, 3 e 4). Gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro base vengono originati da due distinti pathways. L'anello B, con gli atomi di carbonio 2, 3, e 4, viene fornito da un derivato dell'acido cinnamico, mentre l'anello A è il risultato della condensazione testa-coda di 3 unità acetato. Alcune classi di flavonoidi (calconi, diidrocalconi ed auron) differiscono strutturalmente dal tipico scheletro base che contraddistingue le altre classi di flavonoidi, ma da un punto di

vista biosintetico sono strettamente correlate a queste. L'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi (Fig. 5) catalizza la formazione dello scheletro C15 dei flavonoidi a partire da malonil-CoA e p-cumaroil-CoA (derivato attivato dell'acido p-cumarico). I precursori dei flavonoidi derivano entrambi dai carboidrati: il malonil-CoA si forma a partire da acetil-CoA e CO₂, una reazione catalizzata da acetil-CoA carbossilasi (ACC), il p-cumaroil-CoA e gli analoghi esteri idrossicinnamici del CoA vengono forniti dal metabolismo fenilpropanoidico. Il prodotto di questa condensazione dovrebbe essere un calcone, mentre normalmente si è osservato l'accumulo del flavanone naringenina: pertanto, l'enzima chiave di questo primo step nella biosintesi dei flavonoidi è stato chiamato, in un primo tempo, flavanone sintasi (FS). Una tale conclusione non è, comunque, coerente con i risultati di alcuni esperimenti fatti con l'ausilio di calconi marcati, nè è in grado di spiegare il ruolo di un altro enzima coinvolto nella biosintesi dei flavonoidi, la calcone isomerasi (CHI).

VIA di BIOSINTESI dei FLAVONOIDI

Phenylalanine

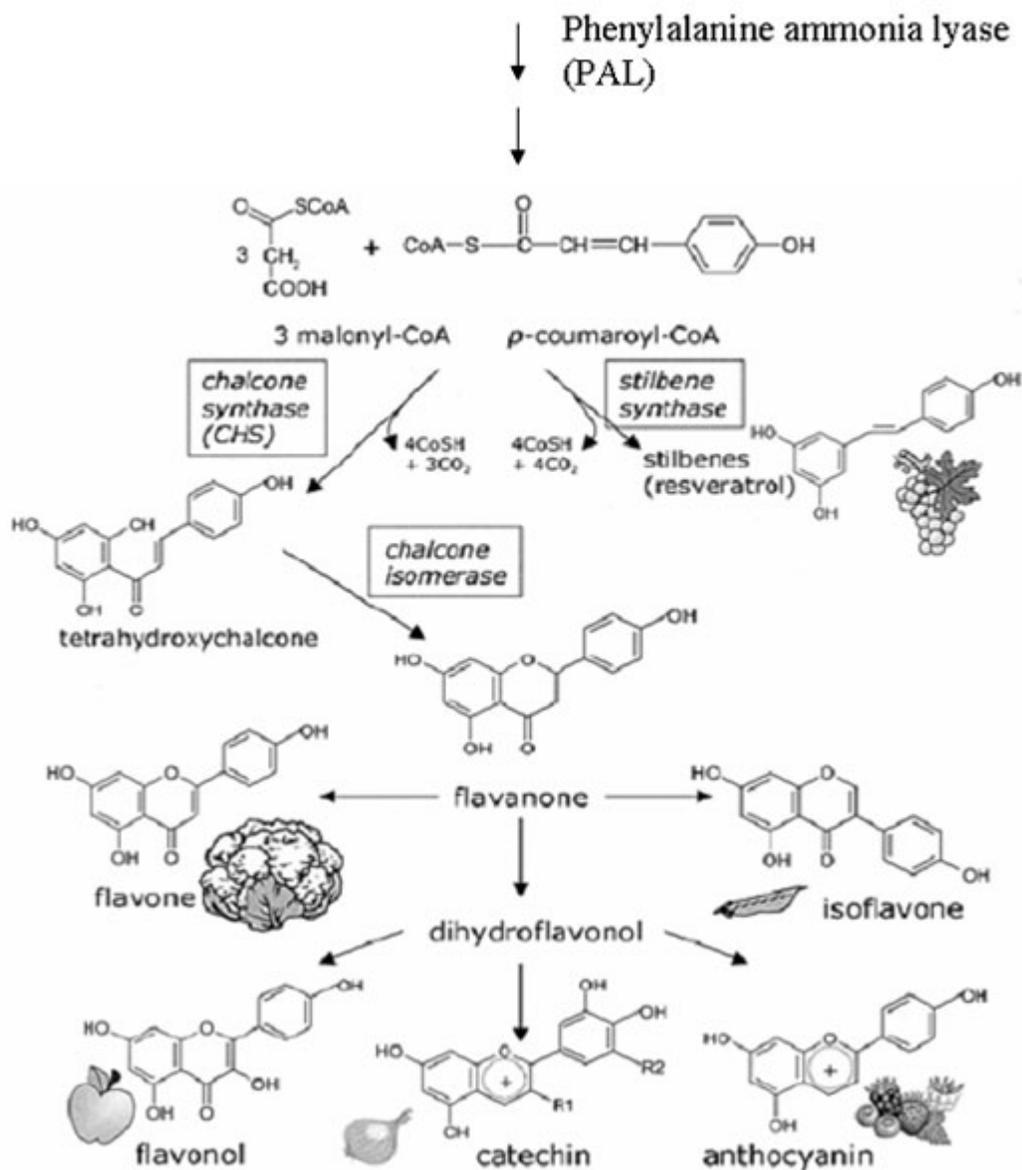


Fig. 5 Biosintesi dei flavonoidi.

Ulteriori ricerche condotte con l'ausilio di mutanti di fiori di *Callistephus chinensis* e di *Dianthus caryophyllus*, che accumulano il calcone a spese di antocianine ed altri flavonoidi, hanno dimostrato che: i) il primo prodotto nelle biosintesi dei flavonoidi è un calcone, ii) la CHI catalizza la ciclizzazione del calcone in maniera stereospecifica con conseguente formazione del flavanone. E', pertanto, la calcone sintasi (CHS) l'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi. Questo enzima catalizza la condensazione in più stadi di tre unità acetato, derivanti da malonil-CoA, con un opportuno derivato attivato dell'acido cinnamico, normalmente il *p*-cumaroil-CoA, con conseguente formazione di un calcone, 4,2',4',6'-tetraidrossicalcone, dal quale si originano tutte le strutture dei flavonoidi. La CHS, in cooperazione con una riduttasi NADPH-dipendente, la polichetide riduttasi (PKR), catalizza anche la formazione del 4,2',4'-triidrossicalcone (6'-deossicalcone=isoliquiritigetina) e del corrispondente 5-deossiflavanone (liquiritigetina), sempre utilizzando malonil-CoA e *p*-cumaroil-CoA. Sia il tetraidrossicalcone, sia il 6'-deossicalcone possono essere utilizzati come precursori diretti nella sintesi degli auron. Negli stadi successivi della biosintesi calconi, flavanoni, diidroflavonoli e flavan-3,4-dioli fungono da precursori nella biosintesi degli antociani, mentre i pathways che portano alla formazione di flavoni e flavonoli rappresentano delle ramificazioni degli stadi iniziali della biosintesi dei flavonoidi. La tipica struttura dei flavonoidi si forma in seguito ad una conversione stereospecifica del calcone a 2S-flavanone (naringenina, liquiritigetina), una reazione catalizzata dall'enzima calcone isomerasi (CHI). Il flavanone rappresenta uno dei principali punti di ramificazione nella biosintesi dei flavonoidi. La naringenina (un 5-

idrossiflavanone) funge da intermedio per la biosintesi di isoflavoni, flavoni, diidroflavonoli e flavan-4-oli. La liquiritigenina (un 5- deossiflavanone) funge da precursore nel pathway degli isoflavoni, mentre resta da dimostrare la sua conversione in altri 5-deossiflavonoidi (flavonoidi mancanti dell'ossidrile sul C5, particolarmente comuni nelle *Leguminosae*). La formazione degli isoflavoni a partire dai flavanoni coinvolge il riarrangiamento ossidativo del flavanone, comprendente uno shift (migrazione) 2-3 del gruppo arilico. La reazione viene catalizzata da una 2-idrossiflavanone sintasi (IFS), in cooperazione con una deidratasi che elimina una molecola di acqua. Substrati della IFS possono essere sia i 5-idrossiflavanoni che i 5-deossiflavanoni. Genisteina e daidzeina, a loro volta, sono intermedi nella biosintesi di tutti gli altri isoflavonoidi, inclusi i pterocarpani. L'introduzione di un doppio legame tra il C2 ed il C3 del flavanone porta alla formazione dei flavoni, una classe di flavonoidi quantitativamente molto importante nei tessuti vegetali. La reazione viene catalizzata da due differenti flavone sintasi (FNA I ed FNS II), la prima ritrovata in colture cellulari di prezzemolo richiede come cofattori ossiglutarato, Fe⁺⁺ ed ascorbato, la seconda, FNS II; richiede per esplicare la sua azione catalitica NADPH ed ossigeno molecolare e viene ritrovata comunemente negli altri tessuti vegetali.

L'idrossilazione del flavanone sul C3 porta alla formazione dei diidroflavonoli, una reazione catalizzata dalla flavanone-3-idrossilasi (FHT), che, analogamente alla FNS I, è una diossigenasi 2-ossiglutarato-dipendente. I diidroflavonoli sono i substrati diretti nella sintesi dei flavonoli, catalizzata da una flavonolo sintasi (FLS), ancora una diossigenasi 2-ossiglutaratodipendente, e dei flavan-3,4-dioli (leucoantocianidine), nonché intermedi nella

formazione di catechine (flavan-3-oli), proantocianidine (dimeri ed oligomeri di flavan-3-oli) ed antocianidine. La riduzione stereospecifica in posizione 4 dei diidroflavonoli, catalizzata da una diidroflavonolo-4-riduttasi (DFR) con NADPH come cofattore, porta alla formazione delle leucoantocianidine. Un enzima analogo alla DFR, la flavanone-4-riduttasi (FNR) catalizza la riduzione NADPH-dipendente del gruppo carbonilico in posizione 4 del flavanone con conseguente formazione dei flavan-4-oli, un tipo di leucoantocianidine, che costituiscono i precursori immediati di apigeninidina e luteolinidina, delle 3-deossiantocianidine rispettivamente di colore giallo-arancio e arancio-rosso. Le leucoantocianidine sono i precursori immediati nella sintesi di catechine e proantocianidine. Le catechine vengono prodotte in seguito ad una reazione di riduzione in posizione 4 della leucoantocianidina catalizzata da una leucoantocianidina-4-riduttasi (LAR). Esistono, infine, prove evidenti che le leucoantocianidine sono dei precursori nella sintesi delle antocianine. E' possibile che, nell'ambito di una sequenza di reazioni ancora da elucidare, una diossigenasi introduca un doppio legame tra il C2 ed il C3 della leucoantocianidina, il composto risultante, il 2-flaven-3,4-cis-diolo, può isomerizzare a formare un composto termodinamicamente più stabile, il 3-flaven-2,3-diolo, che probabilmente si disidrata spontaneamente formando l'antocianidina.

La glicosilazione in posizione 3 dell'antocianidina, o di un suo intermedio, dovrebbe essere parte integrante della sequenza completa di reazioni, in quanto le comuni antocianidine sono instabili nelle normali condizioni fisiologiche della cellula vegetale. Agli enzimi finora citati vanno aggiunti numerosi altri enzimi, i quali catalizzano delle reazioni che portano ad una modificazione dello scheletro base dei flavonoidi: reazioni di idrossilazione,

glicosilazione, acilazione, importanti nel conferire caratteristiche di stabilità ed idrofilicità alle molecole, mentre reazioni di metilazione e prenilazione, conferiscono ai flavonoidi caratteristiche di lipofilicità ed attività antimicrobica.

In questo contesto una questione molto dibattuta è stata: in quale stadio viene definito il pattern di sostituzione dell'anello B. Esistono due possibilità: incorporazione dei sostituenti a livello di derivato dell'acido cinnamico prima della formazione dello scheletro C15, ovvero determinazione del pattern di sostituzione a livello di C15, che è l'ipotesi attualmente prevalente, mentre la produzione di flavonoidi con un alto grado di sostituzione nell'anello B derivante dal corrispondente derivato cinnamico è una via secondaria osservata soltanto in poche specie vegetali. L'introduzione di gruppi -OH in 3' e 5' viene catalizzata da specifiche ossigenasi, flavonoide 3'-idrossilasi (F3'H) e flavonoide-3',5'-idrossilasi (F3',5'H), che utilizzano flavonoidi come substrato. La successiva metilazione di questi ossidrili viene catalizzata da specifiche metiltrasferasi. Quanto sopra porta, quindi, alla conclusione che il p-cumaroil-CoA rappresenta il principale substrato fisiologico per la reazione catalizzata da CHS, il cui prodotto sono dei 4'-idrossi flavonoidi. Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nell'elucidazione della biosintesi dei flavonoidi. Restano, però, ancora da chiarire alcuni aspetti relativi agli ultimi stadi della sintesi delle antocianine, alla sintesi dell'epicatechina e delle proantocianidine ed, infine, relativamente alla sintesi di alcune classi di flavonoidi numericamente meno consistenti, quali auronidi e diidrocalconi (Torssell, 1997).

3. Classificazione dei polifenoli

I polifenoli sono una classe di composti, che giocano un ruolo primario in enologia. Essi, infatti, sono responsabili delle differenze fra i vini bianchi e i vini rossi, in particolare del colore e del gusto di questi ultimi, e sono all'origine del cosiddetto "paradosso francese" per le loro proprietà battericide, antiossidanti, vitaminiche e protettive nei riguardi delle malattie cardiovascolari (Singleton *et al.*, 1982). La composizione e la concentrazione delle sostanze fenoliche nel vino dipende dal tipo di uva, dai processi di vinificazione utilizzati e dall'insieme delle reazioni chimiche che avvengono durante l'invecchiamento (Pena-Neira *et al.*, 2000). Sono considerati i principali composti responsabili dell'imbrunimento dei vini bianchi durante la conservazione in bottiglia diventando substrato di una serie di reazioni enzimatiche e non enzimatiche. (Cheynier *et al.*, 1989; Roussis *et al.*, 2005; Ribèreau-Gayon *et al.*, 2000). Contribuiscono inoltre alla formazione di alcune delle più importanti proprietà sensoriali del vino, colore aroma e astringenza (Recamales *et al.* 2006).

Le sostanze fenoliche sono una famiglia numerosa ed eterogenea (ne sono stati identificate finora oltre 8000, di cui circa 4000 flavonoidi). Si definisce 'fenolica' qualunque molecola che sia caratterizzata, almeno in una sua parte, dalla presenza dell'anello aromatico del benzene legato ad uno o più gruppi funzionali ossidrilici (-OH). Poichè sono metaboliti tipici delle cellule vegetali, dal punto di vista dell'alimentazione le sostanze fenoliche si trovano essenzialmente negli alimenti di origine vegetale, mentre la loro presenza negli alimenti di origine animale è assai meno significativa, e in ogni caso legata all'ingestione di mangimi vegetali da parte dell'animale stesso (Vendrane *et al.*, 2005). Sono distribuiti nella

buccia e nella polpa dell'acido dove sono presenti in quantità nettamente inferiore rispetto agli antociani. Nelle varietà di uve bianche, rispetto a quelle rosse, la concentrazione degli acidi fenolici è inferiore sia nella polpa che nel mosto, dove gli acidi benzoici e cinnammici sono i predominanti (Zafrilla *et al.*, 2003). I principali composti fenolici dei vini sono raggruppabili nelle seguenti classi (Fig. 6):

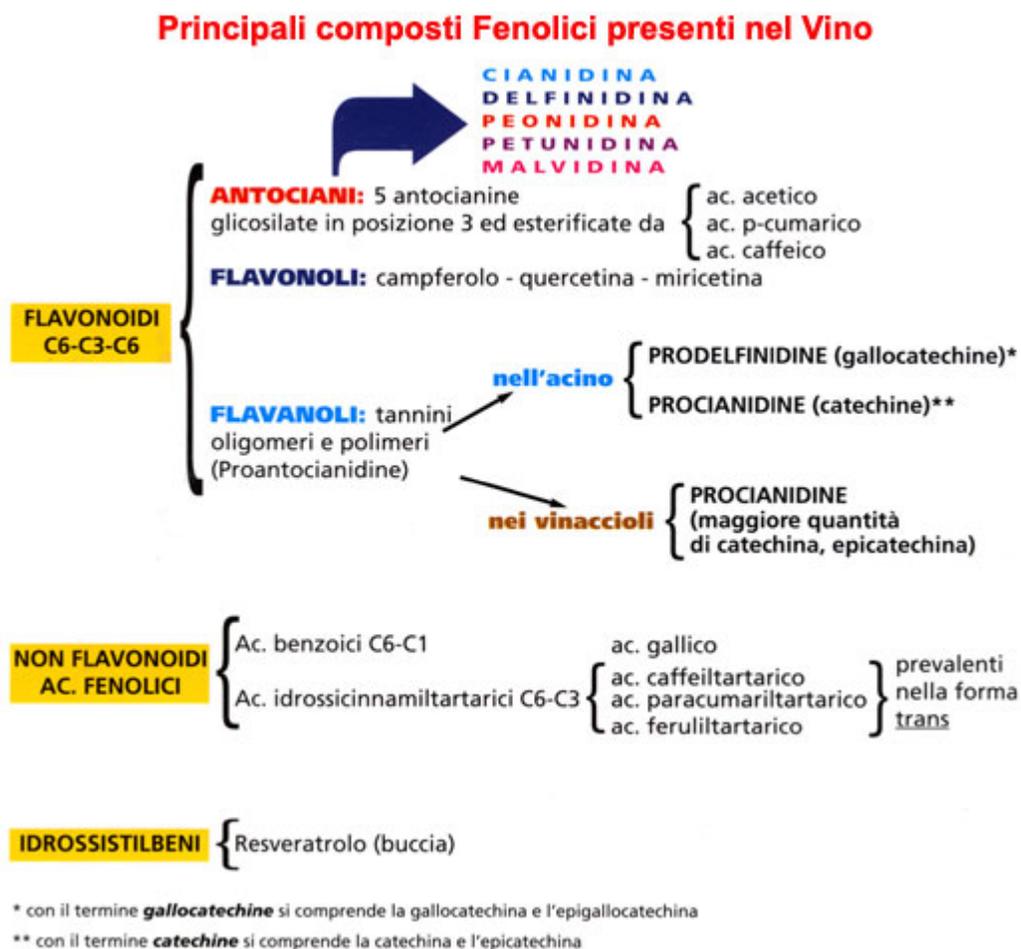


Fig. 6 Principali composti fenolici dei vini

3.1 Flavonoidi

Appartengono alla famiglia dei flavonoidi le seguenti classi di composti: antociani, flavonoli, flavanoli e diidroflavonoli. Questi composti fenolici condividono uno scheletro comune C6-C3-C6 costituito da due anelli fenolici (denominati A e B) collegati tra loro da un anello piranico eterociclico (anello C), come mostrato nella Fig. 7.

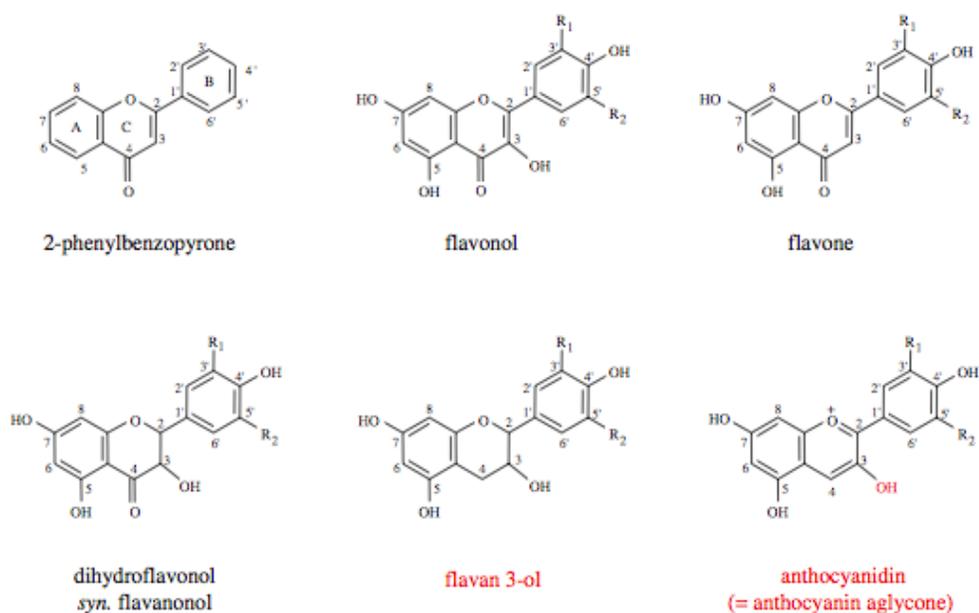


Fig. 7 Struttura chimica dei flavonoidi $R_1, R_2 = H, OH, OCH_3$

Si distinguono diverse classi di composti sulla base dello stato di ossidazione dell'anello C. I flavonoidi hanno come struttura di base il 2-fenilbenzopirone, caratterizzata da un doppio legame tra gli atomi di carbonio C2 e C3 e un gruppo chetonico nel C4. Tra le classi di flavonoidi, nell'uva sono presenti i flavonoli, mentre i flavoni sono presenti anche nelle foglie di vite. I flavonoidi comprendono anche ulteriori classi che non presentano queste caratteristiche configurazioni quali, gli antociani, i flavanoli e i diidroflavonoli, tutti presenti nelle uve. Le prime due classi di composti sono particolarmente abbondanti nell'uva e nel vino e rivestono una grande importanza per la qualità del vino. Infatti, gli antociani sono i pigmenti di colore rosso dell'uva e sono quindi responsabili del colore dei vini rossi mentre i flavanoli danno il loro contributo al gusto (soprattutto astringenza e amaro) e sono anche coinvolti nell'imbrunimento ossidativo, nella formazione di torbidità e di precipitati. All'interno di ciascuna classe di flavonoidi, sono presenti composti differenti a causa di modifiche a carico dei tre anelli dello scheletro carbonioso, come:

- *l'idrossilazione*;

- *la metilazione* degli idrossili fenolici;

- *la glicosilazione*: come sarà illustrato nel caso degli antociani, i flavonoidi possono essere glicosilati da diversi zuccheri (monomeri o oligomeri).

- *l'acilazione* dei gruppi idrossili alcolici;

- *la polimerizzazione*, in particolare nella famiglia dei flavanoli. I flavonoidi presenti nell'uva sono idrossilati in posizione C5 e C7 sull'anello A, e sull'anello B in posizione 4'.

Gli anelli A e B possono anche essere idrossilati o solo in posizione 3' o sia in 3' che in 5' o subire una sostituzione sul gruppo alcolico OH in posizione 3 con un gruppo glicosidico o acilico.

3.1.1 Antociani

Gli antociani si trovano soprattutto nelle bucce dell'uva, con l'eccezione della varietà tintorea, che contiene antociani anche nella polpa. Gli antociani, identificati nella buccia dell'uva e nei vini ottenuti da *Vitis vinifera*, sono i 3-O-monoglicosidi e i 3-O-monoglicosidi acilati di cinque principali antocianidine: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, che differiscono tra loro per il numero e la posizione dei gruppi idrossilici e metossilici situati nell'anello B della molecola (Fig. 8).

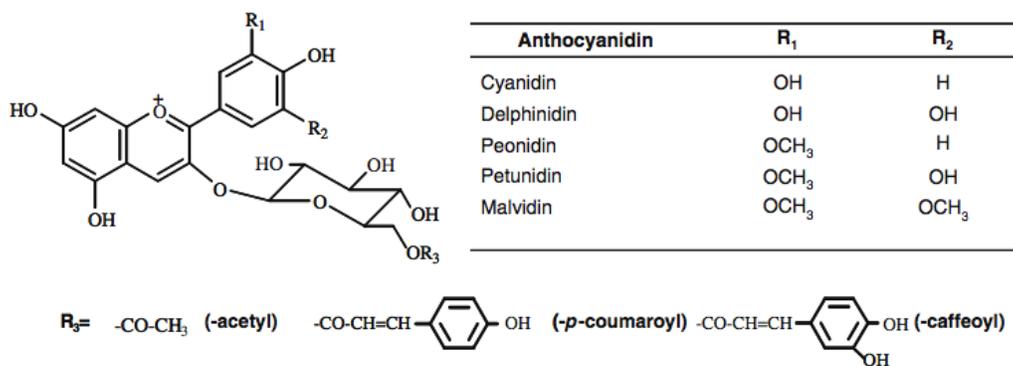


Fig. 8 Struttura chimica degli antociani

L'acilazione che si verifica nella posizione C-6 della molecola di glucosio si ha in seguito ad esterificazione con acido acetico, acidi *p*-cumarico e caffeico (Mazza *et al.*, 1993). La

distribuzione e la concentrazione degli antociani dell'uva dipende dalla cultivar, dalla maturità, dalle condizioni climatiche, zona di produzione e dalla resa (Roggero *et al.*, 1986a; Gonzalez-San J. *et al.*, 1990). La malvidina, generalmente è l'antocianina maggiormente rappresentata nelle uve rosse. Inoltre la quantità di antocianine acilate dipende in larga misura dalla varietà. Il profilo degli antociani è stato utilizzato come criterio per stabilire le differenze chemiotassonomiche tra le diverse varietà di uve. Il rapporto tra la concentrazione delle molecole singole e la concentrazione totale degli antociani, è stato utilizzato per la caratterizzazione varietale (Roggero *et al.* 1986b; Mattivi *et al.*, 2006).

3.1.2 Flavanoli

I flavanoli dell'uva, chiamati con più precisione flavan 3-oli, in quanto idrossilati in posizione 3, si trovano come monomeri, ma anche come oligomeri e polimeri. I principali monomeri presenti nell'uva sono: (+)-catechina e il suo isomero, (-)-epicatechina e, in misura minore, l'estere gallico della (-)-epicatechina e (-)-epicatechina 3-gallate (Singleton *et al.*, 1969) (Fig. 9).

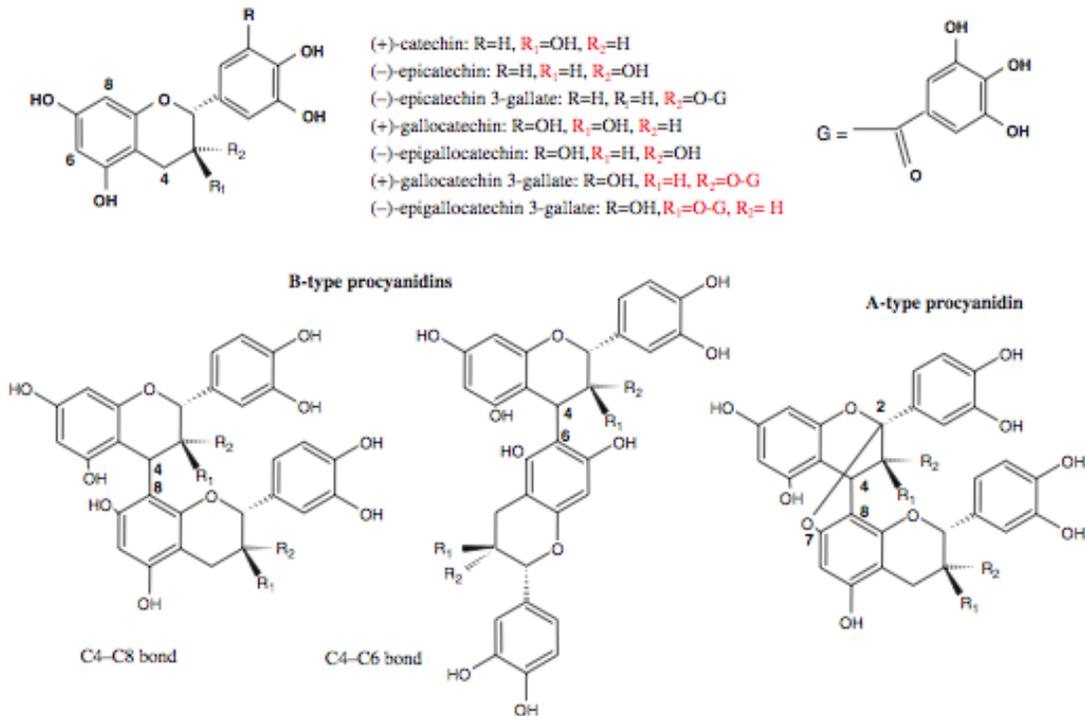


Fig. 9 Struttura dei flavanoli monomeri e dimeri.

La gallocatechina (Piretti *et al.*, 1976; Czochanska *et al.*, 1979b) è stata identificata nella varietà *Vitis Vinifera* mentre la catechina 3-gallate (Lee *et al.*, 1987) e gallocatechina 3-gallate (Lee *et al.*, 1990) sono state rilevate in alcune varietà non-*Vinifera*. Gli oligomeri e polimeri dei flavanoli sono anche chiamati tannini condensati o proantocianidine. Il termine tannino si riferisce alla loro capacità di interagire e reagire con le proteine e farle precipitare. Per effetto del calore e in condizioni acide, queste molecole rilasciano pigmenti antocianici rossi, da qui il termine proantocianidine. In letteratura talvolta si riscontra il termine leucoantocianidina, sempre in riferimento a questa particolare proprietà. Comunque, questo termine dovrebbe essere limitato a un altro gruppo di composti, i flavan

3,4-dioli, che sono intermedi nella via biosintetica che porta alla formazione di flavanoli e antociani (Stafford *et al.*, 1984) ma non sono mai stati isolati dalle uve, presumibilmente a causa della loro instabilità. Nelle proantocianidine di tipo B (Fig. 9), le unità costitutive dei flavanoli sono legate da legami C4-C8 e/o C4-C6, con la possibile formazione di strutture ramificate. I doppi legami C2-O-C7 oppure C2-O-C5 in aggiunta a C4-C6 o C4-C8, danno luogo a proantocianidine di tipo A. A seconda della natura dell'antocianina rilasciata, possono essere distinti diversi gruppi di proantocianidine. Le proantocianidine dell'uva e del vino appartengono a due di questi gruppi e vengono definite rispettivamente, procianidine e prodelfinidine (Fig. 10).

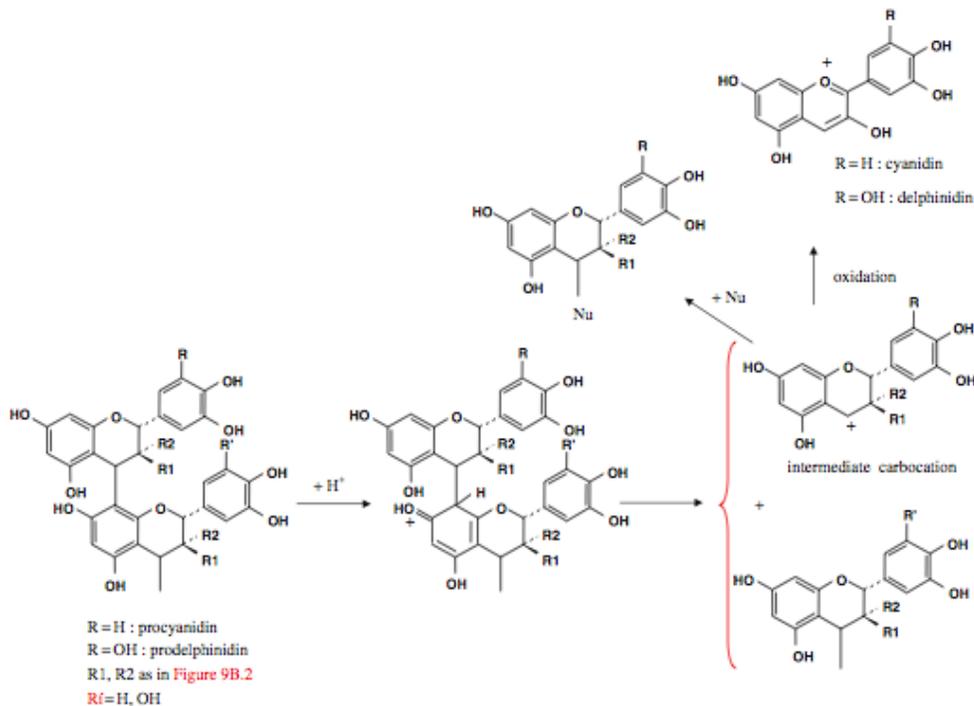


Fig.10 Reazione di scissione acido-catalizzata di legami interflavanici tra proantocianidine e successive reazioni.

I flavanoli sono presenti in vari tessuti vegetali di vite, compreso il legno (Boukharta *et al.*, 1988), le foglie, i semi e la bacca (Tesniere *et al.*, 2006). All'interno della bacca d'uva, sono particolarmente abbondanti nei semi e nella buccia. I dimeri e trimeri di procianidina sono stati identificati prima di tutto nei semi, ma sono presenti anche nella buccia e nel picciuolo con diverse distribuzioni (Ricardo da Silva *et al.*, 1991a). Tuttavia l'analisi di estratti di uva per degradazione acida e con la tecnica ^{13}C NMR, hanno confermato, come atteso, la presenza di prodelphinidine insieme alle procianidine (Czochanska *et al.*, 1980). In accordo

con quanto trovato, nel vino sono stati identificati anche dei dimeri contenenti unità di gallo catechina ed epigallocatechina (Fulcrand *et al.*, 1999).

La distribuzione dei flavanoli negli acini d'uva non è la stessa in tutte le varietà, si presentano una vasta gamma di differenze confrontando i semi e la buccia. La percentuale di flavanoli nel seme va da un minimo di meno del 40% ad un massimo di oltre il 90% come illustrato nella Fig. 11.

Varieties	Monomers (mg/kg)	Percentage in Seeds	Procyanidins (mg/kg)	Percentage in Seeds
Alicante-Bouchet	360	64	287	50
Aramon	213		182	
Syrah	190		176	
Mourvedre	164	58	169	53
Grenache noir	137		125	
Cinsaut	136	37	116	32
Carignan	77	54	73	40
Cabernet Sauvignon	344	83	546	68
Pinot noir	1,165	94	1,609	86

Fig. 11 Percentuale di monomeri e procianidine nei semi di alcune varietà di uva.

La concentrazione dei monomeri totali nei vini rossi è compresa tra 0,5 g/L e 1,5 g/L o addirittura superiore, mentre nel vino bianco, i livelli sono compresi nel range di 10-50 mg/L e la loro concentrazione dipendente fortemente dalle tecniche di pressatura utilizzate (Waterhouse, 2002).

Studi effettuati sui vini bianchi hanno calcolato che la concentrazione totale di catechina, epicatechina e acido gallico, varia da 1,9-370,8 mg/l⁻¹ con un valore medio di 52.2 mg/l⁻¹. Il contenuto di catechina varia da 0-143,1 mg/l⁻¹ (media 27,4 mg/l⁻¹, 52,5%) mentre la concentrazione della epicatechina tra 0-143,1 mg/l⁻¹ (media 11,1 mg/l⁻¹, 21,3%) e quella dell'acido gallico tra 1,9-84,7 mg/l⁻¹ (media 13,8 mg/l⁻¹, 26,4%) (Dimitris *et al.*, 2003).

3.1.3 Flavonoli e diidroflavonoli

I flavonoli, che svolgono un ruolo protettivo contro le radiazioni UV, si trovano nell'uva a livello della buccia e delle foglie. Alcuni flavonoli sono stati rilevati anche nella polpa (Pereira *et al.*, 2006), ma nessuno nei semi (Rodriguez Montealegre *et al.*, 2006). I principali flavonoli presenti nelle uve sono i 3-glicosidi della quercetina, che è diidrossilata sull'anello B (Fig. 12) in particolare il 3-glucoside e 3-glucuronide (Downey *et al.*, 2003b; Price *et al.*, 1995).

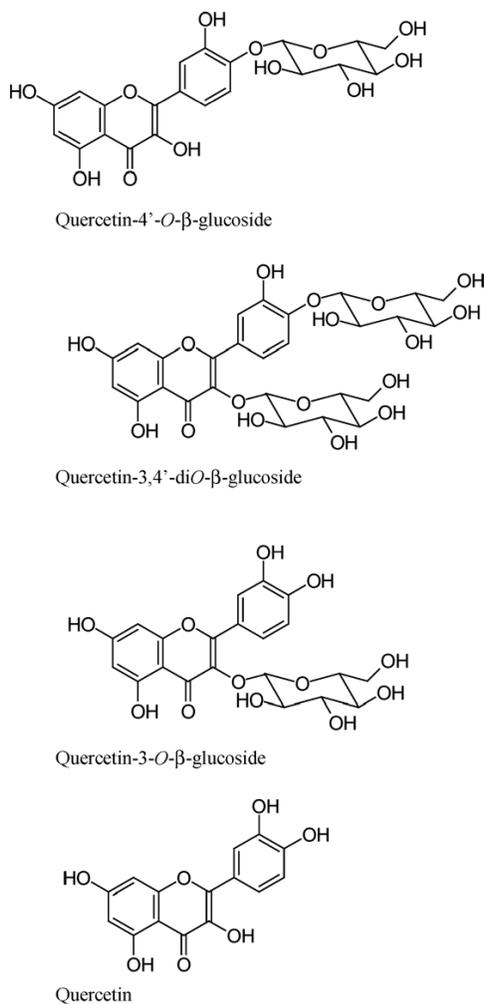


Fig.12 Forme glicosilate della quercetina

Altri flavonoli e diidroflavonoli (sin. flavanonoli) sono stati identificati in diverse parti della pianta. La quantità di flavonoli presente negli acini dipende anche dalla fase di sviluppo della pianta, da fattori genetici e ambientali. La biosintesi dei flavonoli si verifica durante la fioritura e dopo l'invasatura. Piccole quantità possono essere rilevate nella fase verde della pianta, ma la sintesi si verifica principalmente durante la maturazione con un costante aumento del contenuto di flavonoli nella bacca (Downey *et al.*, 2003b). Ogni

cultivar possiede uno specifico profilo relativamente al contenuto dei flavonoli e diidroflavonoli, che potrebbe essere utilizzato per la caratterizzazione tassonomica (Mattivi *et al.*, 2006; Masa *et al.*, 2007). Si pensava che le cultivar a bacca bianca non contenessero flavonoli metilati, fino a quando, Rodriguez Montealegre *et al.*, (2006) rilevarono piccole quantità del glucoside isoramnetina nella buccia. Sulla base di un'indagine effettuata su 91 cultivar di *Vitis vinifera*, Mattivi *et al.*, (2006) hanno concluso che derivati di isoramnetina sono presenti in piccole quantità in cultivar bianche mentre i derivati di miricetina, laricitrina e siringetina sembrano essere specifici delle cultivar a bacca rossa. Tuttavia, la miricetina è stata rilevata in alcune cultivar di moscato bianco (*Vitis rotundifolia* sp.) (Talcott *et al.*, 2002). La quantità di flavonoli variava tra i 2 e i 30mg/kg di bacche di cultivar bianche e tra i 4 e 78 mg/kg di bacche di cultivar nere (Mattivi *et al.*, 2006).

Nella tabella n.1 si riporta il contenuto in flavonoli di alcuni vini italiani.

Tabella 1 Flavonoli di alcuni vini italiani.

type of wine	quercetin (mg/L)	kaempferol(mg/L)	myricetin (mg/L)	isorhamnetin (mg/L)	rutin (mg/L)
Cabernet Sauvignon, red, 1994	28.5	1.5	9.6	1.6	10.2
Corvo Rosso, red, 1993	17.9	1.2	7.8	0.7	6.0
Barbaresco, red, 1991	5.8	0.2	1.2	0.2	1.0
Barbera d'Alba, red, 1993	16.0	0.4	3.0	0.2	0.6
Barbera Oltrepò, red, 1992	2.6	0.1	1.4	0.1	4.3
Chianti, red, 1994	16.7	0.5	3.2	0.1	0.4
Piedirosso, red, 1992	9.7	0.2	2.1	0.1	0
Cirò, red, 1994	23.2	1.0	1.5	0.4	0.6
Cannonau, red, 1991	7.7	0.3	2.1	0.2	0.5
Squinzano, red, 1993	2.8	0.1	0.6	0	0.1
Gewurtztraminer, white, 1995	0	0.1	0.1	0	0.2
Colomba Platino, white, 1994	1.2	0.1	0.3	0	0.9
Torre di Giano, white, 1995	1.0	0.1	0.1	0	0.2
average	10.2	0.4	2.5	0.3	1.9
average red wines	13.1	0.6	3.2	0.4	2.4
average white wines	0.7	0.1	0.2	0	0.4

Nel mosto e nei vini provenienti da cultivar a bacca bianca è stata rilevata la sola presenza della quercetina 3-glucuronide (Betes-Saura *et al.*, 1996), insieme a tracce di Kampferolo-3-glucoside nel vino Riesling (Baderschneider *et al.*, 2001).

La sua concentrazione media è risultata essere tra 0,5 mg/L e 0,25 mg/L, nel mosto e nel vino, rispettivamente, e 0,4 mg/L nei vini spumanti Cava. I vini Champagne fatti da uve di Pinot Nero e Chardonnay contengono l'aglicone quercetina e tracce di astilbina e engeletina (Chamkha *et al.*, 2003), che sono stati riportati anche in altri vini bianchi (Trousdale *et al.*, 1983). I flavanoli monomeri ed oligomeri sono stati trovati in piccole quantità (pochi mg/L) in vini bianchi ottenuti senza il processo di macerazione (Cheynier *et al.*, 1989b; Bestie-Saura *et al.*, 1996; Chamkha *et al.*, 2003; Ricardo da Silva *et al.*, 1993). Ritardi tra la vendemmia e la pressatura, soprattutto se viene aggiunta l'anidride solforosa per prevenire l'ossidazione, causano un aumento delle concentrazioni dei flavonoidi in mosti e vini bianchi (Yokotstuka 1990; Somers *et al.*, 1991). Il contatto delle bucce con il mosto prima della fermentazione è usato a volte nella produzione del vino bianco per favorire l'estrazione di composti volatili e il carattere del vino e favorire l'aroma varietale. Questa pratica ha portato anche ad un aumento della concentrazione di flavanoli nel vino (Cheynier *et al.*, 1989b; Ricardo da Silva *et al.*, 1993). Il principale flavanolo è la Procianidina B1 mentre i dimeri galloilati sono presenti in quantità molto basse, il che suggerisce che i flavanoli nel vino bianco non hanno origine dai semi. La letteratura riporta che le proantocianidine polimeriche non sono state analizzate nei vini bianchi. E' invece ben documentato il ruolo svolto dalla polifenol ossidasi dell'uva (PPO) durante l'ottenimento di

mosti ottenuti da varietà bianche. I flavanoli monomeri sono dei substrati piuttosto poveri per la polifenol ossidasi (PPO) e le proantocianidine non possono essere ossidate dall'enzima, probabilmente a causa di un impedimento sterico. Tutti questi composti sono facilmente ossidati dai chinoni formati durante le reazioni di ossidazione enzimatica a carico dell'acido caffeil tartarico, il principale substrato della PPO nell'uva (Cheynier *et al.*, 1988). Aumentare il livello di esposizione all'ossigeno prima della fermentazione causa una progressiva e netta riduzione dei flavanoli nel vino, confermando il ruolo di questi composti nelle reazioni di ossidazione (Cheynier *et al.*, 1989b; Ricardo da Silva *et al.*, 1993).

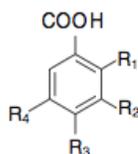
3.2 Acidi fenolici non-flavonoidi

I composti fenolici non flavonoidi del vino si dividono in acidi idrossibenzoici e acidi idrossicinnamici, fenoli volatili, stilbeni e vari composti (ad esempio, lignine e cumarine). Anche se non risultano composti colorati, la componente non-flavonoide è in grado di migliorare e stabilizzare il colore dei vini rossi attraverso reazioni -intra ed -intermolecolari. Questi composti contribuiscono al flavour del vino (fenoli volatili), e alcuni di loro, come il resveratrolo, mostrano potenti attività biologiche.

3.2.1 Acidi idrossibenzoici (HBA)

Essendo derivati dell'acido benzoico, gli acidi idrossibenzoici sono caratterizzati da uno scheletro C6-C1 (Fig. 13). I derivati più comuni presenti nel vino sono: l'acido gallico, l'acido gentisico, l'acido p-idrossibenzoico, l'acido protocatechico, l'acido siringico, l'acido salicilico e l'acido vanillico. Nel vino i diversi acidi idrossibenzoici possono essere

prevalentemente trovati nella loro forma libera (Monagas *et al.*, 2005 a,b; Pena-Neira *et al.*, 2000).



Hydroxybenzoic acids	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MW
Gallic acid	H	OH	OH	OH	170
Gentisic acid	OH	H	H	OH	154
p-Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H	138
Protocatechuic acid	H	OH	OH	H	154
Salicylic acid	OH	H	H	H	138
Syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	198
Vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H	168

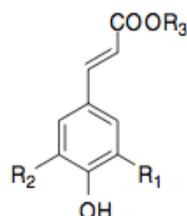
Fig.13 Struttura degli acidi idrossibenzoici del vino

L'acido gallico è uno degli HBA con la concentrazione più elevata nel vino. Tale composto non si trova solo naturalmente nell'uva ma si forma anche per idrolisi dei tannini idrolizzabili e condensati, vale a dire gli esteri gallici dei flavan-3-oli. I livelli di HBA nel vino mostrano grande variabilità a seconda delle varietà di uve e delle condizioni di crescita. Pozo-Bayon *et al.*, (2003) hanno riportato valori compresi tra 0,3 e 1,3 mg/L di acido gallico, in vini spumanti spagnoli ottenuti da uve bianche e rosse, rispettivamente. Per l'acido protocatechico i valori sono compresi tra 0,5 e 0,93 mg/L, mentre le concentrazioni di acido *p*-idrossicinnamico si trovano nell'intervallo 0-0,22 mg/L. Tuttavia, rispetto al gruppo degli acidi idrossicinnamici, la concentrazione complessiva di HBA nel vino è

relativamente bassa. Tra i derivati degli HBA, sono stati identificati diversi composti. Guntert *et al.*, (1986) hanno identificato gli esteri etilici dell'acido vanillico e acido p-idrossibenzoico, e esteri metilici dell'acido protocatechico e dell'acido vanillico, così come l'estere glucosio dell'acido vanillico, isolato dal vino tedesco Riesling (Baderschneider *et al.*, 2001).

3.2.2 Acidi idrossicinnamici (HCA)

Gli acidi idrossicinnamici possiedono uno scheletro C6-C3 e formalmente appartengono al gruppo dei fenilpropanoidi. I principali composti presenti nel vino sono derivati dagli acidi idrossicinnamici caffeico, p-cumarico, ferulico, e sinapico (Fig. 14). Questi derivati possono essere presenti sia nella forma cis che trans, le forme trans sono più stabili e quindi prevalenti. Gli HCA nel vino sono presenti in basse quantità nella loro forma libera, mentre le forme come gli esteri dell'acido L-(+)-tartarico, predominano (Somers Ong *et al.*, 1978; Singleton *et al.* 1978).



Hydroxycinnamic acids	R ₁	R ₂	R ₃	MW
Caffeic acid	OH	H	H	180
Caftaric acid	OH	H	Tartaric acid	312
p-Coumaric acid	H	H	H	164
p-Coutaric acid	H	H	Tartaric acid	296
Ferulic acid	OCH ₃	H	H	194
Fertaric acid	OCH ₃	H	Tartaric acid	326
Sinapic acid	OCH ₃	OCH ₃	H	224

Fig. 14 Struttura degli acidi idrossicinnamici del vino

Tra gli acidi idrossicinnamici, predomina l'acido caftarico (fino al 50% del totale degli acidi idrossicinnamici). Altre sostanze importanti sono gli esteri tartarici dell'acido p-cumarico e acido ferulico, e il glucoside trans-p-cumarico (Somers *et al.*, 1987). I livelli di concentrazione, dei derivati dell'acido idrossicinnamico nel vino, dipendono da molti fattori come la varietà d'uva, le condizioni di coltivazione, clima, ecc. In generale, la concentrazione totale degli HCA è di circa 100 mg/L. Per l'acido p-coutarico e fertarico i valori sono intorno ai 55 mg/L e 16 mg/L, rispettivamente (Cheynier *et al.*, 1989; Herrick *et al.*, 1985; Singleton *et al.*, 1978; Singleton *et al.* 1986). Nei vini giovani il contenuto degli acidi idrossicinnamici è molto basso ma si osserva un aumento durante la fase di

conservazione. Gli esteri dell'acido tartarico sono idrolizzati e danno luogo a forme libere di HCA (Andres-Lacueva *et al.*, 1996; Betes-Saura *et al.*, 1996).

Okamura e Watanabe (1981) hanno fornito una panoramica delle concentrazioni di acido caftarico, coutarico, caffeico e acido cumarico in vini bianchi presenti in commercio. I valori medi sono stati 23.0, 5.0, 0.9, e 0.7 mg/L per i vini Semillon (Bordeaux), 29.0, 10.0, 1.7 e 0.9 mg/L in vini Chardonnay (California), 112.0, 53.0, 3.1 e 2.1 mg/L per i vini Koshu (Giappone), e 51.0, 13.0, 4.1 e 2.9 mg/L per i vini Riesling (Germania). Durante l'invecchiamento si osserva la formazione di numerosi derivati degli HCA. Sono stati individuati e caratterizzati oltre gli esteri dell'acido tartarico, gli esteri etilici degli acidi caffeico e acido cumarico, nonché gli esteri etilici ed esteri dietilici dell'acido caftarico (Baderschneider *et al.*, 2001; Somers *et al.* 1987). Sono stati identificati anche i 4-O-glucosidi dell'acido ferulico e acido cumarico, i glucosidi dell'acido caffeico, cumarico, ferulico e sinapico (Fig. 15) (Baderschneider *et al.*, 2001; Cooper e Marshall, 2001).

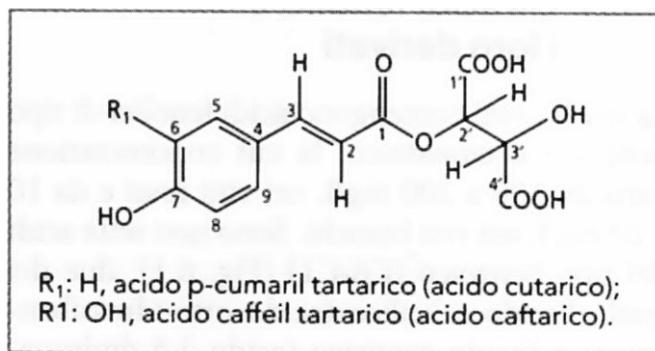


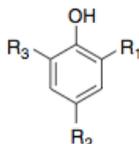
Fig. 15 Alcune forme eterosidiche degli HCA

Cheynier *et al.* (1986) hanno dimostrato che il prodotto di reazione dell'acido caftarico e del glutatione, l'acido 2-S-glutathionilcaftarico, è il principale composto fenolico che si forma durante il processo di ossidazione enzimatica. Questo prodotto incolore che è anche chiamato "prodotto di reazione dell'uva (GRP)" viene usato come misura per valutare il potenziale di ossidazione e imbrunimento del mosto d'uva.

3.2.3 Fenoli volatili

I fenoli volatili possiedono la più bassa concentrazione tra i composti fenolici presenti nel vino. Tuttavia, a causa della loro attività odorosa, hanno una grande influenza sulle caratteristiche sensoriali del vino. Per i fenoli volatili possono essere distinte due fonti: una è la formazione enzimatica a partire da precursori presenti nel vino, l'altra è dovuta alla migrazione di tali composti dal legno al vino, durante la maturazione in botte. Tra i fenoli volatili, i vinil ed etil fenoli, rivestono grande importanza. Si originano dalla decarbossilazione degli acidi idrossicinnamici e sono responsabili degli off-flavors di vini. Con una soglia di percezione di circa 420 µg/L per una miscela 10/1 di 4-vinilphenol e 4-vinylguaiacol nel vino bianco e di 720 µg/L per una miscela 1/1 di etil-fenoli nel vino rosso, questi composti possono facilmente alterare il vino. Come riportato da Chatonnet *et al.* (1989), il lievito *Saccharomyces Cerevisiae* può solo decarbossilare l'acido ferulico e cumarico. La comparsa di sentori fenolici nei vini è in particolare associata allo sviluppo di ceppi di *Brettanomyces*, che causano: perdita di aromi fruttati, sviluppo di sentori diversamente descritti come sentori di fattoria, sudore di cavallo, medicinale, pelle animale, cuoio, plastica, cerotto, vegetale, terroso. Un'altra fonte di fenoli volatili è il legno di rovere

della botte e i trucioli di rovere. Questi fenoli conferiscono al vino, aromi affumicati e tostati. I principali fenoli volatili presenti nel vino sono rappresentati nella Fig. 16.



Phenols	R ₁	R ₂	R ₃	MW
Ethyl phenol	H	C ₂ H ₅	H	122
Vinyl phenol	H	C ₂ H ₃	H	120
Guaiacol	OCH ₃	OH	H	124
Methyl guaiacol	OCH ₃	CH ₃	H	122
Ethyl guaiacol	OCH ₃	C ₂ H ₅	H	136
Vinyl guaiacol	OCH ₃	C ₂ H ₃	H	134
Propyl guaiacol	OCH ₃	C ₃ H ₇	H	150
Allyl guaiacol	OCH ₃	C ₃ H ₅	H	148
Syringol	OCH ₃	H	OCH ₃	154
Methyl syringol	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃	152

Fig. 16 Principali fenoli volatili

3.2.4 Stilbeni

Questa famiglia di composti ha assunto negli ultimi anni grande importanza, soprattutto per la sua influenza positiva sulla salute umana. Gli stilbeni possono essere biosintetizzati dalla vite come risposta di difesa allo stress, così come un'infezione microbica e l'irradiazione UV e, durante il processo di vinificazione vengono trasferiti nel mosto e poi nel vino. Essi possiedono due anelli benzenici uniti per mezzo di una catena etanica o etilenica (Fig. 17).

Fra questi composti, l'isomero trans del resveratrolo, o 3,5,4'-tridrossistilbene (Ribereau-Gayon *et al.*, 2007) (Fig. 18) è il più rilevante.

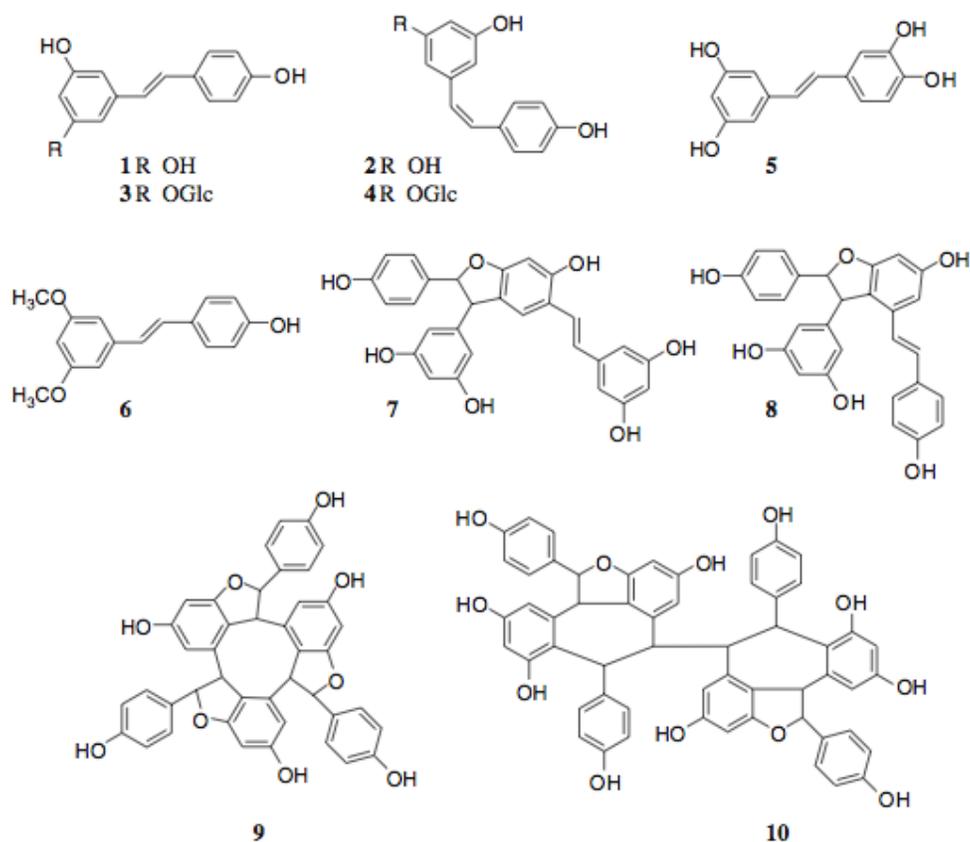


Fig.17 Struttura chimica degli stilbeni: *trans-resveratrolo (1)*, *cis-resveratrolo (2)*, *trans-piceide (3)*, *cis-piceide (4)*, *trans-piceatannolo (5)*, *trans-pterostilbene (6)*, *trans- δ -viniferina(7)*, *trans- ϵ -viniferina (8)*, *α -viniferina (9)*, *hopeaphenol (10)*

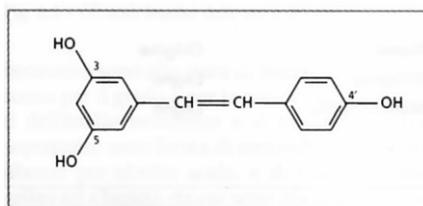


Fig.18 -3,5,4'- triidrossistilbene (resveratrolo)

Gli stilbeni derivano dall'acido cinnamico e da tre unità di acetato dal malonil coenzym A. La prima parte della biosintesi è in comune a quella dei flavonoidi. Le due vie biosintetiche sono divergenti al punto di ciclizzazione dell'acido stil-3,5,7 trichetoeptanoico. L'acilazione-C produce un calcone e successive modifiche a carico dei flavonoidi. Una condensazione aldolica dello stesso intermedio polichetide, produce un acido stilbene-2-carbossilico che è instabile ed è alla base della formazione di una serie di strutture note come stilbenoidi. La Figura 19 mostra una panoramica della via biosintetica (Gorham *et al.*, 1995).

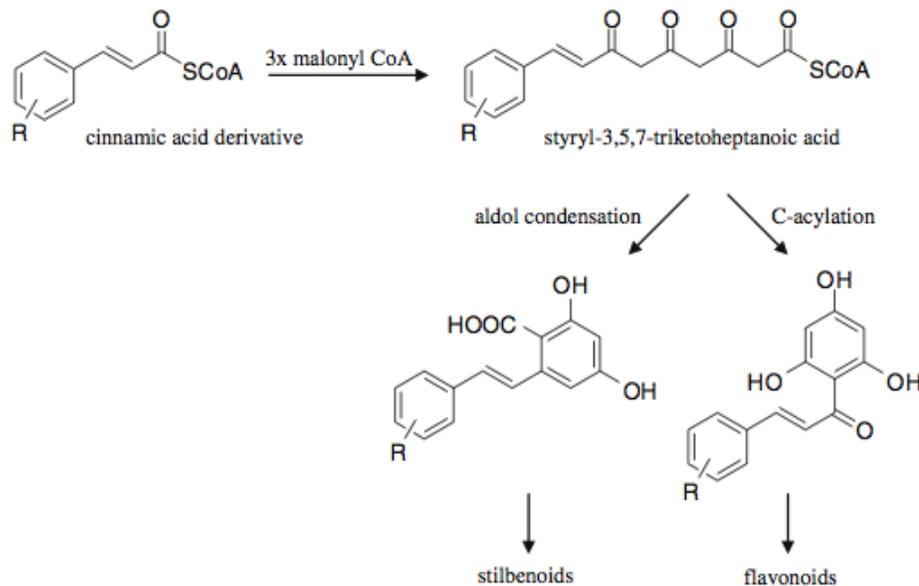


Fig. 19 Via biosintetica comune agli stilbenoidi e ai flavonoidi

Il contenuto di resveratrolo nell'uva differisce a seconda della varietà di uva, alla vendemmia, al grado di maturazione delle uve e allo stato sanitario (Chafer *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008).

Uno studio effettuato sui vini portoghesi da Ribeiro de Lima *et al.* (1999). dimostra che il contenuto di resveratrolo nei vini bianchi varia tra 0 e 2.1 mg/L per l'isomero trans e da 0 a 1,7 mg/L per l'isomero cis.

Altri studi effettuati sui vini portoghesi da De Revel (1996) individuano una concentrazione di trans-resveratrolo tra 0,01 e 0,51 mg/L mentre il contenuto di cis-resveratrolo è stato

calcolato tra 0,016 e 0,40 mg/L. Darias-Martin *et al.* (2000) hanno analizzato i vini bianchi delle Canarie e hanno identificato delle concentrazioni inferiori rispetto a quelle calcolate nei vini portoghesi, con valori medi di 0,22 mg/L per l'isomero trans e di 0,04 mg/L per l'isomero cis.

Studi effettuati sui vini bianchi della Galizia invece hanno mostrato valori di trans-resveratrolo dieci volte superiore rispetto ai vini portoghesi (De Revel *et al.*, 1996), Sebbene il contenuto in cis-resveratrolo sia simile, le concentrazioni erano molto più elevate rispetto ai valori determinati per i vini delle isole Canarie (Darias-Martin *et al.*, 2000).

4. Componente volatile del vino

L'aroma del vino è dovuto alla presenza di alcune centinaia di molecole appartenenti a diverse classi chimiche che ne costituiscono la frazione volatile. Il contributo di tali componenti alla gradevolezza dell'aroma di un vino dipende sia dalla loro natura che dalla loro concentrazione. Le soglie olfattive di tali composti possono differire notevolmente; pertanto, alcuni composti presenti in tracce possono svolgere un ruolo chiave nell'espressione dell'aroma di un vino, mentre altri, seppure più abbondanti, possono intervenire in misura minore. Il contributo di ogni molecola volatile all'aroma del vino dipende, inoltre, dalla sua struttura e quindi dalla sua natura chimica. La complessità dell'aroma del vino e le difficoltà del suo studio sono conseguenza della diversità dei meccanismi che intervengono nella sua genesi. Fra questi sono da segnalare:

- a. il metabolismo dell'uva, che è influenzato dalla varietà, ma anche dal terreno, dal clima e dalle pratiche viticole;
- b. i fenomeni biochimici prefermentativi (ossidazione, idrolisi), che scattano al momento della pigiatura e durante la macerazione;
- c. i metabolismi dei microrganismi che conducono le fermentazioni alcolica e malolattica;
- d. le reazioni chimiche ed enzimatiche postfermentative che intervengono durante la conservazione del vino e durante il suo invecchiamento in botte o in bottiglia.

Fra tutti i costituenti dell'aroma, i composti odorosi che provengono dall'uva giocano un ruolo determinante nella qualità e nella tipicità dei vini di cui costituiscono l'aroma varietale. Si osserva, inoltre, che, mentre il loro profilo qualitativo è sotto il controllo varietale, il loro contenuto è influenzato in modo sensibile dall'ambiente e dalle condizioni climatiche.

L'aroma varietale, a parte le varietà denominate aromatiche, come i moscati, che danno mosti dotati di aroma simile a quello dei vini, può non essere percepibile direttamente nelle uve e nei vini. La nozione di precursori d'aroma, forme inodori dei composti odorosi dell'uva, responsabili dell'aroma varietale dei vini, riveste una grande importanza in enologia. Il percorso di affermazione commerciale di vini ottenuti da vitigni autoctoni prevede l'individuazione di caratteri distintivi, indispensabili per la identificazione varietale e per la valorizzazione e tutela del prodotto. I composti correlati con l'aroma (Versini,

1991; Di Stefano, 1996), oltre ad influenzare la qualità dei vini, risultano determinanti nel definire l'impronta varietale.

4.1 Gli aromi delle uve e dei vini

Le molecole odorose si possono distinguere nei seguenti gruppi:

a) Aromi varietali o primari.

Sono sostanze presenti nell'uva che presentano note olfattive caratteristiche. Appartengono a questa classe i terpeni, i norisoprenoidi, i benzenoidi, gli alcanoli, le pirazine, i tioli e gli aromi di vite americana. Di questi aromi allo stato libero esistono solo le pirazine e quelli delle viti americane. Nelle uve non aromatiche le prime quattro classi di molecole sono contenute nell'uva come glicosidi, sono cioè legate agli zuccheri (glucosio, disaccaridi); nelle aromatiche (moscati) i composti terpenici si trovano anche allo stato libero (Rapp, 1998).

Le caratteristiche varietali del vino possono essere valorizzate con la fase di macerazione prefermentativa per contatto del mosto con le bucce; in seguito a tale processo, infatti, si verifica l'estrazione diretta delle molecole volatili. Tuttavia, il contatto con la buccia può anche tradursi in un incremento del fenomeno dell'astringenza, parziale imbrunimento e formazione di note erbacee, questi fenomeni dipendono dalle condizioni di macerazione e dal grado di maturazione dell'uva (Cabaroglu *et al.*, 2002)

b) Aromi prefermentativi.

Sono composti che vengono generati dai trattamenti che subisce l'uva, dal momento della raccolta a quello dell'avvio della fermentazione alcolica. Questi composti vengono generati dall'attacco delle lipossigenasi sugli acidi grassi insaturi delle membrane cellulari al momento dello schiacciamento dell'acino. I principali composti che fanno parte di questa categoria sono aldeidi e alcoli a sei atomi di carbonio, esanale, trans e cis-3-esenale, trans-2-esenale, esanolo, trans e cis-3-esenolo e trans-2-esenolo, caratterizzati da un odore erbaceo molto marcato.

Questi composti, generalmente, condizionano l'aroma del mosto. In questo contesto si dimostrano di notevole importanza il tipo di raccolta, il trasporto, la pigiatura, il tempo e la temperatura di macerazione, il tipo e il grado di pressatura, il tipo di debourbage, il grado di ossigenazione, coadiuvanti tecnologici utilizzati, ecc. (Zironi *et al.*, 1991).

c) Aromi di fermentazione o secondari.

Sono i profumi che si creano durante i processi di fermentazione alcolica e malolattica e dipendono molto dal tipo di lievito utilizzato, e dalla sua attività metabolica nei riguardi di alcune sostanze già presenti nel succo. Questi profumi sono attribuibili alla presenza di diversi composti chimici come le aldeidi, acidi grassi a corta catena, alcoli superiori, esteri e altri ancora che conferiscono al vino sentori freschi e fragranti di fiori e frutta, tipici dei vini giovani (Di Stefano, 1996). Altre sostanze possono deprimere queste sensazioni di freschezza e delicatezza degli aromi fruttati come, ad esempio, il lattato di etile o il diacetile, prodotti soprattutto dalla fermentazione malolattica, l'alcol isoamilico, ecc. Il

contenuto degli aromi di fermentazione può essere molto variabile e ciò dipende da molti fattori quali:

-La materia da fermentare e quindi il contenuto in zuccheri delle uve, il grado di maturazione (maggiore è la quantità di zuccheri a disposizione, più elevato ed intenso risulterà il profumo) e il tenore in amminoacidi, che influisce sul contenuto finale in esteri e in alcoli superiori (Peynaud *et al.*, 1980).

-La natura del lievito. Ogni specie ha il suo modo particolare di trasformare gli zuccheri e di formare prodotti secondari, tanto che alcune sostanze odorose sono considerate dei markers per specifici ceppi di lievito (Villa *et al.*, 1998).

-Le condizioni fisiche di fermentazione, in particolare temperatura e potenziale redox (in genere basse temperature diminuiscono il tenore in alcoli superiori ed aumentano il contenuto in esteri e ciò si traduce in un notevole miglioramento sensoriale).

Durante la fermentazione, inoltre, si forma l'anidride carbonica (gassosa) che si evolve dal mosto. Se la fermentazione avviene molto velocemente il gas fuoriesce in maniera tumultuosa e trascina con sé le sostanze odorose, in quanto sono facilmente volatili.

d) Aromi postfermentativi o terziari.

Sono i profumi che si formano durante la maturazione e l'affinamento del vino attraverso reazioni chimiche come l'acetalizzazione, l'esterificazione, l'eterificazione e l'ossidazione a carico di aldeidi, alcoli, acidi organici, tannini, ecc.

4.1.1 Gli Aromi Varietali

Gli aromi varietali (primari e secondari) appartengono a diverse famiglie chimiche:

- i terpeni in forma libera e glicosilata;
- derivati da precursori norisoprenoidi C13 in forma libera e glicosilata;
- le metossipirazine;
- i composti solforati che possiedono una funzione tiolica (tioli volatili e precursori dei tioli volatili derivati della cisteina) (Failla *et al.*, 2006, Riberau-Gayon *et al.*, 1998).

È altresì noto che ognuna di queste molecole è il prodotto di vie biosintetiche caratterizzate da enzimi, espressione del genoma della pianta, mentre il loro contenuto è strettamente dipendente dalle condizioni pedoclimatiche e dalle pratiche viticole.

L'aroma varietale, a parte per le varietà denominate aromatiche, come i moscati, può non essere percepibile direttamente nelle uve e nei vini. Tuttavia, i mosti di numerose varietà danno vini il cui aroma caratteristico è più o meno specifico della varietà, come avviene nella la maggior parte dei grandi vitigni quali Merlot, Cabernet, Sauvignon, Semillon, Pinots, Gamay, Chardonnay. Questo è dovuto alla presenza di precursori d'aroma, inodori come per esempio i terpeni e norisoprenoidi glicosilati da cui si liberano gli agliconi odorosi per fenomeni idrolitici dovuti alla vinificazione. L'idrolisi dei composti glicosilati può portare alla liberazione di agliconi volatili oppure agliconi che sono loro stessi

precursori di composti aromatici, come osservato per la maggior parte degli agliconi C13 norisoprenoidi. La via biosintetica dei norisoprenoidi comincia con una reazione di taglio bio-ossidativo dei carotenoidi e comprende una serie di reazioni enzimatiche (Wirth *et al.*, 2001; Strauss *et al.*, 1987; Winterhalter *et al.*, 1990). Quindi, durante la vinificazione uno o più enzimi sono responsabili dell'idrolisi di precursori glicosidici e del conseguente rilascio di composti volatili. I precursori comprendono monoglucosidi, in cui lo zucchero è il β -D-glucosio, e precursori diglucosidici, in cui al glucosio è legata una seconda unità glucidica come α -L-arabinofuranoside, α -L-ramnopiranoside, β -D-apiofuranoside. Al pH del vino l'idrolisi spontanea del legame β -glicosidico porta al rilascio dei composti volatili. Inoltre, enzimi con attività glicosidica, come quelli prodotti da alcuni lieviti, sono capaci di promuovere una rapida idrolisi di composti glicosilati. Il meccanismo proposto include, nel caso dei glicosidi disaccaridi, l'azione preliminare di un'appropriata glicosidasi (arabinofuranosidasi, ramnopiranosidasi o apiofuranosidasi) che permette il rilascio dello zucchero terminale prima che la β -glicosidasi liberi l'aglicone volatile. Per i precursori glucosidici è necessario solo l'ultimo step. Vari studi hanno dimostrato che l'estratto enzimatico di *Saccharomyces cerevisiae* è capace di liberare la frazione volatile dei precursori glicosilati della bacca. I *Saccharomyces cerevisiae* hanno minor attività glicosidica rispetto ai lieviti non *Saccharomyces*; l'attività enzimatica è massima durante la fase di crescita esponenziale della popolazione di lieviti, dopo si abbassa velocemente. L'attività glicosidica è influenzata negativamente dal pH del vino e dalla concentrazione di etanolo, perciò è limitata alla prima fase della fermentazione (Ugliano *et al.*, 2006).

4.1.1.1 Terpeni

I terpeni volatili possono essere distinti in due gruppi correlati biosinteticamente: i monoterpeni, composti a 10 atomi di carbonio, e i sesquiterpeni, composti a 15 atomi di carbonio, formati rispettivamente a partire da due o tre unità isopreniche. Attualmente si conoscono circa 50 monoterpeni. I più odorosi appartengono alla classe degli alcoli monoterpenici quali il linalolo, il geraniolo, il nerolo, il citronello, l' α -terpineolo (Fig. 20).

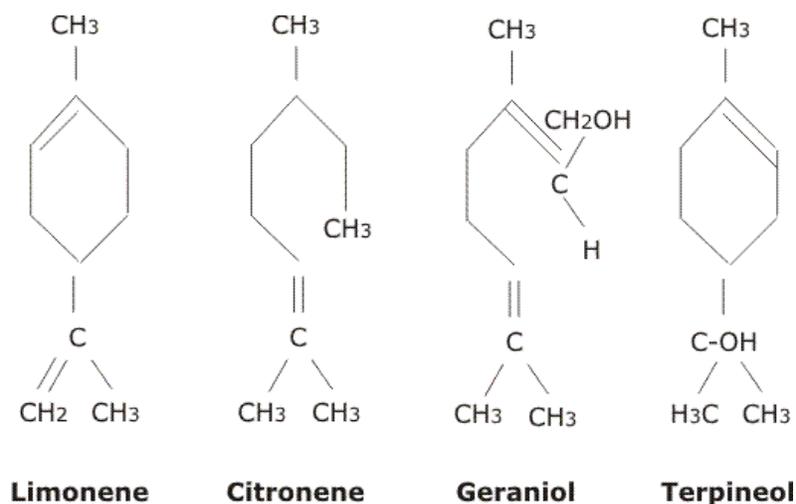


Fig. 20 Esempi di monoterpeni

I terpeni sono costituenti secondari della pianta, la cui biosintesi comincia con l'acetil-coenzimaA (CoA). Anche i microrganismi sono in grado di sintetizzarli (Carrau *et al.*,

2005). Il ruolo dei monoterpeni nell'aroma dell'uva e del vino del moscato è ben conosciuto (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975; Williams *et al.*, 1980). Molti autori hanno indicato che i terpeni glicosidici della buccia hanno un ruolo dominante nella definizione dell'aroma varietale dei vini. È possibile in tal senso la seguente classificazione delle uve:

-*uve moscate*, intensamente aromatizzate, in cui la concentrazione totale di monoterpeni liberi può essere di 6 mg/L;

-*varietà non-moscate*, ma aromatiche con una concentrazione totale di monoterpeni che va da 1 a 4mg/L;

-*varietà neutre*, che non dipendono dai monoterpeni per il loro odore sebbene essi possano essere potenzialmente disponibili nella forma glicosilati inodore.

Nell'uva, infatti, si possono individuare monoterpeni liberi, poli-idrossilati e glicosidici. I principali composti terpenici liberi sono gli alcoli come il linalolo, il geraniolo e il nerolo, insieme alle forme furaniche e piraniche degli ossidi del linalolo, il citronellolo, l' α -terpineolo, l'HO-trienolo, gli ossidi del nerolo, il mircenolo e aldeidi ed idrocarburi. Nei vini, inoltre, sono stati trovati parecchi eteri ed esteri. Le forme poli-idrossilate dei monoterpeni o polioli inodori (come il 3,7-dimetil-1-octen-3,6,7-triolo, il 3,7-dimetil-2-octen-1,7-diolo) possono dare origine, per idrolisi in ambiente acido, a monoterpeni volatili piacevoli e "potenti". Ad esempio dal diendiolo (3,7-dimetil-octa-1,5-diene-3,7-diolo) si può liberare l'ossido del nerolo e dell'HO-trienolo. Le forme glicosilate dei monoterpeni sono

complesse e si differenziano per la struttura dell'aglicone costituita principalmente dai terpenoli, ma anche dagli ossidi del linalolo, dai dioli terpenici ed dai trioli (Fig. 21). I glicosidi sono, nella maggior parte delle uve, più abbondanti delle corrispondenti forme libere. I risultati delle ricerche condotte sull'argomento hanno messo in evidenza che la quantità e la qualità dei terpeni glicosilati dipendono dalla cultivar dell'uva (Bayonove *et al.*, 1993).

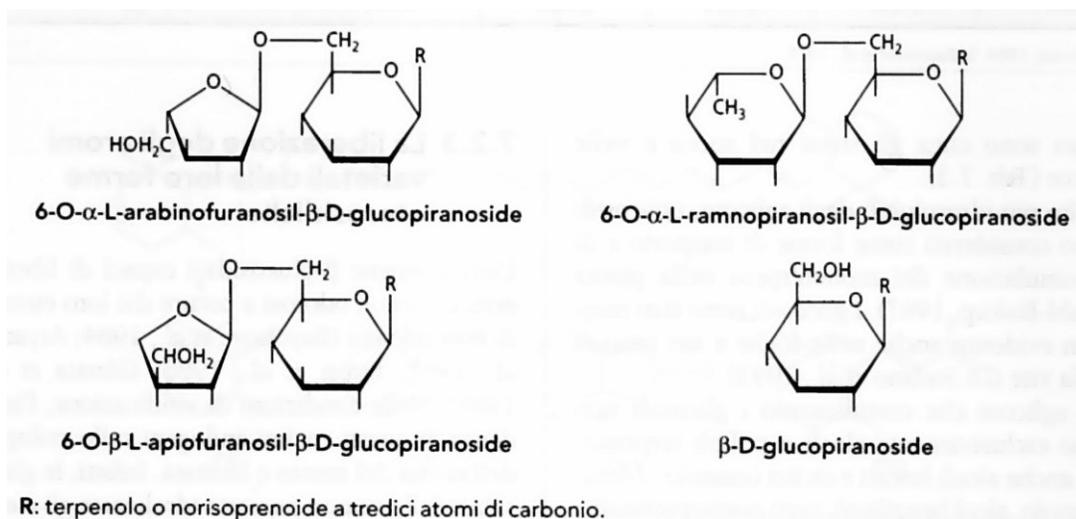


Fig. 21 Le differenti forme dei glicosidi terpenici riscontrati nell'uva

I monoterpeni glicosidi inodori, come precedentemente detto, per idrolisi acida o enzimatica possono liberare gli agliconi aromatici volatili. L'idrolisi enzimatica, durante i trattamenti prefermentativi produce un aroma più "naturale" nel vino (Mateo *et al.*, 2000; Gunata *et al.*, 2002). Il fenomeno è favorito dalla macerazione delle parti solide, data

l'elevata concentrazione di composti terpenici legati presenti nelle bucce. Per quanto concerne l'idrolisi acida dei terpeni glicosidici è stato osservato in vitro che essa può indurre una riorganizzazione molecolare dei monoterpenoli i quali sono trasformati in altri composti (Williams *et al.*, 1982). Questo processo simula le reazioni che avvengono, in vivo, durante l'invecchiamento. Infatti, il contenuto in monoterpeni cambia durante la conservazione in bottiglia, o piuttosto durante la maturazione del vino, per mezzo di reazioni catalizzate da acidi (Rapp *et al.*, 1986; Di Stefano *et al.*, 1989). Diversi studi dimostrano che nei vini Moscato si verifica una progressiva riduzione del contenuto di linalolo e α -terpineolo durante la fase di conservazione in bottiglia, questo è dovuto ai fenomeni di ossidazione e tale variazione si osserva anche in altri vini bianchi (Ferreira *et al.*, 1997).

4.1.1.2 Norisoprenoidi

Sono molecole aromatiche di natura terpenica molto diffuse in natura e presenti in foglie, fiori e frutti. Nella vite si rinvencono in foglie e frutti, prevalentemente in forma monoglucosidica, come arabinosilglucosidi e ramnosilglucosidi (Razungles *et al.*, 1993). Sono caratterizzati da una potente nota aromatica floreale e fruttata grazie alla bassa soglia di percezione. Derivano chimicamente dai carotenoidi, terpeni a 40 atomi di carbonio (tetraterpeni), per degradazione chimica, fotochimica e ossidazione enzimatica (Failla *et al.*, 2006). Da un punto di vista chimico, si distinguono due principali gruppi di composti, i

megastigmani e i non megastigmani, costituiti, ognuno, da un sensibile numero di composti volatili (Fig. 22).

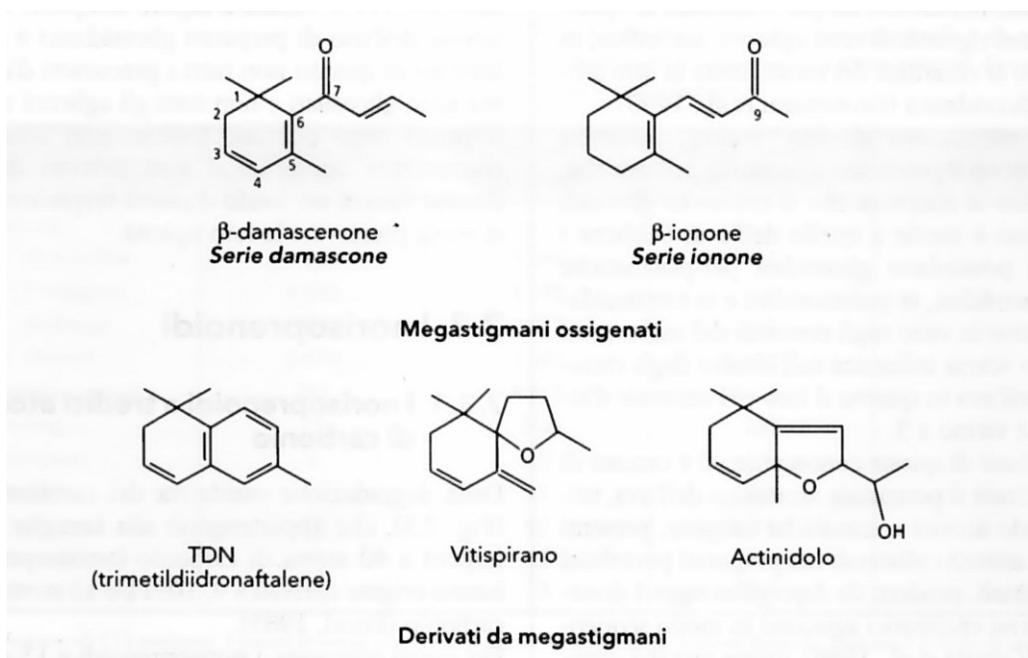


Fig. 22 Principali famiglie C-13 norisoprenoidi nell'uva (Ribereau-Gayon et al., 1998)

La struttura dei megastigmani è caratterizzata da un ciclo a sei atomi di carbonio sostituito da gruppi metilici sui carboni 1 e 5 e da una catena alifatica a quattro atomi di carbonio, recante un'insaturazione sul C6 del ciclo. I megastigmani sono norisoprenoidi a tredici atomi di carbonio ossigenati, sul C7 (serie damascone) o sul C9 (serie ionone). Fra questi composti, il β -damascenone, dall'odore complesso di fiori, di frutti esotici e di composta di mele, possiede una soglia di percezione olfattiva molto bassa nell'acqua (3,5 ng/L) e relativamente bassa in soluzioni modello (45 ng/L) (Ribereau-Gayon, 2006). La sua soglia di riconoscimento nei vini rossi è di 5.000 ng/L. Esso è stato inizialmente identificato nel

succo d'uva delle varietà Riesling e Moscato, ma esiste, verosimilmente, in tutti i vitigni. La concentrazione in β -damascenone dei vini bianchi e rossi è estremamente variabile. Si ritiene, tuttavia, che il suo impatto olfattivo in certi vini sia importante. I valori riscontrati nei vini rossi sono un po' più elevati di quelli dei vini bianchi secchi e molto elevati nei vini dolci naturali ottenuti da varietà di tipo Moscato. In media, i tenori dei vini rossi Merlot, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc, non presentano differenze significative. Il β -ionone, dal caratteristico odore di violetta, possiede una soglia di percezione di 120 ng/L nell'acqua e di 800 ng/L in soluzione idroalcolica modello, mentre nei vini è 1,5 μ g/L. Esso è stato identificato nelle uve di diversi vitigni bianchi e nei Moscati; come il β -damascenone, esiste in tutti i vitigni. Il contributo aromatico del β -ionone all'aroma dei vini bianchi è trascurabile; al contrario, può svolgere un ruolo significativo nei vini rossi. La sua concentrazione è ancora più variabile di quella del β -damascenone e non sembra influenzata significativamente dal vitigno. Gli altri norisoprenoidi ossigenati identificati sono il 3-oxo-A-ionolo (nota aromatica di tabacco), il 3-idrossi- β -damascone (tè, tabacco) e il β -damascone (tabacco, fruttato). L'impatto olfattivo di questi composti, a causa delle loro alte soglie di percezione, è trascurabile, malgrado spesso siano contenuti nei vini in quantità importanti.

I non megastigmani sono anch'essi norisoprenoidi a tredici atomi di carbonio di cui alcuni composti molto odorosi. Fra questi si segnala, innanzi tutto, il TDN (1,1,6 trimetil-1,2-diidronaftalene) che gioca un ruolo importante nella formazione della nota aromatica di cherosene dei vini Riesling vecchi. Generalmente assente nell'uva e nel vino giovane, il

TDN si può formare nel corso dell'invecchiamento in bottiglia, fino a raggiungere tenori di 200 µg/L, che superano la sua soglia di percezione (circa 20 µg/L). Gli actinidoli e i vitispirani sono altri composti della stessa famiglia che possiedono un odore di canfora. Certi norisoprenoidi non megastigmani deriverebbero dalla trasformazione acido catalizzata dei megastigmani. I vitispirani isomeri, che si formano per questa via durante l'invecchiamento in bottiglia, potrebbero contribuire all'odore difettoso di canfora dei vini prematuramente ed esageratamente invecchiati (Riberau-Gayon *et al.*, 1998).

Questi aromi varietali del vino derivano da molecole contenute nell'uva (i carotenoidi) (Fig. 23). Recentemente alcuni studi avrebbero confermato l'ipotesi che i norisoprenoidi si originino in seguito all'attività di un enzima specifico, detto carotene diossigenasi, capace di produrli a partire dai carotenoidi (Failla *et al.*, 2006).

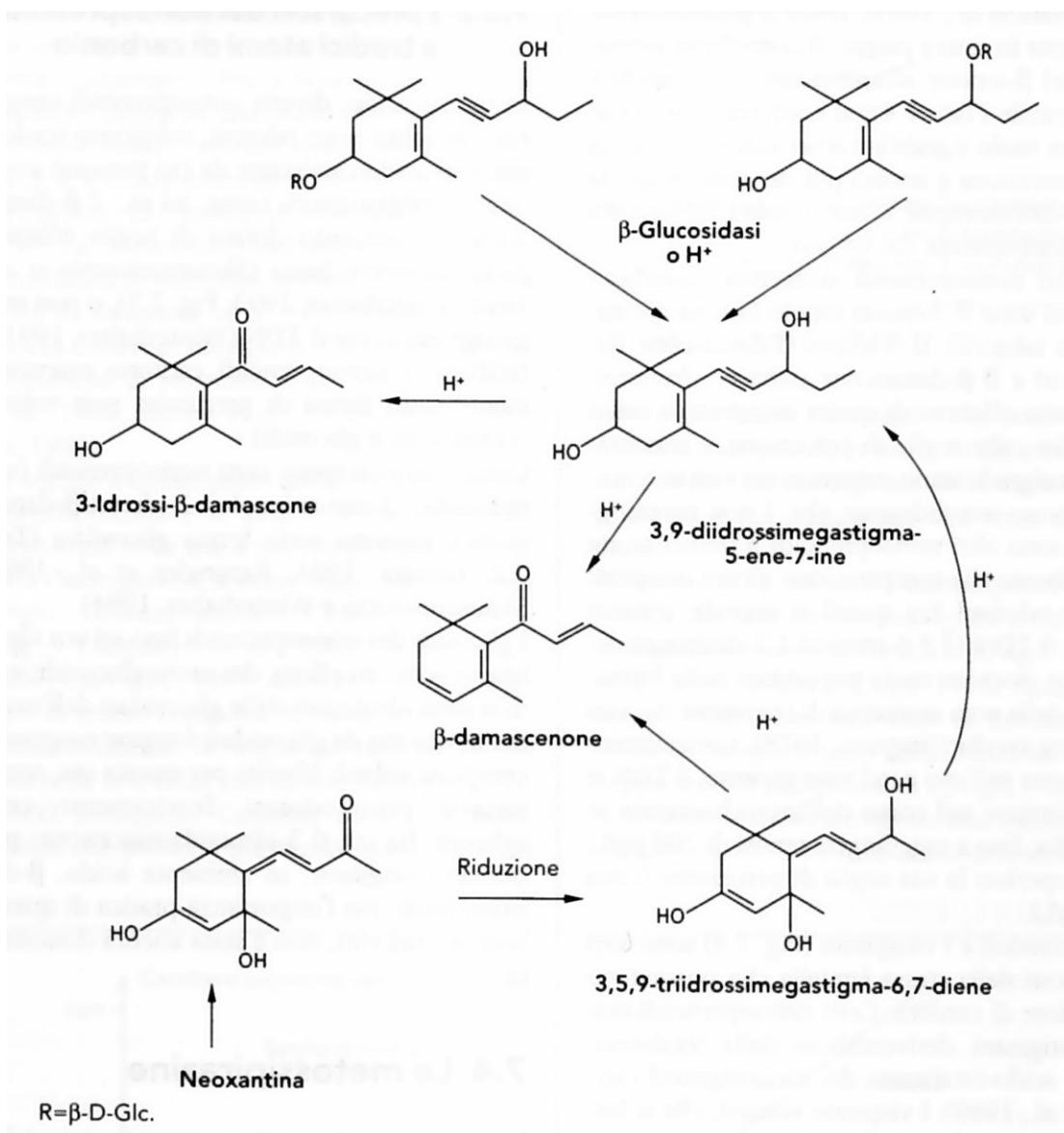


Fig. 23 Via di formazione del β -damascenone nell'uva e nel vino (Shouroumounis et al., 1992; Winterhalter et al., 1993).

In passato, vari risultati avevano supportato l'ipotesi di un coinvolgimento di una ossigenasi regione specifica in grado di formare i C13 norisoprenoidi a partire dai carotenoidi:

-la maggioranza di norisoprenoidi aventi 13 atomi di carbonio,

-la configurazione dei centri asimmetrici in comune con i rispettivi carotenoidi,

-e la correlazione negativa osservata durante la maturazione tra i livelli di C13 norisoprenoidi e carotenoidi.

Adesso è stato identificato un gene (VvCCD1) in *Vitis vinifera* in grado di codificare la carotene diossigenasi; è stata osservata un'induzione significativa nell'espressione del gene circa una settimana prima dell'invasatura in due cultivars, Moscato di Alessandria e Syrah (Mathie *et al.*, 2005). La via biosintetica proposta che porta dai carotenoidi ai C13 norisoprenoidi comprende tre stadi successivi; il primo riguarda la degradazione enzimatica dei carotenoidi tramite ossidasi. I primi prodotti di questi taglio sono carbonili di C13 norisoprenoidi che hanno lo scheletro ossidato dei corrispettivi carotenoidi. Il secondo stadio riguarda la modificazione, tramite ossidasi e reductasi, del grado di ossidazione di questi primi prodotti. Infine, il terzo stadio consiste nella glicosilazione, tramite la glicosiltransferasi, di quei composti norisoprenoidi aventi un gruppo ossidrilico. Ci sono diverse prove in favore dell'ipotesi che i C13 norisoprenoidi derivino dai carotenoidi; queste comprendono il fatto che la maggioranza di norisoprenoidi possiede 13 atomi di carbonio e questo indica la specificità di taglio; la configurazione dei centri asimmetrici

comune ai C13 norisoprenoidi e i corrispondenti carotenoidi (Fig. 24, Fig. 25); il trasferimento di marcatori C dai carotenoidi ai norisoprenoidi tra l'invaiaatura e la maturazione; la correlazione negativa osservata tra i livelli di carotenoidi e norisoprenoidi tra l'invaiaatura e la maturazione, soprattutto se i grappoli sono direttamente esposti alla luce solare.

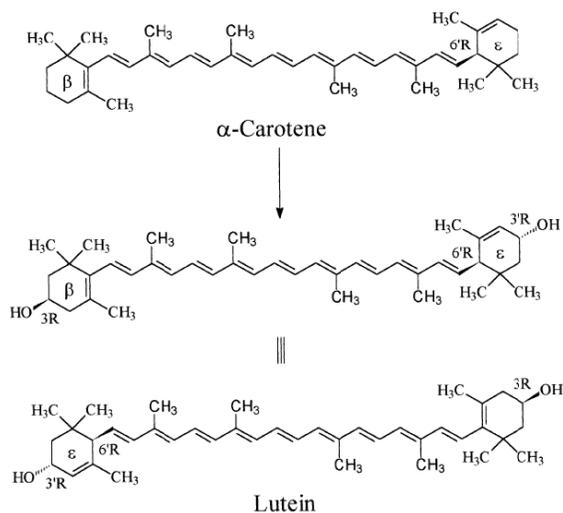


Fig. 24 Formazione dei glucosidi megastigmano-3,9-diolo e del 3-oxo- α -ionolo dalla luteina mantenendo la stereochimica dei carboni 3 e 6 (Baumes et al., 2002).

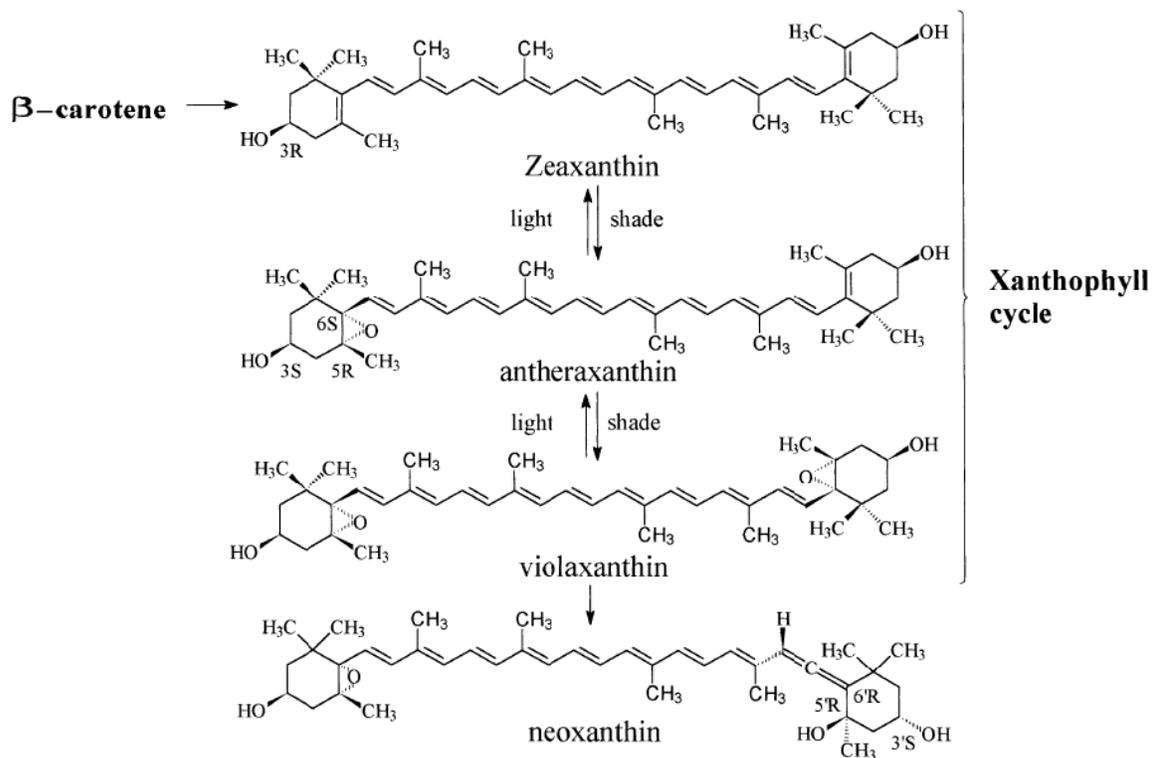


Fig. 25 Formazione del 3-idrossi- β -damascone (e del suo glucoside) e del β -damascenone dalla neoxantina, mantenendo la stereochimica del carbonio 3 (Baumes *et al.*, 2002)

L'espressione del gene che codifica l'enzima e la conseguente sintesi di norisoprenoidi si attivano qualche giorno prima dell'invasatura. Ciò differenzia la sintesi dei norisoprenoidi da quella degli altri metaboliti secondari della maturazione dell'uva, quali gli antociani e i terpeni, e lascia intravedere un loro possibile ruolo regolatore dell'invasatura e della successiva maturazione (Failla *et al.*, 2006).

4.1.1.3 Le Metossipirazine

Sono composti eterociclici azotati, provenienti dal metabolismo degli amminoacidi. La 2-metossi-3-isopropilpirazina, la 2-metossi-3-butilpirazina e la 2-metossi-3-isobutilpirazina sono caratterizzate da un odore vegetale che ricorda il peperone verde, l'asparago e note terrose. La 2-metossi-3-isobutilpirazina ha note aromatiche di peperone verde, pisello e patata (Fig. 26). E' stata identificata per la prima volta da Boyonove (1975) nell'uva della varietà Cabernet Sauvignon; in seguito, sono state identificate anche la 2-metossipirazina e altre pirazine nelle uve e nei vini di numerose altre varietà come Sauvignon, Cabernet franc, Merlot, Pinot grigio, Gewürztraminer, Chardonnay, Resling (Calò *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1994).

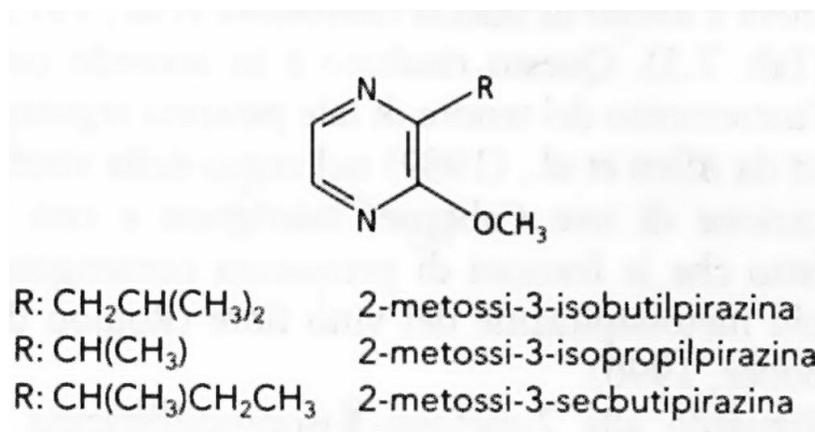


Fig. 26 Principali metossipirazine

4.1.1.4 Composti solforati che possiedono una funzione tiolica

I tioli (o mercaptani, abbreviazione dell'espressione "corpus mercurio aptum" data ai tioalcoli per la loro caratteristica capacità di dare dei precipitati poco solubili con i sali di mercurio) sono composti organici assimilabili ad alcoli in cui l'atomo di ossigeno è stato sostituito da un atomo di zolfo. I composti solforati di tipo tiolico (o mercaptani) sono, generalmente, responsabili di difetti olfattivi. Tuttavia, il loro ruolo nell'aroma di certi frutti è ben noto. Essi conferiscono al vino aromi caratteristici le cui differenti note erbacee e fruttate, ricordano il peperone verde, il bosso, la ginestra, il pompelmo, il frutto della passione, il fumo. Recentemente diversi tioli molto odorosi sono stati identificati nei vini da uve Sauvignon (Fig. 27). La prima tra tali sostanze identificata è stata il 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (Darriet *et al.*, 1993) dal marcato odore di bosso e di ginestra. In seguito sono state identificate altre molecole quali l'acetato di 3-mercaptoesan-1-olo, il 4-4-mercapto-4-metilpentan-2-olo ed altre (Tominaga *et al.*, 1998). I mosti Sauvignon, come quelli di molte varietà neutre, sono poco odorosi mentre l'aroma caratteristico del vitigno si sviluppa durante la fermentazione alcolica. Studi effettuati da Peynaud (1980) riportano che i precursori inodori degli aromi dei mosti Sauvignon, come il 3-mercaptoesan-1-olo, il 4-metil-4-mercaptopentan-2-one, il 4-metil-4-mercaptopentan-2-olo, derivati S-coniugati della cisteina, vengono rilasciati nel corso della fermentazione alcolica, probabilmente per intervento di una β -liasi specifica. Il rilascio di questi composti è più o meno importante a

seconda del ceppo di lievito di *S. cerevisiae* che conduce la fermentazione (Masneuf *et al.*, 1996).

Composti	Campioni			
	1	2	3	4
4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (4MMP)	5 (6)	4 (5)	10 (13)	4 (5)
3-mercapto-esan-1-olo acetato (A3MH)	724 (181)	451 (113)	451 (113)	275 (69)
3-mercaptoesan-1-olo (3MH)	8,402 (140)	12,822 (214)	7,456 (123)	3,736 (63)
4-mercapto-4-metil-pentan-2-olo (4MMPOH)	18 (0,3)	20 (0,4)	22 (0,4)	20 (0,4)
3-mercapto-3-metil-butan-1-olo (3MMB)	78 (0,05)	80 (0,06)	97 (0,07)	82 (0,06)

Fonte: Tominaga et al., 1998b

Fig. 27 Determinazione dei tioli volatili (ng/L) in quattro vini bianchi Sauvignon di Bordeaux annata 1996 (Fra parentesi: indice aromatico di ogni composto (concentrazione/soglia di percezione)).

4.2 Aromi di fermentazione (o secondari)

Gli aromi di fermentazione sono costituiti principalmente dai prodotti del metabolismo dei microrganismi responsabili della fermentazione alcolica e malolattica. Da un punto di vista chimico sono costituiti da alcoli superiori (con più di due atomi di carbonio), dai loro esteri acetici, dagli esteri etilici degli acidi grassi, dai composti carbonilici e dai solfuri volatili.

Alcoli superiori

Gli alcoli sono, da un punto di vista quantitativo, il più importante gruppo di composti volatili prodotti dai lieviti durante la fermentazione alcolica degli zuccheri. Essi sono caratterizzati da una struttura costituita da due atomi di carbonio e comprendono gli alcoli a catena ramificata 2-metilpropanolo (isobutanolo), 2-metilbutanolo (alcol amilico), e 3-metilbutanolo (alcol isoamilico), e gli alcoli aromatici 2-feniletanolo e tirosolo. Secondo Rapp e Versini (1996) le concentrazioni degli alcoli superiori al di sotto dei 300 mg/L arricchiscono il vino in complessità aromatica, mentre concentrazioni più elevate possono essere dannose per la qualità del vino. Al contrario, il 2-feniletanolo è generalmente un composto positivo per l'aroma del vino, conferendo allo stesso un piacevole profumo di rose (Swiegers *et al.*, 2005). Le varie concentrazioni degli alcoli superiori agiscono positivamente o negativamente sul profumo del vino, e sono responsabili dell'intensità aromatica e dello stile del vino. La correlazione tra la composizione dei composti volatili e i dati ottenuti dall'analisi sensoriale dei vini bianchi, suggerisce che per i vini Chardonnay, il 2-metilbutanolo e il 3-metilbutanolo, sono importanti dal punto di vista sensoriale, mentre per i vini Riesling nessuna classe di alcoli superiori influenza il profilo aromatico (Smyth *et al.*, 2005). Gli alcoli superiori si formano in seguito a decarbossilazione e conseguente riduzione a partire dagli α -chetoacidi. Gli α -chetoacidi vengono sintetizzati durante il processo di glicolisi e vengono destinati alla biosintesi degli amminoacidi (Äyräpää *et al.*, 1971) (Fig. 28).

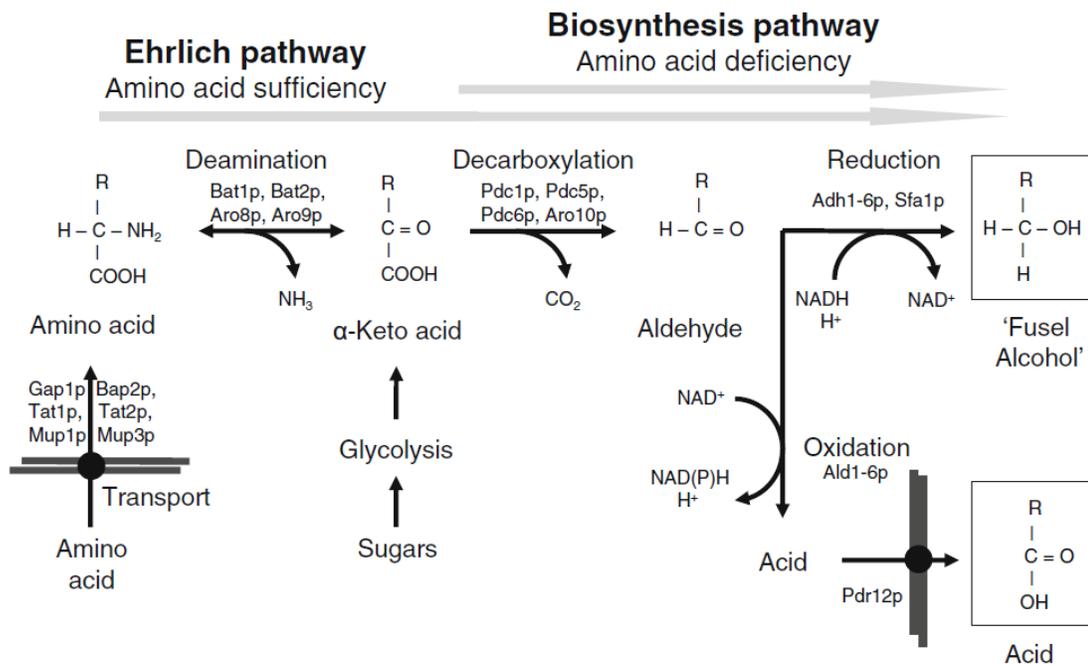


Fig. 28 Formazione degli alcoli superiori da zuccheri ed amminoacidi secondo la via di biosintesi di Ehrlich.

Esteri

Gli esteri derivati dal processo di fermentazione sono in gran parte responsabili dell'aroma di fruttato nel vino e svolgono un ruolo importante nella composizione sensoriale dei vini giovani rossi e bianchi. Anche se al pH del vino una parte significativa degli esteri idrolizza durante l'invecchiamento, i principali esteri prodotti dal processo di fermentazione sono ancora presenti in concentrazione superiore al loro valore di odour threshold (OT) in vini di età compresa tra 1-2 anni (Escudero *et al.*, 2007; Moio *et al.*, 2004; Rapp *et al.*, 1993), questo suggerisce il loro coinvolgimento nel profilo sensoriale di vini con una fase di

invecchiamento superiore. I due principali gruppi di esteri derivati dal processo di fermentazione, ed associati all'aroma di fruttato del vino, sono gli esteri acetati [etilacetato, 2-metilpropil acetato (acetato di isobutile), 2- e 3-metilbutil acetato (amilico attivo e acetato di isoamile, rispettivamente), esil acetato, e 2-feniletilacetato] e gli esteri etilici degli acidi grassi (C3-C12). Van der Merwe e Van Wyk (1981) hanno dimostrato che, per quanto riguarda l'aroma del vino, gli acetati sono più importanti rispetto agli esteri etilici degli acidi grassi, e che l'intensità dell'aroma di una miscela di esteri è più elevata di quella dei singoli componenti. Recentemente, è stato studiato il ruolo svolto dagli esteri a catena ramificata, vale a dire 2-metilpropanoato di etile, 2-metilbutanoato di etile, e 3-metilbutanoato di etile, sull'aroma del vino. Questi esteri conferiscono al vino aromi di fragola, e probabilmente contribuiscono alle note di frutti rossi di alcuni vini rossi (Piombino *et al.*, 2004). I valori di OT sono compresi tra i 3 mg/L per il 3-metilbutanoato di etile (Guth *et al.*, 1997) e i 18 mg/L per il 2-metilbutanoato di etile (Ferreira *et al.*, 2000), evidenziando che questi composti sono tra gli aromi più potenti nella classe di esteri. Tuttavia, anche se si presentano in minore concentrazione rispetto agli esteri ed acetati degli acidi grassi, deve ancora essere studiato il loro impatto sulla aroma del vino (Escudero *et al.*, 2007). Gli esteri acetati si formano attraverso la condensazione degli alcoli superiori con acetil-CoA, catalizzata all'interno della cellula dagli enzimi alcol acetiltransferasi (Malcorps *et al.*, 1991; Mason *et al.*, 2000). La concentrazione finale di questi composti è data dal bilancio tra la loro sintesi ad opera dagli enzimi alcool acetiltransferasi e la loro idrolisi catalizzata dagli enzimi esterasi (Fig. 29) (Fukuda *et al.*, 1998; Plata *et al.*, 2005).

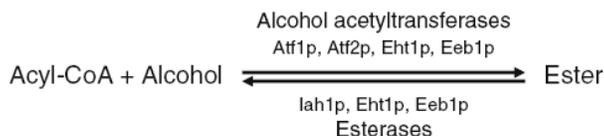


Fig. 29 Via di biosintesi e degradazione degli esteri degli acidi grassi, per attivazione con coenzima A e condensazione con alcoli catalizzata dalle alcol acetiltransferasi. Le esterasi idrolizzano gli esteri nella loro componente acida e alcool.

Composti carbonilici

I lieviti producono diversi composti carbonilici dal metabolismo degli zuccheri, compresi aldeidi, chetoni e chetoacidi. L'acetaldeide è quantitativamente la più importante aldeide satura presente. Ha una soglia di 100 mg/L di vino, con intervalli di concentrazione da 10 mg/L a 75 mg/L nei vini secchi, conferendo note di mela molto matura e aromi di nocciola, quando è presente in concentrazioni sensorialmente rilevabili (Schreier *et al.*, 1979). Inoltre, una concentrazione più elevata di aldeidi sature (C3-C9), conferisce note erbacee, di grasso, fruttato (Ebeler *et al.*, 1998). L'esanale, cis-3-esanale e trans-2-esanale contribuiscono alla formazione delle note erbacee evidenti nel mosto d'uva. Nei vini secchi alte concentrazioni di acetaldeide, generalmente associate a reazioni di ossidazione, causano la formazione di off-flavour; comunque, questo composto ha un ruolo chiave nell'aroma di vini particolari prodotti con processi ossidativi, come ad esempio sherry spagnolo, vin jaune francese, vini marsala siciliani e la vernaccia sarda (Jackson *et al.*,

2000; Schreier *et al.*, 1979). L'esposizione del vino all'ossigeno (aria), quando per esempio viene conservato mantenendo anche un minimo spazio libero o durante le operazioni di trasferimento, determina un aumento del contenuto di acetaldeide, che porta alla formazione di alte concentrazioni di solfito legato. Questo è indesiderabile dal punto di vista del consumatore e del contenuto totale di SO₂ del vino, così come stabilito da decreti normativi. Inoltre, la SO₂ legata ha una ridotta attività antiossidante protettiva e attività antimicrobica. Il chetone più significativo, prodotto dal lievito, è il diacetile (2,3-butanedione), simile ad un dichetone; la fermentazione malolattica è la fonte più importante di diacetile. Ha una OT di 0,2-2,9 mg/L, a seconda del tipo di vino, conferisce aromi di noci, tostato o burro, in relazione alla sua concentrazione (Martineau *et al.*, 1995). I vini bianchi secchi di solito contengono concentrazioni più basse di diacetile (0,1-2,3 mg/L) rispetto ai vini rossi (0-7,5 mg/L) (Bartowsky *et al.*, 2002; Martineau *et al.*, 1995). L'acetoino conferisce note burrose, ed si forma dalla parziale riduzione del diacetile, che viene poi ridotto a 2,3-butandiolo. E' presente, di solito, in concentrazioni (<80 mg/L) molto inferiori alla sua OT di 150 mg/L (Romano *et al.*, 1996).

I lattoni sono un altro gruppo di composti carbonilici formato dai lieviti durante la fermentazione alcolica. Le concentrazioni sono elevate soprattutto durante la maturazione ossidativa del vino con lieviti flor (Wurz *et al.*, 1988). I lattoni, tra cui il butirrolattone, sono il gruppo quantitativamente più importante.

Le aldeidi sature, prodotte dal lievito, sono formate dal metabolismo degli zuccheri, il metabolismo degli acidi grassi e dal metabolismo degli amminoacidi a catena ramificata (Fig. 30).

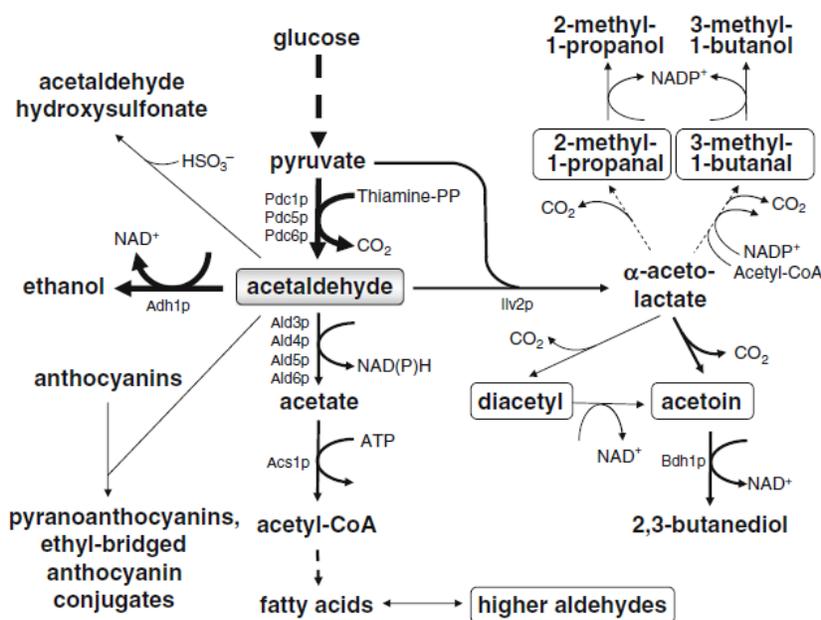


Fig. 30 *Metabolismo delle aldeidi, si evidenzia il ruolo chiave dell'acetaldeide nella formazione di aldeidi a catena ramificata e superiori, diacetile e acetoino.*

L'acetaldeide si forma a partire dal piruvato, la reazione è catalizzata dalla piruvato decarbossilasi (Pdc1p,5P,6P), e può essere ridotta a etanolo dalla alcool deidrogenasi (Adh1p). Le aldeidi superiori, escludendo l'esanale, si formano durante la biosintesi degli acidi grassi a partire dall'acetaldeide, che viene prima ossidata ad acetato dall'aldeide deidrogenasi (Ald3-Ald6p) e attivata con ATP dall'acetil-CoA sintasi (Acs1p). Le aldeidi a catena ramificata, diacetile e acetoino si formano per reazione di decarbossilazione

dell'acetolattato, che deriva dalla condensazione del piruvato e acetaldeide ad opera del complesso tiamina-PP, catalizzata dall'acetolattato sintasi (Ilv2p). A fermentazione completata, le aldeidi libere sono in gran parte ridotte dalle deidrogenasi negli alcoli corrispondenti. L'acetaldeide extracellulare può reagire con gli ioni bisolfito formando acetaldeide-idrossisolfonato, e può reagire con gli antociani formando pigmenti stabili, piranoantocianine e antociani con ponte etilico coniugati con le proantocianidine (tannini). L'aggiunta di SO₂ in fase prefermentativa determina un aumento della concentrazione dell'acetaldeide idrossisolfonato, delle aldeidi superiori [aldeidi a catena ramificata (2-metil-1-propanale, 3-metil-1-butanale), e delle aldeidi sature con C1, C3, C5, C6 e C7] (Frivik *et al.*, 2003). Le aldeidi sature superiori, presenti di solito in tracce, sono prodotte dalla biosintesi degli acidi grassi catalizzata dall'acetil-CoA reduttasi, che deriva dall'acido acetico (Fig.30). Le aldeidi C6, esanale, cis-3-esenale e trans-2-esenale, sono prodotte da reazioni di ossidazione enzimatica degli acidi grassi insaturi C18 dell'uva durante le fasi di macerazione del mosto (Ribereau-Gayon *et al.*, 2000a). La formazione dei lattoni può verificarsi anche per ciclizzazione chimica, anche se la formazione enzimatica è generalmente più frequente in natura. L'acido glutammico è il presunto precursore nella formazione dei lattoni durante la fermentazione (Wurz *et al.*, 1988). Non sono noti i meccanismi che regolano la formazione dei lattoni nel vino.

Composti Solforati Volatili

I composti volatili solforati sono degli aromi potenti, hanno bassi valori di soglia sensoriale (Mestres *et al.*, 2000; Rauhut, 1993). Sono presenti un gran numero di composti solforati in

associazione con il processo di fermentazione, quelli che hanno ricevuto più attenzione sono riassunti nella Tabella 2. I vari tipi di composti e le loro concentrazione nel vino sono molto variabili.

Tabella 2 Composti solforati volatili prodotti nel vino dal metabolismo dei lieviti

Composti Solfotati	Concentrazione (µg/L)	Aroma
<i>SULFIDI</i>		
Sulfide idrogenato	Nd-370	Uovo marcio
Dimetil sulfide	Nd-480	Asparagi, cavolograno cotto
Carbon disulfide	Nd-18	Gomma, cavolo, odore sgradevole
Dietil sulfide	Nd-10	Aglio
Dimetil disulfide	Nd-22	Verdura, cavolo, cipolla
Dietil disulfide	Nd-80	Maleodorante, cipolla
<i>MERCAPTANI</i>		
Metanetiolo	Nd-16	Cavolo cotto
Etanetiolo	Nd-12	Cipolla, gomma, gas naturale, fecale
<i>TIACETATI</i>		
Metil tioacetato	Nd-20	Solforoso
Etil tioacetato	Nd-56	Solforoso
<i>TIOALCOLI</i>		
2- Mercaptoetanolo	Nd-180	Pollame
2-(Metiltio)-1-etanolo	Nd-70	Fagiolino
3-(Metiltio)-1-propanol- metionolo	Nd-4500	Patate, cavolfiore, cavolo cotto
4-(Metiltio)-1-butanolo		
<i>TIOAZOLI</i>		
Benzotiazolo	Nd-180	Cipolla, aglio, terra
		Gomma
2-metiltetraidrotiofan-3-one	Nd-14	Metallico, gas naturale

<p><i>TIOLI VOLATILI CON LUNGHE CATENE POLIFUNZIONALI</i></p> <p>4-mercapto-4-metilpentan-2-one</p> <p>3-mercapto-esanolo</p> <p>3-mercapto-esil acetato</p>	<p>Nd-0,03</p> <p>Nd-5</p> <p>Nd-0,2</p>	<p>Urina di gatto, ginestra, ribes</p> <p>Ribes nero, frutto della passione,</p> <p>Ribes nero, frutto della passione</p>

Fonte: Mestres *et al.*, (2000); Fedrizzi *et al.*, (2007); Swiegers *et al.*, (2005)

La maggior parte dei composti solforati sono associati agli off-flavour e considerati, da molti, come aromi indesiderati o un difetto del vino, contribuendo alla formazione di aromi di uovo marcio, cavolo cotto, cipolla e gomma (Bell *et al.*, 2005; Fedrizzi *et al.*, 2007).

Un'eccezione è rappresentata dai composti solforati con una lunga catena polifunzionale, che a basse concentrazioni conferiscono piacevoli aromi fruttati (Dubourdieu *et al.*, 2006). Il dimetil solfuro (DMS) sembra essere un'eccezione in quanto porta alla formazione di aromi di asparago, mais, melassa e può essere considerato piacevole in alcuni vini, quando presente a basse concentrazioni. Aromi di mela cotogna, tartufi e aromi metallici sono stati associati alla concentrazione di DMS, al tipo di vino e all'età. Recentemente è stato rivalutato l'effetto dei composti volatili solforati sull'aroma del vino, e alcuni hanno sostenuto che molti composti volatili solforati possono contribuire a definire il carattere

varietale, almeno in alcune varietà di specie, quando risultano vicini alle concentrazioni soglia (De Mora *et al.*, 1987; Fedrizzi *et al.*, 2007). Per esempio, i solfuri, i disolfuri, il benzotiazolo e i tioalcoli sono stati trovati in concentrazioni più elevate in alcuni vini Merlot mentre i tioli e i tioacetati sono stati trovati più abbondanti nei vini Marzemino e Teroldego, indicando che, il carattere varietale potrebbe dipendere dalla presenza di composti volatili solforati in misura maggiore di quanto si pensasse (Fedrizzi *et al.*, 2007). L'H₂S è altamente volatile e viene perso rapidamente dai vini giovani, in particolare quelli sottoposti a trattamento di svinatura/travaso (Moreira *et al.*, 2002). I mercaptani, i metantioli, gli etantioli e il 2-mercaptoetanolo sono gli aromi più persistenti presenti nel vino a cui si associano odori sgradevoli di cavolo cotto, cipolla, gomma e pollame. I tioesteri si possono formare anche durante la fermentazione, e nelle condizioni di acidità del vino idrolizzano lentamente con la formazione di mercaptano (Rauhut *et al.*, 1998). La comparsa di composti volatili solforati dopo il processo di fermentazione è un processo chimico e biochimico piuttosto complesso e multiforme. La maggior parte della ricerca si è concentrata sull'induzione del metabolismo dell'H₂S nel lievito, soprattutto in risposta ai cambiamenti nella composizione in nutrienti (Eschenbruch *et al.*, 1974; Henschke *et al.*, 1991). I lieviti producono H₂S e altri composti volatili solforati da una serie di percorsi, che comprendono la riduzione chimica dello S elementare, la degradazione di amminoacidi solforati o la riduzione del solfito.

4.3 Aromi terziari

Gli aromi terziari si vengono a formare con il lento trascorrere del tempo, cioè durante la maturazione e l'invecchiamento del vino, attraverso processi ossidoriduttivi, che avvengono con il contemporaneo arricchimento di ossigeno da parte di alcuni composti e impoverimento da parte di altri. Altre reazioni chimiche particolarmente importanti al fine della formazione del bouquet d'invecchiamento sono quelle di acetalizzazione (formazione di acetali da una molecola di alcool e una di aldeide), di esterificazione (formazione di esteri da una molecola di alcool e una di acido), di eterificazione (formazione di eteri da due molecole di alcoli) e infine di ossidazione di molecole di alcoli, tannini, acidi e numerose altre sostanze. Accade quindi che con il passare del tempo i profumi primari e secondari (giovani) tendano a diminuire, contemporaneamente alla formazione di numerosi profumi più "maturi ed evoluti", che conferiscono al vino sentori speziati, tostati, animali ed eterei, che si fondono spesso in un bouquet particolare, cioè in "un insieme estremamente complesso di sensazioni odorose". Infine da sottolineare i profumi terziari dovuti all'affinamento del vino in barrique ed originati dalla cessione di aromi dal legno (in particolare la vaniglia).

Il legno è responsabile della liberazione di un grande numero di composti non volatili, in primo luogo, gli ellagitannini. I due maggiori composti fenolici presenti nel legno di rovere, impiegato per la fabbricazione dei fusti, sono la vescalagina e la castalagina. Per idrolisi parziale si ottengono la vescalina e la castalina che sono solubili sia in acqua sia in soluzioni idroalcoliche, come i vini. Dal momento che sono facilmente ossidabili, la

principale azione degli ellagitannini è favorire l'invecchiamento del vino, proteggendo gli antociani e i flavonoidi. Il processo di fabbricazione delle botti ha molta influenza sulle sostanze che il legno cederà al vino durante l'affinamento. Altre sostanze estratte dal legno, sono le lignine, ricche in unità guaiacile e siringale. Durante la tostatura, la lignina viene degradata termicamente con formazione di aldeidi sia della serie cinnamica (aldeide sinapica e coniferilica), sia della serie benzoica (aldeide vanillina e siringica) (Chatonnet *et al.*, 1990). Inoltre, sono presenti le cumarine, il cui contenuto nel vino dipende dalla composizione e dalle modalità di essiccamento del legno; esse possono trovarsi disciolte nel vino sia sotto forma eterosidica (scopoletina, esculetina) che agliconica (Salagoity-Auguste *et al.*, 1987). Le cumarine agliconi sono acide e possiedono caratteristiche di durezza, mentre i loro eterosidi sono amari. Un altro gruppo di molecole che provengono dal legno e dalla lignina sono gli acidi fenolici, in particolare l'acido gallico, caratterizzate da un sapore acido. Il legno di rovere grezzo contiene, inoltre, un certo numero di sostanze volatili che presentano un odore caratteristico come i fenoli volatili costituiti dagli isomeri del cresolo, guaiacolo e 4-metilguaiacolo, eugenolo (note odorose di affumicato, spezie e chiodi di garofano), isoeugenolo e propiovanillone. La cellulosa presente nel legno nel corso del riscaldamento libera aldeidi furaniche come l'idrossi-metilfurfurale e il metilfurfurale. Esse sono caratterizzate da odori grigliati, ma la loro soglia di percezione è bassa e possono essere trascurate. Il trans-2-nonenale, un'altra molecola la cui concentrazione varia molto da un campione di legno all'altro, insieme al trans-2-octenale ed al 1-decanale, è la principale responsabile dell'odore di "planche", letteralmente di "asse", che i vini possono acquisire durante l'affinamento nei fusti: questo odore

sgradevole è attribuito al legno fresco e può essere attenuato aumentando il grado di tostatura interne dei fusti. Nel caso dei vini bianchi, la qualità del carattere “boisé” presuppone la vinificazione del vino nei fusti. Infatti, in generale, l’aroma boisè di un vino fermentato in barrique è nettamente inferiore a quello del medesimo vino messo in botte dopo la fermentazione alcolica (Chatonnet *et al.*, 1992). Questo fenomeno è essenzialmente legato alla riduzione, ad opera dei lieviti, della vanillina in alcol vanillico, pressoché inodore; le aldeidi furaniche sono anch’esse ridotte ad alcol. I lieviti sono, infatti, capaci di fissare e di trasformare continuamente alcuni costituenti volatili a mano a mano che vengono liberati dal legno.

5. Evoluzione dei composti polifenolici durante la conservazione

La produzione dei vini bianchi assume un ruolo determinante sia da un punto di vista economico che sociale, data la richiesta sempre maggiore da parte del consumatore di vini di grande bevibilità e freschezza. Tuttavia, la maggior parte dei vini bianchi è caratterizzata da scarsa durata, che ne limita la commercializzazione ed il consumo. La trasparenza, la limpidezza e la stabilità nel tempo di un vino bianco sono alcune delle caratteristiche che il consumatore esige al momento del consumo. Numerosi sono i fattori che influiscono nelle alterazioni delle caratteristiche qualitative del vino bianco e che possono comprometterne l’aroma, il colore e la limpidezza, dando origine ad intorbidamenti indesiderati. Tra questi ricordiamo:

- l'azione dell'ossigeno, specie in fase prefermentativa ed in particolare la sua interazione con alcuni costituenti del vino (sostanze polifenoliche). Nel corso di un anno di conservazione in botti il vino può assorbire fino a 40 mg di ossigeno/L e tutto lascia pensare che l'ossigeno può anche penetrare nel vino conservato in bottiglie tappate (Ribereau-Gayon *et al.*, 1974; Riberau-Gayon *et al.*, 1983);

- la presenza di sostanze minerali quali ferro e rame;

- i sali dell'acido tartarico;

- il contenuto in proteine, che in particolari condizioni possono aggregare e precipitare dando origine all' indesiderato fenomeno della “casse proteica”.

Le reazioni ossidative possono essere di natura enzimatica o chimica; le prime sono dovute alla polifenolossidasi (PPO) e si verificano principalmente nel mosto. Le reazioni di natura chimica sono piuttosto lente, possono richiedere settimane o mesi per verificarsi e avvengono nel vino imbottigliato (Cilliers *et al.*, 1990), alterandone notevolmente le caratteristiche qualitative. Gli effetti peggiori sono dovuti agli enzimi ossidativi, i quali, oltre ad agire sui composti polifenolici (catechine, proantocianidine, acidi cinnamici e loro derivati) (Margheri, 1980), causando indesiderati fenomeni di imbrunimento nei mosti e nei vini, alterano le frazioni aromatiche con conseguente diminuzione o totale assenza dell'espressione varietale dei vitigni. Le sostanze di natura polifenolica, quindi, possono essere responsabili del fenomeno dell'imbrunimento dei vini bianchi, che comporta alterazioni del colore, del sapore e dell'aroma (Singleton *et al.*, 1984). Nei vini bianchi, i processi ossidativi, possono essere prevenuti, controllando alcuni parametri quali:

-temperatura,

-pH,

-l'assorbimento di ossigeno da parte del prodotto,

-uso di chiarificanti e stabilizzanti di natura proteica (gelatina, albumina, caseina), o minerale (silice, bentonite), che riducendo la quantità di sostanze polifenoliche, proteggono il vino dall'imbrunimento non enzimatico.

5.1 Imbrunimento enzimatico del vino

L'imbrunimento ossidativo è uno dei principali problemi che si incontrano durante il processo di vinificazione. L'imbrunimento ha conseguenze deleterie sia sulle proprietà sensoriali (perdita di colore, aroma e incremento dell'astringenza) (Silva Ferreira *et al.*, 2002) che sul valore nutrizionale del vino (Sioumis *et al.*, 2005). L'imbrunimento enzimatico avviene nelle prime fasi del processo di vinificazione e consiste nell'ossidazione enzimatica dei polifenoli dell'uva in presenza di ossigeno e dell'enzima polifenolossidasi (Li *et al.*, 2008).

Nel mosto d'uva l'imbrunimento enzimatico è favorito dai flavanoli ed è in gran parte correlato al contenuto di esteri degli acidi idrossicinnamici e acido tartarico. In particolare nell'uva troviamo soprattutto l'acido trans-caffeiltartarico (Fig. 31), meglio conosciuto come acido caftarico, derivante dall'esterificazione tra l'acido caffeico e l'acido tartarico e l'acido *p*-cumaroiltartarico, definito anche acido *p*-cutarico derivante dall'esterificazione tra acido *p*-cumarico e acido tartarico (Cheyner *et al.*, 1990). Il contenuto nel succo d'uva

dell'acido caftarico è in media di 106 mg/L mentre l'acido cutarico è presente in quantità più ridotte, circa 10 mg/L (Singleton *et al.*, 1985).

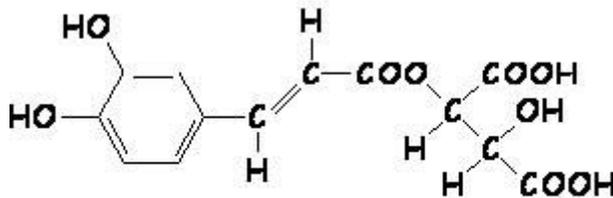


Fig. 31 Struttura dell'acido caftarico o *trans*-caffeoiltartarico.

L'imbrunimento enzimatico ha inizio con l'ossidazione da parte della PPO dell'acido caftarico o dell'acido *p*-cutarico con la conseguente produzione di acido caffeiltartarico *o*-chinone (Fig. 32). Quest'ultimo composto è un forte ossidante capace di ossidare altri composti del vino estranei alla reazione di ossidazione enzimatica e provocare quindi, in funzione dei polifenoli presenti e dell'ambiente di reazione, rilevanti cambiamenti nella tonalità e nel colore del vino. In primo luogo gli *o*-chinoni attraverso rapide reazioni di ossidrilazione con monofenoli o difenoli, portano rispettivamente alla formazione di *o*-difenoli e *o*-chinoni. In seguito a questo tipo di reazione definita di ossidazione accoppiata, catalizzata da acidi presenti nel mezzo, l'*o*-chinone può ridursi nel fenolo originario o produrre dimeri. Gli *o*-chinoni derivati dall'attività enzimatica sono in grado anche di polimerizzare e condensare con molti altri composti, sia specie di natura fenolica che non

fenolica, portando infine, soprattutto in presenza di valori di pH elevati, alla formazione di pigmenti bruni (Robards *et al.*, 1999). In particolare gli *o*-chinoni essendo ossidanti possono ossidare alcuni substrati come altre sostanze fenoliche, acido ascorbico e SO₂ (Li *et al.*, 2008).

Ad esempio l'acido caftarico *o*-chinone prodotto enzimaticamente, attraverso il meccanismo dell'ossidazione accoppiata, ossida la catechina a catechina *o*-chinone riducendosi simultaneamente ad acido caftarico; il chinone della catechina andrà a reagire rapidamente con altri idrochinoni (molecole ridotte di catechina o acido caftarico) formando prodotti di condensazione che possono essere ancora ossidati e polimerizzare ulteriormente (Cheynier *et al.*, 1989). I chinoni riescono a reagire anche con composti come gli amino derivati in presenza di acqua, oppure creare composti bruni in seguito a lente reazioni di polimerizzazione e condensazione con appropriati idrochinoni (Robards *et al.*, 1999).

L'acido caftarico *o*-chinone può essere parzialmente intrappolato dal glutatione ossia il riducente più efficace naturalmente presente nell'uva, andando in questo modo a diminuire la quantità di pigmenti bruni potenzialmente generabili nel mosto. In particolare il glutatione reagendo con il chinone dell'acido caftarico produce l'acido 2-S-glutationil caftarico anche conosciuto come Grape Reaction Product (GRP).

Inoltre il rapporto tra acido caftarico e acido S-glutationil caftarico si presenta come un utile indice di previsione dell'ossidazione del mosto e dei vini bianchi finiti (Singleton *et al.*, 1985). Il GRP non è soggetto ad ulteriori reazioni di ossidazione per cui in una certa misura limiterà l'imbrunimento ossidativo nei mosti (Singleton *et al.*, 1985; Rigaud *et al.*,

1991;). L'acido 2-S-glutationil caftarico si mantiene costante durante le fasi di preparazione del mosto e della fermentazione. La modalità più diffusa per il controllo dell'imbrunimento enzimatico in mosti e vini è il trattamento con SO_2 , la quale già a basse dosi è in grado di inattivare la catecolasi. D'altra parte però, l' SO_2 previene la formazione di GRP mantenendo in questo modo gli acidi caftarico e *p*-cutarico liberi e di conseguenza mantenendo un elevato potenziale di imbrunimento di tipo non-enzimatico (Li *et al.*, 2008). Per limitare l'imbrunimento enzimatico si può ricorrere nei mosti bianchi alla tecnica dell'iperossigenazione che permette di ridurre il potenziale di imbrunimento attraverso due strade: la scomparsa della tirosinasi e l'esaurimento dei substrati fenolici ossidabili durante le reazioni di ossidazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

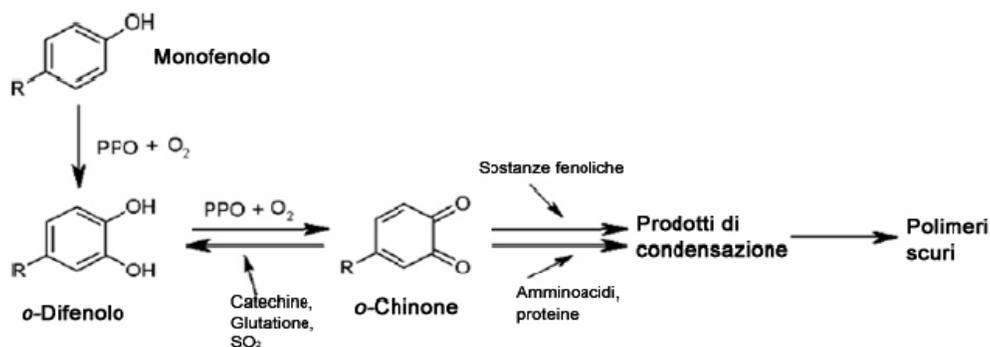


Fig. 32 Processo di imbrunimento enzimatico (Li *et al.*, 2008).

In conclusione è comunque da notare che l'attività e la concentrazione della PPO tende gradualmente ad abbassarsi durante l'ossidazione. Inoltre, lo sviluppo della fermentazione, la produzione di etanolo ed alcune pratiche enologiche, come la chiarificazione e il

trattamento con SO₂, permettono l'eliminazione della PPO nel vino (Cheynier *et al.*, 1989; Spagna *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Inoltre, sempre in relazione alla frazione fenolica dei vini bianchi, Zafrilla *et al.* (2003) hanno studiato le modifiche che avvengono a carico di questi composti e i cambiamenti associati all'attività antiossidante durante 7 mesi di conservazione al buio, concludendo che non vi sono stati cambiamenti significativi nel contenuto totale di acidi idrossicinnamici.

Recenti studi effettuati da Hernanz *et al.*, (2007), su due vini bianchi ottenuti dalle varietà Zalema (Zlm) e Colombard (Colb), riportano le variazioni della componente polifenolica, del colore e della frazione volatile durante la conservazione in bottiglia fino a 12 mesi, a diverse temperature e posizione delle bottiglie. Nel lavoro sono state identificate e quantificate 18 molecole appartenenti alla classe degli acidi idrossicinnamici (caftarico, *p*-cutarico, fertarico, *m*-cumarico, caffeico, ferulico, acidi cumarici, etil caffeato e etil *p*-cumarico), degli acidi benzoici (acido gallico, etil gallato), dei flavonoidi (catechina, epicatechina e quercetina 3- rutinoside), tirosolo e altri composti non classificati, ma assimilabili come spettro di assorbimento a quello della catechina (derv. catechina) e a quello del tirosolo (derv. tirosolo).

Si osservano molte differenze significative tra i vini di controllo (tempo 0) e i vini a diversi tempi di conservazione. Nei vini Zlm solo l'epicatechina, il derv. del tirosolo 1, la rutina e il *p*-etil cumarato, non sono stati influenzati in modo significativo. Comportamento simile hanno avuto l'acido *m*-cumarico, l'acido *p*-cutarico e caffeato di etile nei vini Clb. Dopo 12 mesi di stoccaggio, i vini hanno presentato delle evidenti perdite di composti fenolici. La catechina, derv. catechina, l'acido gallico e acido caftarico sono stati i composti fenolici che

hanno presentato le riduzioni più marcate durante la conservazione. La riduzione dei livelli di catechina durante la conservazione è nota in letteratura. Lavori effettuati da Simpson *et al.* (1982), riportano che le catechine e le procianidine hanno una forte influenza sulla suscettibilità dei vini bianchi di andare incontro a fenomeni di imbrunimento, in conseguenza del fatto che i flavan-3-oli possono subire reazioni di ossidazione e di polimerizzazione. Recenti lavori sperimentali indicano che le condizioni di conservazione possono influenzare il contenuto di fenoli, dal momento che questi composti possono subire reazioni di idrolisi, ossidazione e complessazione (Cheynier *et al.*, 2003; Zafrilla *et al.*, 2003). Altri autori hanno registrato invece perdite notevoli (35-50%) di catechine durante un anno di conservazione dei vini bianchi della varietà Albillo (Pérez-Magariño *et al.*, 2001).

Il contenuto totale degli esteri idrossicinnamici (considerando la somma di tutti gli esteri tartarici degli acidi cinnamici), è simile sia nei vini Zlm che nei vini Clb, il loro contenuto però decresce progressivamente con il tempo di conservazione (14% e 10%, rispettivamente). D'altra parte, si è osservato che il contenuto totale degli acidi cinnamici (considerato come somma degli acidi caffeico, *p*-cumarico e ferulico) aumenta progressivamente con il tempo di conservazione in entrambi i vini (23% e 24%, rispettivamente).

Tale riduzione, può essere correlata ai fenomeni di idrolisi che avvengono nell'ambiente acido del vino, e queste reazioni di idrolisi (enzimatica o non) sono principalmente responsabili dell'aumento del contenuto di molecole semplici, come gli acidi fenolici liberi (García-Parrilla *et al.*, 1999).

Sugli stessi vini e alle stesse condizioni di conservazione è stata analizzata la variazione del colore. Dai dati cromatici riportati nel lavoro, ottenuti attraverso misurazione CIELAB, si osserva che la temperatura ha avuto un effetto significativo sia nei vini Zlm che Clb. Le differenze più significative si sono però osservate fra i vini conservati a basse temperature e quelli conservati a temperatura ambiente e variabili medio/alte. I valori dei parametri a^* , b^* , C^* e h^* dei vini conservati a 4 C° erano più bassi di quelli calcolati per i vini mantenuti alle altre temperature in esame. Nello specifico, queste differenze erano di 0,6 unità CIELAB per a^* , 2 unità CIELAB per b^* , 2 unità CIELAB per C^* e 3,4-4,4° per h , in entrambe le varietà; questo indicava che i vini conservati a temperature più basse si presentano meno verdastri e giallastri e quindi con cromatismo più basso. Per quanto riguarda l'effetto della posizione delle bottiglie (orizzontale/verticale), è stata influenzata in modo significativo la tonalità h nei vini Clb.

Ricerche effettuate da Recamales *et al.* (2007) dimostrano, infatti, che durante la conservazione in bottiglia dei vini bianchi, si osserva un costante aumento del valore del parametro C^* e una diminuzione di L^* , così come avviene per i vini in esame.

6. Evoluzione degli aromi varietali durante la conservazione del vino

Il contenuto aromatico di fermentazione viene completamente rimaneggiato nel corso dell'invecchiamento; in particolare le classi di composti più numerose sono quelle degli alcoli, aldeidi, esteri ed acidi organici, che subiscono importanti modificazioni nel senso di un aumento o di una diminuzione della loro concentrazione. Per quanto riguarda gli alcoli, essi sono coinvolti in diversi tipi di reazione: ossidazioni, esterificazioni o quali prodotti derivanti da idrolisi di esteri. Queste modificazioni non sono marcate e differenti temperature di conservazione non determinano spiccati aumenti o diminuzioni nella concentrazione di tali alcoli. Gli alcoli molto volatili sono gli alcoli terpenici. La conservazione in bottiglia può determinare naturali modifiche nel contenuto aromatico. Prove di conservazione, di ossidazione e di invecchiamento veloce non hanno prodotto soltanto i rispettivi ossidi, derivati del pirano e del furano, ma hanno mostrato anche la comparsa di un altro composto ciclico, l' α -terpineolo, che determina la perdita del tipico aroma fruttato e floreale dei vini bianchi giovani. Le aldeidi, il cui contenuto è elevato nei vini di tipo ossidato, si ritrovano in modeste quantità nei vini naturali, e la loro presenza è promossa dall'intervento indiretto dell'ossigeno. In genere, durante la conservazione e l'invecchiamento, il contenuto in aldeidi aumenta qualora vi sia stato anche un minimo contatto con l'aria; tra l'altro questi composti hanno una bassa soglia olfattiva. Dopo aver raggiunto un massimo di concentrazione compatibile con il tenore in ossigeno ed in polifenoli ossidabili, il contenuto in aldeidi totali subisce una leggera diminuzione. Questo si verifica in seguito all'instaurarsi di alcune reazioni di riduzione o di ossidazione o, più

verosimilmente, per il sopravvento di reazioni di acetalizzazione che interessano le aldeidi. Queste reazioni includono l'addizione, in mezzo alcolico e a pH acido, di una molecola di alcol al gruppo carbonilico, con formazione di un semiacetale, un intermedio instabile che reagisce con una seconda molecola di alcol per formare un acetale. Tali composti, molto volatili, dal profumo molto gradevole e con soglie olfattive molto basse contribuiscono alle note di etereo di molti vini invecchiati. Un'attenta e dettagliata analisi sulla variazione delle sostanze aromatiche dei vini bianchi Riesling durante la conservazione in bottiglia ha dimostrato che si ha un aumento della concentrazione acetale durante l'affinamento in bottiglia (Gfintert *et al.*, 1984; Rapp *et al.*, 1986). I vini Riesling analizzati provengono da 10 annate diverse (1964, 1973-1975, 1977-1982) e dalla stessa proprietà. I dati riportati nel lavoro mettono a confronto gli aromi di un vino Riesling che è stato refrigerato per sei anni con quello conservato normalmente in cella a temperatura costante. Il primo dato evidente è la diminuzione di acetati e l'aumento di esteri degli acidi diprotici. Gli acetati contribuiscono al piacevole aroma di fruttato dei vini giovani e sono prodotti per via enzimatica in quantità superiore rispetto alla loro concentrazione all'equilibrio. Durante la conservazione si idrolizzano gradatamente fino al punto di equilibrio con i rispettivi acidi e alcoli.

Dai risultati ottenuti si è osservato che gli acetati, generati in alte concentrazioni nella fase post-fermentativa, si mantengono più o meno costanti anche dopo quasi 20 anni di conservazione del vino in bottiglia. Simili risultati sono stati ottenuti da Marais *et al.* (1978-1979-1980), Simpson *et al.* (1978-1979-1983), Shinohara *et al.* (1981), che hanno effettuato uno studio volto ad analizzare il processo di invecchiamento esponendo i vini a

temperature progressivamente più elevate. A differenza degli acetati, le concentrazioni di esteri etilici esterificati con catene lineari di acidi grassi restano relativamente costanti durante la conservazione. Ciò può essere spiegato dal fatto che gli esteri etilici idrolizzano più lentamente rispetto agli acetato-esteri (Ramey, 1980), considerando anche le alte concentrazioni di etanolo generato per idrolisi.

La concentrazione del gruppo degli esteri etilici degli acidi diprotici aumenta gradatamente durante il corso di affinamento e questo è causato da reazioni di esterificazione chimica.

Alcuni componenti, i norisoprenoidi, derivanti dalla degradazione dei carotenoidi, sono di particolare interesse in riferimento al vino invecchiato. La concentrazione dei vitispirani aumenta durante la conservazione (Simpson *et al.*, 1977). Tali composti conferiscono aromi simili a quelli di canfora ed eucalipto.

Un idrocarburo che si sviluppa durante la fase di conservazione è l'1,1,6-trimetil-1,2-diidro-naftalina (Simpson, 1978). Si suppone che tale composto conferisca al vino note tipiche di vino invecchiato e cherosene e si osserva chiaramente l'aumento di questo composto durante la conservazione. Il damascenone è un esempio di composto proveniente dal metabolismo dei carotenoidi e mostra un calo di concentrazione durante la conservazione.

Notevole è anche l'aumento del furfurolo durante l'affinamento in bottiglia. I furani sono il prodotto di degradazione dei carboidrati e vengono presi in esame per valutare lo stato di invecchiamento di un vino (Nagy *et al.*, 1973).

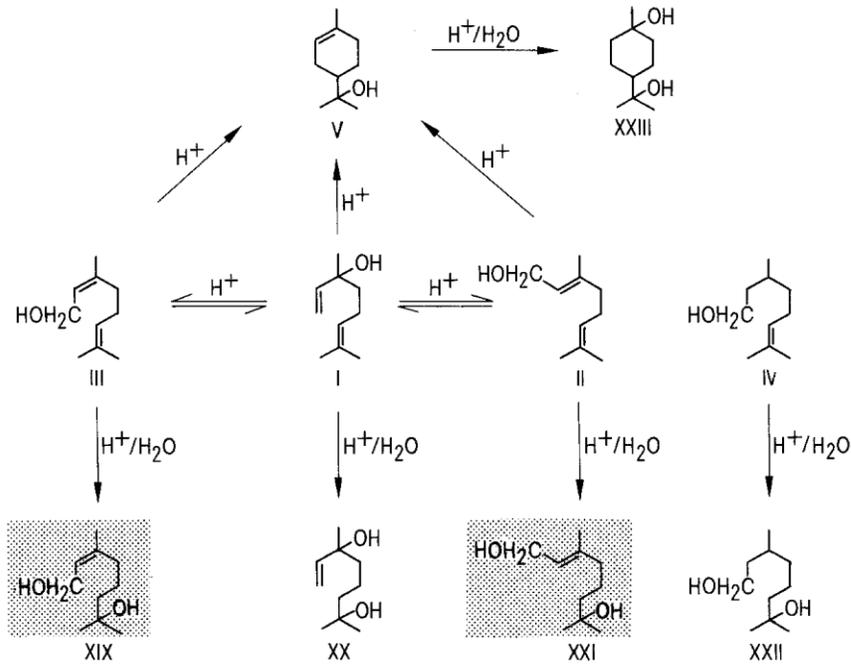
I monoterpeni del vino bianco mostrano notevoli modifiche nel corso della maturazione del vino. Essi possono essere classificati come segue:

- gli alcoli monoterprenici come linalolo, geraniolo e citronellolo diminuiscono,
- gli ossidi del linalolo così come gli ossidi del nerolo, HO-trienolo, idrossilinalolo e idrossicitronellolo aumentano,
- si formano il 2,6,6-trimetil-2-vinil-tetraidropirano, gli ossidi dell'idrolinalolo, il 2,2-dimetil-5 (1-metilpropil)-tetraidrofurano e il cis -1,8-metandiolo.

La Figura 33 mostra le reazioni che portano alla diminuzione dei 4 alcoli monoterprenici, alcoli nerolo [III], linalolo [I], geraniolo [II] e citronellolo [IV] e l'aumento dell' α -terpineolo [V], cis-1,8 metandiolo [XXIII] e i corrispondenti dioli [XIV- XXII]. I dioli che si vengono a formare [XIX, XXI] sono stati identificati solo di recente nei vini con caratteristiche aromatiche tipiche dei vini moscato (Rieth *et al.*, 1984).

Simili risultati sono stati ottenuti da Williams *et al.* (1980), sottoponendo a riscaldamento il mosto del Moscato di Alessandria, e osservando la formazione di eteri monoterprenici, HO-trienolo e terpineolo.

Ci si può aspettare che questi cambiamenti nella composizione delle molecole terpeniche influenzino il carattere del vino. Considerando l'esempio del linalolo, che è uno dei principali monoterpreni presenti nei giovani vini Riesling, dopo un paio di anni di conservazione il suo contenuto diminuisce circa del 10% del suo contenuto originario. Nei vini giovani Riesling la concentrazione stimata è in media di 400 $\mu\text{g/L}$ e si osserva che dopo alcuni anni di stoccaggio questa sarà chiaramente inferiore alla soglia di percezione di circa 100 $\mu\text{g/L}$ (Rapp *et al.*, 1985). D'altra parte, l'aumento della concentrazione del terpineolo influisce negativamente sul flavor del vino.



III nerol XXIII cis-1,8-terpene
 I linalool XIX idrossinerolo
 II geraniolo XX idrossilinalolo
 IV citronello XXI idrossigeraniolo
 V α -terpineolo XXII idrossicitronello

Fig.33 Schema di formazione degli alcoli monoterpenici nei vini bianchi.

Dal momento che la soglia di percezione olfattiva dei monoterpeni nel vino varia tra 100 $\mu\text{g/L}$ e i 700 $\mu\text{g/L}$, gli effetti additivi abbassano la soglia olfattiva (Ribereau-Gayon *et al.*, 1978) ed è molto difficile prevedere con certezza i cambiamenti di aroma durante il processo di invecchiamento.

In questo senso, sono stati effettuati altri studi sui vini bianchi che hanno rivelato i cambiamenti nella concentrazione di sostanze volatili dopo due anni di conservazione (Ghisholm *et al.*, 1995) dove si osserva una riduzione delle note di fruttato dopo soli 18 mesi di conservazione in bottiglia nelle condizioni commerciali (Gonzalez-Viñas *et al.*, 1996, 1998). D'altro canto, altri studi hanno dimostrato che temperature elevate durante le fasi di stoccaggio causano differenze significative nel profumo dei vini bianchi dopo soli cinque giorni (De la Presa *et al.*, 1997).

Recenti studi effettuati da Dolores Hernanz *et al.* (2009), riportano l'evoluzione della componente volatile di due vini bianchi prodotti dalle varietà Zalema e Colombard (oltre che della componente polifenolica e del colore come riportato nel paragrafo 5.1), in diverse condizioni di conservazione in bottiglia.

Sono stati identificati un totale di 19 composti volatili riuniti in cinque diversi gruppi; gli acidi (esanoico, ottanoico, decanoico, propanoico e isobutirrico), gli alcoli (1-butanolo, isobutanolo, alcool isoamilico, etanolo e 2-fenil-Z-3-esanolo), i fenoli volatili (4-vinil-fenolo), composti carbonilici (acetaldeide, furfurolo e 5-idrossimetilfurfurale), gli esteri (acetato di etile, 2metilbutirrato, isoamil acetato, lattato di etile e dietil succinato).

Come si osserva dai dati riportati nel lavoro in esame, il fattore temperatura ha avuto un'influenza significativa sul contenuto di isoamil acetato nei vini Clb, mentre la posizione delle bottiglie (orizzontale /verticale) ha influenzato in modo significativo i livelli di 2-feniletanolo nei vini Zlm. Il tempo di conservazione ha avuto un effetto significativo sul contenuto di alcool isoamilico, acetaldeide, 5-idrossimetilfurfurale e dietil succinato nei vini Clb.

Durante la conservazione la concentrazione totale della componente volatile (calcolata come la somma di tutti i singoli composti volatili studiati) è diminuita progressivamente (0,8% e 0,6% nei vini Zlm e Clb, rispettivamente). Questo è dovuto principalmente alla perdita di alcoli, anche se questi cambiamenti non risultano statisticamente significativi. Comunque, la riduzione dei livelli di alcool era più alta nei vini Zlm conservati a 4 °C. Inoltre, il contenuto degli acidi totali (calcolato come la somma di acido esanoico, ottanoico, decanoico, propanoico e isobutirrico) e quello degli esteri totali (calcolato come la somma di acetato di etile, 2-metilbutirrato, acetato isoamilico, lattato di etile e dietil succinato) è aumentato nel corso del tempo di conservazione dei vini, mentre il livello dei composti carbonilici (acetaldeide, furfurolo e 5-idrossimetilfurfurale) è diminuito solo nei vini Clb.

Si può concludere che, sia la componente fenolica che il colore sono stati maggiormente influenzati durante la fase di conservazione rispetto alla frazione volatile. Si è osservata, inoltre una scarsa influenza della variabile posizione delle bottiglie durante tutto il periodo di conservazione (12 mesi).

Per quanto riguarda l'evoluzione del colore durante la conservazione, al variare della temperatura, si è osservato che un incremento del valore di a^* , nei vini conservati al freddo, con una diminuzione, quindi, del colore verde. Nel complesso, si può concludere che l'evoluzione del colore, dei composti fenolici e volatili nei vini Colombard e Zalema dopo oltre un anno di conservazione, nelle diverse condizioni testate, sono state le stesse.

Concludendo, nei vini bianchi giovani, le reazioni di imbrunimento, la perdita di freschezza e le note di fruttato, si verificano in un ampio periodo che può oscillare da un mese a diversi anni, a seconda del tipo di vino e delle condizioni di conservazione.

7. Materiali e metodi

I campioni di uva Moscato di Sorso-Sennori e Malvasia di Bosa, annata 2008, ci sono stati forniti, rispettivamente, da una cooperativa vinicola sarda e da un produttore privato. Le tecniche di vinificazione sono state scelte dai produttori. I campioni sono stati raccolti poco dopo la fermentazione direttamente dai serbatoi di raccolta (due repliche) e al momento dell'imbottigliamento (maggio 2009).

I vini, imbottigliati in bottiglie da 0,5 L, sono stati conservati a 12 °C al buio per 18 mesi e le analisi sono state effettuate in duplicato ogni tre mesi, l'ultima analisi è stata effettuata nel mese di settembre 2010. E' stato conservato un adeguato numero di bottiglie, al fine di aver una rappresentatività statistica di ciascun campionamento.

Sui campioni di uva sono state effettuate le analisi di routine:

- pH;
- solidi solubili (% °Brix);
- acidità totale (g/L acido tartarico);
- determinazioni spettrofotometriche di: polifenoli totali, flavani reattivi alla vanillina e proantocianidine (Di Stefano *et al.*, 1989).

Sul vino imbottigliato sono stati analizzati, ogni tre mesi, i seguenti parametri:

- pH;
- anidride solforosa libera e totale (mg/L);
- grado alcolimetrico (% vol.);
- colore (CIELAB, spettrofotometria) (Mattivi *et al.*, 2001);
- determinazioni spettrofotometriche di: polifenoli totali, flavani reattivi alla vanillina e proantocianidine (Di Stefano *et al.*, 1989);
- profilo polifenolico HPLC-DAD;
- profilo aromatico GC-MS.

7.1 Analisi chimico-fisiche

7.1.1 Determinazione del pH

Il pH, o acidità reale, varia nel vino normalmente da 2,9 a 4, valori che caratterizzano una soluzione abbastanza acida; infatti, sotto il profilo organolettico, il pH influenza molto la sensazione acida del vino stesso. Oltre a questo, l'importanza del pH è dovuta al fatto che esso influenza l'andamento della fermentazione, la conservabilità, le precipitazioni di bitartrato di potassio, l'efficacia dell'anidride solforosa, ecc.

Per la determinazione del pH è stato utilizzato un elettrodo combinato, collegato mediante pHmetro (modello 710/A, Orion Research inc., Beverly, USA). La taratura dello strumento è stata fatta all'inizio di ogni sessione di prove, usando soluzioni tampone a pH 4, 7 e 10.

I valori di pH appaiono sul display digitale e sono letti introducendo l'elettrodo in un piccolo beaker contenente il campione di vino tal quale, e sottoposto ad agitazione.

Tutte le misurazioni sono effettuate in duplicato.

7.1.2 Determinazione del contenuto di solidi solubili

E' stato utilizzato un rifrattometro manuale (Atago digital refractometer). Dopo aver tarato lo strumento con acqua distillata, è stata effettuata la lettura del contenuto zuccherino di alcune gocce di mosto. Il residuo rifrattometrico (o ottico) è espresso in gradi Brix: 1°Brix = 1% sostanza zuccherina ~10g/L. I risultati ottenuti sono espressi come media di 3 determinazioni.

7.1.3 Determinazione dell'acidità totale

L'acidità conferisce al vino vivacità nel gusto e nel colore: si tratta quindi di un parametro apprezzabile, se dovuto agli acidi giusti. Gli acidi presenti nel vino sono classificabili in acidi naturali, presenti nell'uva (tartarico, malico e citrico) e in acidi di origine fermentativa (acetico, lattico e succinico).

L'acidità totale del vino è costituita dalla somma dell'acidità volatile, data principalmente dall'acido acetico, e dell'acidità fissa, data da acido tartarico, malico, lattico e in misura minore acido succinico e altri acidi.

L'acidità totale è convenzionalmente espressa in g/L di acido tartarico in quanto è l'acido presente in misura preponderante nell'uva e nel mosto.

Le tecnologie di trasformazione e di vinificazione influenzano in modo determinante il quadro acidico finale del vino, che va quindi controllato attentamente mediante la determinazione analitica dei parametri di acidità (totale, volatile e fissa) e dei singoli acidi principali.

L'acidità totale è data dalla somma delle acidità titolabili che si ottiene portando 25 mL di vino/mosto in un beaker a pH=7 aggiungendo una soluzione alcalina di NaOH 0,1N . Dai mL di NaOH 0,1N aggiunti risaliamo ai g/L di acido tartarico che per i vini da tavola non può essere inferiore a 4,5 g/L. (Metodo ufficiale CEE Regolamento CEE n. 2676/90, Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 272 del 3/10/90, Allegato 13:Acidità totale). I risultati ottenuti sono espressi come media di 3 determinazioni.

7.1.4 Determinazione del grado alcolico

È definito come il numero di litri di etanolo contenuti in 100 L di vino; detti volumi si intendono misurati alla temperatura di 20°C ; oltre all'etanolo sono compresi i suoi omologhi e gli esteri etilici che passano nel distillato.

Trattandosi di vini giovani questi devono essere preliminarmente privati della maggior parte del biossido di carbonio agitando 250-300 mL di vino in un pallone di 500 mL.

Successivamente, vengono prelevati 200 mL di vino mediante un pallone tarato, e si annota la temperatura. Si versano nel gorgogliatore dell'apparecchio di estrazione in corrente di

vapore (Exacta-Dualstill). Si risciacqua quattro volte il pallone tarato con 5 mL di acqua che si aggiunge nel gorgogliatore. Si aggiungono 10 mL di una sospensione di idrossido di calcio 2 M, ottenuta versando con cautela 1 L di acqua calda (60-70°C) su 120 g di calce viva, e anche alcuni frammenti di materiale poroso inerte.

Si raccolgono 198-199 mL distillato nel pallone da 200 mL e, si porta a 200 mL con acqua distillata; si mescola con cautela.

Si introduce il distillato in bagno termostatico a circa 20°C, e successivamente si leggono, direttamente sul display della bilancia idrostatica elettronica i valori di densità e grado alcolico (Metodica ufficiale, Regolamento CEE 2568/91).

7.1.5 Determinazione della SO₂ libera e totale

Per la determinazione dell'anidride solforosa libera sono stati versati in una beuta da 500 mL, 50 mL di vino, 5 mL di salda d'amido (5g/L), 30 mg di EDTA, 3 mL di H₂SO₄ al 10% v/v. Tale miscela è stata titolata con una soluzione 0,025 M di iodio sino a quando la colorazione blu persisteva per 10-15 secondi. E' stato segnato il volume in mL di iodio utilizzato (n). Il valore di anidride solforosa libera si è ottenuto moltiplicando n per il fattore 12,8.

Per determinare l'anidride solforosa combinata sono stati aggiunti 8 mL di soluzione 4 M di idrossido di sodio (160 g/L), si è agitato una sola volta e lasciato a contatto per 5 minuti. E' stato poi versato di colpo ed in modo energico il contenuto in un piccolo beaker nel

quale siano stati posti 10 mL di acido solforico al 10% e la miscela è stata titolata con una soluzione di 0,025 M di iodio. Il volume di iodio utilizzato viene chiamato n' .

La metodica prevede poi l'aggiunta di 20 mL di una soluzione 4 M di idrossido di sodio e si lascia a contatto per 5 minuti agitando una sola volta. Si diluisce poi la miscela con 200 mL di acqua molto fredda e, agitando energicamente, si aggiunge in modo rapido il contenuto di un beaker riempito precedentemente con 30 mL di acido solforico al 10%. Si è poi titolata la miscela con una soluzione 0,025 M di iodio (n'' mL di iodio utilizzati). L'anidride solforosa combinata è data dalla somma di $n+n'+n''$, espressa in mg/L.

7.1.6 Determinazione del colore

Il colore del vino costituisce una caratteristica peculiare, quella di più immediata individuazione da parte del consumatore, ed è legata alla qualità del prodotto. Il colore dipende da alcuni parametri come la varietà dell'uva, le tecniche di vinificazione e le numerose reazioni che avvengono durante la conservazione del vino (Auw *et al.*, 1996). Il colore è stato analizzato utilizzando il metodo CIELab, un sistema di misurazione del colore adottato dalla CIE nel 1976, e per via spettrofotometrica a tre diverse lunghezze d'onda (280-420-520 nm).

Metodo CIElab

La misura del colore tramite colorimetria tristimolo, è internazionalmente basata sulle raccomandazioni della *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) e prevede, a partire dalla misura dell'intero spettro di trasmittanza dell'oggetto colorato nella regione del visibile, la sua descrizione in termini di tre grandezze. Il documento definisce (tramite tabelle) gli illuminanti standard, gli osservatori standard e le geometrie di misura che consentono, insieme con lo spettro di trasmittanza, il calcolo delle tre coordinate di colore CIELAB: L^* , a^* e b^* (C.I.E., 1986).

Lo spazio di colore utilizzato è stato il CIELab 1976, che prevede la valutazione dei seguenti parametri cromatici: L^* , che rappresenta la luminosità (varia tra 0 e 100); a^* , la prima coordinata cromatica, positiva quando il colore tende al rosso e negativa quando tende al verde; b^* , la seconda coordinata cromatica, positiva quando il colore tende al giallo e negativa quando tende al blu. Le coordinate sono state sviluppate per riprodurre la percezione del colore dall'occhio umano. Le informazioni sul colore ricevuto dall'occhio si traducono in tre distinti stimoli tra il nervo ottico e il cervello. I segnali sono chiari e scuri, rosso e verde e blu e giallo.

Lo strumento utilizzato nelle analisi è stato un colorimetro Minolta CR-300 con processore Dp 301. I campioni sono stati precedentemente chiarificati in centrifuga a 3000g per 15 minuti (5 misurazioni in doppio per ciascun campione). E' stato utilizzato l'illuminante D65.

Sono state anche determinate due funzioni, C^* che rappresenta la saturazione, quindi l'intensità cromatica del campione, e h^* che rappresenta la tinta o tonalità, calcolate dalle coordinate cromatiche a^* e b^* , usando le seguenti equazioni: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, e $h^* = \arctan(b^*/a^*)$, correlate entrambe agli attributi psicofisici del colore.

Determinazione spettrofotometrica del colore

La determinazione del colore per via spettrofotometrica ci consente di valutare l'andamento delle ossidazioni nei vini; tali alterazioni provocano un imbrunimento e quindi un aumento dell'assorbanza.

Le misure spettrofotometriche sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS Hewlett Packard (modello 8453, Palo Alto, CA). I campioni sono stati precedentemente diluiti 1:10 con H_2O , posti in una cuvetta di vetro di 1 cm di cammino ottico e i valori registrati sono stati poi moltiplicati per un fattore 10 (fattore di diluizione). La lettura dell'assorbanza viene fatta a tre differenti lunghezze d'onda: 280 nm, 420nm e 520 nm.

L'assorbanza a 280 nm è una stima della concentrazione dei fenoli totali e, nel vino bianco, è l'indice della quantità di pigmenti di colore marrone. L'assorbanza a 420 nm indica invece la concentrazione di pigmenti di colore giallo/marrone presenti nel vino (Iland *et al.*, 2004), mentre l'assorbanza a 520 nm indica la concentrazione di pigmenti rossi.

Tutte le analisi sono state effettuate in doppio per ciascun campione.

7.2 Analisi spettrofotometriche dei composti fenolici

7.2.1 Protocollo di estrazione dei composti polifenolici da uve bianche

Il protocollo di estrazione, opportunamente modificato per i vini bianchi, si basa sul metodo adottato da Mattivi *et al.* (2003) per i vini rossi e prevede le seguenti fasi:

- preparazione della soluzione di estrazione (idroalcolica acida), contenente alcool buongusto (aggiunto in volume corrispondente al 12% di alcool), acido tartarico 5g/L (neutralizzato per 1/3 con NaOH fino a pH 3,2), 200 mg/L di bisolfito di potassio;
- è stata separata la polpa dalla buccia e dai vinaccioli, aiutandoci con delle spatole da laboratorio in modo da separare il più possibile i residui grossolani di polpa.
- Sia le bucce che i vinaccioli (insieme) vengono mano a mano messi in una beuta contenente 250 mL di soluzione idroalcolica di cui è stata effettuata la pesata (bottiglia+soluzione) su bilancia tecnica. In questo modo le bucce non rimangono a contatto con l'aria per troppo tempo, evitando così fenomeni di ossidazione dei polifenoli.
- A fine operazione, si ripesa la beuta su bilancia tecnica in modo da calcolare per differenza il peso delle bucce e dei vinaccioli.

- Le beute vengono messe per 5 giorni in una stufa termostata alla temperatura di 30°C ed agitate manualmente una volta al giorno.

- A fine estrazione si estraggono le beute dalla stufa e si lasciano raffreddare per almeno trenta minuti. A questo punto si procede alla svinatura e l'estratto delle bucce con i vinaccioli viene messo, con l'aiuto di un passino a maglie fini e di un imbuto, in un cilindro dove viene, se necessario, portato a 250 mL con la soluzione idroalcolica, si centrifuga a 5000 giri per 8 minuti poi viene trasferito in bottiglie da 250 mL riempite completamente e tappate con tappo a corona.

- Le bottiglie sono state conservate al buio in frigorifero, fino al momento dell'analisi.

7.2.2 Determinazione dei polifenoli totali

Per quanto riguarda la determinazione dei polifenoli totali i campioni di mosto (ottenuto attraverso il protocollo di estrazione come riportato al punto 7.2.1) e di vino bianco (conservato in bottiglia) sono stati diluiti 2 volte con H₂SO₄ 1N. Un mL di campione diluito è stato assorbito su C₁₈ Sep-Pak precedentemente attivata con 2mL di H₂SO₄ 0,1 N per allontanare le sostanze interferenti; i composti fenolici sono stati eluiti con 2 mL di metanolo e 5 mL di acqua in un matraccio da 20 mL. Si è aggiunto al contenuto del matraccio 1 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu e dopo circa 3-5 min, 4 mL di NA₂CO₃ al 10%. Si è portato a volume con acqua e, dopo 90 minuti si è registrata l'assorbanza a 700 nm su cuvette da 1cm di percorso ottico, contro un bianco preparato sostituendo al vino

l'acqua (Singleton *et al.*, 1965). Prima della lettura spettrofotometrica i campioni sono stati filtrati con una membrana da 0.45 μ m. Il contenuto in polifenoli del campione si ottiene attraverso la seguente formula: Abs (assorbanza)*186,5* d (diluizione)/V (volume di campione caricato), e i valori ottenuti sono stati espressi in mg/L di catechina.

7.2.3 Determinazione dei flavani reattivi alla vanillina

I campioni di mosto e vino vengono diluiti 2 volte con H₂SO₄ 1N. 5 mL di campione diluito vengono assorbiti su C18 Sep-Pak previamente attivata con 4 mL di metanolo e 10 mL di H₂SO₄ 0,1 N. Si lava con 2 mL di H₂SO₄ 0,1 N e si eluiscono i fenoli con 5 mL di metanolo. 1 mL della soluzione metanolica così ottenuta viene introdotto in una beuta da 50 mL nella quale sono aggiunti 6 mL di vanillina al 4% in metanolo. Si pongono le beute ricoperte di stagnola in bagno d'acqua fredda. Dopo alcuni minuti si aggiungono 3 mL di HCL concentrato. Si agita e dopo 15 minuti si legge l'assorbanza a 500 nm contro un bianco preparato allo stesso modo, sostituendo la vanillina con un uguale volume di metanolo (Broadhurst *et al.*, 1978). Si risale al contenuto in catechine e proantocianidine per mezzo della formula: (+) catechina mg/L= 290,8* Δ E (differenza di assorbanza fra la prova con vanillina e senza)*d (diluizione effettuata sul vino, nel nostro caso è di 2).

7.2.4 Determinazione delle proantocianidine

Per le analisi è stata utilizzata la metodica di Di Stefano (1989), che prevede una fase di preparazione del campione più semplice e più affidabile ed un ambiente di reazione che inibisce quanto più possibile la formazione di pigmenti bruni.

Si è diluito il campione (mosto o vino) 2 volte, 4mL di campione diluito sono stati assorbiti su C₁₈ Sep-Pak previamente attivata con 4 mL di metanolo e 10 mL di H₂SO₄ 0,01 N. Si lava con 8 mL di H₂SO₄ 0,1 N e si eluiscono le proantocianidine con 3 mL di metanolo, raccogliendo in un pallone da distillazione da 50 mL. Si riprende con 9,5 mL di etanolo e 12,5 di HCl concentrato contenente 300mg/L di FeSO₄*7H₂O e si scalda in bagno d'acqua bollente per 50 minuti. Al termine si inserisce il pallone in bagno d'acqua fredda ed al buio per 10 minuti. Per il bianco si è preparato il campione allo stesso modo escludendo però il riscaldamento. Si è registrato lo spettro di assorbimento da 380 a 700nm. Si è tracciata la tangente alla curva di assorbimento a partire dal punto di minimo, ed è stato trasformato in unità di assorbanza (E') il segmento MT parallelo all'asse delle ordinate che unisce il punto di massimo alla tangente (analoga misura per il bianco).

Si risale al contenuto in proantocianidine come cianidina cloruro in 25 mL di miscela reagente, considerando una resa del 20%, per mezzo della formula: cianidina $\mu\text{g}/25 \text{ mL} = \Delta E'$ (differenza delle assorbanze tra campione scaldato e quello non scaldato)* 1162,5. Il risultato, diviso per il volume di vino diluito prelevato e moltiplicato per le diluizioni iniziali del vino, dà il contenuto di proantocianidine in mg/L.

Tutte le determinazioni spettrofotometriche sono state effettuate in duplicato.

7.3 Determinazione della componente polifenolica attraverso HPLC-DAD.

L'analisi dei composti fenolici è stata effettuata utilizzando un cromatografo liquido della Hewlett-Packard, Series 1090, con un HP 1050 diode array detector (DAD). I campioni sono stati precedentemente filtrati con filtri di acetato di cellulosa da 0,22 μm e si è proceduto all'iniezione diretta (La Torre *et al.*, 2008).

Le condizioni operative sono state le seguenti: colonna LiChrospher C18, 4 mm x 250 mm, 5 μm , loop 20 μL , flusso 0,5 mL/min; fase mobile: soluzione A = 50 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ portato a pH 2,6 con H_3PO_4 , B = 80% CH_3CN e il 20% della fase A, C = 200 mM H_3PO_4 (Donovan *et al.*, 1998). I composti fenolici sono stati analizzati a tre diverse lunghezze d'onda: 280 nm per le catechine, 316 nm per gli acidi idrossicinnamici (Fig. 34-35), 365 nm per i flavonoli. I campioni sono stati quantificati tramite calibrazione con standard esterni. I composti quantificati mediante calibrazione con standard puri sono stati: acido gallico, catechina, epicatechina, acido protocatechico, acido caffeico, acido *p*-cumarico, acido ferulico, tirosolo, acido trans-caftarico (Sigma-Aldrich). La quercetina 3 glucuronide, di cui non possedevamo lo standard è stata quantificata come rutina e l'etil estere dell'acido caffeico è stato quantificato come acido caffeico. Ciascun dato è il risultato di due determinazioni.

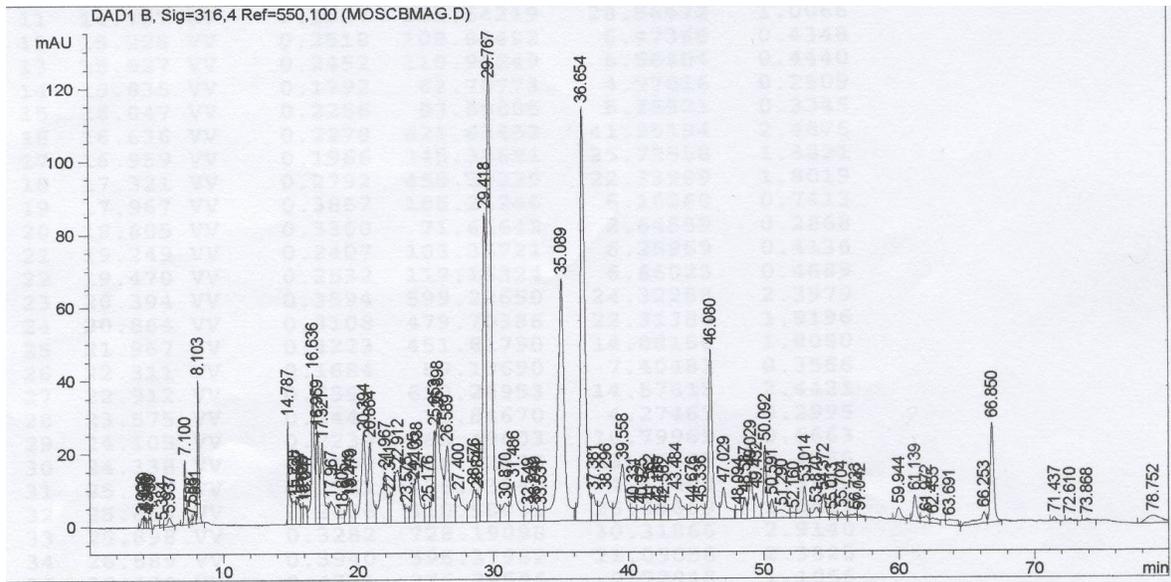


Fig. 34 Cromatogramma Hplc del Moscato a 316 nm (acidi idrossicinnamici)

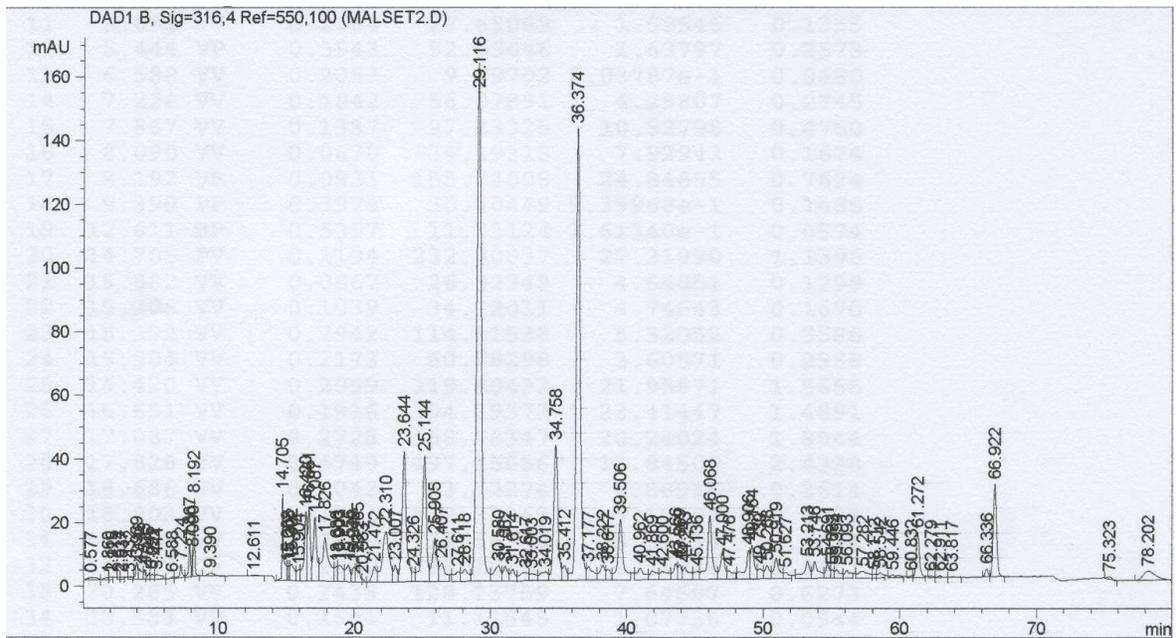


Fig. 35 Cromatogramma Hplc della Malvasia a 316 nm (acidi idrossicinnamici).

7.4 Estrazione ed analisi dei componenti volatili liberi e degli agliconi

Le analisi sono state effettuate presso la sede decentrata della Facoltà Federico II di Napoli, con sede ad Avellino, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof Luigi Moio.

I componenti volatili presenti in forma libera e glicosilata sono stati estratti mediante estrazione in fase solida (SPE), impiegando una fase stazionaria C18 (Di Stefano *et al.*, 1991). Venticinque mL di campione, preventivamente diluiti 1:1 con acqua e addizionati di 2-ottanolo come standard interno (125 µL di una soluzione 200 mg/L) sono stati caricati su una colonna contenente 1g di resina C18 (Phenomenex, Torrence, CA) precedentemente attivata con 10 mL di metanolo, seguiti da 10 mL di acqua. Il campione è stato diluito ad una velocità di circa 3 mL/min. Al termine dell'eluizione, la fase stazionaria è stata lavata con 10 mL di acqua. I composti volatili presenti in forma libera e glicosilata sono stati recuperati rispettivamente con 5 mL di diclorometano, seguiti da 10 mL di metanolo. La frazione diclorometanica è stata poi disidratata mediante Na₂SO₄ e ridotta a piccolo volume (circa 300 µL) mediante flusso di azoto.

La frazione metanolica, contenente i glicosidi, è stata portata a secco mediante evaporatore rotante, ripresa con 5 mL di tampone citrato-fosfato 0,1 M a pH 5, ed addizionata di 40 mg di un preparato enzimatico ad elevata attività glicosidasica (Novaromtm Blanc). Dopo incubazione a 42 °C per 16 h, la miscela, contenente gli agliconi, è stata addizionata di 2-ottanolo e caricata su di una colonna C18 contenente 1 mg di fase stazionaria attivata come in precedenza descritto, ed estratta poi con 5mL di diclorometano. L'estratto così ottenuto è

stato trattato come sopra, per essere poi sottoposto ad analisi GC-MS. Tutte le estrazioni sono state effettuate in triplo per ciascun campione. (Di Stefano *et al.* 1991; Ugliano, 2003).

Per le analisi gascromatografiche, 1 μL di ciascun estratto è stato iniettato in un gascromatografo Shimadzu QP 2010 munito di iniettore split-splitless e rivelatore di tipo FID, ed equipaggiato con una colonna DB-Wax (30m di lunghezza, 0,32 i.d, 0,25 film thickness).

Le condizioni cromatografiche sono state le seguenti: 40°C per 3 minuti, 4°C/min fino a 220 °C, 20 min alla massima temperatura. La velocità di trasporto del gas (He) era di 25,7 cm/sec, la temperatura di iniettore e rivelatore pari a 250 °C. L'identificazione dei componenti volatili è stata effettuata mediante confronto degli spettri di massa ottenuti sperimentalmente con quelli contenuti nel database NIST. Gli spettri sperimentali sono stati acquisiti con uno spettrometro di massa a quadrupolo (mod. HP 5972) accoppiato con un gascromatografo HP 5890 operante nelle stesse condizioni descritte in precedenza. Per l'acquisizione, l'energia della sorgente ionica è stata di 70 eV. Ulteriore conferma dell'identificazione di ciascun composto oggetto di studio è stata ottenuta mediante confronto degli indici di ritenzione lineare dei singoli composti con quelli standard puri di riferimento iniettati nelle medesime condizioni.

8. RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 Dati chimici

8.1.1 Moscato

Le analisi sulle uve moscato al momento del campionamento relative al pH, solidi solubili e acidità totale sono riportate nella tabella 3. Il pH delle uve alla vendemmia è di 3,91, il grado zuccherino di 28,4 Brix %, mentre l'acidità totale espressa come somma dell'acidità fissa e volatile, è di 5,68 g/L ac. tartarico. L'acido tartarico è quello presente in maggiore quantità, dai 2 ai 6 g/L, ed è quindi la componente che più influisce sull'acidità fissa.

Tabella 3- Parametri chimico-fisici uva moscato al campionamento

Moscato	Analisi uve alla vendemmia
pH	3,91
Solidi solubili	28,4 Brix %
Acidità	5,68 g/L ac tartarico

Le determinazioni del pH, dell'anidride solforosa libera (mg/L) e totale (mg/L) sono state effettuate sul vino imbottigliato nei mesi di Gennaio 2010-Maggio 2010-Settembre 2010, al

fine di valutare i principali parametri chimico fisici del vino e la loro evoluzione nel tempo fino a 16 mesi.

I dati relativi a questi parametri sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4- Evoluzione temporale di alcuni parametri chimico fisici del vino Moscato

Moscato	pH	Solforosa libera (mg/L)	Solforosa totale (mg/L)
Gen-10	4,0	15	124
Mag-10	4,0	17	121
Set-10	4,5	12,5	91

Come possiamo osservare nel corso della conservazione in bottiglia, il pH arriva ad un valore di 4,5. Il pH risulta sempre meno acido rispetto all'uva da cui proviene, in quanto durante e dopo la vinificazione si verifica la precipitazione dei sali di potassio e calcio dell'acido tartarico e in parte dell'acido malico.

La solforosa libera e totale diminuiscono col tempo. Il valore di anidride solforosa totale presente nel vino Moscato è di 121 mg/L all'imbottigliamento, mentre a fine conservazione è di 91 mg/L, è diminuita durante la conservazione rimanendo, quindi, su valori più che accettabili in relazione alla stabilità del vino.

Nelle tabelle 5 e 6 sono riportati i valori relativi alle determinazioni spettrofotometriche dei polifenoli totali, indice di vanillina, e proantocianidine nell'uva e nel vino prima dell'imbottigliamento.

Tabella 5- Analisi spettrofotometriche dell'uva e del vino prima dell'imbottigliamento

Moscato	Analisi uve alla vendemmia	Analisi vino serbatoio
Polifenoli totali (mg/kg catechina)	536,78	463,65
Indice di Vanillina (mg/kg catechina)	544,14	312,76
Proantocianidine (mg/kg cianidina)	848,58	253,20

Tabella 6- Evoluzione temporale dei polifenoli totali, indice di vanillina e proantocianidine del vino imbottigliato.

Moscato	Polifenoli totali (mg/kg catechina)	Indice di Vanillina (mg/kg catechina)	Proantocianidine (mg/kg cianidina)
Maggio-09	457,32ns	191,63bc*	195,21b
Sett-09	515,74	229,72ab	185,41bc
Gen-10	507,75	254,96a	265,74a
Mag-10	559,15	143,81c	178,19bc
Set-10	555,60	199,40b	158,95c

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$.

Durante la conservazione il contenuto in catechine e proantocianidine a basso peso molecolare (indice di vanillina) aumenta dall'imbottigliamento (mag-10) fino a gen-10 per poi diminuire a fine conservazione tornando ad un valore simile al valore iniziale.

Per quanto riguarda il contenuto in proantocianidine, si osserva che il loro contenuto nel vino durante la conservazione aumenta fino a gen-10 per poi diminuire significativamente a fine conservazione.

Durante l'invecchiamento del vino, queste molecole, che sono specie altamente reattive, vanno incontro a diverse reazioni, come la polimerizzazione, (Gomez-Plaza *et al.*, 2002), ossidazione, (Kallithraka *et al.*, 2009) e interazioni con i polisaccaridi (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991).

Esiste una notevole correlazione fra la diminuzione del contenuto polifenolico del vino e i cambiamenti di colore che si osservano in esso (Gonzales *et al.*, 1994; Ibert *et al.*, 2000).

Nella tabella 7 sono riportati rispettivamente i dati relativi alle determinazioni del colore, effettuate mediante spettrofotometria UV-VIS.

Figura 7- Evoluzione temporale degli indici spettrofotometrici di colore del vino Moscato.

Moscato	Lunghezza d'onda		
	280 nm	420 nm	520 nm
Maggio-09	23,55c*	0,50b	0,14c
Sett-09	24,75ab	0,53b	0,12c
Gen-10	24,09bc	0,67a	0,25ab
Mag-10	25,86a	0,70a	0,28a
Set-10	23,97bc	0,69a	0,19bc

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$.

Si osserva che l'assorbanza a 280 nm e quella a 520 non subiscono variazioni significative durante la conservazione, mentre il valore di assorbanza a 420 nm mostra incrementi significativi. L'assorbanza a 420 nm viene utilizzata come marker per indicare l'ossidazione dei vini bianchi, in quanto è la reale stima dei pigmenti di colore giallo presenti nel vino. Tipicamente, un vino bianco giovane subisce durante l'invecchiamento un cambiamento di colore da quasi incolore, con tinte di verde, paglierino, a giallo oro, ambra e marrone. Questo cambiamento di colore è legato alle crescenti assorbanze

registrate su tutto lo spettro visibile. In questo caso si osserva un significativo imbrunimento ossidativo (Iland *et al.* 2004; Zoecklein *et al.*, 1995).

Nella tabella 8 sono riportati i valori delle coordinate di colore CIElab L*, a*, b*, Chroma, Hue.

Tabella 8- Evoluzione temporale delle coordinate di colore CIElab del vino Moscato.

Moscato	L*	a*	b*	C*	h*
Mag-09	24,03c	3,54ns*	11,88a	12,39a	1,28ns*
Sett-09	25,4b	3,56	9,69b	10,32b	1,21
Gen-10	26,21bc	3,35	10,12bc	10,66bc	1,25
Mag-10	26,82ab	3,39	8,78c	9,42c	1,2
Sett-10	27,80a	2,90	6,86d	7,46d	1,16

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$

Si osserva che la coordinata cromatica L* aumenta significativamente dopo 16 mesi di conservazione e ciò potrebbe essere dovuto ai processi di aggregazione proteica con

conseguente precipitazione e chiarificazione del vino. Tale evoluzione è in accordo con i dati riportati nel lavoro di Almela *et al.* (1995).

Il parametro a^* (relativo allo spettro rosso-verde) non mostra variazioni significative mentre b^* (relativo allo spettro giallo-blu) diminuisce significativamente nel corso del tempo. La riduzione di b^* diventa significativa a fine conservazione con una conseguente riduzione della componente cromatica gialla. Diversi lavori sui vini bianchi indicano una simile evoluzione di tali parametri (b^* ed L^*), un basso valore di b può essere conseguenza di un alto valore di L^* (Chiralt *et al.*, 1987; Gamasa *et al.*, 2009). Si denota quindi una riduzione della componente cromatica gialla. Di conseguenza anche l'intensità del colore C^* (correlata ad a^* e b^*) diminuisce significativamente a fine conservazione indicando una progressiva perdita di intensità cromatica. Non si osservano, invece, variazioni della tonalità h^* .

8.1.2 Malvasia

I principali parametri chimico-fisici sono riportati nelle tabelle 9 e 10.

Tabella 9- Alcuni dati chimico-fisici dell'uva al momento della vendemmia

Malvasia	Analisi uve alla vendemmia
pH	3,21
Solidi solubili	25,2 Brix %
Acidità	8,25 g/L ac tartarico

Il pH delle uve al momento della vendemmia è di 3,21, il grado zuccherino di 25,2 Brix % e l'acidità totale è di 8,25 g/L ac tartarico. L'acidità risulta elevata e abbiamo un elevato contenuto di zuccheri.

Tabella 10- Evoluzione del pH e anidride solforosa libera e totale del vino durante la conservazione in bottiglia.

Malvasia	pH	Solforos a libera (mg/L)	Solforos a totale (mg/L)
Gen-10	3,4	14	113
Mag-10	3,425	15	126
Set-10	3,575	19	123,5

Come possiamo notare durante la conservazione il pH passa da 3,4 a quasi 3,6, l'anidride solforosa libera da 14 a 19 mg/L, e la solforosa totale si mantiene su livelli accettabili per la stabilità del vino.

I dati relativi ai polifenoli totali, indice di vanillina, e proantocianidine nell'uva e nel vino prima dell'imbottigliamento sono riportati nella tabella 11, quelli durante la conservazione nella tabella 12.

Tabella 11- Analisi spettrofotometriche dell'uva e del vino prima dell'imbottigliamento.

Malvasia	Analisi uve alla vendemmia	Analisi vino serbatoio
Polifenoli totali (mg/kg catechina)	491,567	270,61
Indice di Vanillina (mg/kg catechina)	257,646	135,13
Proantocianidine (mg/kg cianidina)	414,717	54,68

Tabella 12- Evoluzione temporale dei polifenoli totali, indice di vanillina e proantocianidine del vino imbottigliato.

Malvasia	Polifenoli totali (mg/kg catechina)	Indice di vanillina (mg/kg catechina)	Proantocianidine (mg/kg cianidina)
Mag-09	235,43*	98,23a	6,02°
Sett-09	247,18	86,26ab	2,4°
Gen-10	257,30	60,98c	0b
Mag-10	242,58	57,64c	0b
Set-10	264,69ns	77,63b	0b

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$

Dai dati riportati si nota che durante la conservazione i polifenoli totali non variano in modo significativo, la concentrazione è molto elevata nell'uva al momento della vendemmia e varia per effetto dell'azione ossidativa operata dalla PPO durante la fase di fermentazione del mosto e nel vino all'imbottigliamento, mag-2009 è circa la metà di quella riscontrata nelle uva. I flavanoli a basso peso molecolare e le proantocianidine diminuiscono in modo significativo e le ultime scompaiono dopo 8 mesi di conservazione. Come riportato in letteratura, le catechine e le proantocianidine hanno una forte influenza sulla suscettibilità dei vini bianchi a subire processi di imbrunimento ossidativo, infatti i flavanoli vanno incontro a reazioni di ossidazione e polimerizzazione (Recamales *et al.*, 2006; Simpson, 1992).

Escudero *et al.* (2002) affermano che molti costituenti del vino, soprattutto i polifenoli, sono esposti ad ossidazioni durante il processo produttivo di vinificazione e durante l'affinamento. Il substrato per la PPO è costituito da acidi cinnamici e dai loro esteri con l'acido tartarico (acido caftarico). Gli enzimi ad azione polifenolossidasi sono infatti in grado di ossidare soprattutto gli *o*-difenoli ed in certi casi i monofenoli (Margalit, 2005).

I dati relativi alla determinazione del colore per via spettrofotometrica sono riportati nella tabella 13.

Tabella 13- Evoluzione temporale degli indici spettrofotometrici di colore del vino.

Malvasia	Lunghezza d'onda		
	280 nm	420 nm	520 nm
Mag-09	14,8c	0,26bc	0,06 ns*
Sett-09	15,15b	0,24c	0,03
Gen-10	13,92d	0,37a	0,16
Mag-10	15,59a	0,33ab	0,14
Set-10	15,30ab	0,35a	0,15

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$

L'assorbanza a 280 aumenta, il vino ha subito un significativo imbrunimento e si è arricchito di note giallastre come dimostrato dall'aumento dell'assorbanza a 420nm. I polifenoli sono incolori in soluzione idroalcolica ma possono assumere colorazione gialla

in seguito ad ossidazione. L'assorbanza a 520 nm non fa registrare aumenti significativi. L'intensità colorante consiste nel valore dell'assorbanza letta a 420 nm (giallo dovuto ai tannini) e tale valore risulta aumentare in seguito alla formazione di prodotti di ossidazione e condensazione.

La polifenolossidasi dell'uva (PPO), attraverso meccanismi di ossidazione-riduzione accoppiata, genera dai tannini presenti, polimeri bruni. Come riportato in letteratura, vi è la possibilità di un aumento dei coefficienti di assorbimento dei polimeri bruni rispetto ai precursori monomeri, aumentando così i valori di estinzione molare (Chaves *et al.*, 2007). Nella tabella 14 sono riportati i valori delle coordinate di colore CIElab L*, a*, b*, Chroma C*, Hue h*.

Tabella 14- Evoluzione temporale delle coordinate di colore CIElab del vino imbottigliato.

Malvasia	L*	a*	b*	C*	h*
Mag-09	25,58b	0,36b	9,32a	9,33a	1,53°
Set-09	28,93a	1,12a	8,27c	8,35c	1,44b
Gen-10	28,32a	1,29a	8,89ab	8,98ab	1,43b
Mag-10	28,40a	1,11a	8,41bc	8,48bc	1,44b
Sett-10	28,34a	1,22a	8,61bc	8,72bc	1,43b

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$

Analizzando i dati sul colore del vino malvasia il vino appare più limpido (aumento della coordinata L^*), arricchito di sfumature rossastre (aumento di a^*), con perdita di note giallastre (b^* diminuisce), riduzione della tonalità h^* e dell'intensità del colore $C,^*$ anche se quest'ultimo parametro dopo settembre-09 rimane costante. Questi dati sono in accordo con quelli riportati da Gometz (2006) sui vini bianchi Zalema. Anche *Almela et al.* (1995) identificano una simile correlazione tra L^* e a^* (aumentano entrambi i parametri) così come nel lavoro di Munoz *et al.* (1997). L'aumento di a^* è da imputarsi a processi di ossidazione che avvengono durante la conservazione e che portano alla formazione di polimeri colorati mentre l'aumento di L^* è dovuto probabilmente al fenomeno della 'casse proteica' che determina la formazione di aggregati proteici generati dall'aggregazione dei tannini con le proteine (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998).

8.2. Composizione polifenolica

8.2.1. Moscato

8.2.1.1. Acidi fenolici

La tabella 15 riporta l'evoluzione degli acidi fenolici (mg/L) a partire dal vino in serbatoio per seguire con il vino imbottigliato.

Tabella 15 – Evoluzione degli acidi fenolici del vino moscato.

Periodo	Ac.caftarico	Ac.caffeico	Ac. p-cumarico	Ac.ferulico	Ac.gallico	Ac.protocatechico	Etil estere caffeico	Tirosolo
<u>Intermedio</u>	27,99a*	14,45ns	2,52e	1,52ab	33,25c	2,22d	1,79c	0,00b
<u>Mag-09</u>	26,30ab	14,80	3,85d	1,58ab	38,19b	3,83bcd	2,41c	17,70a
<u>Set-09</u>	22,31ab	14,44	4,37c	1,44b	37,61b	3,47cd	3,13b	0,00b
<u>Gen-10</u>	21,40b	12,52	6,29b	1,47b	42,11a	6,49a	4,00a	15,5a
<u>Mag-10</u>	14,39c	18,26	6,60b	2,01ab	42,51a	5,17abc	4,50a	0,00b
<u>Sett-10</u>	4,77d	22,96	7,77a	2,40a	41,26a	5,38ab	4,43a	17,58a

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi)

Sono stati identificati 8 acidi fenolici. I dati hanno mostrato molte differenze significative tra il vino all'imbottigliamento (maggio 2009) e il vino durante la fase di conservazione. Si osserva che dopo 16 mesi di stoccaggio l'acido caftarico subisce una notevole diminuzione da 27,99 mg/L nel vino contenuto nei serbatoio di fermentazione a 4,77 mg/L nel vino

imbottigliato a fine conservazione. L'acido *p*-cumarico, l'acido gallico, l'acido protocatechico e l'etil estere caffeico tendono ad aumentare. Il tirosolo rimane costante durante la conservazione. Si segnala che, in alcuni mesi di campionamento, il picco del tirosolo, durante la corsa cromatografica, non si è separato correttamente impedendo quindi una corretta quantificazione. Questo composto viene prodotto durante la fase di fermentazione dalla deaminazione dell'amminoacido tirosina (Singleton *et al.*, 1983). L'idrolisi, enzimatica o non, è responsabile dell'aumento dei composti fenolici più semplici, come gli acidi fenolici liberi. La diminuzione del contenuto in polifenoli è invece dovuta alle modifiche che questi composti subiscono durante lo stoccaggio, a causa di reazioni di idrolisi, ossidazione e di complessazione (Recamales *et al.*, 2006).

Una significativa diminuzione dell'acido caftarico è spiegata, infatti, dalle reazioni di imbrunimento enzimatico che avvengono durante la conservazione in bottiglia. Tali reazioni hanno inizio con l'ossidazione da parte della PPO dell'acido caftarico o dell'acido *p*-cutarico con la conseguente produzione di acido caffeiltartarico *o*-chinone. Questo composto essendo un forte ossidante è capace di ossidare altri composti del vino, in primo luogo gli *o*-chinoni che, attraverso rapide reazioni di ossidrilazione con monofenoli o difenoli, portano rispettivamente alla formazione di *o*-difenoli e *o*-chinoni. Gli *o*-chinoni derivati dall'attività enzimatica sono in grado anche di polimerizzare e condensare con molti altri composti, sia specie di natura fenolica, che non fenolica, portando infine, soprattutto in presenza di valori di pH elevati, alla formazione di pigmenti bruni (in correlazione con un aumento di assorbanza a 280nm) e precipitazione (quindi maggiore limpidezza, come dimostrato da un aumento del parametro CIElab L*) (Robards *et al.*,

1999). In particolare gli *o*-chinoni essendo ossidanti possono ossidare alcuni substrati come altre sostanze fenoliche, acido ascorbico e SO₂ (Li *et al.*, 2008). Il coinvolgimento della SO₂ nelle reazioni di ossidazione spiega in parte la sua progressiva riduzione durante la conservazione.

8.1.1.2 Flavonoidi

Nella tabella 16 è riportata l'evoluzione dei flavonoidi a partire dal vino in serbatoio per seguire con il vino imbottigliato.

Tabella 16- Evoluzione dei flavonoidi del vino.

Periodo	Catechina	Epicatechina	Quercetina 3-glu
<u>Intermedio</u>	73,88a	31,45a	10,90a
<u>Mag-09</u>	67,68b	32,70a	5,50b
<u>Set-09</u>	66,65b	32,44a	3,05c
<u>Gen-10</u>	49,99c	18,19b	0,00d
<u>Mag-10</u>	46,69cd	19,21b	0,00d
<u>Sett-10</u>	42,11d	18,46b	0,00d

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

Sono stati identificati 3 flavonoidi. Analizzando i dati si osserva che dopo 16 mesi di stoccaggio il vino ha mostrato significative perdite di composti flavonoidici. In particolare, l'ossidazione dei composti orto-diidrossifenolici, come (+)-catechina, (-)-epicatechina, porta alla formazione di prodotti di colore giallo o marrone a causa della polimerizzazione degli orto-chinoni (Guyot *et al.*, 1996). Inoltre, gli esperimenti di Cheynier (1988a, 1989) effettuati con soluzioni sintetiche hanno rivelato che gli oligomeri di catechina si formano più rapidamente di quelli di acido caftarico. Queste reazioni portano all'ossidazione di acido caftarico, seguita da una reazione di ossidazione con una seconda sostanza chimica (ad esempio, catechina e epicatechina) da parte del chinone dell'acido caftarico, con rigenerazione di acido caftarico che produce principalmente polimeri del flavanolo. La diminuzione del contenuto di questi composti è altamente correlata con l'imbrunimento del vino (Es Safi *et al.*, 2000), con un conseguente aumento dei coefficienti di assorbanza nella regione del visibile compresa tra 400-500 nm (Martinez *et al.*, 1995).

8.2.2 Malvasia

8.2.2.1. Acidi Fenolici

La Tabella 17 riporta l'evoluzione degli acidi fenolici (mg/L) a partire dal vino in serbatoio per seguire con il vino imbottigliato.

Tabella 17 - Evoluzione degli acidi fenolici nel vino Malvasia.

Periodo	Ac.caftarico	Ac.caffeico	Ac. p-cumarico	Ac.ferulico	Ac.gallico	Ac.protocatechico	Etil estere caffeico	Tirosolo
<u>Intermedio</u>	37,73a	12,04d	0,99c	0,69c	0,00c	8,48ns	1,53e	22,55b
<u>Mag-09</u>	34,99bc	15,89a	1,44b	1,08ab	0,00c	7,89	2,22d	34,01a
<u>Set-09</u>	35,99b	16,04a	2,00a	1,35a	0,00c	9,67	2,54c	38,87c
<u>Gen-10</u>	34,43cd	14,16b	1,99a	1,40a	5,09b	9,91	3,14b	39,83a
<u>Mag-10</u>	32,80e	12,92c	1,69ab	1,15ab	5,29a	8,68	3,10b	37,57a
<u>Sett-10</u>	33,51de	12,90c	1,87a	0,93bc	0,00c	9,67	3,41a	0,00d

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

L'idrolisi, enzimatica o non, è responsabile dell'aumento dei composti fenolici più semplici, come gli acidi fenolici liberi. In questo caso può essere messo in evidenza un aumento degli acidi p-coumarico, ferulico, e dell'etil estere dell'acido caffeico. Si può osservare che a fine conservazione l'acido caftarico diminuisce così come l'acido gallico che presenta un andamento particolare, infatti non è presente al momento dell'imbottigliamento, compare solo a Gen-10 per poi scomparire a Set-10. I dati relativi

all'evoluzione dell'acido protocatechico non sono risultati significativi. Il tirosolo tende ad aumentare, anche se non viene più rilevato a fine campionamento, ciò è probabilmente dovuto alla progressiva riduzione di concentrazione dell'amminoacido tirosina (fino ad esaurirsi) a partire dal quale viene sintetizzato per deaminazione.

La sua sintesi dell'amminoacido tirosina avviene per opera dei lieviti durante il processo di fermentazione (Singleton *et al.*, 1983). Come riportato in letteratura gli acidi idrossicinnamici sono i principali componenti fenolici presenti nei vini bianchi e sono i substrati dei processi di ossidazione e imbrunimento (Singleton *et al.*, 1995; Cheynier *et al.*, 1990). La diminuzione del contenuto di questi composti durante l'ossidazione dei mosti e dei vini è stata dimostrata da diversi autori. La maggior parte degli studi a questo riguardo sono stati effettuati su mosto (con l'enzima intatto) o soluzioni modello contenenti l'enzima polifenolossidasi e si è osservato un decremento in entrambi i casi del contenuto di acidi idrossicinnamici (Cheynier *et al.*, 1988; Cheynier *et al.*, 1992). La diminuzione della concentrazione di questi composti durante la conservazione dei vini bianchi può essere dovuta a reazioni di idrolisi degli esteri nei loro acidi corrispondenti, che poi decarbossilano con la formazione di off-flavour. (Rouseff *et al.*, 1992). L'aumento del contenuto di acido caffeico, p-cumarico, ferulico ed etil estere caffeico viene riportato anche nei lavori di Mayen (1997), ma sono in contrasto con quelli di altri autori (Recamales *et al.*, 2006; Zafrilla *et al.*, 2003).

Anche altri autori come Hernands (2009), che ha effettuato l'analisi del profilo fenolico dei vini bianchi ZLM e CLB, riporta risultati simili a quelli ottenuti sui nostri vini. Nei vini analizzati da Hernands il profilo cinnamico totale (considerando la somma degli acidi

caffeyico, p-cumarico e ferulico) è aumentato in concomitanza con il tempo di conservazione in entrambi i vini rispettivamente del 23% e 24%.

8.2.2.2. Flavonoidi

I dati relativi alla componente flavonoidica (mg/L) sono riportati nella tabella 18.

Tabella 18 - Evoluzione dei flavonoidi nel vino Malvasia.

Periodo	Catechina	Epicatechina	Quercetina 3-gluc
<u>Intermedio</u>	8,31c	9,86a	6,39a
<u>Mag-09</u>	9,09b	6,60b	0,00b
<u>Set-09</u>	11,68a	5,45c	0,00b
<u>Gen-10</u>	11,69a	5,75b	0,00b
<u>Mag-10</u>	11,11ab	5,90b	0,00b
<u>Sett-10</u>	10,26ab	1,63d	0,00b

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

Sono stati identificati anche per il vino malvasia 3 flavonoidi. Dai dati si osserva che nel vino malvasia si osserva la diminuzione del contenuto di epicatechina e quercetina 3-

glucuronide (che tende a scomparire già al momento dell'imbottigliamento), mentre per la catechina si osserva un aumento significativo fino a sett-09 poi tale valore rimane costante fino a fine conservazione.

La diminuzione del contenuto di alcuni flavanoli è stata già riportata in alcuni lavori dove si attribuisce a questi composti polifenolici il progressivo imbrunimento dei vini bianchi. (Guyot *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1995). Questi composti reagiscono con le aldeidi e in particolare con l'acido gliossilico, prodotto per ossidazione dell'acido tartarico. Quest'ultimo acido è uno dei principali acidi organici presenti nelle uve e nei vini. La (+)-catechina e l'acido gliossilico potrebbero probabilmente attivare il processo di formazione di pigmenti colorati, noti come cationi xanthylum (Es Safi *et al.*, 2000; Cheynier *et al.*, 1988-1989).

8.3 Profilo aromatico

L'analisi con GC-MS ha permesso di identificare 59 composti. Sono presenti sedici alcoli superiori, quattro alcoli C-6, quattordici terpeni, tredici esteri, quattro acidi, tre aldeidi, due lattoni e fenoli e un altro composto. Gli alcoli superiori sono i principali composti presenti in entrambi i vini. Questa classe di composti è sintetizzata dal metabolismo dei lieviti a partire dagli amminoacidi, e influenza positivamente la qualità dei vini quando il suo livello complessivo non sia superiore a 400 mg/L (Rapp, 1986), come nel nostro caso. I principali alcoli superiori sono 3 e 2 metil-1-butanolo, come già segnalato per il vino Fiano dolce (Genovese *et al.*, 2007). In particolare, il 2-fenil etanolo, che ha un piacevole profumo di

rosa, ha un valore OAV di 1,4 e 2,3, rispettivamente nel Moscato e nella Malvasia, in base al valore OTV riportato da Lopez *et al.* (1999). Solo una piccola parte degli alcoli superiori sono in forma glicosilata. Gli alcoli C-6 sono stati trovati in basse quantità, e questo è importante a causa del loro effetto negativo sulla qualità del vino, in quanto conferiscono note erbacee e di foglie. Un'altra classe di importanti metaboliti secondari è quella degli esteri. Abbiamo trovato principalmente esteri etilici degli acidi grassi e anche due esteri acetato. Gli esteri sono composti molto importanti del sapore del vino giovane, in quanto conferiscono aroma di fruttato (Nykänen, 1986; Selli *et al.*, 2006). L'estere più abbondante in entrambi i vini è stato il succinato etilico, che è responsabile delle note di dolce, fruttato, con una sfumatura di cera e sapone. A causa della bassissima OTV degli esteri, la maggior parte dei composti trovati possono essere considerati interessanti per l'aroma tipico dei due vini. I terpeni, che sono responsabili del caratteristico aroma delle uve aromatiche, sono stati trovati come alcoli e relativi ossidi. Tra questi, i più abbondanti sono: linalolo, α -terpineolo, 2,6-dimetil-3,7-ottadien-2,6-diolo, β -citronellolo, nerolo e geraniolo, e provengono dall'epicarpo e dalle parti solide degli acidi d'uva (Gunata *et al.*, 1985). Si è osservato che i terpeni presenti nel moscato sono in concentrazione più elevata nella forma glicosilata e questo è importante per il potenziale contributo sull'aroma del vino durante la fase di invecchiamento. Gli acidi, che sono più elevati nella malvasia, sono ad una concentrazione di gran lunga inferiore al loro OTV (Etievant, 1991). Tra gli altri composti volatili, si evidenzia la presenza del 4-vinil guaiacolo, della benzaldeide e di due lattoni, a basse concentrazioni. Non sono stati trovati norisoprenoidi C13. Tutti i dati riportati sono in accordo con i precedenti risultati sui vini moscato (Roussis *et al.*, 2005; Selli *et al.*, 2006) o

malvasia (Borsa *et al.* 2002), ma sono i primi risultati su vini moscato e malvasia della Sardegna.

I dati relativi alla caratterizzazione aromatica dei due vini suddivisi per classe di composti sono riportati a seguire nelle tabelle 19, 20, 21, 22, 23, 24.

Tabella 19- Classe degli alcoli C6 e alcoli superiori identificati nel vino Moscato

Moscato	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Media	DS*	Media	DS
<u>Alcoli C-6</u>				
cis 3-esen-1-olo	13	1		
1-esanolo	1271	21	121,8	2.8
trans 2-esen-1-olo			16,7	0.5
trans 3-esen-1-olo	12	0	3,8	0.5
Totali	1296		142,3	
<u>Alcoli</u>				
2-Metil-1-propanolo	1916	175	6,3	0.9
1-Butanolo	99	7	16,6	2
3+2-Metil-1-butanolo	45602	3056		
2-Metil-3-buten-1-olo	14	1		
3-Metil-1-butanolo			176,0	17.6
1-Pentanolo	164	1	27,7	2.1
4-Metil-1-pentanolo	17	2		
3-Metil-1-pentanolo	33	2		
2-Ottanolo	17	2		
1-Otten-3-ol	79	4	10,4	1.4
1-eptanolo	338	50	11,8	1
2-etil-esanolo	17	2		
1-Ottanolo	51	0	5	0.6
3-Metil-1propanolo	30	1		
Benzilalcol	119	20	182,7	16.2
2-feniletanolo	14256	978	169,6	10.4
Totali	62318		606,1	

*Deviazione Standard

Tabella 20- Classe degli esteri identificati nel vino Moscato

<u>Moscato</u>	Liberi (µg/L)	
	Media	DS*
<u>Esteri</u>		
Etil 2-metilpropanoato	10	1
Etil butanoato	148	11
Etil 2-metilbutanoato	Tr	
Etil 3-metilbutanoato	Tr	
3-Metilbutil acetate	178	0
Etil esanoato	206	3
Etil eptanoato	16	1
Etil lattato	226	3
Etil ottanoato	161	9
Etil decanoato	63	12
Dietil succinato	1192	163
Etil vanillato	106	14
2-feniletile acetate	21	2
Totali	2327	

*Deviazione Standard

Tabella 21- Classe dei terpeni identificati nel vino Moscato.

<u>Moscato</u>	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Media	DS*	Media	DS
<u>Terpeni</u>				
Ossido trans-linaloolo	30	2	19,2	3.5
Ossido cis-Linaloolo	56	2	58,5	11.
Linaloolo	326	13	307,4	35.
Terpinen 4-olo	11	0		
HO-trienolo	12	2	tr	
α-Terpeneolo	114	7	22,5	3.1
2,6-Dimetil-3,7-ottadien- 2,6-diolo	108	1		
Epossilinalolo I			120,2	22.
Epossilinaloolo			9,2	2
β-Citronellolo	185	0	26,6	1.9
Nerolo	249	12	570,4	54.
Geraniolo	229	2	589,1	44.
2,6-Dimetil-1,7-ottadien- 3,6-diolo	49	6		
Totali	1378		1723,1	

*Deviazione Standard

Tabella22 - Altre classi di composti aromatici identificati nel vino Moscato

<u>Moscato</u>	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Media	DS*	Media	DS*
<u>Acidi</u>				
acido esanoico	614	93		
acido ottanoico	429	15		
acido decanoico	157	31		
acido geranico	689	40		
Totali	1889			
<u>Lattoni</u>				
Butirrolattone	128	13		
5-pentildiidro	241	12		
2(3H)-furanone				
Totali	369			
<u>Fenoli</u>				
4-Vinilguaiacolo	61	4		
Totali	61			
<u>Aldeidi e Chetoni</u>				
Benzaldeide	240	4		
Nerale			12,1	2
Geraniale			12,5	1.6
Totali	240		24,6	
<i>altri</i>				
N-3-Metilbutil acetamide	510	49		

*Deviazione Standard

Tabella 23- Classe degli alcoli C6 e alcoli superiori identificati nel vino Malvasia.

<i>Malvasia</i>	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Media	DS	Media	DS
<u>Alcoli C-6</u>				
cis 3-esen-1-olo	45	3		
1-esanolo	1098	47		
trans 2-esen-1-olo			13,9	0.7
trans 3-esen-1-olo	170	9	30,6	1.9
Totali	1313		44,5	
<u>Alcoli</u>				
2-Metil-1-propanolo	2652	162	9,5	1.1
1-Butanolo	50	5	38,5	4
3+2-Metil-1-butanolo	52966	225		
		0		
2-Metil-3-buten-olo	6	1		
3-Metil-1-butanolo			134,8	
4-Metil-1-pentanolo	47	1		
3-Metil-1-pentanolo	45	1		
1-Pentanolo	47	2	44,2	4.1
2-Ottanolo	17	1		
1-Otten-3-ol	7	1	10,7	0.8
1-eptanolo	40	9	12,9	0.4
2-etil-esanolo	17	1		
1-Ottanolo	23	0		
3-Metil-1-propanolo	154	10		
Benzilalcool	91	15	109,2	7.5
2-feniletanolo	22696	239	287,2	27
Totali	78858		647	

*Deviazione Standard

Tabella 24- Classe degli esteri identificati nel vino Malvasia

<u>Malvasia</u>	Liberi ($\mu\text{g/L}$)	
<u>Esteri</u>	Media	DS*
3-Metilbutil acetate	522	54
Etil esanoato	420	18
Etil eptanoato	Tr	
Etil lattato	600	31
Etil ottanoato	727	10
Etil decanoato	389	14
Dietil succinato	2149	16
Etil vanillato	34	5
2-feniletilel acetato	78	4
Totali	5099	

*Deviazione Standard

Tabella 25- Classe dei Terpeni identificati nel vino Malvasia.

Malvasia	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Media	DS*	Media	DS
Terpeni				
Linalolo	42	1	33,7	5.1
Terpinen 4-olo	599	13	35	3.8
HO-trienolo	26	2		
α-Terpineolo	52	2	2,9	0.3
2,6-Dimetil-3,7-ottadien- 2,6-diolo	366	14	27,3	4.4
Epossilinalolo I	57	2		
Epossilinalolo II			48,8	6.9
β-Citronellolo			tr	
Nerolo	25	2	5,6	0.7
Geraniolo	25	1	33,6	1
2,6-Dimetil-1,7-ottadien- 3,6-diolo	Tr		41,8	3.7
Totali	1204		236	

*Deviazione Standard

Tabella 26- Altre classi di composti aromatici identificati nel vino Malvasia.

<u>Malvasia</u>	Liberi (µg/L)	
<u>Acidi</u>	Media	DS
acido esanoico	1349	17
acido ottanoico	2273	90
acido decanoico	1121	11
acido geranico	23	3
Totali	4766	
<u>Lattoni</u>		
Butirrolattone	42	6
5-pentildiidro 2(3H)- furanone	36	0
Totali	78	
<u>Fenoli</u>		
4-Vinilguaiacolo	101	11
Totali	101	
N-3-metilbutilacetamide	83	14

*Deviazione Standard

8.4 Evoluzione aromatica dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia

8.4.1 Alcoli C-6 e alcoli superiori

Confrontando i dati relativi alla frazione aromatica degli alcoli C-6 e alcoli superiori del vino Moscato con quelli ottenuti a fine conservazione si evidenzia che dopo 16 mesi di conservazione (Tabella 27):

-il cis 3-esen-1-olo, 1-esanolo, trans 3-esen-1-olo (forme libere) e 1-esanolo, trans 2-esen-1-olo e trans-3-esen-1-olo (forme glicosilate), composti appartenenti alla classe degli alcoli a sei atomi di carbonio, diminuiscono significativamente.

La concentrazione totale della frazione dei liberi degli alcoli C-6 passa da 1226 $\mu\text{g/L}$ a 467,7 $\mu\text{g/L}$ mentre per quanto riguarda la frazione dei glicosilati questa passa da 142,3 $\mu\text{g/L}$ a 37,9 $\mu\text{g/L}$.

-si denota in generale anche per la classe degli alcoli superiori una significativa riduzione del contenuto aromatico iniziale; per la frazione dei glicosilati si ha la riduzione del 2-metil-1-propanolo che è presente in tracce mentre per la frazione dei liberi si ha la scomparsa dell'1-ottanolo e del 3-metil-1-propanolo. La concentrazione totale della frazione degli alcoli superiori liberi passa da 62318 $\mu\text{g/L}$ a 19632,9 $\mu\text{g/L}$ mentre per la frazione dei legati si passa da una concentrazione iniziale di 3285,4 $\mu\text{g/L}$ a 115,9 $\mu\text{g/L}$.

Tabella 27 Evoluzione degli alcoli C-6 e alcoli superiori nel vino Moscato dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

Moscato				
<u>Alcoli C-6</u>	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Mag-09	Set-10	Mag-09	Set-10
cis 3-esen-1-olo	13a*	5,2b	tr	
1-esanolo	1271a	457,6b	121,8a	32,8b
trans 2-esen-1-olo			16,7a	4,5b
trans 3-esen-1-olo	12a	4,9b	3,8a	0,6b
Totali	1296	467,7	142,3	37,9
<u>Alcoli</u>	.			
2-Metil-1-propanolo	1916a	606,2b	6,3a	Trb
1-Butanolo	99a	32,6b	16,6a	3,1b
3+2-Metil-1-butanolo	45602a	18369,3b		
2-Metil-3-buten-1-olo	14 a	0b		
3-Metil-1-butanolo			176,0a	31,4b
1-Pentanolo	164a	52,3b	27,7a	3,9b
4-Metil-1-pentanolo	17a	0b		
3-Metil-1-pentanolo	33a	9,2b		
2-Ottanolo	17a	4,2b		
1-Otten-3-ol	79a	26,5b	10,4a	1,0b
1-eptanolo	338a	105,1b	11,8	7,5b
2-etil-esanolo	17a	3,8b	0a	0,9a
1-Ottanolo	51	0b	5a	3,5b
3-Metil-1-propanolo	30a	9,9b		
Benzilalcool	119a	47,3b	182,7a	25,5b
2-feniletanolo	14256a	4941,6b	169,6a	40,0b
Totali	62318	19632,9	3285,4	115

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi). (I dati sono espressi in $\mu\text{g/l}$)

Analizzando i dati relativi all'evoluzione della classe degli alcoli C-6 e alcoli superiori nel vino malvasia (Tabella 28) dopo il periodo di conservazione si osserva anche in questo caso una riduzione del contenuto aromatico e in particolare:

-per la classe degli alcoli C-6 si ha una diminuzione del contenuto in cis-3-esen-1-olo, 1-esanolo e trans 3-esen-1-olo (liberi) mentre per i glicosilati si ha la riduzione significativa del contenuto del trans 2-esen-1-olo e del trans 3 esen-1-olo. In totale il contenuto degli alcoli C-6 liberi passa da 1313 $\mu\text{g/L}$ a 458 $\mu\text{g/L}$ mentre i glicosilati passano da 44,3 $\mu\text{g/L}$ a 4,3 $\mu\text{g/L}$,

-per la classe degli alcoli superiori (frazione dei liberi) si ha la riduzione significativa del contenuto di 2-metil-1-propanolo, 1-butanolo, 1-otten-3-olo, 1-eptanolo, 3+2-metil-1-butanolo, 2-etil-esanolo, 1-ottanolo, benzilalcol e 2-feniletanolo. Si osserva inoltre la scomparsa del 2-metil-3-buten-1-olo e del 3-metil-1-propanolo. Per quanto riguarda la frazione dei glicosilati, anche in questo caso osserviamo una netta riduzione della concentrazione di tutte le molecole volatili presenti all'imbottigliamento. Il contenuto totale della frazione libera degli alcoli superiori passa da un contenuto iniziale di 78858 $\mu\text{g/L}$ a 34715,8 $\mu\text{g/L}$, mentre per la frazione dei glicosilati il contenuto totale passa da 942,4 $\mu\text{g/L}$ a 46,2 $\mu\text{g/L}$.

Tabella 28 Evoluzione degli alcoli C-6 e alcoli superiori nel vino Malvasia dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

Malvasia				
Alcoli C-6	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
	Mag-09	Set-10	Mag-09	Set-10
cis 3-esen-1-olo	45a*	15,5b		
1-esanolo	1098a	387,9b		
trans 2-esen-1-olo			13,9a	2,0b
trans 3-esen-1-olo	170a	54,7b	30,6a	2,3b
Totali	1313	458,1	44,5	4,3
Alcoli				
2-Metil-1-propanolo	2652a	834,9b	9,5a	0,5b
1-Butanolo	50a	16,4b	38,5	2,0b
3+2-Metil-1-butanolo	52966a	24079,9b		
2-Metil-3-buten-1-olo	6a	0b		
3-Metil-1-butanolo			134,8a	11,0b
1-Pentanolo	47a	12,1b	44,2a	2,4b
4-Metil-1-pentanolo	47a	0b		
3-Metil-1-pentanolo	45a	12,6b		
2-Ottanolo	17a	1000,0b		
1-Otten-3-ol	7a	2,9b	10,7a	2,2b
1-eptanolo	40a	11,8b	12,9a	0,9b
2-etil-esanolo	17a	3,8b		
1-Ottanolo	23a	4,8b		
3-Metil-1-propanolo	154a	0b		
Benzilalcool	91	22,3	109,2a	5,9b
2-feniletanolo	22696a	8742,8b	287,2a	21,3b
Totali	78858	34715,8	942,4	46,2

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

La progressiva riduzione del contenuto aromatico degli alcoli durante la fase di invecchiamento in bottiglia, come osservato anche da Oliveira *et al.*, (2008) nei vini bianchi *Alvarinho*, deriva dal fatto che questa classe di composti è coinvolta in diversi tipi di

reazioni: ossidazioni, esterificazioni o quali prodotti derivanti da idrolisi di esteri che ne rimaneggiano completamente il quadro aromatico e lo arricchiscono di nuovi e complessi profumi, più fini e delicati e privandone di altri caratteristici della varietà. Per quanto riguarda il vino Alvaieinho si ha durante la conservazione la perdita di intensità aromatica delle note floreali, di agrumi e frutta tropicale (come avviene anche per i nostri vini).

Il 2-feniletanolo è, infatti, uno dei composti che maggiormente determina le note aromatiche fruttate dei vini bianchi e una sua riduzione ne determina la progressiva attenuazione. La progressiva riduzione della componente aromatica alcolica è riportata anche nel lavoro di Debordieu *et al* (1990). Una riduzione della concentrazione degli alcoli superiori, derivati dal metabolismo azotato dei lieviti, risulta positiva per la qualità aromatica dei vini bianchi, infatti è stato dimostrato che se presenti in quantità elevata contribuiscono a deprimere le caratteristiche di freschezza dei vini (Rocha *et al.*, 2000).

8.4.2 Esteri

Analizzando il profilo di evoluzione della classe aromatica degli esteri in forma libera nel Moscato dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia, si denota che solo il dietilsuccinato e l'etil lattato aumentano significativamente. Il dietilsuccinato passa da un valore iniziale di 1192 µg/L a 1375,6 µg/L a fine conservazione, mentre l'etil lattato passa da una concentrazione iniziale di 226 µg/L a 263,6 µg/L a fine conservazione. Tutti gli altri composti presenti al momento dell'imbottigliamento diminuiscono significativamente nel corso del tempo. (Tabella 29)

Tabella 29 - Evoluzione degli esteri nel vino Moscato dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

<u>Moscato</u>	Liberi (µg/L)	
	Mag-09	Set-10
<u>Esteri</u>		
Etil 2-metilpropanoato	10a*	2,7b*
Etil butanoato	148a	31,8b
Etil 2-metilbutanoato	Tr	
Etil 3-metilbutanoato	Tr	
3-Metilbutil acetato	178a	59,2b
Etil esanoato	206a	65,9b
Etil eptanoato	16a	5,9b
Etil lattato	226a	<u>263,6b</u>
Etil ottanoato	161a	48,8b
Etil decanoato	63a	7,9b
Dietil succinato	1192a	<u>1375,6</u>
Etil vanillato	106a	26,6b
2-feniletil acetato	21a	9,8b
Totali	2327	1897,8

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

Nella Malvasia, a differenza del moscato, non si verifica l'aumento significativo né di dietilsuccinato e di etil lattato, ma si osserva una diminuzione significativa della stessa classe di composti identificati al momento dell'imbottigliamento. (Tabella 30)

Tabella 30 - Evoluzione degli esteri nel vino Malvasia dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

<u>Malvasia</u>	Liberi (µg/L)	
	<u>Esteri</u>	
	Mag-09	Set-10
Etil 2-metilpropanoato	19,7a*	29,8b
3-Metilbutil acetato	522a	140,4b
Etil esanoato	420a	133,2b
Etil eptanoato	tr	
Etil lattato	600a	170,9b
Etil ottanoato	727a	219,4b
Etil decanoato	389a	96,3b
Dietil succinato	2149a	1032,5b
Etil vanillato	34a	10,6b
2-feniletil acetato	78a	19,6b
Totali	5099a	1852,7b

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

Per quanto riguarda gli esteri, a parte le trascurabili quantità presenti nell'uva, essi si formano nel vino principalmente per opera dei lieviti durante la fermentazione alcolica. Essi sono i maggiori responsabili della gradevole nota fresca e fruttata dei vini giovani e una loro diminuzione ne determina la scomparsa (Du Plessis *et al.*, 2000). In particolare sono i principali responsabili dell'aroma caratteristico dei vini Moscato (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975).

Dal momento che sono prodotti quasi esclusivamente dai lieviti, gli esteri sono frutto di reazioni enzimatiche che avvengono all'interno della cellula (esterificazione ed idrolisi), che determinano a seconda del tipo di fermentazione un aumento (Laurent *et al.*, 1994) o

diminuzione del loro contenuto (come riportato dall'evoluzione generale dei nostri composti identificati) (Gil *et al.*, 1996).

Il 2-feniletilacetato, che diminuisce in modo significativo durante la conservazione, è responsabile delle note floreali di rosa dei vini bianchi. La sua diminuzione è in accordo con i dati riportati nei lavori di Ugliano *et al.* (2005).

Un marcato aumento presentano invece il dietilsuccinato, (come si osserva per il vino Moscato ma non nella Malvasia dove si ha una riduzione) e l'acetato di etile: la temperatura nuovamente può avere una notevole influenza, causando significativi aumenti nella concentrazione di questi due esteri (i nostri campioni sono comunque stati conservati a bassa temperatura). Un aumento in concentrazione che si verifica normalmente e piuttosto velocemente (come visto per il dietilsuccinato), è quello del lattato di etile (come nel Moscato ma non nella Malvasia dove invece si ha una diminuzione). L'aumento di questi due composti è probabilmente dovuto a reazioni di esterificazione di natura chimica in relazione alla produzione di acido lattico nel corso del metabolismo dell'acido malico. Il lattato di etile è il principale sottoprodotto del metabolismo dei batteri lattico e conferisce al vino note di latte. (Shinohara, 1984; Davis *et al.*, 1980)

Per quel che riguarda la partecipazione al bouquet d'invecchiamento, sembra ormai assodato che il loro ruolo della classe degli esteri sia scarso e si abbia solo in concomitanza del decremento in esteri acetici. E' a questo decremento che corrisponde, infatti, la perdita della nota di fruttato (Ramey *et al.*, 1980).

8.4.3 Terpeni

Dai dati riportati sull'evoluzione della classe dei terpeni liberi nel vino moscato (Tabella 31) si evidenzia una generale diminuzione della componente aromatica e la perdita del composto geraniolo, con una conseguente perdita da parte del vino del caratteristico aroma di rosa. Si ha inoltre la comparsa dell'eossilinalolo I e II, rispettivamente in concentrazione di 81,7 $\mu\text{g/L}$ e 11,7 $\mu\text{g/L}$.

Analizzando i terpeni glicosilati si osserva la perdita dell' α -terpineolo (profumo di bergamotto e fiori d'arancio) e dell'eossilinalolo II, mentre le altre molecole volatili iniziali permangono, ma diminuiscono di concentrazione.

Tabella 31 Evoluzione dei terpeni nel vino Moscato dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

Moscato	Liberi (µg/L)		Glicosilati (µg/L)	
Terpeni	Mag-09	Set-10	Mag-09	Set-10
Ossido trans-linalolo	30a*	7,7b*	19,2a	0,9b
Ossido cis-Linalolo	56a	20,8b	58,5a	5,1b
Linalolo	326a	134,4b	307,4a	11,8b
Terpinen 4-ol	11a	2,3b		
HO-trienolo	12a	8,2b	Tr	
α-Terpeneolo	114a	55,5b	22,5a	0b
2,6-Dimetil-3,7-ottadien-2,6-diolo	108a	29,0b		
Epossilinalolo I	0a	81,7b	120,2a	6,4b
Epossilinalolo II	0a	11,7	9,2a	0b
β-Citronello	185a	48,8b	26,6a	0,5b
Nerolo	249a	143,0b	570,4a	47,4b
Geraniolo	229a	0b	589,1a	73,4b
2,6-Dimetil-1,7-ottadienolo-3,6-diolo	49a	5,3b		
Totali	1378	448,4	1723,1	145,5

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

Per quanto riguarda l'evoluzione della frazione terpenica libera nella malvasia (Tabella 32) si può osservare la perdita dell'eossilinalolo I-II e geraniolo, ma si ha la comparsa del β-citronello (aroma di limone) che non era presente al momento dell'imbottigliamento. Tutti gli altri composti iniziali tendono progressivamente a diminuire con il tempo.

Analizzando la frazione dei glicosilati si evidenzia la perdita di terpinene 4-olo, α-terpineolo, 2,6-dimetil-3,7-ottadien-2,6-diolo, eossilinalolo II e 2,6-dimetil-1,7-ottadien-3,6-diolo e una diminuzione di concentrazione dei restanti composti iniziali. Si ha anche la

formazione di nuove molecole come l'epossilinalolo I e il β -citronellolo. Per la frazione dei liberi abbiamo la perdita dell'epossilinalolo I e geraniolo e la formazione del β -citronellolo (aroma di limone). Si osserva inoltre l'aumento del linalolo (aroma floreale) e α -terpineolo (liliaceo, aroma di pesca), il linalolo passa da 42 $\mu\text{g/l}$ al momento dell'imbottigliamento a 168,7 $\mu\text{g/L}$ nel vino dopo 16 mesi di conservazione mentre l' α -terpineolo passa da 52 $\mu\text{g/L}$ a 148,8 $\mu\text{g/L}$.

Tabella 32 Evoluzione dei terpeni nel vino Malvasia dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

<i>Malvasia</i> <i>Terpeni</i>	Liberi ($\mu\text{g/L}$)		Glicosilati ($\mu\text{g/L}$)	
	Mag09	Set-10	Mag09	Set10
Linalolo	42a*	168,7b	33,7a	11,8b
Terpinen 4-olo	599a	8,9b	35a	0b
HO-trienolo	26a	17,9b		
α -Terpineolo	52a	148,8b	2,9a	0b
2,6-Dimetil-3,7-ottadien-2,6-diolo	366a	14,5b	27,3a	0b
Epossilinalolo	57a	0b	0a	6,4
Epossilinaloolo			48,8a	0b
β -Citronellolo	0a	3,8b	Tra	0,5b
Nerolo	25a	4,5b	5,6a	47,4b
Geraniolo	25a	0b	33,6a	73,4b
2,6-Dimetil-1,7-ottadien-3,6-diolo	tr		41,8a	0b
Totali	1204	367,1	236	139,5

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi).

Gli alcoli terpenici, tra i quali per esempio il linalolo, il nerolo ed il geraniolo; sono molto volatili; tipici dei vini bianchi provenienti da uve aromatiche (Moscato, Malvasia ecc.), il

linalolo ha un'elevata soglia di percezione di 50 µg/L, sono presenti anche in vini bianchi provenienti da uve neutre (Riesling renano per es.) nei quali concorrono a determinare l'aroma fruttato e varietale (Versini *et al.*, 1985; Ribereau-Gayon, 2000). La conservazione in bottiglia può determinare naturali modifiche nel contenuto aromatico di questi composti. Prove di conservazione, di ossidazione e di invecchiamento veloce non hanno prodotto soltanto i rispettivi ossidi, derivati del pirano e del furano, ma hanno mostrato anche la comparsa di un altro composto ciclico, l'alfa-terpineolo. Questa sostanza probabilmente deriva da un'interconversione dei terpeni sopracitati (che sono isomeri strutturali e geometrici) e da una successiva ciclizzazione acido-catalizzata. L' α -terpineolo e gli ossidi monoterpenici hanno un valore soglia più alto e la loro formazione è sicuramente da mettere in relazione con la diminuzione o la perdita del tipico aroma fruttato e floreale, che come è noto si verifica durante l'ossidazione o l'invecchiamento di questi vini. Si può ragionevolmente presumere che queste trasformazioni avvengano anche durante la normale conservazione in bottiglia (Guntert, 1984; Rapp *et al.*, 1985).

8.4.4 Acidi, lattoni, fenoli, aldeidi e chetoni e altri composti volatili.

Analizzando l'evoluzione degli aromi appartenenti alla classe degli acidi (forma libera) nel vino moscato (Tabella 33), si evidenzia una generale diminuzione della loro concentrazione. Tali valori passano da un valore totale iniziale di 1889 µ/L a 594,4 µ/L a fine conservazione. Si è osservata inoltre la coeluizione dell'acido esanoico con il geraniolo. Anche i lattoni inizialmente identificati al momento dell'imbottigliamento tendono a diminuire da un totale di 369 µ/L a 112,4 µ/L. Il fenolo, 4-vinilguaiacolo,

diminuisce così come la benzaldeide (libera), mentre si osserva la perdita di nerale e geraniale (forma glicosilata).

Tabella 33 Evoluzione degli acidi, lattoni, fenoli, aldeidi e chetoni e altri composti volatili nel vino Moscato dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

<u>Moscato</u>	Liberi(µg/L)		Glicosilati(µg/L)	
	Magg-09	Sett-10	Magg-09	Sett-10
<u>Acidi</u>				
acido esanoico	614a	365,9b		
acido ottanoico	429a	192,2b		
acido decanoico	157a	43,5b		
acido geranico	689a	331,8b		
Totali	889a	594,4b		
<u>Lattoni</u>				
Butirrolattone	128a	21,1b		
5-pentildiidro 2(3H)-furanone	241a	91,3b		
Totali	369a	112,4b		
<u>Fenoli</u>				
4-Vinilguaiacolo	61a	43,1b		
<u>Aldeidi e Chetoni</u>				
Benzaldeide	240a	38,5b		
Nerale			12,1a	0b
Geraniale			12,5a	0b
Totali	240	38,5	24,6	
<u>altri</u>				
N-3-Metilbutilacetamide	510a	190,0b		

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi). L'acido esanoico coeluito con il geraniolo.

Anche nella malvasia (tabella 34) assistiamo, a fine conservazione, alla progressiva diminuzione degli acidi iniziali e si ha la coeluizione dell'acido esanoico con il geraniolo, per la classe dei lattoni si ha la diminuzione del butirrolattone mentre si ha la scomparsa del 5-pentildiidro 2(3H)-furanone, il fenolo 4-vilguaiacolo diminuisce così come N-3-metilbutilacetamide. Per i composti identificati non sono presenti le forme glicosilate.

Tabella 34 Evoluzione degli acidi, lattoni, fenoli, aldeidi e chetoni e altri composti volatili nel vino Malvasia dopo 16 mesi di conservazione in bottiglia.

<u>Malvasia</u>	Liberi (µg/L)	
	Mag-09	Set-10
<u>Acidi</u>		
acid esanoico	1349a*	222,2b
acid ottanoico	2273a	754,3b
acid decanoico	1121a	378,2b
acid geranico	23a	3,4b
Totali	4766	1358,1
<u>Lattoni</u>		
Butirrolattone	42a	12,2b
5-pentildiidro 2(3H)-furanone	36a	0b
Totali	78	12,2
<u>Fenoli</u>		
4-Vinilguaiacolo	101a	24,1b
<u>altri</u>		
N-3-metilbutilacetamide	83a	28,6b

*A lettere diverse nell'ambito di ciascuna colonna corrispondono medie significativamente differenti secondo il test LSD di Fischer per $p < 0,05$ (ns dati non significativi). L'acido esanoico coeluito con il geraniolo.

Gli acidi sono forse il gruppo di componenti volatili che meno influenzano il bouquet d'invecchiamento, pur potendo risultare da reazioni di idrolisi, di ossidazione o intervenire in reazioni di esterificazione. Infatti, la riduzione del contenuto deriva dal fatto che durante la fermentazione e nelle fasi di invecchiamento si formano in seguito a reazioni di esterificazione, per esempio, gli esteri metilici degli acidi esanoico, ottanoico e decanoico (Monaga *et al.*, 2006).

Le aldeidi, il cui contenuto è elevato nei vini fortificati di tipo ossidato, si ritrovano in modeste quantità nei vini naturali. Diversi lavori riportano una riduzione significativa del loro contenuto in vini bianchi durante la conservazione (Osborne *et al.*, 2000).

A tal proposito vi sono due ipotesi per spiegare la presenza delle aldeidi nel vino, ed entrambe implicano l'intervento indiretto dell'ossigeno, di composti fenolici, di acqua ossigenata e, come substrato ultimo, degli alcoli. Secondo la prima ipotesi, alcuni composti fenolici verrebbero ossidati dall'ossigeno, con formazione di acqua e ossigeno atomico. L'ossigeno atomico reagirebbe poi con l'acqua per formare acqua ossigenata; quest'ultima essendo un energico ossidante, ossiderebbe gli alcoli ad aldeidi finché è presente nel mezzo. La seconda ipotesi, più recente, implica un meccanismo più complicato: l'ossigeno disciolto nel vino formerebbe acqua ossigenata e radicali liberi, con la partecipazione di ioni H^+ (ioni idrogeno) e di elettroni ceduti da catalizzatori metallici (Cu e Fe). In seguito i composti fenolici interverrebbero a ridurre i catalizzatori ossidati, ossidandosi a loro volta in composti chinonici, che tra l'altro determinano anche un incupimento del colore. Per reazione dei radicali liberi così formati ed in presenza di acqua ossigenata, gli alcoli verrebbero ossidati ad aldeidi. (Windenradt *et al.*, 1974; Danilewicz *et al.*, 2010)

La durata del processo del contatto legno-vino è un altro fattore di possibile variabilità del profilo aromatico del vino. Affinamenti brevi possono provocare una maggiore rilevanza dei descrittori di *caramello*, *vaniglia* e *torrefatto*, alla luce del fatto che i composti responsabili (aldeidi fenoliche, aldeidi furaniche, fenilchetoni ed eterocicli di origine Maillard) sono presenti soprattutto negli strati più superficiali del legno tostato, e per questa ragione la loro cessione al vino durante i primi mesi di affinamento è percentualmente

preponderante mostrando durante la conservazione un rapido declino (Gerbi, 2009). È stato identificato in entrambi i vini un fenolo, il 4-vinilguaiacolo ,estratto organico di legno di rovere che evoca odore di paglia bruciata, di cenere di camino umida (Chatonnet *et al.*, 1990) e si osserva una suo decremento durante la fase di conservazione in bottiglia. Comunque c'è da dire che i nostri vini non sono stati invecchiati in legno.

9. Conclusioni

La Sardegna conta oltre 120 vitigni *autoctoni*, cioè derivati dalla domesticazione avvenuta direttamente nella nostra isola, ai quali si riconosce una diretta discendenza dalla *Vitis vinifera sylvestris*. Ciò testimonia la ricchezza e profondità di radici storiche e culturali della nostra viticoltura.

Negli ultimi due decenni, le cantine sociali, ma soprattutto i produttori privati, sono stati fortemente coinvolti nel migliorare la qualità dei vini, al fine di far diventare la Sardegna competitiva sui mercati nazionali ed internazionali. Tutti questi sforzi hanno migliorato la produzione. I produttori regionali hanno inoltre fortemente incoraggiato l'attività di ricerca, spesso con la collaborazione degli istituti di ricerca locali e nazionali. Diversi studi sono stati fatti finora, ma sono necessarie ulteriori ricerche sui cambiamenti delle componenti chimiche del vino responsabili di importanti parametri sensoriali (colore e aroma).

Risulta evidente dalla letteratura esistente, che non esistono lavori sui composti polifenolici e aromatici del Moscato di Sorso Sennori e Malvasia di Bosa. Infatti, lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare i composti polifenolici, il colore e i composti aromatici dei due vini. E' stata seguita anche l'evoluzione dei composti polifenolici e del colore durante l'invecchiamento in bottiglia fino a 16 mesi.

Dalle analisi effettuate e dai dati ottenuti sul vino Moscato si può concludere che: il pH del vino durante la conservazione rimane pressoché costante, mentre il contenuto di solforosa libera e totale si mantiene su valori accettabili. Le catechine e proantocianidine a basso peso molecolare ad un primo aumento fanno registrare un ritorno ai valori iniziali, mentre il contenuto in flavonoidi totali tende a scomparire del tutto già al momento

dell'imbottigliamento. Le proantocianidine totali presentano un andamento simile con un aumento iniziale e una riduzione significativa a fine conservazione.

Analizzando il colore, si osserva che l'assorbanza a 280 nm e quella a 520 non subiscono variazioni significative durante la conservazione, mentre il valore di assorbanza a 420 nm mostra incrementi significativi dovuti ad un progressivo imbrunimento del vino a fine conservazione. Dai dati CIELAB sul colore si osserva che la coordinata cromatica L^* aumenta significativamente dopo 16 mesi di conservazione e il vino è diventato più luminoso e trasparente. Il parametro b^* diminuisce significativamente nel corso del tempo. La riduzione di b^* diventa significativa a fine conservazione con una conseguente riduzione della componente cromatica gialla, il vino diventa di giallo meno intenso. Di conseguenza anche l'intensità del colore C^* (correlata ad a^* e b^*) diminuisce significativamente a fine conservazione indicando una generale perdita di intensità cromatica.

Per quanto riguarda il vino Malvasia si osserva che il pH del vino rimane invariato durante la conservazione e anche l'anidride solforosa libera e totale non subisce variazioni significative il cui valore rimane costante per tutto il periodo di conservazione. Dai risultati delle determinazioni spettrofotometriche si osserva che durante la conservazione i polifenoli totali non variano in modo significativo ma si osserva che la loro concentrazione nel vino all'imbottigliamento, mag-2010, è circa la metà di quella riscontrata nelle uva. I flavanoli a basso peso molecolare e le proantocianidine diminuiscono in modo significativo e le ultime scompaiono dopo 8 mesi di conservazione. La riduzione del contenuto polifenolico è da imputarsi ai processi di tipo ossidativo che avvengono nel corso dell'affinamento in bottiglia. Per quanto riguarda il colore si denota che l'assorbanza a 280

aumenta, il vino ha quindi subito un significativo imbrunimento e si è arricchito di note giallastre come dimostrato anche dall' aumento dell'assorbanza a 420nm (giallo dovuto ai tannini) e tale valore risulta aumentare in seguito alla formazione di prodotti di ossidazione e condensazione (pigmenti colorati). Analizzando i dati sul colore utilizzando la tecnica CIElab si osserva che il vino appare più limpido (aumento della coordinata L*), arricchito di sfumature rossastre (aumento di a*) dovute al progressivo imbrunimento ossidativo, perdita di note giallastre (b* diminuisce) quindi il vino appare di giallo più pallido, riduzione della tonalità h* e dell'intensità del colore C* (diminuisce), quest'ultimo parametro dopo settembre rimane costante.

Dal profilo polifenolico e dalla sua evoluzione durante la conservazione, si può concludere che nel vino Moscato come nella Malvasia sono stati identificati 8 acidi fenolici (ac.caftarico, ac.caffeico, ac. p-cumarico, ac.ferulico, ac.gallico, ac.protocatechico, etil estere caffeico e tirosolo) e 3 flavonoidi (catechina, epicatechina, quercetina 3-glucuronide). Si osserva che dopo 16 mesi di stoccaggio l'acido caftarico subisce una diminuzione significativa a fine conservazione. L'acido p-cumarico, l'acido gallico, l'acido protocatechico e l'etil estere caffeico tendono ad aumentare significativamente. Tra i composti flavonoidici si osserva la progressiva ossidazione dei composti ortodidrossifenolici, come catechina, e epicatechina, che porta alla formazione di prodotti di colore giallo o marrone ed imbrunimento del vino.

Dall'analisi del profilo polifenolico della Malvasia si osserva un aumento degli acidi p-coumarico, ferulico, e etil estere del caffeico durante la conservazione mentre l'acido caftarico diminuisce così come l'acido gallico che presenta un andamento particolare infatti

non presente al momento dell'imbottigliamento, compare solo a Gen-10 per poi scomparire a Set-10. Il tirosolo tende ad aumentare significativamente anche se non viene più rilevato a fine campionamento. Analizzando il profilo aromatico e la sua evoluzione dopo 16 mesi di conservazione si può concludere che nel vino Malvasia si ha una riduzione significativa del contenuto aromatico degli alcoli, nota positiva perché ad alte concentrazioni contribuiscono a deprimere le caratteristiche di freschezza dei vini. Nella Malvasia, a differenza del moscato, non si verifica l'aumento né di dietilsuccinato e di etil lattato ma si osserva una totale diminuzione degli stessi composti presenti al momento dell'imbottigliamento (perdita delle note floreali e fruttate). Si può osservare inoltre la perdita dell'eossilinalolo I-II e geraniolo, ma si ha la comparsa del β -citronellolo (aroma di limone) che non era presente al momento dell'imbottigliamento. Tutti gli altri composti iniziali tendono a diminuire significativamente con il tempo. Analizzando la frazione dei glicosilati si evidenzia la perdita di terpinene 4-olo, α -terpineolo, 2,6-dimetil-3,7-ottadien-2,6-diolo, eossilinalolo II e 2,6-dimetil-1,7-ottadien-3,6-diolo e una diminuzione di concentrazione dei restanti composti iniziali. Si ha anche la formazioni di nuove molecole come l'eossilinalolo I e il β -citronellolo. Per la frazione dei liberi abbiamo la perdita dell'eossilinalolo I e geraniolo e la formazione del β -citronellolo (aroma di limone). Si osserva inoltre l'aumento del linaloolo (aroma floreale) e α -terpineolo (liliaceo, aroma di pesca). Anche nella malvasia assistiamo, a fine conservazione, alla progressiva diminuzione degli acidi iniziali ed dei composti inizialmente identificati appartenenti alla classe dei lattoni si ha la diminuzione del butirrolattone mentre si ha la scomparsa del 5-

pentildiidro 2(3H)-furanone, il fenolo 4-vilguaiacolo diminuisce così come N-3-metilbutilacetamide.

Analizzando il profilo aromatico, l'analisi con GC-MS ci ha consentito di identificare 59 composti aromatici in entrambi i vini. Sono presenti sedici alcoli superiori, quattro alcoli C-6, quattordici terpeni, tredici esteri, quattro acidi, tre aldeidi, due lattoni e fenoli e un altro composto. Gli alcoli superiori sono i principali composti presenti in entrambi i vini. I principali alcoli superiori sono 3 e 2 metil-1-butanolo, in particolare il 2-fenil etanolo, che ha un piacevole profumo di rosa. Solo una piccola parte degli alcoli superiori sono in forma glicosilata. Gli alcoli C-6 sono stati trovati in basse quantità, e questo è importante a causa del loro effetto negativo sulla qualità del vino, in quanto conferiscono note erbacee e di foglie. Gli esteri sono composti molto importanti del sapore del vino giovane, in quanto conferiscono aroma di fruttato. L'estere più abbondante in entrambi i vini è stato il succinato etilico, che è responsabile delle note di dolce, fruttato, con una sfumatura di cera e sapone. I terpeni, che sono responsabili del caratteristico aroma delle uve aromatiche (Moscato, Malvasia), sono stati trovati come alcoli e relativi ossidi. Tra questi, i più abbondanti sono: linalolo, α -terpineolo, 2,6-dimetil-3,7-ottadien-2,6-diolo, β -citronellolo, nerolo e geraniolo. I terpeni presenti nel moscato sono in concentrazione più elevata nella forma glicosilata. Gli acidi sono più elevati nella malvasia. Tra gli altri composti volatili, si evidenzia la presenza del 4- vinil guaiacolo, della benzaldeide e di due lattoni, a basse concentrazioni. Durante la conservazione in bottiglia per 16 mesi si osserva una riduzione significativa e positiva per l'aroma del vino del contenuto degli alcoli a sei atomi di

carbonio e degli alcoli superiori identificati al momento dell'imbottigliamento, con la scomparsa dell'1-ottanolo e del 3-metil-1-propanolo. Questi composti sono infatti responsabili della comparsa delle note erbacee se presenti in elevata concentrazione. Per la classe degli esteri si denota che solo il dietilsuccinato e l'etil lattato (note di latte) aumentano di concentrazione mentre i restanti composti diminuiscono. Per la classe dei terpeni liberi si evidenzia una generale diminuzione della componente aromatica e la perdita del composto geraniolo, con una conseguente perdita da parte del vino del caratteristico aroma di rosa. Si ha inoltre la comparsa dell'eossilinalolo I e II. Analizzando i terpeni glicosilati si osserva la perdita dell' α -terpineolo (profumo di bergamotto e fiori d'arancio), dell'eossilinalolo II, mentre le altre molecole volatili iniziali permangono ma diminuiscono di concentrazione. Anche per la classe degli acidi (forma libera) nel vino moscato si evidenzia una generale e significativa diminuzione della loro concentrazione. Anche i lattoni inizialmente identificati al momento dell'imbottigliamento tendono a diminuire così come il fenolo, 4-vinilguaiacolo (note di fumo, bruciato) e la benzaldeide (Libera) mentre si osserva la perdita di nerale e geraniale (aroma di rosa) (forma glicosilata).

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio sono i primi in assoluto sulla Malvasia e Moscato prodotti in Sardegna, ed appaiono molto interessanti e di grande importanza in quanto gettano le basi per ulteriori studi futuri di caratterizzazione di altre varietà vitivinicole sarde, in modo da valorizzarne al meglio la qualità e le proprietà organolettiche, innalzando la loro qualità per una diffusione sul mercato nazionale ed internazionale.

BIBLIOGRAFIA

Ayrapaa T. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium . *J Inst Brew* 77 : 266 – 276;1971.

Allen M.S., Lacey M.J. and Boyd S. *Journal of Food Agriculture and Chemistry*, 42, 1734;1994.

Almela, L., Javaloy, S., Fernandez-Lopez, J. A. and Lopez- Roca, J. M. Comparison between the tristimulus measurements Yxy and L* a* b* to evaluate the colour of young red wines. *Food Chem.* 53, 321±327;1995.

Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M., Buxadera, S., Torre-Bonat, M. C. (Polyphenol content in sparkling wines (Cava) at different aging period. In J. Vercauteren, C. Cheze, M.C. Dumon, J.F. Weber (Eds.), *Polyphenols communications 96/XVIIIth International Conference on Polyphenols* (Vol. 2, pp. 305–306). Bordeaux: Secretariat du Groupe Polyphenols;1996.

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

Aznar M., Lopez R., Cacho J. F., & Ferreira V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-Olfactometry, quantitative GC–MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Food Chemistry and Agriculture* 49, 2924–2929;2001.

- Baderschneider B.**, & Winterhalter, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2788–2798;2001.
- Bayonove C.** *In Les Acquisitions Recentes en Chromatographie du Vin*, (ed. B.Doneche). Lavoisier, Paris;1993.
- Bayonove C.**, Cordonnier R. and Dubois P. C.R. *Academy Science Paris*, 281, (D), 75;1975.
- Barbagallo M.G.**, Vini dolci siciliani-Vinos dulces sicilianos. Dipartimento di Colture Arboree. Università di Palermo, Italia. *ACE Rivista di Enologia*;2006.
- Bartowsky E. J.**, Francis I. L., Bellon J. R., & Henschke P. A. Is buttery aroma perception in wines predictable from diacetyl concentration? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 180–185;2002.
- Baumes R.**, Wirth J., Bureau S, Gunata Y., Razungles A. Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458 3–14;2002.
- Bell S.J.**, & Henschke P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 242–295;2005.
- Betes-Saura C.**, Andres-Lacueva, C., & Lamuela-Raventos, R. M.. Phenolics in white free run juices and wines from Penedes by High-performance liquid chromatography: Changes during vinification. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3040–3046;1996.
- Borsa D.** (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA) - Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti (Italy)), Barbagallo, M.G. (Palermo Univ. (Italy)).

Dipartimento di Colture Arboree), Di Lorenzo, R. (Palermo Univ. (Italy). Dipartimento di Colture Arboree), Di Stefano, R. (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA) - Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti (Italy)), (2002). Terpene compounds changes of Sicily Italia grapes during ripening according to cultivation environment and covering by nets [*Vitis vinifera* L.; grapevine]. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, v. 55(2-3) p. 23-38;2002.

Boukharta M., Girardin, M., & Metche, M. Procyanidines galloyles du sarment de vigne (*Vitis vinifera*) separation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *J. Chromatogr.*, 455, 406–409;1988.

Broadhurst R.B., Jones W.T Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of Food Science and Agriculture* 28, 788;1965;1978.

Cabaroglu T., Canbas A., Baumes R. L., Bayonove C. L., Lepoutre J. P., & Gunata Y.. Aroma composition of a white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as affected by skin contact. *Journal of Food Science*, 62, 680–683;1997.

Cabaroglu T., Canbas A., Lepoutre J.P. and Gunata Z..Free and bound volatile composition of red wines of *Vitis vinifera* L cv. Öküzgözü and Bo azkere grown in Turkey. *American Journal of Enology and Viticulture* 51,pp. 64–68;2002.

Cagnasso E. Quaderni della scuola di specializzazione in scienze vitivinicole ed enologiche. Dipartimento di Colture arboree, Università di Torino, Grugliasco(TO), 21;129-153,1997.

Calo A., Di Stefano R., Costacurta A. and Calo G. *Rivista di Viticoltura ed Enologia*, 3, 3. 1991.

Carratu B. & Sanzini E.; Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti e nelle piante; Ann. Ist. Superiore della Sanità 41: 7-16, 2005.

Carrau F. M., Medina K., Boido E., Farina L., Gaggero C., Dellacassa E., Versini G. and Henschke P.A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts *FEMS Microbiology Letters* 243 (1), 107-115;2005.

Casu A., Peretto R. Vini di Sardegna. Laore Sardegna. 2007.

Chafer A., Pascual-Marti M.C., Salvador A., Berna, A.,. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *Journal of Separation Science* 28, 2050–2056;2005.

Chamkha M., Cathala, B., Cheynier, V., & Douillard, R. Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. *J. Agric. Food Chem.*, 513179–3184;2003.

Chaves M.M., Santos TP, Souza CR. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*;150:237-252;2007.

Chatonnet P., Boidron J. N., Poons M. 1990. *Alimentary Science*. 10, 565-587. Gerbi M. Tesi: Influenza del legno sul profile aromatic del vino. Facoltà di Agraria, Università di torino;2009.

Chatonnet P., Boidron J. N., Poons M. *Science Alimentary*, 10, 565-587;1990.

Chatonnet P., Dubourdieu, D., & Boidron, J. N. Effects of certain factors on yeast phenolic acid decarboxylation. *Conn. Vigne Vin.*, 23, 59–62;1989.3;2006.

Chatonnet P., Dubourdie D., Boidron J., Pons M. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 60, Issue 2, pages 165–178;1992.

Cheyrier V. F., & Fulcrand H. Oxidación de los polifenoles en los mostos y los vinos. In C. Flanzky (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, (2nd ed., pp. 369–376). Madrid: AMV; Mundi-Prensa; 2003.

Cheyrier V., Rigaud J., Souquet J., Duprat F., Moutounet M. Must browning in relation to the behaviour of phenolic compound during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture* 41: 346-349;1990.

Cheyrier V., Rigaud, J., Souquet, J. M., Barillere, J. M., & Moutounet, M. Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 36–42;1989.

Cheyrier V., Basire N., Rigaud J. Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1069-1071;1989.

Cheyrier V., Osse, C., & Rigaud, J. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.*, 53, 1729–1732;1988.

Chiralt A., Maestud, P., Fito, P. and Giner, J. Estudio del color de vinos blancos varietales joÀ venes de la D.O. Rueda. *Adv. Food Technol.* 3, 1677±1686;1987.

Cilliers J. J. L., Singleton V. L.. Nonenzymic autoxidative reactions of caffeic acid in wine. *American Journal of Enology Viticulture*. 41 (1): 84-86;1990.

Cooper H. J., & Marshall, A. G. Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5710–5718;2001.

Crespan M., Cabello F., Giannietto S., Ibanez J., Kontic J.K., Maletic E., Pejic I., Rodrigueztirres I. and Antonacci D. Malvasia delle Lipari, Malvasia di Sardegna, Greco di Gerace, Malvasia de Sitges and Malvasia dubrovacka - synonyms of an old and famous grape cultivar. *Vitis*, 45, 69-74.

Czochanska, Z., Foo, L. Y., Newman, R. H., Porter, L. J., Thomas, W. A., & Jones, W. T. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 8, 375–377;1979b.

Czochanska Z., Foo, L. Y., Newman, R. H., & Porter, J. L. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units and molecular weight. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2278–2286;1980.

Danilewicz J. C. and Wallbridge P. J. Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61(2): 166 – 175;2010.

Darias-Martin J.J., Rodriguez O., Diaz E., Lamuela-Ravento R.M.,. Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry* 71, 483–487;2000.

Darriet Ph., Tominaga T., Demole E. and Dubourdieu D. C.R. *Academy Science*. (Paris),serie 3,316 (11), 1332;1993.

De la Presa-Owens C. & Noble A. C. Effect of storage at elevated temperatures on aroma of Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 310–316;1997.

De Mora S. J., Knowles S. J., Eschenbruch R., & Torrey W. J. Dimethyl sulphide in some Australian red wines. *Vitis*, 26, 79–84;1987.

De Revel G., Hogg T., Santos C. Analyses du cis- and trans-resveratrol dans les vins produits au Portugal. *Journal International of the Sciences de la Vigne et du Vin* 30, 31–37;1996.

Di Felice M.L., Mattone A. Storia della vite e del vino in Sardegna.1999.

Di Stefano R. Composti volatili prodotti dai lieviti. Relazione tenuta al corso di aggiornamento A.E.I.: “Gli aromi in enologia: il punto sulle nuove conoscenze d’indirizzo applicativo” Milano. *Annali dell’Istituto Sperimentale per l’Enologia, Asti, vol. XXVI,* 1732;1996a.

Di Stefano R. Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. *Rivista di Viticoltura ed Enologia* 49(1),51; 1996b.

Di Stefano R. Proposal for a method of sample preparation for the determination of free and glycoside terpenes of grapes and wines. *Bull. O. I. V.,* 721-722, 219-223;1991.

Di Stefano R., Cravero M. C., Gentilini N.”Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini”, *L’enotecnico* 5, 83-89;1989.

Dimitris P. Makrisa, Eleni Psarraa, Stamatina Kallithrakac, Panagiotis Kefalasa. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines *Food Research International* 36 (2003) 805–814. Received 6 January 2003; accepted 7 April 2003.

Dolores H., Valeria G., Ángeles F., Recamales A., Antonio J.M., Lourdes G., Francisco J. H. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry* 113 530–537;2009.

Food Quality, 21, 285–297;1998.

Downey M., Harvey, J., & Robinson, S. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera L.*). *Austr. J Grape Wine Res.*, 9, 110–121;2003b.

Duplessis H.W., Steger C.L., Toit M., Lambrechts M.G. The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality. *Journal Applied Microbiology* 92,1005-1013;2002.

Dubourdieu D., Tominaga T., Masneuf I., Peyrot des Gachons C., & Murat M. L. The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 81–88;2006.

Dubordieu D., Lavigne V. Incidence de L'Hyperoxygénéation sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs du Bordelais. *Rev. Fr. Oenol*,124, 58-61;1990.

Ebeler S. E.. Analytical chemistry: unlocking the secrets of wine flavor. *Food Review International*, 17, 45–64;2001.

Ebeler S. E., & Spaulding, R. S. Characterization and measurement of aldehydes in wine. In A. L. Waterhouse & S. E. Ebeler (Eds.), *Chemistry of wine flavor* (pp. 166–179). Washington, DC: American Chemical Society;1998.

Eschenbruch R. sulfite and sulfide formation during winemaking – A review *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 157–161;1974.

Escudero A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., & Ferreira, Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501–4510;2007.

Escudero A., Asensio E., Cacho J., Ferreira V., Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77 (3), 325–331;2002.

Es-Safi N.E., Cheynier V., Moutounet M. Implications of phenolic reactions in food organoleptic properties, *Journal of Food Composition* 16: 535-553;2003.

Es-Safi N., Guerneve C.L., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M. Xanthylum salts formation involved in wine colour change. *International Journal of Food Science and Technology*, 35 , 63-74;2000.

Etievant P. X. (1991). Wine. In H. Maarse (Ed.), *Volatile Compounds in Food and Beverages* (pp. 483–546). New York: Marcel Dekker.

Failla O., Brancadoro L., Rossoni M., La scienza A. Le sostanze aromatiche nella bacca. *L'informatore Agrario* 14:6-10;2006.

Fedrizzi B., Magno F., Badocco D., Nicolini G., & Versini G. Aging effects and grape variety dependence on the content of sulfur volatiles in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10880–10887;2007.

Ferreira V., Lopez R., & Cacho J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659–1667;2000.

Ferreira V., Escudero, A., Fernandez, P., & Cacho, J. F.. Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung Und Forschung*, 205, 392–396;1997.

Frivik S. K., & Ebeler S. E. Influence of sulfur dioxide on the formation of aldehydes in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 31–38;2003.

Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1023–1028;1999.

Fukuda K., Yamamoto N., Kiyokawa Y., Yanagiuchi T., Wakai Y., Kitamoto K., Inoue Y., & Kimura A. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4076–4078;1998.

Gamasa Carlos Saenz, Begona Hernandez, Vicente de Santiago Juan, Alberd Coro, Santiago Alfonso, Jose' Manuel Dineiro. Measurement of the colour of white and rose' wines in visual tasting conditions. *Eur Food Res Technol* 229:263–276;2009.

García-Parrilla M. C., Heredia F. J., & Troncoso A. M. Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging. *Food Research International*, 32, 433–440;1999.

Genovese A., Gambuti A., Piombino P., Moio L. Sensory properties compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry* 103, 1228-1236;2007.

Gfintert M., Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen flfichtiger Inhaltsstoffe des Weinaromas: Beitrag zur Sortencharakterisierung der Rebsorte Weisser Riesling. Thesis, Universitht Karlsruhe, Karlsruhe 1984.

Gil J.V., Mateo J.J, Jimenez M., PastorA., Huerta T. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeast. *Journal of Food Science* 61, 1247-1266; 1996.

Ghisholm M., Guiher L., & Zaczkiwicz S. Aroma characteristic of aged Vidal blanc wine.

American Journal of Enology and Viticulture, 46(1), 56–62;1995.

Gonzales Cartagena L, Perez-Zu_iga FJ, Abad FB (1994) *Am J Enol Vitic* 45:43–48;1966.

Ibern-G_mez M, Andr_s-Lacueva C, Lamuela-Ravent_s RM, Buxaderas S, Singleton VL, de la Torre-Boronat MC;2000.

Gómez-Plaza E, Gil-Munõz R, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A and Fernández-Fernández JI, Maintenance of colour composition of a red wine during storage: influence of fermentative practices, maceration time and storage. *Lebensm Wiss Technol* 35: 46–53;2002.

Gomez M. J., Gonzalez, M. L., Hernanz, D., Fernandez, M. A., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. Effects of fermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*;2006.

González-Viñas M. A., Pérez-Coello M. S., Salvador M. D., Cabezudo M. D., & Martín-Alvarez P. J. Changes in the gas-chromatographic volatiles of young Airen wines during bottle storage. *Food Chemistry*, 56, 399–403;1996.

Gonzalez-San Jose, M., Santa Maria, G., & Diez, C. Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region and wine-making methods. *J. Food Comp. Anal.*, 3, 54–66;1990.

Gorham, J. *The Biochemistry of the Stilbenoids*. London: Chapman & Hall;1995.

Gunata Z., Bayonove C. L., Baumes R. L., Cordonnier R. E. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fraction of some grape aroma components cv.

muscat during first development and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 857-862;1985.

Gunata Y. Z., Bayonove C. L., Baumes R. L., & Cordonnier R. E. Aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some white grape varieties. *Journal Chromatography*, 331, 83–90;1985.

Gunata Z.Y., Bayonove C.L., Cordonnier R.E., Arnaud A., Galzy P. Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *Journal of Food Science and Agriculture* 50: 499-506;1990.

Guntert, M., Rapp, A., Takeoka, G. R., & Jennings, W. HRGC and HRGC-MS Applied to wine constituents of lower volatility. *Z. Lebens. Unter. Forsch.*, 182, 200–204;1986.

Guth H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3027–3032;1997.

Henschke P. A., & Jiranek V. Hydrogen sulfide formation during fermentation: Effect of nitrogen composition in model grape must. In J. Rantz (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, Seattle, USA (pp. 172–184). Davis, CA: *American Society for Enology and Viticulture*;1991.

Herrick, I. W., & Nagel, C. W. The caffeoyl tartrate content of white Riesling wines from California, Washington, and Alsace. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 95–97;1985.

Iland, P., N. Bruer, G. Edwards, S. Weeks, and E. Wilkes.: *Techniques and Concepts. Chemical Analysis of Grapes and Wine*. Patrick Iland Wine, Campbelltown;2004.

Jackson R.S. *Wine Science. Principles and Applications*. London, UK: Academic Press;2000.

Jeandet P., Bessis R., Gautheron B. The production of resveratrol (3,5,40-trihydroxystilbene) by grape berries in different development stages. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 41–46;1991.

Laurent M.H., Acree, T.E., Henick-Kling T., 1994. Changes in aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. *Weinwissenschaft* 49, 3-10;1994.

La Torre G., La Pera L., Rando R., Lo Turco V., Di Bella G., Saitta M., Dugo G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. *Food Chemistry*, 110,729-734;2008.

La Torre G. L., Saitta M., Vilasi F., Pellicanò T. M., & Dugo G. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food* Lee C. Y., & Jaworski, A.. Phenolic compounds in white grapes grown in New York. *Am.J. Enol. Vitic.*, 38, 277–281;1987.

Lee C. Y., & Jaworski, A. W. Identification of some phenolics in white grapes. *Am. J.Enol. Vitic.*, 41, 87–89;1990. *Chemistry*, 94, 640–650;2006.

Li H., Guo A., Wang H. Mechanisms of oxidative browning of wine, *Food Chemistry* 108: 1-13;2008.

Lopez R., Ferreira V.,Cacho J.F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. An assessment of their sensory role. In Aline Lonvaud-Funel (Ed.), *6th symposium International d'Oenologie* (pp. 15-48). Paris: Tec and Doc;1999.

Malcorps P., Cheval J. M., Jamil S., & Dufour J.-P. A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49, 47–53;1991.

Marais J., and Pool, H.J. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* 19 151-164;1980.

Marchal R., Marchal Delahaut L., Lallement A., Jeandet P.. Wheat gluten used as a clarifying agent of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 177-184;2002.

Marais J. The effect of pH on esters and quality of Colombard wine during maturation. *Vitis* 17 396-403;1978.

Marais J. Effect of storage time and temperature on the formation of dimethyl sulphide and on white wine quality. *Vitis* 18 254-260;1979.

Marais J., and Pool, H.J. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* 19 151-164;1980.

Marais J. The effect of pH on esters and quality of Colombard wine during maturation. *Vitis* 17 396-403;1978.

Marais J. Effect of storage time and temperature on the formation of dimethyl sulphide and on white wine quality. *Vitis* 18 254-260;1979.

Marais J., and Pool, H.J. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* 19 151-164;1980.

Margalit Y. Elementi di chimica del vino. Ed. Eno-one, Reggio Emilia;2005.

Margheri G., Tonon, D., Trepin, P.. I polifenoli dei vini bianchi come potenziali di

ossidazione. *Vigne vini*, 79 (9): 35-44;1980.

Margalit Y., Winery Technology and Operations, The Wine Appreciation Guild, San Francisco;1996.

Martineau B., Acree T. E., & Henick-Kling T. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Research International*, 28, 139–143;1995.

Martinez M.V., Whitaker J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195-200;1995.

Masa A., Vilanova, M., & Pomar, F. Varietal differences among the flavonoid profile of white grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1164, 291–297;2007.

Mason A. B., & Dufour, J. P. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16, 1287–1298;2000.

Masneuf I. Recherches sur l'identification genetiquesdes levures de vinifications. Applications oenologiques. These Doctorat, Universite Victor Segalen Bordeaux II;1996.

Mateo J.J., Jimenez M. Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal Of Chemistry*. 881, 558-561;2000.

Mathieu S., Terrier N., Procureur J., Bigey F. and Gunata Z. A Carotenoid CleavageDioxygenase from *Vitis vinifera*: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 420, pp. 2721–2731;2005.

Mattivi F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R.. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7692–7702;2006.

Mattivi F. Prast A., Nicolini G., Valenti L. Il potenziale polifenolico delle uve rosse e la sua applicazione in enologia. *L'enologo*, pg105-114; ottobre 2003.

Maury C., Sarni-Manchado P., Lefebvre S., Cheynier V., Moutounet M.. Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology Viticulture*. 54:2;2003.

Mayen M., Baron R.,Merida J.,e Medina M. Change in phenolic composition during accelerated browning in white wine from cv. Pedro Ximenes and cv. Baladi grapes. *Food Chemistry* , 56, 7-13;1993.

Mazza G., & Miniati, E.. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. USA: CRC Press;1993.

Mestres M., Busto O., & Guasch J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, 881, 569–581;2000.

Moio L. Colori, odori ed enologia dell'Aglianico. Sette anni di sperimentazione e ricerca enologica in Campania. A cura di L. Moio, Edito da Regione Campania, Assessorato Agricoltura (Se.S.I.R.C.A.); pp 109-184;2004.

Monagas M., Bartolomè B. and Gòmez-Cordovès C. *Food Chemistry*, 95, 405-412;2006.

Monagas M., Martin-Alvarez, P. J., Bartolome, B., & Gomez-Cordoves, C. Statistical interpretation of the color parameters of red wines in function of their phenolic composition during aging in bottle. *Eur. Food Res. Tech.*, 222, 702–709;2006..

Moreira N., Mendes F., Pereira O., Guedes de Pinho P., Hogg T., & Vasconcelos I. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta*, 458, 157–167;2002.

- Moreno A**, Castro M, Falqué E. Evolution of trans- and cisresveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenzao) during ripening. *Eur Food Res Technol* 227:667–674;2008.
- Nagy S.**, Randall V. Use of furfural content as an index of 66 storage temperature abuse in commercially processed orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21 272-275;1973.
- Nykanen L.** Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96;1986.
- Okamura S.**, & Watanabe, M. Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2063–2070;1991.
- Oliveira M.J**, Oliveira P., Baumes R.,Maia O. Changes in aromatic characteristics of Loureiro and Alvarinho. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 695-707;2008.
- Office International de la Vigne et du Vin (OIV)** - "Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins", AO 1-14;1969.
- Osbourne J.P.**, Mira de Orduna R., Pilone J.G., Liu S.Q., Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 91, 51-55; 2000.
- Panero L.**, Bosso A., Gazzola M., Scotti B., Lefbvre S.. Primi risultati di esperienze di chiarifica con proteine di origine vegetale condotte su vino Uva di Troia. *Vignevini*. 11: 117- 126;2001.
- Pena-Neira, A.**, I. Estrella, C. Garcia-Vallejo, T. Hernandez and A.J. Suarez. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *Food Res. Technol.*, 210: 445-448; 2000.

Pereira, G. E., Gaudillere, J.-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6765–6775;2006.

000.

Pérez-Magariño S., & González-San José M. L. Influence of commercial pectolytic preparations on the composition and storage evolution of Albillo white wine. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 789–796;2001.

Peynaud E. *Le gout du vin*. Dunod Paris 1980.

Piombino P., Pessin R., Genovese A., Le Quere J.-L. & Moio L. Gli odori di frutti di bosco dell'aroma del vino. Parte II: analisi strumentale. *L'Enologo*, 50, 97–101;2004.

Piretti, M. V., Ghedini, M., & Serrazanetti, G. Isolation and identification of the polyphenolic and terpenoid constituents of *Vitis vinifera*. v. Trebbiano variety. *Annali di Chimica*, 66,429–437;1976.

Plata C., Mauricio J.C., Millan C., & Ortega J. M. Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 115–121;2005.

Pozo-Bayón M A., Polo M. C., Martín-Álvarez P. J. and Pueyo E. Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chem* 86,3;2003.

Price S. F., Breen, P. J., Vallado, M., & Watson, B. T.. Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 187–194;1995.

Publication CIE N. 15.2. “Colorimetry”, Commission Internationale del’Éclairage, Wien; 1986.

Ramey D.D., Ough C. S. Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28- 928-934;1980.

Rapp A., Mandery H. Wine Aromas. *Experientia*, 42, 873-884;1986.

Rapp A., & Marais J. The shelf life of wine: changes in aroma substances during storage and aging of white wines. In G. Charalambous (Ed.), *The Shelf Life of Foods and Beverages. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects* (pp. 891–921). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher;1993.

Rapp A. Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, 42, 351–363;1998.

Rapp A., Versini G. Volatile phenolic compounds in wine. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92 (2) 42-48;1996.

Rapp A. and Mandery H. Wine aroma. Mandery Federal Research Station for Grapevine-Breeding, Geilweilerhof, D-6741 Siebeldingen (Federal Republic of Germany), and Institute for Food Chemistry, University of Karlsruhe, D-7500 Karlsruhe (Federal Republic of Germany), Birkh/iuser Verlag, CH 4010 Basel/Switzerland, *Experientia* 42;1986.

Rauhut, D. Yeasts – Production of sulfur compounds. In G. H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (pp. 183–223). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers;1993.

Rauhut D., Kurbel H., MacNamara K., & Grossmann M. Headspace GC-SCD monitoring of low volatile sulfur compounds during fermentation and in wine. *Analisis*, 26, 142–145;1998.

Razungles A., Gunata Y., Pinatel S., Baumes R., Bayonove, C. Etude quantitative de composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisin. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 13, 59–72;1993.

Recamales A. F., Sayago A., González-Miret M. L., & Hernanz D. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*, 39, 220–229;2006.

Ribereau Gayon P., Dubourdieu d., Doneche B. Lonvau A. *Trattato di enologia II*;2007.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Handbook of enology*, The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2), Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd;2006.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. *Trattato di enologia II*. Ed. Edagricole, 1998.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., & Lonvaud A. *Handbook of Enology*, Volume 1. *The microbiology of wines and vinification*. (p. 497) Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd;2000a.

Ribereau-Gayon P. 'Wine-Flavor' in flavor of foods and beverages. Eds G. Charalambous and G. E. Inglett. Academic Press, New York/San Francisco/London 1978.

Ribereau-Gayon P., Lafon-Lafourcade S., Bertrand A., Le debourbage des mounts de vendange blanche. *Conn. Vigne Vin* 9, 117-139;1975.

Ribeiro de Lima M.T., Waffo-Teguo P., Teissedre P.L., Pujolas A., Vercauteren J., Cabanis J.C., Merillon J.M. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2666–2670; 1999.

Ricardo-da-Silva JM, Cheynier V, Souquet JM *and* Moutounet M, Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J Sci Food Agric* 57: 111–125; 1991.

Ricardo da Silva J. M., Bourzeix, M., Cheynier, V., & Moutounet, M.. Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. *Vitis*, 30, 245–252; 1991a.

Ricardo da Silva J. M., Cheynier, V., Samson, A., & Bourzeix, M. Effect of pomace contact, carbonic maceration and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 168–172; 1993.

Rieth W., Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen flüchtiger Inhaltsstoffe des Traubenmost- und Weinaromas: Einfluss onologischer Verfahren und Behandlungsmittel auf die Aromazusammensetzung. Dissertation, Universität Karlsruhe, Karlsruhe; 1984.

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry* 66: 401-436; 1999.

Rocha S., Coutinho P., Barros A., Coimbra M.A., Delbadillo I., Cardoso A. *Journal of Food Chemistry and Agriculture*, 48, 4802-4807; 2000.

- Rodriguez Montealegre, R.**, Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J. L., Martinez Gascuena, J., & Garcia Romero, E.. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in warm climates. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 687–693;2006.
- Roggero J.P.**, Coen, S., & Larice, J.L. Etude comparative de la composition anthocyanique des cepages. Essai de classification. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 13,380–388;1986a.
- Roggero J.P.**, Coen, S., & Ragonet, B. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in reponing grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 77–83;1986b.
- Romano P.**, Suzzi G., Turbanti L., & Polsinelli M. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 213–218;1994.
- Roussis I.G.** Soulti K. and Tzimas P. Inhibition of Decrease of Linalool in Muscat Wine by phenolic acids, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (4) 389–392;2005.
- Roussis I.G.**, Lambropoulos I., Papadopoulou D. Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine. *Food Chemistry*, 93,485;2005.
- Shinohara T.** L'importance des substances volatiles du vin. Formation et effets sur la qualite. *Bullettin del'OIV* 641-642,606-618;1984.
- Schreier P.** Flavour composition of wines. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12, 59–111;1979.
- Selli S.**, Canbas A., Cabaroglu T., Erten H., Gunata Z. Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment. *Food Chemistry*, 94: 319–326;2006.

- Skouroumounis G.K.**, Massy Westropp R.A., Sefton M.A., Williams P.J. Precursors of damascenone in fruit juices. *Tetrahedron Lett.*, 33: 3533-3536;1992.
- Singleton, V. L.**, Zaya, J., & Trousdale, E. K. Caftaric and coumaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochemistry*, 25, 2127–2133;1986.
- Singleton V.L.** Factor affecting oxidative browning of white wine. *Vitis* 21, 233-239;1982.
- Singleton V. L.**, Trousdale E. : White Wine Phenolics: Varietal and Processing Differences as Shown by HPLC. *American Journal of enology and Viticulture*, 34 (1): 27;1983.
- Singleton U.L.**, Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology* 16, 144;1965.
- Smyth H.E** , Cozzolino D , Herderich MJ , Sefton MA & Francis IL. Relating volatile composition to wine aroma : identification of key aroma compounds in Australian white wines. Proceedings of the 12th Australian Wine Industry Technical Conference (Blair RJ , Williams PJ & Pretorius IS , eds), pp. 31–33 . *Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Melbourne, VIC, Adelaide;2005.*
- Somers T.C** and Pocock K.E. Evolution of red wine. III Promotion of the maturation phase. *Vitis* 29, 109-121;1990.
- Somers T. C.**, & Evans, M. E. Evolution of red wine: I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis*, 25, 31–39;1986.
- Strauss C.R.**, Wilson B., Williams P.J., *Phytochemistry* 26(1987) 1995–1997.
- Salagoity-Auguste M.H**, Tricard Ch, Sudraud P. *Journal of Chromatography* 392:379-387;1987.
- Shinohara T.**, and Watanabe, M. Effects of fermentation conditions and temperature on

- volatile ester contents in wine. *Agricultural Biology Chemistry* 45 2645-2651;1981.
- Silva Ferreira A. C.**, Guedes de Pinho P., Rodrigues P., Hogg T. Kinetics of oxidative degradation of white wine and how they are affected by selected technological parameters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 50: 5919-5924;2002.
- Simpson R.F.** Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and aging. *Vitis* 17 274-287;1978.
- Simpson R. F.** Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis* 18 148-154;1979.
- Simpson R.F.**, and Miller, G.C. Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis* 22 51-63;1983.
- Simpson R. F.** Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, 21(3), 233–239;1982.
- Simpson R.F.**, Strauss C.R., Williams, P.J. Vitispirane: a C13 spiro-ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape-spirits. 663-664;1977.
- Simpson R.F.** 1,1,6-Trimethyl- 1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine, *Chemical Industry* 37;1978.
- Singleton V. L.**, Salgues M., Zaya J., Trousdale E. Tartaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine, *American Journal of Enology and Viticulture* 36: 50-56;1985.
- Singleton V.L, Trousdale E.** White wine phenol: varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 27-34;1983.
- Simpson R. F.** Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*,21(3), 233–239;1982.

Simpson R.F. 1,1,6-Trimethyl- 1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine, *Chemical Industry* 37;1978.

Singleton, V. L., Zaya J., Trousdale E., Salgues M.. Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis*. 23: 113-120; 1984.

Sioumis N., Kallitharaka S., Tsoutsouras E., Makris D. P., Kefalas P. Browning development in white wines: Dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics, *European Food Research and Technology* 220: 326-330;2005.

Somers, T. C., & Pocock, K. F. Phenolic assessment of white musts: varietal differences in free-run juices and pressings. *Vitis*, 30, 189–201; 1991.

Somers, T., Verette, E., & Pocock, K. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 40, 67–78.;1987

Spagna G., Barbagallo R. N., Pifferi P. G. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4619-4627; 2000.

Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A. and Pretorius I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 139-173; 2005.

Swiegers J. H., & Pretorius I. S. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 74, 954–960;2007.

Talcott, S., & Lee, J. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of Muscadine wine and juice. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3186–3192;2002.

Tesniere C., Torregrosa, L., Pradal, M., Souquet, J.-M., Gilles, C., Dos Santos, K., Chatelet, P., & Günata, Z.. Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.*, 57, 91–99; 2006.

Tominaga T., Furrer A., Henry R. and Dubourdieu D. *Flavour and Fragrance Journal* 13(3), 159–162; 1998a.

Torsell K.B.G. A Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach. Apotekarsocieteten–Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, Sweden. UK, ISBN. *Natural Product Chemistry*. 91-8627-4635; 1997.

Trousdale E., & Singleton, V. L. Astilbin and engeletin in grapes and wines. *Phytochemistry*, 22, 619–620; 1983.

Ugliano M., Moio L. L'influenza della fermentazione malolattica e *oeni* ceppo *oeni* su precursori di aroma glicosidici e relativi composti volatili del vino rosso. *Journal of Food Chemistry and Agriculture* 26;14, pg 2468-2476; 2006.

Ugliano M., Moio L. Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10134-10139; 2005.

Ugliano M., Genovese A., & Moio L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Food Chemistry and Agriculture*, 51(17), 5073–5078;2003.

Van der Merwe C. A., & van Wyk, C. J. The contribution of some fermentation products to the odor of dry white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 41–46;1981.

Vendrame S., tesi “Le sostanze fenoliche negli alimenti e il loro ruolo funzionale nell’organismo” 2005.

Versini G., Dalla Serra A. L’influenza della produzione di uva per ha sulla variazione compositiva in prodotti volatili e fissi del vino: studio analitico sui vini Müller Thurgau e Riesling Renano prodotti presso l’Istituto di Viticoltura ed Enologia di Geisenheim. *L’Enotecnico*, XXI, 127-133;1985.

Versini G. Utilizzazione degli aromi nel riconoscimento varietale. *Corso internazionale di ampelografia S. Michele all’Adige (TN)*, 19 luglio 1991.

Villa I., Sablayrolles J.M., Baumes R., Bayonone C., Barre P. Study of the influence of yeast strain on fermentation aroma by sensory and chemical analyses. *Wein Wissenschaft* 53, 3 124130;1998.

Kallithraka S., Salacha MI and Tzourou AI, Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem* 113: 500–505;2009.

Yokotstuka, K. Effect of press design and pressing pressures on grape juice components. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 15–21;1990.

Waterhouse Andrew L. Wine Phenolics Article first published online: 24 Jan. 2006
DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903. *Annals of the New York Academy of Sciences*,
pg 21–36, May 2002.

Williams P.J., Strauss C.R., & Wilson B. Hydroxylated linalool derivatives as precursors
of volatile monoterpenes of Muscat grapes. *Journal of Food Chemistry and Agriculture* 28,
766–771;1980.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. and Massy-Westropp R.A. *Phytochemistry*,
21(8),20133;1982.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. Hydroxylized linalool derivatives as precursors of
volatile monoterpenes of Muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28
766-77;1980.

Windenrad H.L., Singleton V.L. The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation
of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Agin. *J. Enol. Vitic.* 25:2:119-
126;1974.

Winterhalter P., Rouseff R., Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction in:
Proceedings of the 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, 2000.

Winterhalter P. In *Flavour precursors-thermal and enzymatic conversion*. Ed. Teranishi
R., Takeoka G., Günter M., ACS series 490;1993.

Wirth J. Etude de la filiation entre les norisoprénoides et les caroténoides chez la vigne,
Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, Montpellier, 2001.

Wurz R. E. M., Kepner R. E., & Webb A. D. The biosynthesis of certain gamma-lactones from glutamic acid by film yeast activity on the surface of Flor Sherry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 234–238;1988.

Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Cayuelas J. M., Martínez-Cachá A., Pardo F., & Nicolás J. M. L. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4694–4700;2003.

Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Cayuelas, J. M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., & Nicolás, J. M. L. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4694–4700;2003.

Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.C.; Gump, B.H.; Nury F.S. (1995) Wine analysis and production. Chapman & Hall, New York: 146–151.

Zironi R. La raccolta delle uve e l'ammestamento. *Vitivinicoltura*, 32, 1124;1991.

RINGRAZIAMENTI

Giunta alla fine di questo lavoro penso sia più che giusto spendere due parole anche verso coloro che mi hanno aiutato e sostenuto in questo percorso.

Desidero ringraziare il prof. Piga A. e la dott.ssa Del Caro, relatori di questa tesi, per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi, e per tutto l'aiuto fornito durante la stesura e nel corso dei tre anni di dottorato.

Desidero inoltre ringraziare tutto il personale del Dipartimento DISAABA.

Un ringraziamento va al gruppo di ricerca del Prof. Luigi Moio per la disponibilità mostrata nel corso delle analisi.

Un particolare ringraziamento va al mio fidanzato, Fabio, che mi è stato vicino in quest'ultima parte di dottorato, conferendomi sempre ed in ogni momento difficile e di sconforto fiducia e sostegno morale.

Un sentito ringraziamento ai miei genitori, che, con il loro incrollabile sostegno morale mi hanno sostenuto anche in questo traguardo.

Un ultimo ringraziamento va alle mie amiche e alle nuove coinquiline, per essermi state vicine sia nei momenti difficili, sia nei momenti felici

