



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

TESI DI DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE – XXVIII° CICLO

**STUDIO DEI METABOLITI DEL VINO DA VITIGNI
COLTIVATI IN PIEMONTE ATTRAVERSO L'USO
DELLA SPETTROSCOPIA NMR**

Candidato: dr. Christos Tsolakis

Tutor: prof. Domenico Osella

**Co-Tutors: dr. Claudio Cassino
dr.ssa Valentina Gianotti**

Coordinatore: Prof. Domenico Osella

RINGRAZIAMENTI

Il mio primo ringraziamento va al prof. Domenico Osella, in qualità di relatore della mia tesi, per avermi proposto questo progetto di ricerca, concedendomi la possibilità di fare una nuova esperienza, che ha avuto risvolti molto interessanti sia dal punto di vista tecnico scientifico che enologico.

Continuo con il dottor Claudio Cassino al quale va la mia gratitudine e riconoscenza per tutto quello che mi ha trasmesso sia dal punto di vista tecnico scientifico che umano. Il suo supporto, accompagnato da una grande pazienza e profonda conoscenza, è stato prezioso per lo sviluppo del presente lavoro.

Alla dot.ssa Valentina Gianotti va un ringraziamento per la sua accoglienza e gentilezza dimostratami e per il suo aiuto relativo all'interpretazione dei dati.

Ancora un ringraziamento al dottor Aldo Ciambotti e alla dot.ssa Valentina Dell'Oro del Centro di Ricerca per l'Enologia (CRA-ENO) di Asti i quali mi hanno dato la possibilità di collaborare nel laboratorio di revisione analisi.

La dot.ssa Federica Bonello del Centro di Ricerca per l'Enologia (CRA-ENO) di Asti per i suoi preziosi consigli relativi alla stesura della tesi sempre pronta a dare il suo contributo.

Si ringrazia la Tenuta Cannona, Centro Sperimentale Vitivinicolo della Regione Piemonte, per aver fornito gran parte dei campioni di vino utilizzati per questo lavoro.

Un ringraziamento particolare va al Centro di Ricerca per l'Enologia (CRA-ENO) di Asti per il supporto nelle misure di routine sui vini.

Si ringraziano inoltre la fondazione Cassa di Risparmio di Alessandria, la fondazione Cassa di Risparmio di Torino e la Regione Piemonte per il supporto economico.

Un pensiero particolare va a tutte quelle persone che mi hanno appoggiato e in particolar modo ai miei genitori i quali, anche se lontani, hanno sempre condiviso le mie scelte.

Dedico questo lavoro alle persone a me più care, mia moglie, e mia figlia Sofia.

INDICE	3
PREFAZIONE	7
SCOPO DEL LAVORO	9
INTRODUZIONE	10
CAPITOLO 1 IL VINO E LA SUA COMPOSIZIONE	12
<i>1.1 Gli acidi organici nei vini</i>	13
1.1.1 Gli acidi organici dell'uva	14
1.1.2 Gli acidi organici di fermentazione	14
<i>1.2 Gli alcoli e le altre sostanze volatili</i>	15
1.2.1 L'alcol etilico	16
1.2.2 L'alcol metilico	17
1.2.3 Gli alcoli superiori di origine fermentativa	17
1.2.4 Gli altri alcoli	18
1.2.5 I polioli	18
1.2.6 Gli acidi grassi della serie alifatica	20
1.2.7 Gli esteri	20
1.2.8 I composti carbonilici (aldeidi e chetoni)	22
1.2.9 Gli acetali	22
1.2.10 I lattoni	23
<i>1.3 I glucidi</i>	23
1.3.1 Il glucosio e il fruttosio	24
1.3.2 Gli osi semplici	25
1.3.3 I dioliosidi o disaccaridi	25
1.3.4 Gli eterosidi	26
1.3.5 I prodotti di ossidazione	26
1.3.6 Le sostanze pectiche provenienti dall'uva	26
1.3.7 I polisaccaridi esocellulari dei lieviti	27
<i>1.4 Le sostanze azotate</i>	27
1.4.1 L'azoto totale	27
1.4.2 L'azoto minerale	27
1.4.3 Le diverse forme di azoto organico	28
1.4.4 Gli amminoacidi	28
1.4.5 Gli oligopeptidi	30
1.4.6 L'urea	30
1.4.7 Il carbammato di etile	30
1.4.8 Le ammine biogene	31
1.4.9 Le proteine	31
<i>1.5 I composti fenolici</i>	32
1.5.1 Gli acidi fenolici e i loro derivati	33

1.5.2 I flavoni	34
1.5.3 Gli antociani	34
1.5.4 I tannini	36
1.6 L'estratto secco e le sostanze minerali	38
1.6.1 Le ceneri	38
1.6.2 Gli anioni minerali	39
1.6.3 I cationi minerali	39
CAPITOLO 2	41
2.1 Il vino in Piemonte	42
2.2 Il vitigno Barbera	43
2.2.1 Descrizione Ampelografica	43
2.2.2 Fenologia	45
2.2.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	46
2.3 Il vitigno Dolcetto	46
2.3.1 Descrizione Ampelografica	46
2.3.2 Fenologia	48
2.3.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	49
2.4 Il vitigno Cortese	49
2.4.1 Descrizione Ampelografica	49
2.4.2 Fenologia	51
2.4.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	52
2.5 Vitigno Chardonnay	52
2.5.1 Descrizione Ampelografica	52
2.5.2 Fenologia	54
2.5.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	54
2.6 Vitigno Grignolino	55
2.6.1 Descrizione Ampelografica	55
2.6.2 Fenologia	56
2.6.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	56
2.7 Vitigno Nebbiolo	57
2.7.1 Descrizione Ampelografica	57
2.7.2 Fenologia	59
2.7.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	59
2.8 Vitigno Ruché	60
2.8.1 Descrizione Ampelografica	60
2.8.2 Fenologia	61
2.8.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali	61
CAPITOLO 3	62
3.1 Determinazione del pH	63
3.2 Determinazione del grado alcolico	63
3.3 Determinazione dell'estratto secco	63
3.4 Determinazione dell'acidità totale	64
3.5 Determinazione spettrofotometriche	64

3.5.1 Determinazione dell'indice di antociani totali e dell'indice di flavonoidi totali	64
3.5.2 Determinazione del colore	65
3.6 Determinazione del profilo metabolico tramite Spettroscopia ^1H NMR	66
3.7 Determinazione dei rapporti isotopici tramite Spettroscopia ^2H NMR e Spettrometria di massa IRMS	68
3.7.1 Determinazione dei Parametri $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ e $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$	69
3.7.2 Determinazione del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	70
3.7.3 Determinazione del rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	71
3.8 Analisi statistica dei dati	71
3.8.1 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	71
3.8.2 Analisi statistica dei dati spettroscopici	72
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONE	
Effetto vitigno ed annata di produzione	73
4.1 Creazione della Banca dati dei Metaboliti	74
4.2 Selezione dei campioni	79
4.3 Analisi dei vini della zona di produzione di Carpeneto (AL)	81
4.3.1 Analisi chimiche	81
4.3.2 Analisi isotopiche	83
4.3.3 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	83
4.3.4 Analisi ^1H NMR per la discriminazione del vitigno	86
<i>Vini rossi</i>	87
<i>Vini bianchi</i>	91
<i>Analisi dei risultati ottenuti</i>	95
4.3.5 Analisi ^1H NMR per la discriminazione dell'annata di produzione	96
<i>Vino Barbera</i>	96
<i>Vino Dolcetto</i>	102
<i>Analisi dei risultati ottenuti sui vini rossi</i>	107
<i>Vino Cortese</i>	108
<i>Vino Chardonnay</i>	115
<i>Analisi dei risultati ottenuti sui vini bianchi</i>	121
4.3.6 Analisi ^1H NMR per la valutazione degli effetti dovuti all'invecchiamento	121
<i>Vino Barbera</i>	121
<i>Vino Dolcetto</i>	126
<i>Analisi dei risultati ottenuti sui vini rossi</i>	132
<i>Vino Cortese</i>	133
<i>Vino Chardonnay</i>	139
<i>Analisi dei risultati ottenuti sui vini bianchi</i>	143
4.4 Analisi dei vini della zona di produzione di Portacomaro (AT)	143
4.4.1 Analisi chimiche ed isotopiche	143
4.4.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	144
4.4.3 Analisi ^1H NMR per la valutazione degli effetti del vitigno e dell'annata di produzione	145

<i>4.4.4 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti dell'invecchiamento</i>	150
<i>Vino Ruchè</i>	150
<i>Vino Grignolino</i>	153
4.5 Analisi dei vini della zona di produzione di Cisterna d'Asti (AT)	156
4.5.1 Analisi chimiche ed isotopiche	156
4.5.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	157
4.5.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti del vitigno e dell'annata di produzione	158
4.5.4 Analisi ¹ HNMR per la valutazione degli effetti dovuti all'invecchiamento	162
<i>Vino Nebbiolo</i>	162
<i>Vino Barbera</i>	166
CAPITOLO 5 - RISULTATI E DISCUSSIONE	
Effetto zona di produzione	170
5.1 Confronto zone di produzione (Est Piemonte – Ovest Piemonte) su vino Dolcetto	171
5.1.1 Analisi chimiche ed isotopiche	171
5.1.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	171
5.1.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione	172
5.2 Confronto zone di produzione (Nord Piemonte –Sud Piemonte) su vino Barbera	175
5.2.1 Analisi chimiche ed isotopiche	175
5.2.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	176
5.2.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione	177
5.3 Confronto zone di produzione (Est Piemonte –Ovest Piemonte) su vino Barbera	181
5.3.1 Analisi chimiche ed isotopiche	181
5.3.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	182
5.3.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione	183
5.4 Confronto tra microzone di produzione con vino Barbera	187
5.4.1 Analisi chimiche ed isotopiche	188
5.4.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	188
5.4.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione	189
5.5 Ampliamento del confronto tra microzone di produzione con vino Barbera	194
5.5.1 Analisi chimiche ed isotopiche	194
5.5.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici	195
5.5.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione	196
5.6 Analisi dei risultati ottenuti	201
CONCLUSIONI	203
BIBLIOGRAFIA	206
APPENDICE	216

PREFAZIONE

La metabolomica è lo studio del contenuto in metaboliti di una cellula o di un campione: è generalmente definita come il metabolismo istantaneo del sistema vivente, mirato per il miglior apprendimento del metabolismo primario e secondario dei sistemi biologici ed è applicata per diverse ricerche ed in vari settori. In campo alimentare, inoltre, la caratterizzazione degli alimenti, della loro autenticità e tracciabilità ha lo scopo di proteggere i consumatori e i produttori da frodi commerciali o di altro genere. Scopo di questo progetto di dottorato di ricerca è la caratterizzazione, attraverso lo studio dei metaboliti, di vini Piemontesi.

Per quanto riguarda il settore enologico, differenti fattori come il vitigno, le pratiche e le tecniche colturali, il sistema di allevamento, l'ambiente (clima) in cui si trova il vigneto, l'epoca di vendemmia, la tecnologia di vinificazione adottata, il ceppo di lievito impiegato per la fermentazione alcolica, il tempo (e condizioni) di conservazione attuate in cantina, hanno una influenza sulla qualità del prodotto finito. Negli ultimi anni, i consumatori hanno mostrato un forte interesse verso alimenti che sono identificati dal loro luogo di origine, e questo ha dato vita a molti studi sulla loro tracciabilità ed autenticità. Anche per il vino la tracciabilità e l'autenticità sono molto importanti infatti, a causa della sua complessa composizione chimica, molteplici sono i fattori (come sopra indicati) che hanno un'influenza sulla sua qualità. Diventano quindi molto importanti la caratterizzazione e la differenziazione delle diverse componenti del vino.

Nel vino si è interessati a diversi gruppi di metaboliti sia di natura primaria (acidi organici, carboidrati e proteine) che di natura secondaria (composti polifenolici e aromatici). Lo studio di quello che avviene durante la conservazione dei campioni (nelle condizioni standard di conservazione) è oggetto della presente ricerca atta a rilevare la variazione ed evoluzione nel tempo dei diversi metaboliti nel vino.

Un altro aspetto che è possibile studiare con l'analisi del contenuto in metaboliti, è la distinzione dei vini provenienti da diversi vitigni e con diversa origine geografica.

Questa metodica può rappresentare un approccio diverso nello studio del vino od altri alimenti.

SCOPO DEL LAVORO

Nel vino sono stati studiati diversi gruppi di metaboliti di natura primaria e di natura secondaria. Tali metaboliti, fino ad ora, sono stati determinati singolarmente, richiedendo un notevole sforzo sia in termini di tempo che di reattivi.

Scopo di questo progetto di dottorato di ricerca, quindi, è la messa a punto di una metodica analitica che permetta la determinazione contemporanea di un gran numero di metaboliti e consenta, quindi, allo stesso tempo, la caratterizzazione dei vini.

Attraverso questa nuova metodica ci si accinge ad un approccio diverso di studio del vino od altri alimenti.

Per questo motivo, la tesi si propone i seguenti scopi:

- ✓ Variazione dei metaboliti (primari e secondari) e loro evoluzione nel tempo.
- ✓ Individuazione delle differenze tra i vitigni.
- ✓ Possibilità di utilizzo della metodica al fine di individuare l'origine geografica.
- ✓ Studio dei metaboliti responsabili della capacità antiossidante del vino.
- ✓ Preparazione di una banca dati di standard di riferimento.
- ✓ Utilizzo della metodica $^1\text{H-NMR}$ anche come uno strumento analitico.
- ✓ Utilizzo del metodo $^1\text{H-NMR}$ come integrazione e complementarietà ai metodi (ormai associati) isotopici NMR (D/H) ed IRMS in modo da disporre di un migliore quadro analitico e quindi maggiore sicurezza sul contenuto in metaboliti, provenienza e tracciabilità dei prodotti enologici. Possibilità di valutare la riproducibilità delle analisi estendendole, in futuro, ad un sistema di analisi interlaboratorio a livello europeo.

INTRODUZIONE

Per quanto riguarda il settore vitivinicolo mondiale, come si evince dalla figura (Fig.1), nell'ultimo decennio le superfici vitate hanno subito una contrazione mentre la produzione enologica ha conosciuto un incremento. La spiegazione di ciò può essere ricercata in diversi fattori, quali la sempre maggiore specializzazione dei vigneti a livello mondiale coadiuvata anche da un incrementato e continuo contributo importante della tecnica agronomica e da un buon compromesso tra la massima resa e una buona qualità del prodotto finale trasformato.

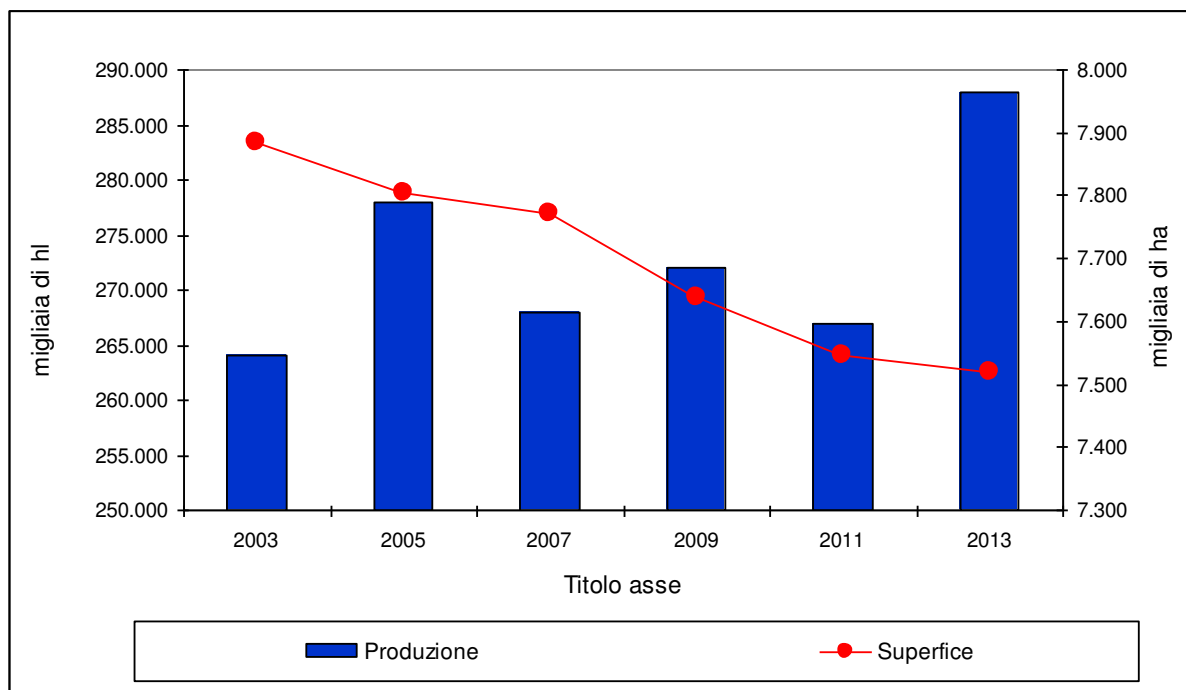


Figura. 1. Andamento della produzione enologica e della superficie vitata dal 2003 al 2013.

La superficie vitata nel mondo è di circa 8.000.000 ha, mentre la produzione di uva è intorno a 67.000.000 t. Più del 50% di questa superficie è concentrata in Europa. La Spagna e la Francia sono ai primi due posti a livello mondiale come superficie vitata; l'Italia, nonostante sia al terzo posto (intorno 650.000 ha), risulta essere, nel ultimo anno, il primo produttore di vino (circa 48.000.000 hL).

La superficie vitata Italiana è costituita per più del 90% da vitigni da vino. La superficie rimanente (10%) è occupata da vitigni da tavola, i quali sono coltivati prevalentemente al Sud (Puglia, Sicilia). Le bevande spiritose, come la grappa, il brandy, l'acquavite, hanno un certo rilievo nel mercato interessando determinati territori.

Il vino è il prodotto che interessa principalmente la viticoltura Italiana. Infatti il vino a denominazione di origine è intorno al 34% mentre quello a indicazione geografica è intorno al 36% con 405 DOP (DOC/DOCG), e 118 IGP, la parte rimanente è vino da tavola. Poco più di un terzo di questa produzione viene esportata prevalentemente nei mercati europei, statunitense, e in paesi emergenti del resto del mondo. Il settore vinicolo interessa il 45% dell'export agroalimentare con un fatturato di 3.5 miliardi di euro su un fatturato complessivo di circa 15 miliardi di euro incidendo per l'1% del PIL. Il settore vitivinicolo riveste un'importanza sia in termini economici ma anche in termini ambientali, culturali, e sociali grazie a favorevoli condizioni pedoclimatiche che permettono a tanti vitigni autoctoni di ottenere prodotti di elevata qualità riconosciuti anche a livello mondiale.

CAPITOLO 1

IL VINO E LA SUA COMPOSIZIONE

Secondo il DPR del 12 febbraio 1965, N° 162: “Il nome di **vino** è riservato al prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica totale o parziale dell'uva fresca, dell'uva ammostata o del mosto d'uva, con gradazione alcolica non inferiore ai 3/5 della gradazione complessiva”.

Il regolamento CEE n. 822/87 del 16 marzo 1987, art. 1, definisce **vino** “il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione totale o parziale di uve fresche pigiate o non, o di mosti di uve”; definizione ripresa nell'Allegato IV del Regolamento UE N° 1493/1999 del 17 maggio 1999 che sostituisce il precedente e inserita per ben altre due volte in altri regolamenti UE fino all'ultimo n° 479/2008 (Allegato IV).

Nel regolamento UE n. 479/2008 del 29 aprile 2008 relativo all'organizzazione comune del mercato vitivinicolo, che modifica i regolamenti UE n. 1493/1999, UE n. 1782/2003, UE n. 1290/2005 e UE n. 3/2008 e abroga i regolamenti UE n. 2392/86 e UE n. 1493/1999 (Allegato IV) si legge la seguente definizione: “Il **vino** è il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione alcolica totale o parziale di uve fresche, pigiate o no, o di mosti di uve”.

L'acqua è il principale costituente del vino l'80÷90% del totale. Anche l'alcol è uno dei principali componenti (5-16%). La restante parte è costituita da diversi composti di seguito esposti.

1.1 Gli acidi organici nei vini.

Gli acidi organici contribuiscono in modo determinante alla composizione, alla stabilità microbiologica e chimico fisica ed alle qualità sensoriali dei vini. La maggior parte degli acidi organici dei mosti e dei vini possiede uno o più centri chirali. La configurazione assoluta dei carboni asimmetrici si deduce da quella degli zuccheri da cui derivano direttamente. I principali acidi organici dell'uva sono descritti (Figura 1.1) secondo la rappresentazione convenzionale di Fischer.

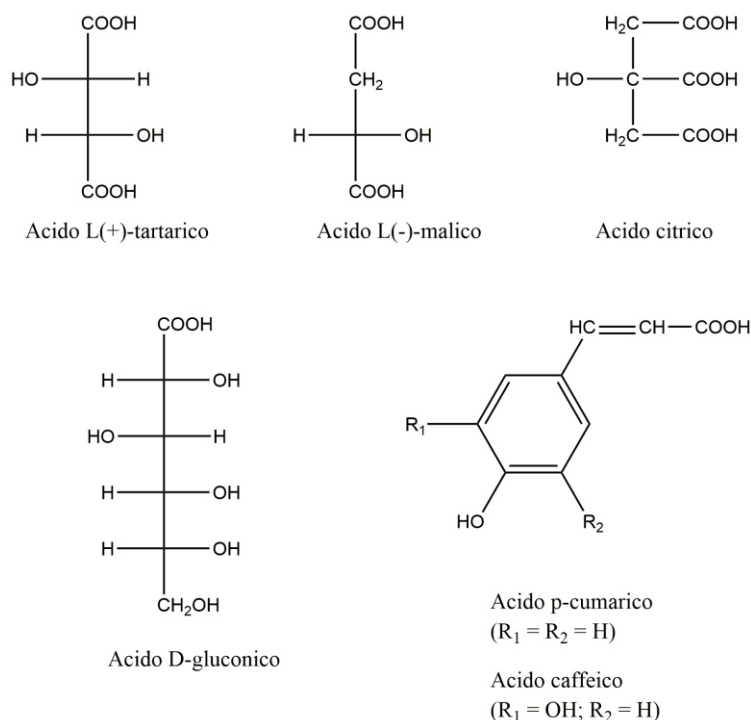


Figura 1.1 Gli acidi organici dell'uva.

1.1.1 Gli acidi organici dell'uva.

Dal punto di vista quantitativo, l'acido tartarico è uno degli acidi più importanti dei mosti e dei vini. Infatti, alla fine della fase erbacea, la sua concentrazione nel succo d'uva può raggiungere 15 g/l. Nei mosti da uve prodotte al nord la sua concentrazione supera spesso 6 g/l, mentre nei mosti del sud non supera 2-3 g/l.

L'acido tartarico è poco diffuso in natura al di fuori dell'uva. Acido relativamente forte, conferisce al vino un pH generalmente compreso tra 3,0 e 3,5. L'acido L(-) malico si riscontra in tutti gli organismi viventi. Esso è abbondante soprattutto nelle mele verdi, ma si trova anche nel ribes, nel rabarbaro oltre che nell'uva, il cui succo ottenuto dagli acini acerbi può contenerne fino a 25 g/l prima dell'invasatura. Nel periodo che segue la comparsa della prima colorazione, la concentrazione dell'acido malico diminuisce fino a ridursi alla metà, sotto l'effetto del fenomeno di diluizione per ingrossamento dell'acino, ma anche in quanto viene metabolizzato dalle stesse cellule che lo contengono. Alla maturazione, i mosti delle regioni del nord contengono ancora da 4 a 6,5 g/l di acido malico mentre in quelli delle regioni del sud ne rimangono circa 1-2 g/l.

L'acido citrico è un acido tricarbossilico molto diffuso in natura il cui ruolo importante, sotto l'aspetto biochimico e metabolico (ciclo di Krebs), è universalmente noto. Il suo tenore nei mosti e nei vini prima della fermentazione malo lattica è compreso tra 0.5 e 1 g/l.

A questi tre acidi principali dell'uva, si possono aggiungere gli acidi fenolici della serie cinnamica (caffeico, p-cumarico e ferulico) esterificati con una funzione alcolica dell'acido tartarico.

1.1.2 Gli acidi organici di fermentazione

I principali acidi di origine fermentativa sono riportati nella Figura 1.2. Il primo da considerare, a motivo della sua funzione chiave nel metabolismo cellulare, è l'acido piruvico, anche se il suo tenore nel vino è limitato. La sua riduzione indotta dal coenzima NADH della L- e D-lattato deidrogenasi, conduce ai due enantiomeri L e D dell'acido lattico. Il primo è soprattutto di origine batterica; il secondo deriva principalmente dal metabolismo degli lieviti. Sotto forma enolica attivata dal fosfoenolpiruvato, l'acido piruvico può reagire con il biossido di carbonio, via addizione nucleofila, producendo acido ossalacetico, precursore dell'acido aspartico per transaminazione. L'acido piruvico, per decarbossilazione enzimatica, assistita dalla tiamina pirofosfato (TPP) o vitamina B1, si trasforma in etanale che da origine, per riduzione, durante la fermentazione alcolica, ad etanolo. La sua ossidazione enzimatica e microbica da origine all'acido acetico.

Un altro acido che i lieviti sintetizzano durante la fermentazione alcolica è l'acido succinico, il cui tenore nei vini si aggira intorno a 1 g/l. Esso è prodotto da tutti gli organismi viventi e interviene nel metabolismo dei lipidi e nel ciclo di Krebs, al livello dell'acido fumarico. Sul piano sensoriale l'acido succinico dà un gusto intenso amaro e salato stimolante la secrezione salivare e conferisce ai vini sapidità e vinosità.

Anche l'acido citramalico o α -metilmalico è di origine fermentativa.

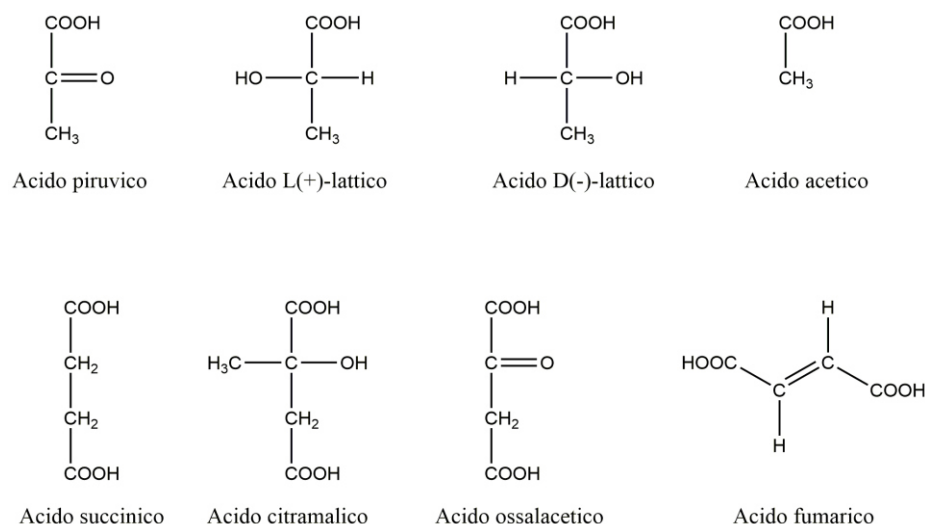


Figura 1.2 Gli acidi organici di fermentazione.

In conclusione, si può sottolineare, dopo questa descrizione dei principali acidi organici del mosto e del vino, che, indipendentemente dalla loro origine, la maggior parte di essi è costituita da molecole polifunzionali. Molti sono idrossiacidi, ai quali i gruppi carbossilico e ossidrilico conferiscono un carattere polare e idrofilo che determina la loro elevata solubilità in acqua ed in soluzioni idroalcoliche come il vino. Il carattere polifunzionale di questi composti determina inoltre una reattività chimica che spiega la loro evoluzione durante la conservazione e l'invecchiamento del vino.

1.2 Gli alcoli e le altre sostanze volatili.

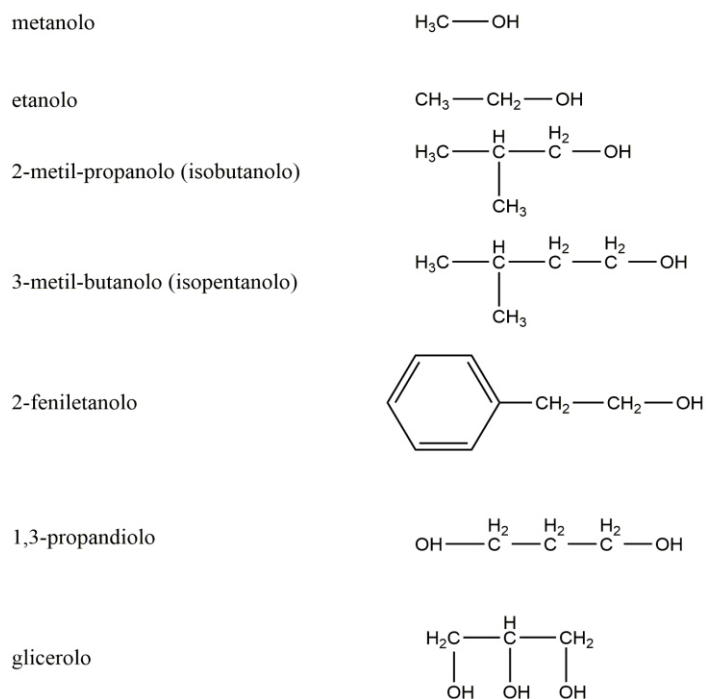


Figura 1.3 I principali alcoli del vino.

1.2.1 L'alcol etilico.

L'etanolo, o alcol etilico, è, dopo l'acqua il composto quantitativamente più importante fra quelli presenti nei vini. Il suo tenore è espresso per mezzo del grado alcolico che rappresenta la percentuale, in volume, di alcol nel vino. Tenuto conto che la densità dell'etanolo è uguale a 0.79, un vino il cui grado alcolico è 10% vol, contiene in peso 79 g/L di etanolo. L'alcol è contenuto di solito nel vino in quantità intorno a 100 g/L (12,6% vol.); eccezionalmente può raggiungere 136 g/L (ossia un grado alcolico di 16% vol.).

L'etanolo del vino proviene essenzialmente dalla fermentazione alcolica degli zuccheri del mosto. Le stesse cellule dell'uva sono in grado di formarne una piccola quantità, soprattutto in anaerobiosi (macerazione carbonica). La comparsa di tracce di etanolo nella bacca corrisponde all'inizio dell'attività alcol deidrogenasica e può essere considerata di per sé un indicatore dello stato di avanzamento del fenomeno di maturazione.

Tenuto conto che sono necessari da 16 a 18 g/L di zuccheri, secondo il tipo di vinificazione e il rendimento fermentativo dei lieviti, per produrre, nel corso della fermentazione alcolica, 1% vol. di etanolo, i mosti devono contenere 180, 226 e 288 g/L di zuccheri per ottenere rispettivamente, sulla base del più basso rendimento fermentativo, vini di 10, 12,6 e 16% di etanolo. Quest'ultimo valore è considerato come il limite massimo della resistenza del lievito all'alcol, anche se, limitatamente ad esperimenti di laboratorio, si conoscono ceppi capaci di raggiungere 18% vol.

Per molti consumatori, il grado alcolico costituisce una espressione importante della qualità; questo parametro riveste, inoltre, grande rilevanza ai fini commerciali. Esiste certamente una relazione fra il carattere vinoso e il tenore in alcol da una parte e le sensazioni di morbidezza *moelleuses* e di corpo *corsées* dall'altra.

Nei climi temperati, la ricchezza naturale in alcol è funzione diretta dello stato di maturità; gli alti gradi si ottengono unicamente in certe annate beneficiando di fattori climatici favorevoli, con certi sistemi di coltivazione e con certe esposizioni. Le grandi annate, di conseguenza, sono spesso caratterizzate da gradi alcolici elevati.

Dal punto di vista chimico, l'etanolo è un alcol primario, cioè un composto in cui il carbonio 1, ibrido sp³ tetraedrico, è legato a due atomi di idrogeno e a un radicale idrossile. Dell'alcol etilico di fermentazione, fanno parte molecole in cui certi atomi di idrogeno, sui carboni 1 e 2, sono rimpiazzati dal deuterio, isotopo dell'idrogeno; malgrado esse rappresentino una frazione molto bassa del totale, il loro numero è funzione dell'origine dello zucchero fermentato (uva, barbabietola, canna da zucchero). Questa caratteristica ha permesso la messa a punto di un metodo di controllo dell'arricchimento dei mosti con saccarosio (*chaptalisation*) ed il rilevamento delle frodi corrispondenti (Martin e Brun, 1987); tale metodo è riconosciuto ufficialmente dalla Comunità Europea e dall'OIV (Office International de la Vigne et du Vin). L'etanolo è, però, tossico per l'uomo; esso agisce sulle cellule nervose e sulle cellule del fegato; la dose letale (DL 50), per ingestione orale, è pari a 1400 mg/Kg di peso corporeo. Il suo potere solvente consente la dissoluzione dei composti fenolici delle parti solide dell'uva durante la vinificazione. Possiede, inoltre, le diverse proprietà chimiche della funzione alcolica; in particolare, si esterifica con gli acidi tartarico e lattico, interviene nella

solubilizzazione di certe molecole odorose e certamente partecipa all'espressione globale dell'aroma del vino.

1.2.2 L'alcol metilico.

Il metanolo è presente nei vini sempre in piccola quantità, compresa fra 60 e 150 mg/L e non ha influenza sensoriale. La fermentazione alcolica non è implicata nella formazione di tale composto che proviene, invece, esclusivamente dall'idrolisi enzimatica, durante la vinificazione, dei gruppi metossilici delle pectine che vengono così trasformate in acidi pectici. Dato che l'uva è un frutto relativamente povero in pectine, il vino è la bevanda fermentata a più basso tenore in metanolo.

Il contenuto in metanolo è funzione della durata della fermentazione in presenza delle parti solide dell'uva, in particolare delle bucce ricche in pectine; per questo i vini rossi ne sono più ricchi (152 mg/L) rispetto a quelli rosati (91 mg/L) e soprattutto ai vini bianchi (63 mg/L). Inoltre, dalla constatazione che i vini derivati da varietà ibride sono più ricchi in metanolo di quelli provenienti da *Vitis vinifera*, si deduce che le bucce delle prime varietà sono più ricche in pectine di quelle delle seconde. L'impiego di enzimi pectolitici in vinificazione, per facilitare l'estrazione del mosto o per facilitare la sua chiarifica, può causare un aumento del contenuto di metanolo, per effetto dell'attività pectinmetilesterasica. La tossicità del metanolo è ben nota; per ingestione si ossida ad aldeide formica e ad acido formico che sono entrambi tossici per il sistema nervoso centrale; l'aldeide formica altera innanzi tutto il nervo ottico, portando alla cecità. Le normali pratiche di vinificazione non permettono, neanche lontanamente, di raggiungere le dosi di metanolo dannose per l'organismo (DL50 = 350 mg/Kg di peso corporeo).

1.2.3 Gli alcoli superiori di origine fermentativa.

Gli alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio sono chiamati alcoli superiori; essi sono per la maggior parte di origine fermentativa e sono presenti nei vini a dosi variabili da 150 a 550 mg/L. Come i loro esteri possiedono odori intensi che possono giocare un ruolo importante nell'aroma dei vini. I principali alcoli superiori di origine fermentativa sono l'alcol isobutilico (2-metil-propan-1-olo) e gli alcoli amilici (miscela di 2-metil-butan-1-olo e di 3-metil-butan-1-olo). A bassa concentrazione (meno di 300 mg/L) essi partecipano alla complessità aromatica del vino; a concentrazione più elevata, il loro odore penetrante maschera la finezza aromatica. Gli esteri acetici di questi alcoli, in particolare l'acetato di isoamile possiedono un odore di banana che può giocare un ruolo positivo nell'aroma di certi vini rossi novelli

Gli alcoli superiori sono prodotti dai lieviti, sia direttamente a partire dagli zuccheri, sia a partire dagli amminoacidi dell'uva attraverso la reazione di Ehrlich; quest'ultima reazione avviene grazie all'attività di una deidrogenasi che richiede come coenzima il FAD⁺, per ossidare l'amminoacido ad imminoacido che, a sua volta, dopo idrolisi ad α -chetoacido, subisce l'azione di una decarbossilasi il cui coenzima è la tiamina pirofosfato (TPP). Così, secondo questa via, la leucina porta all'alcol isoamilico e l'isoleucina all'alcol amilico otticamente attivo, in quanto portatore di un carbonio asimmetrico. I tenori degli alcoli di

origine fermentativa variano in funzione delle condizioni di fermentazione e, in particolare, del ceppo di lievito. Come regola generale, le prati che aumentano la velocità della fermentazione (biomassa del lievito, ossigenazione, temperatura elevata, presenza di torbido d'uva) aumentano la formazione degli alcoli superiori. Il tenore in alcoli superiori del vino può aumentare in seguito ad alterazioni microbiche causate da lieviti o da batteri; in questo caso, l'odore amilico può diventare eccessivo.

1.2.4 Gli altri alcoli.

Si tratta di molecole che provengono dall'uva e che si ritrovano nei vini. Un primo gruppo è costituito dagli alcoli a 6 atomi di carbonio, l'esanol e gli esenoli, che si formano al momento della disorganizzazione dei tessuti vegetali e sono responsabili di odori erbacei che si avvertono perfettamente nei vini derivati da uve non mature. Si può aggiungere l'1-octen-3-olo che possiede un odore di fungo e la cui presenza nei vini è legata all'intervento di *Botrytis cinerea* sulle uve.

1.2.5 I polioli.

Sono caratterizzati dalla presenza di diversi gruppi idrossilici, più o meno vicini, nella stessa molecola, lineare o ciclica. Come regola generale, l'aumento del numero dei gruppi idrossilici in un composto, a causa della maggior possibilità di formazione di legami idrogeno, comporta un aumento importante del suo punto di ebollizione, oltre che della viscosità. Parallelamente si osserva un aumento della solubilità e del sapore dolce.

Il glicerolo è nel vino il composto chimico più importante dopo l'acqua e l'etanolo e il primo dei prodotti secondari della fermentazione alcolica. Il suo tenore minimo nei vini è pari a 5 g/L, ma può raggiungere, in funzione delle condizioni di fermentazione (in particolare del livello di solfitazione dei mosti), valori fino a 15 o 20 g/L. Il glicerolo è prodotto dai lieviti all'inizio della fermentazione. La via di formazione di questo composto prende il nome di fermentazione gliceropiruvica, unico mezzo a disposizione del lievito per assicurare la riossidazione del coenzima NADH a NAD per riduzione del diidrossiacetone a glicerolo; a questo stadio, il livello di etanale è troppo basso per assicurare la riossidazione del NADH con produzione di etanolo. Il glicerolo possiede un sapore dolce che si somma a quello dell'alcol etilico nel caso dei vini secchi, ma esso probabilmente non interviene nella sensazione di dolcezza (*moelleux*) dei vini dolci.

Il 2,3-butandiolo è, dal punto di vista quantitativo, uno dei più importanti prodotti secondari della fermentazione alcolica, malgrado esso possa essere formato anche durante la fermentazione malolattica. Praticamente non ha odore ed è, nello stesso tempo, leggermente dolce e amaro. Nei vini non gli si attribuisce un ruolo sensoriale significativo; inoltre, non viene attaccato dai batteri, ma partecipa insieme all'acetoino (o acetilmetil-carbinolo) e al diacetile agli equilibri di ossidoriduzione. Sarebbe formato proprio per riduzione dell'acetoino proveniente dalla condensazione di due molecole di etanale. L'eritritolo è anche una molecola a 4 atomi di carbonio ma, a differenza del 2,3-butandiolo, essa possiede quattro funzioni

alcoliche. Si ammette che il lievito ne produca tenori limitati (da 30 a 200 mg/L). Non gli si attribuiscono proprietà particolari.

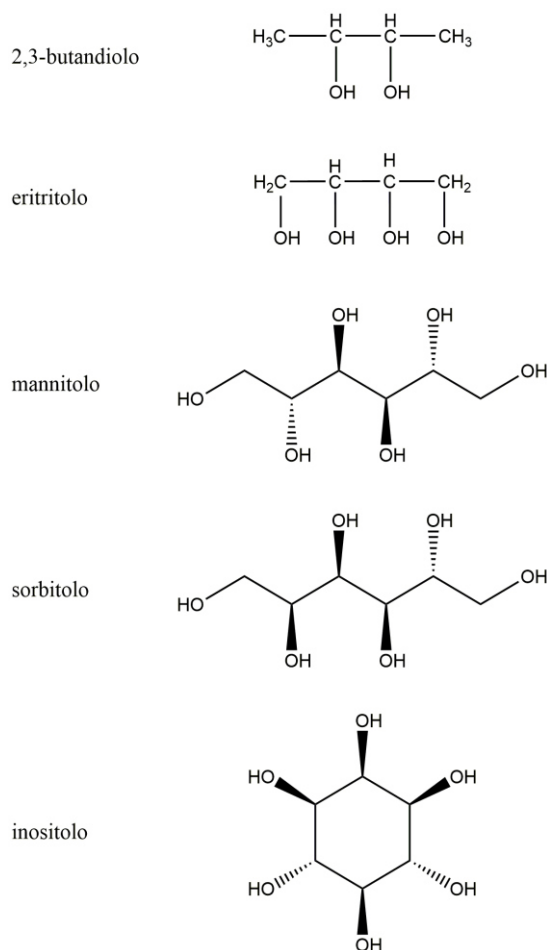


Figura 1.4 I polioli nel vino.

Il mannitolo, il sorbitolo e il mesoinositolo sono polioli a sei atomi di carbonio. Questi tre composti possiedono sei funzioni alcoliche; mentre i primi due sono a catena lineare, il terzo è ciclico. Il mannitolo deriva dalla riduzione del carbonile aldeidico del mannosio; quello presente nel vino è originato dai batteri lattici per riduzione del carbonile chetonico del fruttosio. Esso è generalmente presente in quantità modesta; tenori più alti sono prodotti in seguito all'intervento di batteri lattici o, eventualmente, di *Botrytis cinerea*.

Il sorbitolo è originato dalla riduzione del carbonile aldeidico del glucosio ed è il diastereoisomero del mannitolo. È totalmente assente nelle uve sane; a causa dello sviluppo della *Botrytis cinerea* se ne formano quantità più o meno importanti. La fermentazione alcolica contribuisce con circa 30 mg/L al suo contenuto totale; i batteri lattici invece non ne producono. Tenori importanti di sorbitolo sono indici del taglio di vino d'uva con prodotti della fermentazione di frutti diversi; infatti, oltre al sorbo da cui proviene il suo nome, la mela, la pera e la ciliegia ne sono ricche.

Il mesoinositolo è un componente importante delle uve e dei vini. Esso è un poliolo ciclico a 6 atomi di carbonio, a ciascuno dei quali è legato un gruppo idrossilico. Fra i nove inositoli stereoisomeri, diastereoisomeri gli uni rispetto agli altri, esso presenta un piano di simmetria

passante per i carboni 1 e 4. Il suo carattere meso, pertanto, lo rende otticamente inattivo. Si tratta di un poliolo largamente diffuso nel mondo animale e vegetale e rappresenta un fattore di crescita essenziale per numerosi microrganismi, in particolare per certi lieviti. È difficile attribuire ai polioli a sei atomi di carbonio un ruolo sensoriale.

1.2.6 *Gli acidi grassi della serie alifatica.*

Il più importante è l'acido acetico che è il componente essenziale dell'acidità volatile; il suo tenore, sottoposto a limiti per legge, rappresenta un indice dell'importanza degli interventi batterici (lattici o acetici) e la conseguente alterazione dei vini. Dato che i lieviti producono un po' di acido acetico, tutti i vini possiedono una acidità volatile. Gli acidi volatili, ad esempio, l'acido propionico a tre atomi di carbonio e gli acidi butirrici a quattro atomi di carbonio sono ugualmente associati ad alterazioni batteriche.

Gli acidi grassi in C6, C8 e C10 sono prodotti dai lieviti, sono inibitori della fermentazione ad una concentrazione di qualche mg/L e possono essere responsabili di arresti di fermentazione.

Gli acidi grassi insaturi a lunga catena (C18, C20) sono imparentati con la famiglia degli steroli e sono attivatori di fermentazione, soprattutto in anaerobiosi. I più importanti sono gli acidi oleico (C18 con un doppio legame), linoleico (C18 con due doppi legami) e linolenico (C18 con tre doppi legami); agiscono allo stato di tracce e provengono dalle membrane delle cellule dell'uva.

Come «acidi grassi», vengono designate, pertanto, due famiglie di composti le cui proprietà sono totalmente differenti.

1.2.7 *Gli esteri.*

Gli esteri sono originati dalla reazione di un gruppo alcolico con una funzione acida, con eliminazione di una molecola di acqua. Si tratta di una reazione reversibile, limitata dalla reazione inversa di idrolisi dell'estere. Il vino contiene numerosi alcoli e acidi; di conseguenza, il numero possibile degli esteri è altrettanto grande. Tenuto conto, tuttavia, dell'importanza quantitativa dell'etanolo e della reattività degli alcoli primari, gli esteri etilici sono, per motivi cinetici, i più abbondanti. Gli esteri sono poco rappresentati nell'uva: si può segnalare qualche molecola odorosa, ad esempio, l'antranilato di metile, responsabile dell'odore *foxy* delle uve e dei vini da *V. labrusca*. A questa classe appartengono anche i gruppi metossilici delle pectine che, per idrolisi, liberano metanolo. Nei vini, invece, gli esteri hanno due origini distinte: i processi fermentativi che comportano esterificazioni di natura enzimatica e la conservazione di lunga durata che porta ad esterificazioni chimiche. Questi due processi possono intervenire nella sintesi di uno stesso estere.

L'estere più importante del vino è certamente l'acetato di etile. Una piccola quantità è formata dal lievito durante la fermentazione, ma le dosi più elevate provengono dall'intervento dei batteri acetici aerobi, principalmente durante la conservazione in fusti di rovere; sembra che i batteri lattici non abbiano la possibilità di sintetizzarlo. Questo estere è responsabile delle caratteristiche olfattive dei vini affetti d'acescenza, caratterizzati da un odore acre e soffocante e da una acidità volatile elevata. La soglia di percezione olfattiva per l'acetato di etile si situa intorno a 160 mg/L, ma anche al di sotto di questo valore, senza essere identificabile

sensorialmente, può denaturare il bouquet di un vino conferendogli una nota pungente, sgradevole. Forse a piccole dosi (da 50 a 80 mg/L), può partecipare alla complessità olfattiva senza nuocere alla qualità. L'acetato di etile interviene sul sapore propriamente detto del vino; a dosi relativamente elevate (a partire da 120 mg/L), pur se inferiori alla sua soglia di percezione olfattiva, esso conferisce ai vini rossi un sapore bruciante (brillante) che rafforza l'impressione finale di asprezza (*apreté*). È, inoltre, uno degli elementi della durezza (*dureté*) e del vigore (*fermeté*) dei vini rossi.

Gli esteri etilici degli acidi grassi, essenzialmente caproato e caprilato di etile, sono formati dai lieviti durante la fermentazione alcolica. La loro sintesi coinvolge le forme degli acidi attivate dal coenzima A (HS-CoA), le acil-S-CoA. Enzimi specifici catalizzano successivamente l'alcolisi degli acil-S-CoA con produzione degli esteri etilici degli acidi grassi, rigenerando il coenzima A.

In generale, la concentrazione degli esteri aumenta in funzione del tempo di conservazione. Nel caso degli esteri etilici degli acidi grassi avviene il contrario: la loro formazione da parte del lievito, in anaerobiosi, porta a concentrazioni superiori rispetto a quelle previste dalla legge di azione di massa; di conseguenza, si osserva la loro idrolisi e la loro diminuzione nel corso della conservazione.

Gli esteri etilici degli acidi grassi hanno odori molto piacevoli di cera e di miele; partecipano alla finezza aromatica dei vini bianchi dove sono presenti ad una concentrazione totale di qualche mg/L.

Appare importante segnalare, inoltre, fra gli esteri di fermentazione, gli esteri acetici degli alcoli superiori (acetato di isoamile, acetato di 2-feniletile), presenti in quantità modesta ma dotati di odore intenso, molto particolare (banana, caramella inglese, mela). Essi partecipano alla complessità aromatica dei vini da uve neutre e possono mascherare gli aromi specifici di certe varietà.

La formazione di tutti questi esteri è favorita da una fermentazione lenta, dall'assenza di ossigeno, dalle basse temperature, dalla chiarifica del mosto.

Altri esteri sono di origine chimica. La presenza nel vino, accanto ad una quantità importante di etanolo, di numerosi acidi, spiega la formazione di esteri che avviene durante tutta la durata dell'invecchiamento. Lo studio del meccanismo di esterificazione applicato al vino ha mostrato che, nelle condizioni pratiche, l'equilibrio previsto dalla teoria non è mai raggiunto per nessun acido. Il contenuto in esteri raggiunge, infatti, approssimativamente il 30% del limite teorico in un anno, il 50% in due o tre anni e l'80% in 50 anni. Il tenore in esteri totali (formati per via chimica o enzimatica) è condizionato dalla composizione e dall'età del vino; esso varia da 2 a 3 meq/L nei vini giovani e da 9 a 10 meq/L nei vini vecchi in cui circa 10% degli acidi sono esterificati.

I monoacidi conducono, per reazione con l'etanolo, solamente ad esteri neutri, mentre ciascun diacido può originare sia un estere neutro sia un estere acido (ad es., il tartrato di etile e l'acido monoetiltartarico). In media il vino contiene all'incirca la stessa quantità di esteri neutri e di esteri acidi; questi ultimi contribuiscono anche all'acidità totale del vino.

Gli esteri etilici dei principali acidi organici non sembrano giocare se non un ruolo limitato nei riguardi della qualità sensoriale dei vini sani; in ogni caso, la maturazione legata all'invecchiamento non sembra loro imputabile in quanto la loro presenza è la stessa in tutti i vini.

Il lattato di etile occupa una posizione particolare. La formazione di questo estere è legata alla fermentazione malolattica in quanto la maggior parte dell'acido lattico è prodotta proprio in questo processo, in cui non si può escludere l'intervento di una esterasi di origine batterica. Il suo tenore aumenta nel corso dell'invecchiamento, per esterificazione chimica.

Fra gli altri composti volatili coinvolti nella formazione dell'aroma del vino, si possono citare i fenoli volatili e i composti solforati che di solito sono presenti quando si avvertono. Alla classe dei composti volatili appartengono anche le sostanze responsabili dell'aroma varietale dei diversi vitigni.

1.2.8 I composti carbonilici (aldeidi e chetoni).

L'etanale è il più importante fra tutti i composti carbonilici presenti nel vino. La possibilità che essa ha di essere originata attraverso vie diverse, la grande reattività (il gruppo funzionale CHO è un reattivo elettrofilo), la proprietà di combinarsi rapidamente a freddo con il diossido di zolfo, l'influenza sensoriale, conferiscono a questo composto un ruolo molto importante in enologia.

La presenza di etanale, prodotto dell'ossidazione dell'etanolo, è intimamente legata ai fenomeni di ossidoriduzione; essa interviene nel meccanismo della fermentazione alcolica e inoltre, gioca un ruolo importante nell'evoluzione del colore durante la conservazione dei vini rossi, inducendo la copolimerizzazione dei composti fenolici (antociani e flavani).

Oltre all'etanale, altre aldeidi sono presenti nel vino allo stato di tracce. In particolare, le aldeidi superiori possono far parte del bouquet di certi vini. L'azione di neutralizzazione e di appiattimento esercitata dall'anidride solforosa sul fruttato di certi vini bianchi si spiega con la combinazione di questo composto con la frazione aldeidica del bouquet.

Nei vini si trovano anche aldeidi della serie aromatica, in particolare la vanillina, associata a maturazione in fusti di legno e dotata di un spiccato aroma vanigliato.

Fra le molecole a funzione chetonica sono stati segnalati il propanone, il butanone e il pentanone, ma i composti più importanti di questa classe sono l'acetilmetilcarbinolo e il diacetile.

1.2.9 Gli acetali.

Le aldeidi reagiscono con gli alcoli per formare gli acetali. Una ventina di tali composti sono stati segnalati nei vini; il più importante, il dietossietano, deriva dalla reazione fra etanale ed etanolo. Tenuto conto delle quantità molto piccole di etanale libera presenti nei vini da tavola, il tenore in acetali di questi prodotti è molto basso. Gli acetali sono caratterizzati da una nota odorosa di carattere vegetale.

1.2.10 I lattoni.

I lattoni sono formati per reazione di esterificazione interna fra una funzione acida e una funzione alcolica appartenenti ad una stessa molecola; la reazione porta ad un eterociclo ossigenato. Alcuni lattoni volatili di origine fermentativa possono contribuire all'aroma del vino. Il più noto è il γ -butirrolattone, presente ad una concentrazione intorno al mg/L; esso deriva dalla lattonizzazione dell'acido γ -idrossibutirrico originato per deamminazione e decarbossilazione dell'acido glutammico. Non sembra avere un ruolo importante nella formazione dei caratteri sensoriali dei vini. I lattoni possono anche provenire dall'uva; es. è stato segnalato il loro contributo nella formazione dell'aroma varietale del Riesling.

1.3 I glucidi.

Gli zuccheri sono denominati, nell'uso comune, carboidrati per il fatto che la loro formula bruta può essere rappresentata, oltre che da $C_nH_{2n}O_n$, anche da $C_n(H_2O)_n$, in cui a ciascun atomo di carbonio corrisponde una molecola d'acqua. In enologia si usano frequentemente le espressioni “zuccheri riduttori” e “zuccheri fermentescibili”. Gli zuccheri riduttori possiedono una funzione aldeidica o chetonica (più precisamente α -chetonica) che permette di ridurre le soluzioni rameiche alcaline utilizzate per la loro determinazione. Si tratta di esosi e di pentosi. Nella struttura del saccarosio e di altri disaccaridi, le due molecole monomeriche, legate attraverso la loro funzione aldeidica o chetonica, perdono il loro potere riducente e devono essere idrolizzate per essere dosate.

Gli zuccheri fermentescibili sono utilizzati come fonte di carbonio dai lieviti e sono i diretti precursori dell'etanolo. Il glucosio e il fruttosio sono fermentescibili; il saccarosio è fermentescibile dopo idrolisi chimica o enzimatica a glucosio e fruttosio; i pentosi non sono fermentescibili.

Denominati abitualmente in enologia con il termine generico di «colloidi glucidici», i polisaccaridi del mosto o del vino costituiscono un insieme di sostanze complesso ed eterogeneo. Dal punto di vista strutturale sono polimeri di osi neutri e/o di acidi uronici legati fra loro per mezzo di legami O-glicosidici e possiedono una configurazione anomica α o β .

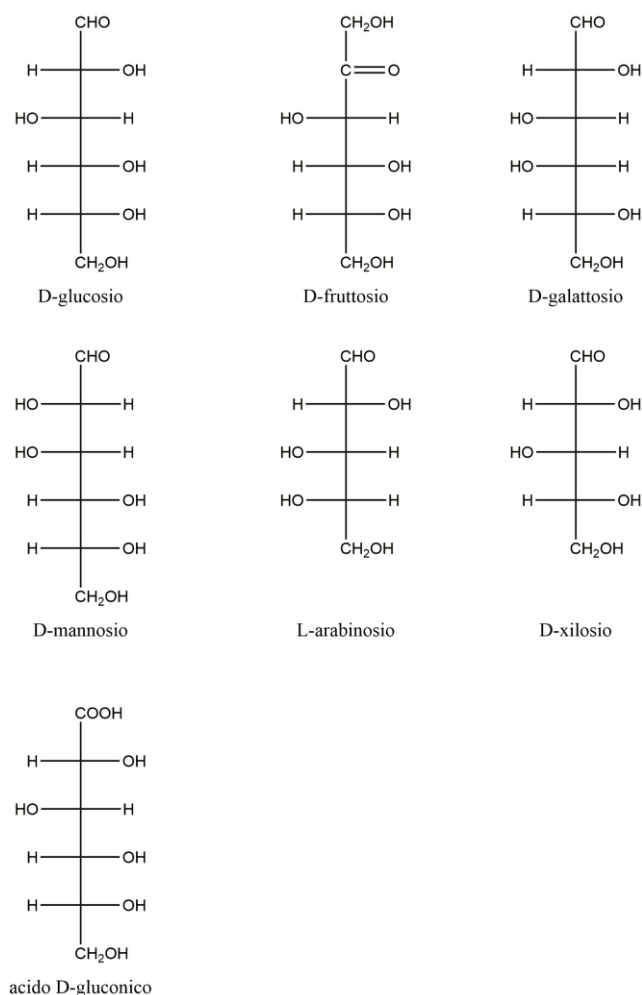


Figura1.5 I glucidi del vino.

1.3.1 Il glucosio e il fruttosio.

I due esosi principali del succo vacuolare delle cellule della polpa dell'uva sono:

- il D-glucosio, detto anche destrosio in quanto devia a destra la luce polarizzata (α) = + 52,5°;
- il D-fruttosio, detto anche levulosio in quanto devia a sinistra la luce polarizzata (α) = - 93,0°.

Dato che nel corso della maturazione, il valore del rapporto glucosio/fruttosio, sotto l'azione di un'epimerasi, diminuisce, lo studio della sua evoluzione, allo stesso modo dell'evoluzione dell'attività alcoldeidrogenasica, può costituire un utile indicatore dello stato di avanzamento della maturazione della bacca. Esso varia da circa 1,5 all'invasatura, a meno di 1 alla maturità. Nel succo dell'uva a maturità, il tenore complessivo in glucosio e fruttosio è compreso approssimativamente fra 150 e 250 g/L, ma può essere più elevato nel caso della sovra maturazione, dell'appassimento o dell'attacco da «marciume nobile».

I vini secchi, derivati da una fermentazione completa degli zuccheri, contengono piccole quantità di esosi (dell'ordine di 1 g/L), rappresentati principalmente da fruttosio, in quanto il glucosio è fermentato preferenzialmente dalla maggior parte dei lieviti. Per questo motivo, il rapporto G/F, vicino ad 1 nel mosto dell'uva, si abbassa regolarmente nel corso della

fermentazione tanto che, nei vini dolci contenenti diverse decine di grammi di zuccheri per litro, il tenore in fruttosio può rappresentare da due a quattro volte quello del glucosio.

Questi due zuccheri si differenziano anche per il loro potere dolcificante e per il loro contributo a livello di gusto del vino. Se si attribuisce al saccarosio un potere dolcificante uguale ad 1, quello del fruttosio risulta pari a 1,73 e quello del glucosio 0,74. Di conseguenza, per uno stesso tenore in zuccheri residui, il sapore dolce di un vino dipende dal rapporto G/F.

1.3.2 *Gli osi semplici.*

Tra gli aldosesi isomeri del D-glucosio, solo il D-galattosio ed il D-mannosio sono stati segnalati nei vini anche se in quantità molto piccola (0.1 g/l). Ognuno di essi ammette un isomero di configurazione L che, tuttavia, non ha interesse biologico. Lo stesso si può ripetere per i chetoesosi che, possedendo tre carboni asimmetrici, ammettono otto isomeri; il D-fruttosio, l'unico presente nell'uva e nel vino, è uno di essi.

Si ammette che il vino contenga sempre piccole quantità di pentosi (da 0.3 ad, eccezionalmente, 2 g/l). Essi sono più abbondanti nei vini rossi, piuttosto che nei bianchi, sono riduttori e possono essere determinati con soluzioni contenenti ioni rameici. Inoltre, non sono fermentati da parte dei lieviti ed intervengono meno degli esosi nella formazione del sapore dolce. Infatti se si considera uguale a 1 il potere dolcificante del saccarosio, quello dei pentosi risulta soltanto 0.4. I principali pentosi segnalati nell'uva e nel vino sono l'L-arabinosio ed il D-xilosio, i cui contenuti possono raggiungere qualche centinaio di mg/l; il D-ribosio ed il L-ramnosio, un metilpentoso, possono essere presenti in quantità non superiore a 100 mg/l. Il D-xilosio possiede una struttura del tipo pirano, mentre il D-ribosio del tipo furano. Il primo è molto comune nel legno sotto forma di poliosidi (xilani), in associazione alla cellulosa; esso esiste anche sotto forma di glicosidi. Il D-ribosio è un componente essenziale dei nucleotidi e degli acidi nucleici. L'arabinosio è comune nel regno vegetale; esso si trova sotto forma di poliosidi (gomme) spesso associati alle pectine. Il L-ramnosio, ovvero L-desossimannosio è un metilpentoso, risultante dalla deossigenazione del carbonio 6 del L-mannosio. Esso è largamente presente nel regno vegetale sotto forma eterosidica; nel Moscato, ad esempio, si trova coinvolto nella parte glucidica degli eterosidi terpenici.

1.3.3 *I dioloidi o disaccaridi.*

Diversi dioloidi sono stati segnalati, generalmente, in piccola quantità, nell'uva e nel vino. I più comuni sono:

- melibiosio: galattosio + glucosio (riduttore);
- maltosio: glucosio + glucosio (riduttore);
- lattosio: glucosio + galattosio (riduttore);
- raffiniosio: fruttosio + melibiosio (non riduttore);
- trealosio: glucosio + glucosio (non riduttore);
- saccarosio: glucosio + fruttosio (non riduttore).

La proprietà di essere riduttori è dovuta alla presenza di una funzione aldeidica o α -chetolica libera. Quando i disaccaridi non sono riduttori, i gruppi carbonilici dei monosaccaridi di cui sono composti sono impegnati nel legame disaccaridico.

Il trealosio, assente nel mosto dell'uva, si ritrova nel vino a una concentrazione dell'ordine di 150 mg/L; esso proviene dall'autolisi dei lieviti dopo la fermentazione.

Il disaccaride più importante è il saccarosio; esso risulta dal legame fra il carbonio 1 dell' α -D-glucopiranosio con il carbonio 2 del β -D-fruttofuranosio. La sua presenza nel succo dell'uva è stata motivo di discussioni per lungo tempo; si sa ora che tale disaccaride è presente naturalmente nell'uva a livelli di solito bassi, ma spesso compresi fra 2 e 5 g/L. Il saccarosio si accumula nelle foglie come conseguenza del processo fotosintetico, ma esso è idrolizzato, durante il trasporto verso gli acini dell'uva, in glucosio e in fruttosio che sono, nell'acino, gli zuccheri essenziali. Il saccarosio dell'uva potrebbe anche essere originato dalle riserve glucidiche idrolizzabili del legno dei sarmenti che ne contengono da 40 a 60 g/Kg di legno fresco, sotto forma di cellulosa e di amido. Il saccarosio è fermentato dal lievito, dopo idrolisi a glucosio e fruttosio indotta da una invertasi dello stesso lievito; di conseguenza esso non può esistere nel vino, a meno che non venga aggiunto illegalmente dopo la fermentazione. A causa della sua purezza e del suo basso costo esso è il principale zucchero utilizzato per l'arricchimento del mosto (Chaptalisation).

1.3.4 Gli eterosidi.

Gli eterosidi derivano dalla reazione di un composto di natura non glucidica con la funzione semiacetalica di un osio. La parte non ossidica degli eterosidi è denominata aglicone.

Si distinguono gli O-eterosidi e gli N-eterosidi. Negli O-eterosidi, la parte glucidica è legata alla parte agliconica per mezzo di un atomo di ossigeno; tale legame di tipo etere è facilmente rotto per idrolisi enzimatica o chimica. Negli N-eterosidi, è attraverso un atomo di azoto che sono legati lo zucchero e l'aglicone; i composti più noti di quest'ultima categoria sono le frazioni nucleotidiche degli acidi nucleici.

Gli O-eterosidi sono molto comuni nel regno vegetale. Un gran numero di essi possiedono proprietà farmacodinamiche; quelli presenti nell'acino d'uva condizionano i processi enologici e la qualità dei vini.

1.3.5 I prodotti di ossidazione.

I prodotti di ossidazione degli zuccheri che hanno importanza in enologia si identificano essenzialmente con gli acidi che provengono dall'ossidazione dell'una o dell'altra delle funzioni terminali della catena degli atomi di carbonio. Il più importante è l'acido gluconico che proviene dall'ossidazione della funzione aldeidica del glucosio; la sua presenza nell'uva e nel vino è direttamente legata all'intervento della Botrytis cinerea sotto forma di muffa nobile o soprattutto di muffa grigia.

1.3.6 Le sostanze pectiche provenienti dall'uva.

I polisaccaridi che derivano dall'uva sono il risultato dell'idrolisi e della solubilizzazione di una parte delle sostanze pectiche contenute nella parete delle cellule della buccia e della polpa. Si dividono in pectine e gomme. Le pectine sono costituite quasi esclusivamente da catene di acido galatturonico (acido α -D-galattopiranosidico) parzialmente esterificate dal metanolo. Il grado di esterificazione di queste molecole polimeriche è elevato (da 70 a 80%). I

termini acido poligalatturonico, omogalatturonano sono sinonimi utilizzati per denominare tali catene. I legami osidici degli omogalatturonani sono del tipo α -(1,4).

Le gomme sono i polisaccaridi solubili che si ottengono dopo eliminazione delle pectine (omogalatturonani) per saponificazione e precipitazione o per idrolisi ad opera di pectinasi esogene. Oltre che da acido galatturonico, esse sono costituite da zuccheri neutri, principalmente ramnosio, galattosio e, in misura minore, xilosio, mannosio e glucosio.

1.3.7 I polisaccaridi esocellulari dei lieviti.

I lieviti sono la seconda maggior fonte di polisaccaridi del vino. Numerosi lavori sono stati dedicati allo studio dell'organizzazione della parete cellulare di questi microrganismi, ma molto meno allo studio della natura dei colloidali glucidici da essi ceduti al vino. Un mezzo sintetico contenente zuccheri, inizialmente impoverito di colloidali, inoculato con *S. cerevisiae*, si arricchisce di colloidali nel corso della sua fermentazione; questo arricchimento prosegue, dopo la fermentazione alcolica per tutto il tempo in cui il mezzo fermentato è conservato sulla biomassa del lievito e può raggiungere diverse centinaia di mg/L. La quantità di polisaccaridi ceduti dal lievito dipende dal ceppo e dalle condizioni di fermentazione e di conservazione ed è tanto più elevata quanto più alta è la temperatura, l'agitazione del mezzo e il tempo di conservazione sulla biomassa.

1.4 Le sostanze azotate.

1.4.1 L'azoto totale.

L'azoto totale di un mosto o di un vino comprende una forma minerale e diverse forme organiche. Esso viene determinato secondo il metodo di Kjeldahl per mineralizzazione a caldo, in acido solforico e in presenza di catalizzatori. La determinazione del tenore in azoto totale dei mosti (espresso in mg/L) ha permesso di constatare la variabilità di questo parametro da un anno all'altro, probabilmente in dipendenza dallo stato di maturità dell'uva, dal vitigno e dalla zona di produzione; questi ultimi due fattori contribuirebbero in ugual misura. Il fattore di variazione può raggiungere il valore 4 da una vendemmia alla successiva. I tenori medi in azoto dei vini rossi sono circa due volte più alti di quelli dei vini bianchi; si tratta di una conseguenza della vinificazione con macerazione a temperatura elevata, che favorisce la dissoluzione delle sostanze azotate delle bucce e dei semi, oltre che l'autolisi delle cellule di lievito morte. Per i vini bianchi si riscontrano valori da 77 a 377 mg/L con una media di 185 mg/L, mentre per i rossi da 143 a 666 mg/L con una media di 330 mg/L.

1.4.2 L'azoto minerale.

Nelle cellule della polpa degli acini d'uva, durante la fase erbacea, cioè di crescita vera e propria, i sali ammoniacali sono la forma di combinazione più rappresentata di questo elemento. A questo stadio fenologico, esso rappresenta 80% dell'azoto totale e ha origine, certamente, dai nitrati assorbiti dal terreno attraverso le radici. Al momento dell'invaiaura, l'azoto ammoniacale, ancora largamente predominante, vede diminuire rapidamente il suo contenuto in quanto viene utilizzato nella sintesi di molecole organiche più complesse. Così, ad es., con gli α -chetoacidi del ciclo di Krebs e della respirazione degli zuccheri, attraverso

reazioni di transaminazione, è prodotta la maggior parte degli amminoacidi liberi, che vengono utilizzati dalle cellule dell'uva per produrre peptidi, polipeptidi e proteine.

A maturità, l'azoto minerale in un mosto, rappresenta meno del 10% dell'azoto totale, ossia qualche decina di mg/L, espresso come ammoniaca. L'ammoniaca, o più propriamente il catione ammonio NH_4^+ , è la forma azotata più direttamente assimilabile da parte dei lieviti; il suo tenore influenza sia la velocità d'inizio della fermentazione di un mosto sia il suo potenziale di fermentescibilità. Dato che si osserva la scomparsa pressoché totale di questa forma azotata nei mosti alla fine della fermentazione alcolica, appare importante la conoscenza del suo contenuto nel mosto, in particolare negli anni di buona maturità. Nei vini, dopo permanenza sui lieviti o dopo fermentazione malolattica, si può ritrovare qualche decina di mg/L di azoto minerale infatti i batteri lattici non assimilano azoto ammoniacale ma lo possono cedere.

1.4.3 Le diverse forme di azoto organico.

Le diverse forme dell'azoto organico, di cui si tratterà in dettaglio, si possono riassumere in:

- 1) amminoacidi;
- 2) gli oligopeptidi e i polipeptidi, costituiti da catene di un numero limitato di amminoacidi uniti da legame peptidico;
- 3) le proteine sono costituite dall'unione di un gran numero di amminoacidi. Il loro peso molecolare è superiore a 10.000 Da;
- 4) l'azoto ammidico;
- 5) le ammine biogene;

1.4.4 Gli amminoacidi.

Da un punto di vista strutturale, i venti amminoacidi maggiormente riscontrati e rappresentati nei mosti e nei vini sono, esclusi l'acido γ -amminobutirrico e la β -alanina, sono α -amminoacidi, cioè composti aventi i gruppi amminico— NH_2 (basico) e carbossilico COOH (acido) legati allo stesso atomo di carbonio.

Gli amminoacidi liberi del succo d'uva rappresentano dal punto di vista quantitativo la frazione più importante dell'azoto totale; il loro tenore infatti, varia da una vendemmia all'altra da 1 a 4 g/l e costituisce, allo stato di maturità dell'uva generalmente, da 30 a 40% dell'azoto totale. Tenuto conto dell'interesse, per l'alimentazione dei lieviti e per l'andamento della fermentazione, di questa forma di combinazione dell'azoto, numerosi metodi analitici sono stati proposti; essi completano il dosaggio dell'azoto totale e del catione ammonio. Come esempio, si può citare la determinazione dell'azoto amminico libero (free α -amino nitrogen, FAN) per reazione con ninidrina, o ancora dell'azoto assimilabile per formoltitolazione (metodo di Sørensen). Quest'ultimo, con cui si dosano globalmente gli amminoacidi liberi e lo ione ammonio presenti nel mosto, si rivela interessante e utile per la conoscenza del carattere fermentescibile di un mosto o di un vino. In questa determinazione, non viene inclusa la prolina che, di solito, è l'amminoacido quantitativamente più importante dei mosti e dei vini. I lieviti, però, non assimilano la prolina in assenza di ossigeno, per cui, dopo fermentazione alcolica, il contenuto di questo amminoacido nel vino può essere maggiore di quello del mosto di partenza.

Certi aminoacidi hanno una presenza predominante nel vino, in particolare l' α -alanina, la serina, l'arginina e la prolina, insieme all'acido glutammico e alla sua amide, la glutammina, a cui si attribuisce il ruolo di trasportatrice d'ammonio. L'arginina e la prolina rappresentano caratteristiche varietali. Lo Chardonnay, il Cabernet sauvignon e il Merlot sono cultivar a predominanza di prolina, mentre il Pinot noir, e l'Aligoté appaiono come vitigni a predominanza di arginina. Al contrario della prolina, questo aminoacido è utilizzato dai lieviti e dai batteri lattici.

Si verifica, inoltre, un aumento del tenore in aminoacidi liberi e totali nel corso della maturazione dell'uva. Si osserva effettivamente un aumento di un fattore superiore a 2, fra l'inizio della maturazione e la data della vendemmia. Questo aumento si verifica ogni anno, ma non deve portare alla conclusione affrettata che il potenziale di fermentescibilità del mosto cresca con l'aumento del grado di maturazione. Infatti, l'esame più dettagliato dei tenori di ciascun aminoacido, in particolare dell'arginina e della prolina, mette in evidenza che quest'ultima subisce un netto aumento una quindicina di giorni prima della data della vendemmia. La prolina appare, pertanto, come un indicatore di maturità. Si spiega così la diminuzione del potenziale di fermentescibilità di un mosto nel corso della maturazione. Soprattutto negli anni in cui si raggiunge una buona maturità, appare importante determinare il tenore in azoto dei mosti per integrarlo, eventualmente, con fosfato o solfato biammonico. Questo controllo è particolarmente importante per le varietà come lo Chardonnay ricche di prolina che, durante la quindicina di giorni precedenti la vendemmia, subisce un aumento molto marcato, mentre l'arginina resta sensibilmente stazionaria.

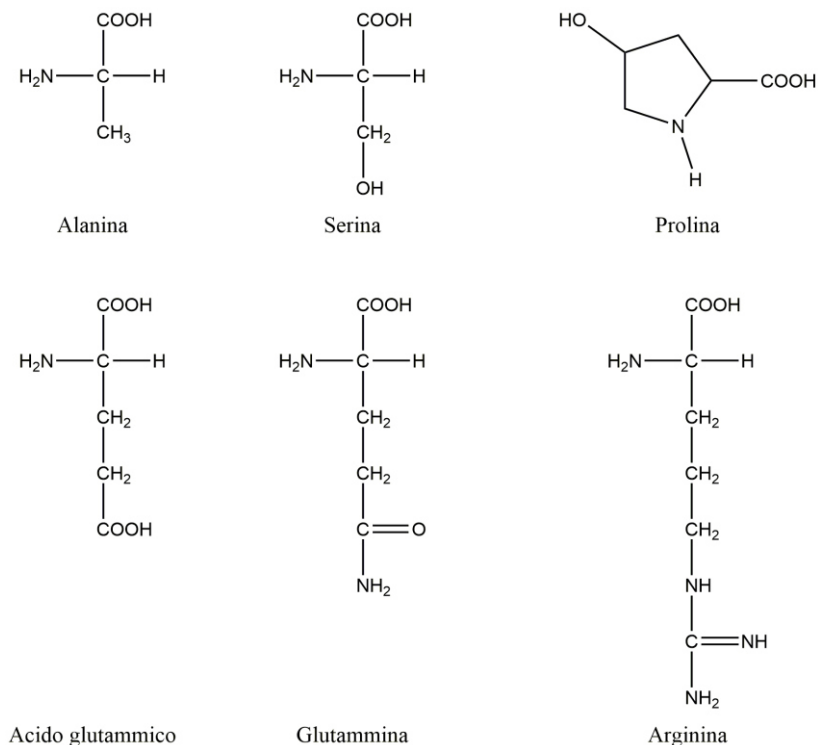


Figura 1.6 I principali aminoacidi del vino.

1.4.5 Gli oligopeptidi.

Nei mosti e nei vini, l'azoto oligopeptidico non è chiaramente differenziato dall'azoto polipeptidico. L'azoto oligopeptidico è rappresentato da composti azotati costituiti al massimo da quattro amminoacidi. Nel mosto, un tripeptide importante è il glutatione. Attraverso la sua parte cisteinica, reagisce parzialmente con i chinoni prodotti per ossidazione dei fenoli; il nuovo derivato che ha origine da questa reazione (grape reaction product, GRP) è ossidabile in presenza di laccasi di *Botrytis cinerea*, ma non di tirosinasi dell'uva. Il glutatione interverrebbe nella prevenzione dell'invecchiamento aromatico pre-maturo dei vini bianchi. È noto, inoltre, che i batteri lattici dispongono di una ammino-peptidasi di membrana grazie alla quale possono assimilare piccoli peptidi, in particolare tripeptidi. Attraverso le loro proprietà sensoriali, queste sostanze intervengono sicuramente sul gusto del vino. Non risulta, tuttavia, che siano stati fatti studi su questo tema.

1.4.6 L'urea.

Dal punto di vista chimico, l'urea si può considerare come la diammide dell'acido carbonico o anche come l'ammide dell'acido carbammico. Le sue proprietà corrispondono a quelle delle ammidi. Per idrolisi origina acido carbonico e ammoniaca. Sicuramente, è di origine microbica ed è presente nel vino in quantità, di solito, minore di 1 mg/L. Il suo interesse in enologia è legato al fatto che potrebbe essere un precursore del carbammato di etile.

1.4.7 Il carbammato di etile.

Il carbammato di etile è l'estere etilico dell'acido carbammico. Mentre l'acido carbammico è molto instabile ed evolve rapidamente a biossido di carbonio e ammoniaca, gli esteri di questo acido, denominati uretani, sono stabili. In enologia, e più generalmente nell'industria delle bevande fermentate, il carbammato di etile ha acquisito una cattiva fama, probabilmente esagerata dai media, a causa del suo carattere mutageno. La media dei tenori riscontrati, indipendentemente dai tipi di vini, è di 7,7 µg/L, con una deviazione standard di 5,5 µg/L. Pochi vini, pertanto superano il limite di 15 µg/L fissato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 1988. I tenori di questo composto nei vini sono poco legati alla varietà o alla eccessiva concimazione azotata del vigneto, le cui influenze, infatti, restano modeste. Certi interventi in vinificazione come le temperature elevate, in particolare la macerazione finale a caldo, e la non diraspatura dell'uva causano un aumento del tenore in carbammato di etile. I lieviti sintetizzano carbammato di etile e contengono anche un suo precursore. Anche l'influenza dei batteri lattici sembra dimostrata; infatti, i vini che hanno subito la fermentazione malolattica, in confronto a testimoni che non l'hanno subita, sono dotati di tenori dell'estere carbammico sempre superiori di qualche µg/L. I differenti ceppi di batteri lattici presentano proprietà diverse: i cocchi eterofermentativi del genere *Leuconostoc oenos* ne produrrebbero meno dei ceppi omofermentativi del genere *Lactobacillus plantarum*. Le condizioni di conservazione, in particolare la temperatura, al momento della distribuzione e della commercializzazione, potrebbero rappresentare un fattore determinante per l'incremento del carbammato di etile nei vini. L'evoluzione di questo composto durante l'invecchiamento sembra legata sia alla presenza di urea, sia a quella degli amminoacidi implicati nel ciclo dell'urea.

1.4.8 Le ammine biogene.

Le ammine biogene sono conosciute dai tempi di Ippocrate come responsabili di problemi fisiologici per l'uomo. Dal punto di vista biochimico, le ammine biogene provengono per la maggior parte dalla decarbossilazione degli amminoacidi per azione della decarbossilasi, che ha come cofattore piridossal fosfato dei lieviti e dei batteri. Di conseguenza esse sono di origine fermentativa. Certi ceppi batterici, come *Pediococcus* o *Lactobacillus*, possono possedere questo tipo di enzima o sono capaci di biosintetizzarlo per induzione, in presenza dell'amminoacido precursore. Un amminoacido precursore di diverse ammine biogene è l'arginina. La sua decarbossilazione ad opera della arginina-decarbossilasi batterica, conduce all'agmatina, ammina biogena precursore della putrescina. Quest'ultima può anche avere come precursore diretto l'ornitina e originare due nuove ammine biogene, la spermidina e la spermina. Infine, l'arginina è il precursore, in modo più o meno diretto, di quattro ammine biogene.

A queste ammine, bisogna ancora aggiungere la metilammina, la dimetilammina, l'etilammina, l'esilammina, l'isopentilammina, la piperidina, la propilammina, la pirrolidina e la triptamina. La loro presenza nei vini sarebbe dovuta principalmente all'attività batterica. L'intervento della fermentazione malolattica spiegherebbe perché i vini rossi ne contengano quantità superiori rispetto ai bianchi non disacidificati biologicamente. I tenori delle diverse ammine che si riscontrano nei vini sono dell'ordine di qualche mg/L o di qualche decina di mg/L. L'istamina appare durante la fermentazione alcolica, quale che sia il ceppo di lievito; essa poi aumenta durante la fermentazione malolattica. Non esiste una relazione fra il contenuto di istidina dei mosti e il contenuto di istamina dei vini corrispondenti. Quest'ultimo, generalmente intorno a qualche mg/L, può superare in certi vini, 10 mg/L, valore considerato come limite massimo dalla legislazione di certi paesi. La causa esatta e le condizioni responsabili di una formazione importante di istamina nei vini, non sono ancora ben note; l'intervento di ceppi batterici specifici, ricchi in istidina decarbossilasi appare l'ipotesi più verosimile.

1.4.9 Le proteine.

Le proteine sono costituenti strutturali e funzionali essenziali del mondo vivente. Si tratta di macromolecole di peso molecolare superiore a 10.000 formate da una sequenza definita di amminoacidi, legati fra loro da legami peptidici. Dato che le proteine vengono precipitate dai tannini, i vini rossi praticamente non ne contengono allo stato libero; i vini bianchi e rosati, al contrario, presentano tenori di queste sostanze che possono raggiungere valori di qualche centinaio di mg/L e che provengono essenzialmente dall'uva.

Le proteine del mosto sono una causa ben nota di instabilità della limpidezza dei vini bianchi. La loro precipitazione costituisce la «casse proteica» segnalata fin dal 1904 da Laborde e per molto tempo confusa con la «casse bianca» o con la «casse rameica». Gli intorbidamenti o depositi caratteristici della «casse proteica» appaiono in bottiglia durante la conservazione a temperatura elevata o in seguito ad arricchimento del vino in tannini del tappo e, insieme alle precipitazioni tartariche, sono responsabili dei principali inconvenienti a carico della limpidezza dei vini bianchi in bottiglia.

L'aumento dei tenori in azoto peptidico, passando dal mosto al vino, durante la fermentazione alcolica e l'affinamento sui lieviti, è dovuto alla liberazione da parte dei lieviti, nel corso dell'autolisi, di peptidi considerati termostabili. Al contrario, le proteine termosensibili che provengono dal mosto, generalmente, presentano tenori costanti nel corso della fermentazione; esse non sono assimilate dai lieviti in quanto sono resistenti alle proteasi di questi microrganismi.

Studiando le proteine dei vitigni Riesling per elettroforesi su gel di poliacrilamide, Hsu e Heatherbell hanno osservato che, quelle che contribuiscono all'instabilità proteica dei vini, sono identiche alle proteine dei mosti ed hanno massa molecolare compresa fra 12.500 e 30.000 Da e punti isoelettrici da 4,1 a 5,8; alcune sono glicosilate. Sembra, pertanto, che le proteine responsabili dell'instabilità dei vini bianchi provengano esclusivamente dall'uva e presentino masse molecolari relativamente piccole, comprese fra 12.000 e 35.000 Da. Inoltre, la natura di queste proteine, il loro punto isoelettrico, il loro grado di glicosilazione e la loro termostabilità variano secondo la cultivar.

Il tenore in proteine dei mosti dipende dalla varietà, dal grado di maturità dell'uva e dalle operazioni prefermentative. Per i vitigni bianchi del Bordoiese (Sauvignon, Sémillon, Muscadelle), il tenore in proteine termicamente instabili dei mosti aumenta durante la maturazione dell'uva. I mosti ottenuti per immediata pressatura da uve Sauvignon e Muscadelle a maturità, presentano tenori in proteine simili. Nelle stesse condizioni di estrazione del succo (con o senza macerazione pellicolare), il contenuto in proteine di un mosto da uve Sémillon proveniente dallo stesso terroir è più basso. Per il Sauvignon e il Sémillon a maturità, la macerazione pellicolare provoca, in confronto alla pressatura immediata, aumenti importanti dei tenori in proteine termicamente instabili il cui contenuto raddoppia nel caso dei mosti Sauvignon e aumenta del 50% nel caso dei mosti Sémillon. La diffusione di tali proteine nel mosto avviene fin dalle prime ore di macerazione. Anche il solfitaggio del pigiato, a basse dosi, durante la macerazione, favorisce l'estrazione delle proteine; per limitare i fenomeni ossidativi, di conseguenza, è preferibile realizzare il contatto succo-bucce in atmosfera inerte di CO₂ e diminuire la dose di SO₂. Infine, i succhi provenienti dalla pressatura immediata delle uve diraspate sono nettamente più ricchi in proteine di quelli ottenuti per pressatura immediata delle uve intere. I tannini dei raspi, pertanto, hanno una spiccata attitudine a fissare le proteine del mosto al momento della pressatura delle uve. Le vendemmie meccaniche, che comportano l'eliminazione dei raspi, possono essere considerate come uno dei fattori più importanti dell'instabilità proteica dei vini di certe varietà.

1.5 I composti fenolici.

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. Durante la vinificazione vengono estratti dalle differenti parti dell'acino d'uva e subiscono sensibili variazioni di struttura nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino, in funzione delle condizioni in cui tali processi vengono attuati, in quanto substrati di reazioni di polimerizzazione, di ossidazione, di condensazione e di idrolisi.

1.5.1 Gli acidi fenolici e i loro derivati.

Le uve e i vini contengono acidi fenolici di tipo benzoico e cinnamico, la cui concentrazione varia da 100 a 200 mg/L nei vini rossi e da 10 a 20 mg/L nei vini bianchi. Sono noti sette acidi del tipo benzoico (C6-C1) (Figura 1.7), due dei quali, l'acido salicilico (acido orto-idrossibenzoico) e l'acido gentisico (acido 2,5-diidrossibenzoico) sono allo stato di tracce. Essi differiscono per il grado e per la natura dei sostituenti dell'anello benzenico e si trovano nell'uva soprattutto sotto forma di eterosidi, da cui sono liberati per idrolisi acida, e di esteri (tannini gallici ed ellagici), da cui sono liberati per idrolisi alcalina. Le forme libere sono maggiormente presenti nei vini rossi, a causa dell'idrolisi delle loro forme combinate e di reazioni di degradazione di molecole più complesse, in particolare gli antociani, sotto l'azione del calore.

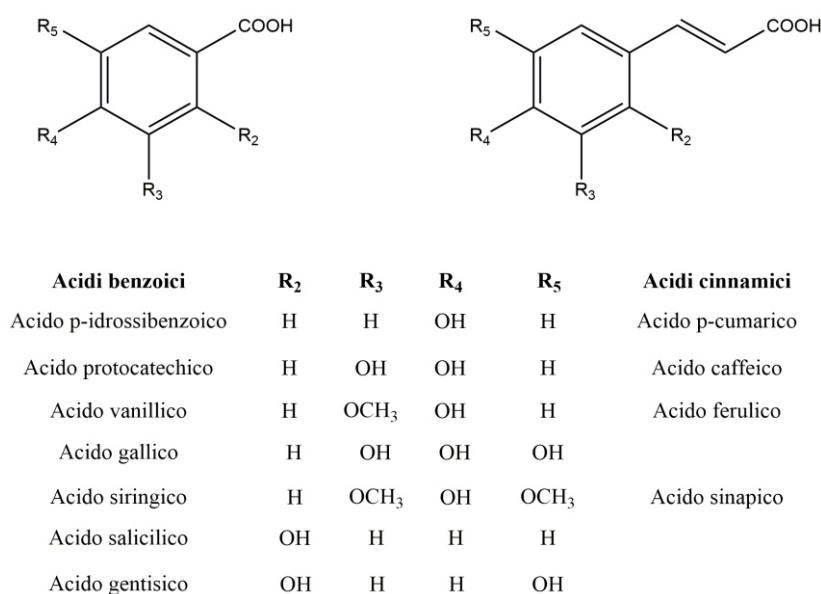


Figura 1.7 Gli acidi fenolici delle uve e dei vini

Nelle uve e nei vini sono presenti anche acidi fenolici del tipo cinnamico (C6-C3) (Figura 1.7). Essi si trovano sotto forma esterificata essenzialmente con l'acido tartarico o come eterosidi del glucosio mentre le forme libere sono poco rappresentate. Gli esteri con l'acido tartarico, in particolare l'acido caftarico (o acido caffeil tartarico), sono i substrati delle PPO (Polifenol ossidasi) dell'uva e sono responsabili dell'imbrunimento dei mosti (Cheynier et al., 1989a e 1989b). Dall'esterificazione del glucosio degli antociani monoglucosidi da parte dell'acido caffeico e dell'acido p-cumarico, hanno origine gli antociani acilati, nei quali il gruppo acilico può anche essere rappresentato dall'acido acetico.

A livello di polifenoli più complessi, è presente nelle uve e nei vini un'altra famiglia di composti che ha assunto negli ultimi anni grande importanza, soprattutto per la sua influenza positiva sulla salute dell'uomo. Si tratta degli stilbeni che possiedono due anelli benzenici uniti per mezzo di una catena etanica o etilenica. Fra questi composti, l'isomero trans del resveratrolo, o 3,5,4'-triidrossistilbene, sarebbe prodotto dalla vite in risposta all'attacco di parassiti fungini. Al resveratrolo, il cui tenore varia da 1 a 3 mg/L, che è localizzato nelle

bucce e che è estratto soprattutto durante la vinificazione in rosso, si attribuiscono diverse proprietà farmacologiche.

1.5.2 I flavoni.

Sono pigmenti di colore giallo più o meno intenso e presentano una struttura caratterizzata da due anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, derivante sia dal nucleo 2-fenil cromone (flavoni e flavonoli), sia dal nucleo 2-fenil cromanone (flavanoni e flavanonoli) (Figura 1.8). I composti più comuni sono i flavonoli, pigmenti gialli delle bucce delle uve nere e bianche e, a un livello meno importante, i flavanonoli di colore molto più pallido. Nelle uve queste molecole si trovano sotto forma eterosidica. Essi si differenziano per i sostituenti dell'anello laterale; si tratta del campferolo (1 OH), della quercetina (2 OH) e della miricitina (3 OH). Questi tre pigmenti sono presenti nelle uve nere, mentre le uve bianche contengono solo i primi due. Il loro contenuto nei vini rossi è pari a un centinaio di mg/L sotto forma di agliconi, originati dall'idrolisi degli eterosidi già durante la vinificazione; nei vini bianchi, la cui fermentazione è realizzata in assenza delle parti solide dell'uva, esso varia da 1 a 3 mg/L secondo le varietà considerate. Il flavanolo più importante fra quelli identificati nelle uve e nei vini è la diidroquercetina, detta anche tassifolina.

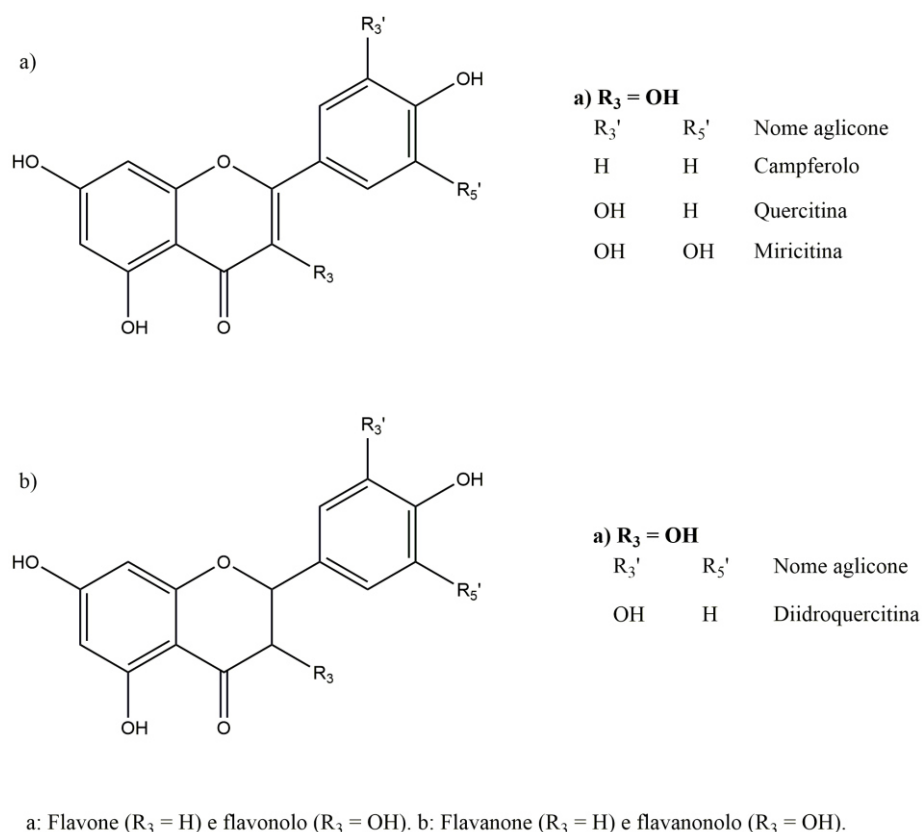


Figura 1.8 I flavoni

1.5.3 Gli antociani.

Gli antociani sono i pigmenti rossi delle uve. Essi si trovano essenzialmente nella buccia, eccezionalmente nella polpa (varietà *teinturiers*), ma sono anche presenti nelle foglie, in quantità tanto più importante quanto più la vite è alla fine del ciclo vegetativo. La molecola

degli antociani è costituita da due anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, insaturo e dotato di carica positiva, lo ione flavilio, che deriva dal 2-fenil-benzopirilio. Nelle uve e nei vini si distinguono, secondo la struttura dell'anello laterale, cinque molecole fondamentali, aventi due o tre sostituenti (OH e OCH₃) (Figura 1.9).

Sotto forma eterosidica (antocianine), queste molecole sono molto più stabili che sotto forma di agliconi (antocianidine). Nelle uve di *Vitis vinifera* e nei vini corrispondenti, sono state identificate solo le antocianidine monoglucosilate e i loro derivati acilati con l'acido p-cumarico, caffeico e acetico.

La presenza di antociani diglucosidi in quantità importante è specifica di certe specie del genere *Vitis* (*V. riparia* e *V. rupestris*); tracce di questi ultimi composti sono state segnalate in certi frutti di *V. vinifera*.

Il colore di questi pigmenti è funzione della composizione del mezzo (pH, SO₂) e dipende dalla loro struttura molecolare e da quella delle sostanze insieme ad essi presenti. Gli antociani si trovano in soluzione soprattutto nel succo vacuolare nelle cellule della buccia insieme ad altri polifenoli (acidi fenolici, flavonoidi...) che ne possono influenzare il colore attraverso il fenomeno della copigmentazione, con spostamento verso il blu.

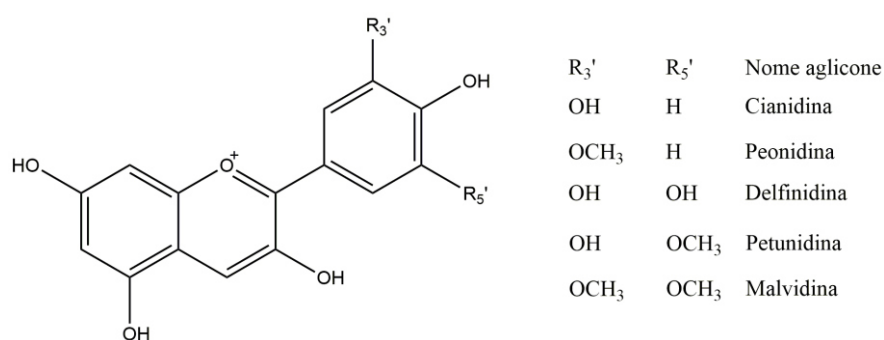


Figura 1.9 Struttura delle antocianidine delle uve e dei vini.

Fra le cinque antocianine, la malvidina monoglucoside (malvina) è la molecola dominante in tutte le varietà; essa varia dal 90% (Grenache) a poco meno del 50% (Sangiovese) sul totale degli antociani e può essere considerata come il composto maggiormente implicato nella formazione del colore delle uve nere e dei vini rossi. Al contrario, il contenuto di monoglucosidi acilati è molto variabile in funzione della varietà. Nel caso del vino da uve di *Vitis vinifera*, gli antociani acilati spariscono rapidamente qualche mese dopo la vinificazione lasciando in prevalenza i cinque monoglucosidi, con una forte predominanza della malvina. Il contenuto di questi composti varia sensibilmente con l'età dei vini e con la natura delle varietà da cui derivano; da 100 mg/L (Pinot) a 1.500 mg/L (Syrah, Cabernet Sauvignon...) dopo la vinificazione, essi diminuiscono rapidamente nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino, fino a raggiungere un valore limite dell'ordine di 0-50 mg/L. La maggior parte di questi pigmenti, tuttavia, si associa o condensa con i tannini del vino per formare un'altra classe di molecole dal colore più stabile; si tratta degli antociani combinati di struttura complessa, responsabili del colore del vino. Un'altra parte di antociani, relativamente piccola, tuttavia, scompare, sia per degradazione sotto l'azione di agenti esterni (temperatura, luce, ossigeno...), sia per precipitazione come materia colorante colloidale.

1.5.4 I tannini.

Per definizione i tannini sono sostanze in grado di originare combinazioni stabili con le proteine e con altri polimeri vegetali, quali ad esempio i polisaccaridi. Dal punto di vista chimico, i tannini sono molecole fenoliche relativamente voluminose che derivano dalla polimerizzazione di molecole monomeriche contenenti funzioni fenoliche e la cui configurazione spaziale è correlata con la loro reattività. È necessario che le loro dimensioni siano sufficientemente grandi perché possano originare combinazioni stabili con le proteine; ma se sono troppo ingombranti rischiano di non potersi avvicinare ai siti attivi di queste molecole e, di conseguenza, la reazione non può avvenire. Le masse molecolari dei tannini attivi sono, generalmente, comprese fra 600 e 3.500 Da. Secondo la natura delle molecole elementari, essi si distinguono in tannini idrolizzabili, in tannini condensati o catechici e i tannini complessi o misti.

I tannini idrolizzabili comprendono i galletannini e gli ellagitannini che liberano rispettivamente acido gallico ed acido ellagico dopo idrolisi acida e che contengono anche una molecola di glucosio. I tannini idrolizzabili non sono tannini naturali dell'uva; al contrario essi costituiscono i principali tannini commerciali utilizzati nel trattamento dei vini. L'acido ellagico eventualmente presente nei vini può provenire sia dal legno del contenitore, sia dall'aggiunta di tannini enologici; mentre l'acido gallico che si trova in tutti i vini, può provenire anche dalle bucce e dai semi dell'uva.

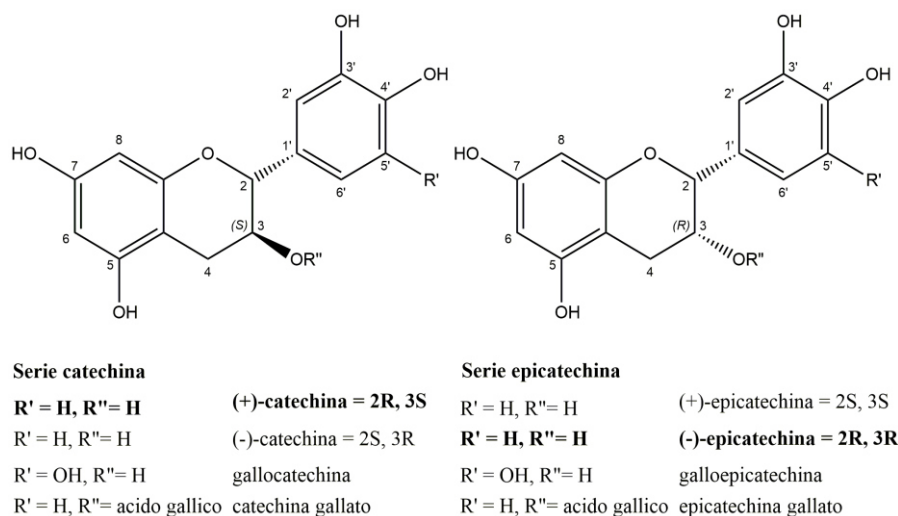


Figura 1.10 Struttura dei precursori delle procianidine e dei tannini.

I tannini condensati dell'uva e del vino sono polimeri più o meno complessi dei flavan-3-oli o catechine; la (+)-catechina e la (-)-epicatechina sono le unità monomeriche fondamentali. Il riscaldamento di questi polimeri in ambiente acido libera carbocationi fortemente instabili che si trasformano in prodotti di condensazione bruni e soprattutto in cianidina e delphinidina rosse, da cui il nome di “procianidine”, “prodelfinidine” o, più in generale “proantocianidine” dato a queste sostanze.

Nell'uva e nel vino, è possibile isolare e frazionare le seguenti molecole: la (+)-catechina, la gallo catechina, la (-)-epicatechina, l'epigallo catechina e l'epicatechina-3-O-gallato, oltre alle procianidine dimere, trimere, oligomere e alle proantocianidine condensate. Le unità

strutturali di base, le catechine, non possono essere considerate come dei tannini in quanto la loro massa molecolare è troppo piccola e la loro reattività nei riguardi delle proteine è molto ridotta. Bisogna arrivare ai dimeri per avere una massa molecolare sufficiente per permettere la formazione di legami stabili con le proteine. Le catechine (Figura 1.10) possiedono due cicli benzenici legati da un ciclo ossigenato saturo (fenil-2-cromano). Questa struttura presenta due carboni asimmetrici (C2 e C3) che sono all'origine di quattro isomeri; la (+)-catechina e la (-)-epicatechina corrispondono alle forme più stabili.

Le procianidine dimere (Figura 1.11) possono essere divise in due categorie, identificate da una lettera dell'alfabeto e da un numero:

- 1) le procianidine del tipo B sono dimeri che risultano dalla condensazione di due unità di flavan-3-oli legati fra loro per mezzo di legame C4-C8 (da B1 a B4) o C4-C6 (da B5 a B8)
- 2) Le procianidine del tipo A sono dei dimeri che possiedono, oltre al legame interflavanico C4-C8 o C4-C6, un legame tipo etere fra i carboni C5 o C7 dell'unità terminale e il carbonio C2 dell'unità superiore.

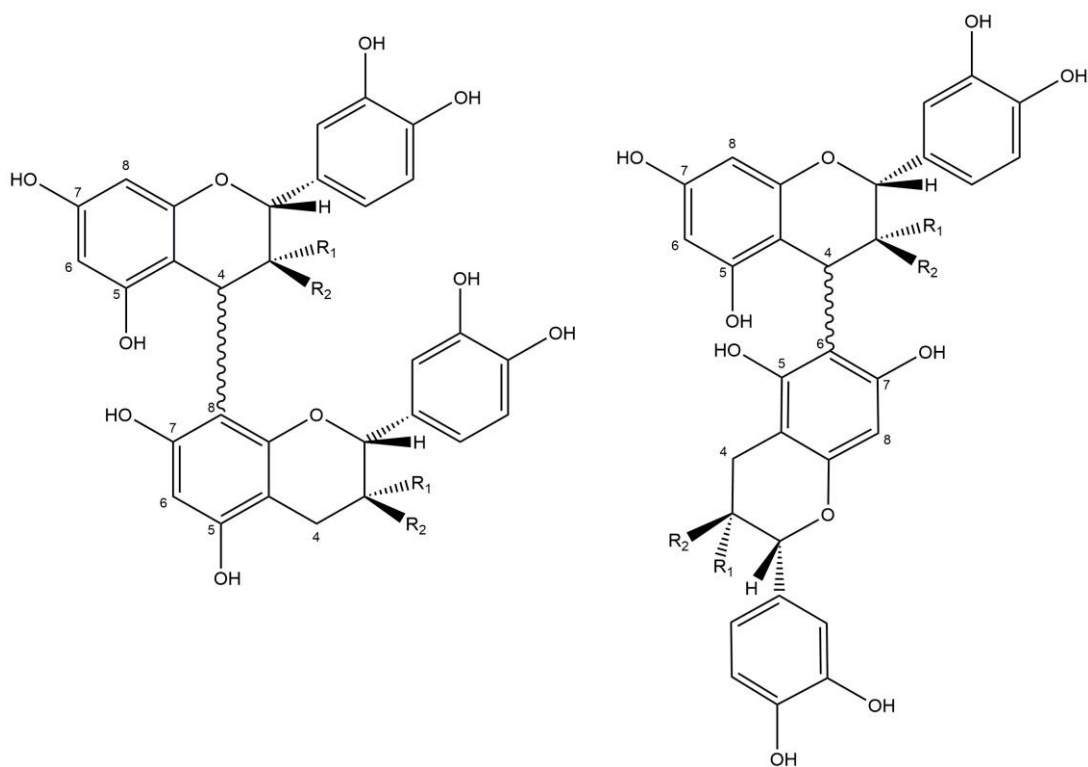


Figura 1.11 Struttura delle procianidine dimere di tipo B

Similmente le procianidine trimere possono essere classificate in due categorie:

- 1) le procianidine del tipo C che sono dei trimeri in cui i due legami interflavanici corrispondono al tipo B dei dimeri;
- 2) le procianidine del tipo D sono dei trimeri in cui un legame interflavanico è del tipo B e l'altro del tipo A

Le procianidine oligomere corrispondono a polimeri formati da unità di flavan-3-oli (da tre a dieci), legati per mezzo di legami C4-C8 o C4-C6.

I tannini condensati, in particolare le procianidine, così come le catechine, sono presenti in tutte le parti solide dell'uva (bucce, semi, raspo) e passano nel vino durante la fase di macerazione. Il loro tenore nel vino rosso dipende dalla varietà e, soprattutto, dalle condizioni di vinificazione ed è compreso fra 1 e 4 g/L. Nel caso dei vini bianchi secchi, il grado di chiarifica condiziona la concentrazione in tannini, che risulta compresa entro 100 mg/L, quando la chiarifica è stata fatta accuratamente, e fra 200 e 300 mg/L se la fermentazione avviene in presenza di torbido d'uva.

1.6 L'estratto secco e le sostanze minerali.

L'estratto secco totale o materie secche totali, rappresenta l'insieme di tutte le sostanze che non volatilizzano in condizioni fisiche tali da evitare la loro alterazione. Esso comprende le sostanze organiche non volatili e le sostanze minerali del vino. Al momento della combustione dell'estratto, i costituenti organici sono trasformati in CO₂, e in H₂O, mentre le sostanze minerali danno carbonati e sali di anioni inorganici che costituiscono le ceneri.

Gli acidi organici dell'acino d'uva, gli acidi tartarico e malico, sono in parte salificati dagli ioni potassio e calcio. A tale salificazione si deve il potere tampone nei riguardi degli acidi e delle basi del mosto e del vino.

A questi due cationi, che sono anche i più rappresentati, bisogna aggiungere altri elementi minerali come il ferro, il rame, il magnesio e il manganese, la cui presenza è essenziale per il metabolismo di tutte le cellule, in quanto hanno funzione di cofattori aprotici nell'attività di certi enzimi, quali ad esempio, le ossidoreduttasi e le chinasi.

Tutti gli anioni e i cationi minerali sono presenti naturalmente nei mosti e nei vini in tenori tali da non destare preoccupazioni di ordine tossicologico capita, tuttavia che certi metalli, come il piombo, lo zinco, lo stagno e il mercurio si ritrovino in quantità superiore alla soglia di guardia a causa dell'influenza dell'ambiente e delle pratiche colturali della vite.

Nel caso del vino, mezzo biologico, l'estratto secco totale, non è costituito soltanto da sostanze minerali ma anche da sostanze organiche diverse dagli zuccheri. Per questo motivo un vino secco, esente cioè da zuccheri fermentescibili, possiede un valore dell'estratto secco sensibilmente superiore a quello di un'acqua minerale. Inoltre, il peso dell'estratto secco totale è influenzato oltre che dalle tecniche di vinificazione adottate, dalla pigiatura, dalla diraspatura, dalla macerazione, dalla durata della fermentazione, fattori che, singolarmente, favoriscono l'estrazione delle sostanze minerali e organiche dell'uva e che hanno, in linea di principio, una influenza sul tenore in sostanze non volatili.

1.6.1 Le ceneri.

Il contributo delle sostanze organiche all'estratto secco di un vino, è più importante di quello delle sostanze minerali. Queste ultime sono rappresentate dalle ceneri che corrispondono all'insieme dei prodotti dell'incenerimento del residuo dell'evaporazione del vino, condotto in

modo da ottenere la totalità dei cationi sotto forma di carbonati e di altri sali minerali anidri, Il catione ammonio, che fa parte di certi sali, ha la proprietà di sublimare e per questa sua caratteristica non è compreso nella totalità dei cationi delle ceneri. Il peso delle ceneri varia generalmente da 1,5 a 3 g/L per i vini comuni. Le sostanze minerali sono localizzate soprattutto nelle parti solide dell'uva: bucce, semi, pareti cellulosepectiche delle cellule della polpa.

1.6.2 Gli anioni minerali.

I principali anioni minerali dei mosti e dei vini corrispondono a sali più o meno solubili. I nitrati, presenti nei vini solo allo stato di tracce, sono noti per essere sali molto solubili. I cloruri, eccetto i cloruri di piombo, di argento e di mercurio, sono ugualmente solubili. Il loro tenore, espresso in cloruro di sodio, generalmente, è inferiore a 50 mg/L e può superare 1 g/L nei vini ottenuti da uve raccolte in particolari territori. A questi bisogna aggiungere ancora gli anioni fosforico e solforico. Il vino contiene allo stato naturale, cioè proveniente solo dall'uva senza alcun trattamento, solo piccoli tenori in solfati, compresi fra 100 mg/L e 400 mg/L espressi come K_2SO_4 , che, però, aumentano progressivamente nel corso della conservazione, a causa dei solfitaggi e dell'ossidazione della SO_2 . Il fosforo esiste naturalmente nei vini sotto forma minerale e organica. I vini bianchi contengono da 70 a 500 mg/L di fosfati, mentre nei vini rossi il tenore va da 150 mg/L a 1 g/L. Queste ampie variazioni sono legate all'aggiunta di fosfato ammonico per migliorare il corso della fermentazione alcolica dei mosti. Fra gli altri anioni minerali che esistono nel allo stato di tracce, si possono citare il bromo, lo iodio, il fluoro, l'acido silicico e l'acido boricco.

1.6.3 I cationi minerali.

I cationi giocano un ruolo importante in enologia alcuni di essi devono essere tenuti sotto controllo in quanto sono coinvolti nella formazioni di precipitati. È, ad esempio, il caso del potassio, del calcio, del ferro trivalente e del rame a stato di ossidazione 1 che possono precipitare, rispettivamente, come bitartrato, tartrato, fosfato e solfuro. Come in tutti i vegetali e i loro derivati, il potassio è il catione dominante nei vini. Il suo contenuto varia da 0,5 a 2 g/L, con una media di 1 g/L. I vini ottenuti con uve appassite, attaccate da marciume nobile, sono i più ricchi; i vini rossi ne contengono più dei vini bianchi secchi, a causa dell'inibizione della precipitazione del bitartrato di potassio da parte dei composti fenolici.

Il calcio è un catione i cui sali sono, generalmente, poco solubili. L'ossalato, ad esempio, è uno dei meno solubili. Anche il tartrato di calcio è un sale poco solubile, soprattutto in presenza di etanolo e, come il gluconato di calcio riscontrato nei vini prodotti da vendemmie botritizzate, può formare precipitati cristallini. I tenori in calcio dei vini sono dell'ordine di qualche decina di milligrammi per litro, un po' più elevati nei bianchi che nei rossi, ma possono aumentare nel caso della disacidificazione con carbonato di calcio. Trattandosi di uno ione bivalente esso esercita un'azione più energica del potassio nella flocculazione e nella precipitazione dei colloidali: ad esempio, fosfato ferrico, complesso tannini-gelatina, ecc.

Il sodio, che pure è il catione più rappresentato nell'universo, è poco abbondante nel vino. Il suo tenore si attesta fra 10 e 40 mg/L, ma aumenta nel caso in cui il vino sia stato addizionato di bisolfito di sodio o sia stato trattato con bentoniti insufficientemente purificate. Come nel

caso dell'anione cloruro, il suo tenore è più elevato nei vini prodotti con uve provenienti da vigneti situati in particolari territori.

Il contenuto in magnesio dei vini varia da 60 a 150 mg/L ed è di solito maggiore di quello del calcio, in quanto, a differenza di questo, i suoi sali sono tutti solubili e non diminuiscono durante la fermentazione e la conservazione. Il manganese è presente in tutti i vini in piccola quantità (da 1 a 3 mg/L), di solito legata al contenuto di questo elemento nel terreno della zona da cui l'uva proviene. La macerazione che si effettua nella fermentazione in rosso, porta ad un suo incremento in quanto i semi ne contengono tre volte più della buccia e trenta volte più della polpa. Questo elemento, come lo zinco, può provenire anche dai trattamenti della vite con fungicidi come i ditiocarbammati. Il ferro e il rame, pur se presenti in piccola quantità, giocano un ruolo particolare nell'instabilità del vino in quanto responsabili della casse ferrica e della casse rameica.

CAPITOLO 2

VITIGNI CONSIDERATI

2.1 Il vino in Piemonte.

La vite e il vino hanno conquistato, in Piemonte, un ruolo di grande rilievo, non soltanto nel comparto agroalimentare ma anche come coprotagonisti di uno sviluppo complessivo del territorio in termini socio-economici e culturali.

La vocazione delle colline del Piemonte a produrre grandi vini è storia antica; ma il prodotto vino, a poco a poco, è diventato il vero e proprio lievito economico dell'intera area di produzione, facendo crescere la propria immagine ed il proprio valore ed innescando lo sviluppo delle attività ad esso collegate.

La fisionomia del settore vitivinicolo piemontese è delineata attraverso i dati statistici che segnalano nel 2013 circa 50 mila ettari di superficie a vite, e una trasformazione in vino di circa 3 milioni di ettolitri con un giro d'affari di circa 1,4 miliardi di euro. Sui mercati esteri va circa il 60% dei vini piemontesi, ovvero: 63 milioni di bottiglie di Asti, 20 milioni di Moscato d'Asti, 8 milioni di Barolo, 2,5 milioni di Barbaresco, 10 milioni di Barbera d'Asti, 8 milioni di Gavi, 1,5 milioni di Brachetto d'Acqui.

L'aspetto di maggior valore e significato è infatti quello qualitativo, ciò che fa del Piemonte una tra le regioni leader dell'enologia italiana ed anche mondiale. La qualità dei vini piemontesi nasce nel vigneto, tutto collinare e con basse rese. La dedizione e la professionalità dei viticoltori nel produrre le uve sono parte imprescindibile della qualità che i maestri di cantina traspongono, esaltandola, nel vino.

Oltre il 70 per cento della produzione vinicola regionale è rappresentata da vini a denominazione d'origine e, precisamente, da 18 DOCG (denominazione d'origine controllata e garantita) e 42 DOC (denominazione d'origine controllata).

Il territorio del Piemonte si trova per il 30% in collina, per il 26% in pianura e per il 44% in montagna. Con ciò, più del 90% della produzione vitivinicola regionale avviene nelle zone collinari, con sistemi di allevamento moderni (guyot, controspalliera). I vitigni coltivati sono perlopiù a bacca rossa, con qualche rimarchevole eccezione autoctona a bacca bianca.

Otto sono le zone vitivinicole principali in questa regione:

1) Zona a nord di Novara e Vercelli dove troviamo le DOCG Gattinara e Ghemme ed anche le DOC Lessona, Bramaterra, Boca, Sizzano e Fara. Vitigni principali il Nebbiolo, chiamato in questa zona Spanna, la Croatina, la Barbera e il bianco Erbaluce.

2) Al confine con la Valle d'Aosta troviamo le DOC Canavese e Carema, sempre con i vitigni Nebbiolo ed Erbaluce.

3) Vicino a Torino la DOC Collina Torinese (vitigni Freisa, Barbera, Bonarda e Dolcetto) e la DOCG Erbaluce di Caluso.

4) La zona del Monferrato, compresa tra Asti, Casale Monferrato, Ovada e Gavi comprende tra le altre le DOCG Barbera del Monferrato Superiore, Brachetto d'Acqui, Dogliani, Ovada, Gavi e Ruchè di Castagnole Monferrato, con i vitigni Moscato Bianco, Cortese, Grignolino, le Malvasie a bacca nera di Casorzo e di Schierano, in aggiunta agli altri già menzionati.

5) L'Astigiano, importante zona spumantistica con il Moscato bianco, che comprende anche la DOC Loazzolo famosa per il Moscato passito.

6) La zona del Tortonese in cui, oltre a Cortese e Barbera, segnaliamo il bianco autoctono Timorasso.

7) Il fiume Tanaro divide due delle più importanti zone vinicole della regione: a sinistra del fiume la DOCG Roero con i vitigni Nebbiolo, Barbera ed Arneis

8) a destra la Langa, con le DOCG Barolo, Barbaresco (Nebbiolo, ma anche Ruché, Barbera e Dolcetto) e Dogliani (Dolcetto).

Il prodotto vino rappresenta una delle realtà maggiormente “indagate” rispetto al comparto agroalimentare piemontese. La dettagliata conoscenza del comparto consente, quindi, scelte ragionate negli indirizzi di politica vitivinicola da parte delle istituzioni ma anche degli imprenditori. Questo permette da un lato, di fornire agli operatori aggiornate informazioni di tipo tecnologico-produttivo ed economico e, dall'altro, di rendere il consumatore sempre più avveduto nelle sue scelte di consumo e consapevole della complessa realtà produttiva di cui la bottiglia acquistata è la felice sintesi.

In questo ambito si inserisce anche questo lavoro di tesi che tende ad evidenziare l'importanza dell'approccio metabolomico applicato al settore enologico. In particolare in questa tesi si sono studiati trentatré vini provenienti da sette vitigni normalmente coltivati in Piemonte. I sette vitigni studiati sono: Barbera, Dolcetto, Nebbiolo, Grignolino, Ruchè, Cortese e Chardonnay. Per l'elenco completo dei vini considerati si veda la tabella 4.3.

2.2 Il vitigno Barbera.

2.2.1 Descrizione Ampelografica.

Per la descrizione del vitigno venne scelto un clone in comune di Nizza Monferrato; ma i caratteri vennero confrontati e controllati nelle varie zone piemontesi tipiche di coltura del vitigno.

Germoglio di 10-15 cm

Apice: espanso, biancastro con orli terminali con tomento aracnoideo.

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): spiegate, pagina superiore con tomento aracnoideo, pagina inferiore con fitto tomento cotonoso, biancastro; colore della lamina verde, con sfumature rossastre ed orlo parzialmente carminato.

Foglioline basali (dalla 4a in poi):



Figura 2.1 Apice di Barbera

spiegate; pagina superiore con tomento aracnoideo, pagina inferiore con tomento lanuginoso, di color verde opaco.

Asse del germoglio: per lo più ricurvo.

Germoglio alla fioritura

Apice: espanso, verde biancastro con punte rosso-carminio; con tomento aracnoideo.

Foglioline apicali: piegate a doccia la 1a e la 2a; spiegate e rivolte all'indietro le altre; pagina superiore con tomento aracnoideo, pagina inferiore cotonosa, biancastra; colore verde parzialmente carminato.

Foglioline basali: spiegate, pagina superiore glabra, pagina inferiore vellutata, di colore verde, con picciolo striato in rosso.

Asse del germoglio: ricurvo.

Tralcio erbaceo: a sezione quasi circolare, ma alquanto angoloso, con tomento aracnoideo nella parte apicale; poi quasi glabro; colore verde, con qualche striatura rossa.

Viticci: bi e trifidi, lunghi, intermittenti (formula: 0-1-2-0-1-2-0).

Infiorescenza: normalmente conica, lunghezza media 10-15 cm.

Fiore: ermafrodita, con 5 stami (talora 6), di color verde; apertura della corolla normale; auto fertile.

Foglia: di grandezza media, pentagonale, quinquelobata; con seno peziolare a lira, per lo più chiuso, e anche con bordi sovrapposti; seni laterali superiori a lira, per lo più chiusi, talvolta con bordi sovrapposti; seni laterali inferiori un po' meno profondi, per lo più aperti; pagina superiore glabra, di color verde cupo (talora già durante l'estate arrossate o bronzate), con nervature verdi sfumate



Figura 2.2 Foglia di Barbera.

in rosso presso la base; pagina inferiore tomentosa, con le nervature di 1°, 2°, 3° ordine setolose, di color verde chiaro, sfumate in rosso presso la base; lembo piano, leggermente bollosa; denti irregolari, a base larga.

Picciolo: di media lunghezza, rossiccio.

Colorazione autunnale delle foglie: rossiccia, non di rado anche rosso vivo.

Grappolo a maturità industriale: di grandezza media, per lo più piramidale, più raramente cilindrico; talora piuttosto sciolto, talora compatto (a seconda delle condizioni ambientali e colturali); peduncolo abbastanza lungo, semi-legnoso, sovente bruno-rossiccio; pedicelli di media lunghezza, sovente rossicci; cercine evidente; pennello corto, rosso.



Figura 2.3 Grappolo di Barbera.

Acino: medio, ellissoide, regolare; buccia molto pruinosa, di color blu

intenso tannica, sottile ma abbastanza consistente; polpa molto succosa, di sapore semplice, dolce ma acidulo; succo incolore.

Vinaccioli: per lo più 2, raramente 3, grandezza un po' più che media, con becco lungo e sottile.

Tralcio legnoso: robusto, ma con legno piuttosto tenero, elastico; corteccia ben aderente, di color bruno piuttosto scuro, fortemente striata; sezione ellittica; nodi con gemme bene sporgenti, coniche; internodi di lunghezza media (di 10-12 cm).

Tronco: robusto.

2.2.2 Fenologia.

Condizioni d'osservazione: Il clone descritto è situato in comune di Nizza Monferrato, nelle seguenti condizioni:

Ubicazione

Longitudine: 8°20'15" E (Greenwich); 4°6'45" O (Monte Mario);

Latitudine: 44°46' N;

Altitudine: m 190 s.l.m;

Esposizione: sud;

Portinnesto: "Berlandieri" x "Riparia 420 A";

Età delle viti: 25 anni;

Sistema di allevamento: a filare basso;

Sistema di potatura: tipo Guyot;

Terreno: collinare, di medio impasto (argilloso-calcareo).

Fenomeni vegetativi

Germogliamento: medio-precoce (per lo più nella prima metà di Aprile).

Fioritura: media (per lo più nella prima decade di Giugno).

Invaiaitura: media (per lo più verso la metà di Agosto).

Maturazione dell'uva: III epoca (per lo più ai primi di Ottobre).

Caduta delle foglie: per lo più verso la metà di Novembre.

2.2.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali.

Vigoria: buona, ma non eccezionale. Nella sua zona più tipica di coltura viene allevato con sistemi tipo Guyot, per lo più con un solo capo a frutto relativamente lungo (10, anche 12 gemme), molto più raramente con due capi a frutto.

Produzione: è considerata una delle più costanti per i vitigni piemontesi, e, relativamente, abbondante; solo in annate decisamente sfavorevoli può andar soggetta a colatura.

Posizione del primo germoglio fruttifero: 3° nodo (più raramente 2°).

Numero medio di infiorescenze per germoglio: per lo più 2 (raramente 1).

Fertilità delle femminelle: trascurabile.

Resistenza ai parassiti ed altre avversità: piuttosto sensibile alle gelate e brinate (relativamente ad esempio al "Freisa"). Quanto alla resistenza alle malattie crittogamiche, i pareri non sono sempre concordi: chi lo considera più ricettivo all'oidio che alla peronospora; chi al contrario; tuttavia si può bene difendere da entrambe queste crittogame. In autunni piovosi l'uva va piuttosto soggetta al marciume, anche perché piuttosto attaccata dalle tignole (specialmente la cosiddetta "Barbera grossa", a grappoli serrati).

Comportamento rispetto alla moltiplicazione per innesto: oggi i portinnesti preferiti sono il "420" e il "Kober 5BB" (quest'ultimo tende a prevalere sul primo, ma non dappertutto la maturazione dell'uva avviene con esso egualmente bene). Poco usata la "Ruprestis du Lot" (che può provocare colatura) e, nei terreni molto calcarei, il "41 B" (che in qualche caso ha dimostrato di ritardare la maturazione). Ormai abbandonati gli ibridi di "Riparia" x "Rupestris", specialmente per le frequenti fallanze lamentate negli innesti sul "3309".

2.3 Il vitigno Dolcetto.

2.3.1 Descrizione Ampelografica.

La descrizione di questo vitigno è stata effettuata su d'un clone sito in comune di Strevi (Alessandria). I caratteri vennero poi confrontati e controllati nelle varie zone tipiche di coltura delle provincie di Alessandria e di Cuneo. Inizialmente s'erano posti allo studio due cloni: uno di "Dolcetto a raspo rosso", l'altro di "Dolcetto a raspo verde"; ma quest'ultimo poi venne abbandonato, allorché risultò trattarsi di semplici modificazioni ambientali nel solo colore del raspo.

Germoglio di 10-20 cm

Apice: cotonoso, verde con sfumature vinose carminate.

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): la prima (in alto) a gronda, le altre spiegate; cotonose inferiormente (le prime due aracnoidee nella pagina superiore), rosso vinoso intenso, che traspare sotto la pelurie.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): spiegate, glabre superiormente, leggermente tomentose inferiormente;

di color verde, con gli orli carminati.

Asse del germoglio: ricurvo.



Figura 2.4 Apice di Dolcetto

Germoglio alla fioritura

Apice: espanso, con tomento aracnoideo, verde, con sfumature vinose.

Foglioline apicali: la prima (verso l'alto) a coppa; le altre spiegate, con tomento aracnoideo, verdi, con sfumature vinose.

Foglioline basali: spiegate, glabre superiormente, con tomento aracnoideo inferiormente; verdi, con orlature carminate; nervature delle foglioline di color rosso vinoso.

Tralcio erbaceo: a sezione ellittica, con contorno angoloso, glabro, verde (ma rosso vinoso dalla parte del sole).

Vitici: intermittenti (formula: 0-1-2-0-1-2...), bifidi o trifidi, medi o lunghi, dapprima rossicci, poi verdi.

Infiorescenza: di media lunghezza (12-14 cm), di forma piramidale.

Fiore: bottone florale globoso; fiore ermafrodita, auto fertile, di color verde-chiaro; corolla normale (a cappuccio); stami 5 (raramente 6).

Foglia: di grandezza media o meno, pentagonale, un po' più larga che lunga; per lo più quinquelobata; seno peziolare a V largamente aperto; seni laterali superiori profondi, a lira, poco aperti o quasi chiusi; inferiori meno profondi, poco aperti o più o meno chiusi; pagina superiore glabra, liscia; pagina inferiore con leggero tomento aracnoideo; nervature sporgenti,



Figura 2.5 Foglia di Dolcetto

sfumate in rosso per lungo tratto in vicinanza dell'inserzione col picciolo, aracnoidee; lembo generalmente quasi piano, ma con lobi rovesciati in basso; lobo terminale acuto; denti irregolari, acuti, convessi; colore della pagina superiore verde cupo, con sfumature rosse agli orli; della pagina inferiore verde chiaro.

Picciolo: di lunghezza e grossezza media, pressoché glabro, con canale poco evidente, di color rosso vinoso.

Colorazione autunnale delle foglie: verde, con intense sfumature rosso-vinose.

Grappolo a maturità industriale: di grandezza media o più, mediamente spargolo; piramidale piuttosto lungo (18-20 cm), alato (con 1-2 ali); peduncolo piuttosto grosso, bruno; pedicelli medi, rossi o rosso bruni a maturità; cercine evidente, rosso; pennello medio, rosso vinoso; separazione dall'acino: facile (non di rado anche troppo).



Figura 2.6 Grappolo di Dolcetto

Acino: di grandezza media (12 mm), di forma rotonda, ma non sempre costante, come non è sempre uguale la

grandezza degli acini nello stesso grappolo; ombelico persistente; buccia ben pruinosa, di color nero bluastro, sottile; polpa succosa, di sapore molto dolce, semplice, gustosa; succo incolore.

Vinaccioli: da 1 a 3, piriformi, con becco sottile, di grandezza media.

Tralcio legnoso: di lunghezza media o più; robusto; con corteccia aderente, resistente; sezione circolare; superficie liscia, parzialmente pruinosa; nodi globosi; glabri; internodi di media lunghezza (cm 8-12); colore grigio-nocciola, con nodi più scuri; gemme coniche molto sporgenti; cercine peziolare largo, sporgente; diaframma convesso; midollo non molto abbondante.

Tronco: abbastanza robusto.

2.3.2 Fenologia.

Condizioni di osservazione: il clone prescelto è situato in comune di Strevi (Alessandria).

Ubicazione

Longitudine: 3°9' O (Monte Mario);

Latitudine: 44°41' N;

Altitudine: circa m 230 s.l.m.;

Esposizione: sud-ovest;

Portinnesto: "Berlandieri" x "Riparia A 420";

Età delle viti: anni 20;

Sistema d'allevamento: a filari bassi;
Forma di potatura: tipo Guyot;
Terreno: collinare, calcareo-siliceo-argilloso.

Fenomeni vegetativi

Germogliamento: piuttosto precoce (prima metà d'Aprile).
Fioritura: piuttosto precoce (fine Maggio-prima decade di Giugno).
Invaiaatura: piuttosto precoce (prima decade d'Agosto)
Maturazione dell'uva: fine I epoca - inizio II (seconda metà di Settembre).
Caduta delle foglie: prima metà di Novembre.

2.3.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali.

Vigoria: media (inferiore al "Barbera"). Vuole perciò sistemi di allevamento e potatura non espansi, tipo Guyot, con un solo capo a frutto per lo più di 6-8 gemme.

Produzione: buona e regolare solo nelle località che meglio si confanno; se no, irregolare, molto variabile da un anno all'altro (nelle zone poco adatte, lascia facilmente cadere gli acini alla maturità). Si sarebbe anche osservata una colatura un po' più accentuata nel "Dolcetto a graspo rosso" che in quello a "graspo verde".

Posizione del primo germoglio fruttifero: per lo più al 3° nodo, più di rado al 2°.

Numero di infiorescenze per germoglio: per lo più 2.

Resistenza alle avversità: in generale si considera meno resistente alle malattie crittogamiche del "Barbera", e anche alle tignole. E' invece ritenuto più resistente alle avversità atmosferiche (geli, grandine).

Comportamento rispetto alla moltiplicazione per innesto: in generale buono. Dimostra buona affinità col "420 A", "Kober 5BB" ("Teleki"), e anche "Rupestris du Lot", "3309", "161-49", "41 B". Ma al di fuori delle zone tipiche sembra che l'innesto sulle viti americane abbia accentuato il difetto di lasciar cadere gli acini a maturazione.

2.4 Il vitigno Cortese.

2.4.1 Descrizione Ampelografica.

La descrizione è stata fatta su d'un clone di "Cortese" situato in comune di Gavi (Alessandria), e i dati vennero controllati su altro clone coltivato in comune di Melazzo, e con altri delle Province di Alessandria e Asti.

Germoglio di 10-20 cm

Apice: medio, lanuginoso, verde biancastro, con riflessi bronzii e sfumature carminate agli orli.

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): spiegate, con leggero tomento aracnoideo, di color verde giallognolo chiaro, con sfumature rossastre, con l'apice dei dentelli color giallo dorato.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): Asse del germoglio: ricurvo. Nell'insieme il germoglio si presenta di color verde-chiaro, con riflessi bronzati più accentuati verso la punta.



Figura 2.7 Apice di Cortese

Germoglio alla fioritura

Apice: espanso, lanuginoso, di color verde-biancastro (nel clone di Melazzo con sfumature carminate ai bordi).

Foglioline apicali: spiegate, cotonose (con tomento più fitto alla pagina inferiore); di colore verde biancastro chiaro.

Foglioline basali: spiegate, con tomento aracnoideo più fitto nella pagina inferiore; di color verde con riflessi giallo-dorati superiormente, più chiaro inferiormente.

Asse del germoglio: a pastorale.

Tralcio erbaceo: a sezione ellittica, con contorno un po' angoloso, con tomento aracnoideo diffuso, di color verde con striature vinose dalla parte del sole.

Viticci: bifidi o infidi, formula: 0-1-2-0-1-2-0...

Infiorescenza: lunga (18 a 24 cm).

Fiore: corolla verde-chiaro, giallognola verso l'apice, apertura normale (a cappuccio); stami da 5 a 6 (raramente 4); fiori morfologicamente normali, uniformi; autofertili.

Foglia: di grandezza più che media, pentagonale, quinquelobata; seno peziolare chiuso, con bordi sovrapposti; seni laterali superiori chiusi, con bordi sovrapposti; seni inferiori a lira, chiusi; pagina superiore glabra, verde cupo, con nervature di color verde chiaro (talvolta con qualche sfumatura rosea al punto periolare); pagina inferiore con tomento aracnoideo molto



Figura 2.8 Foglia di Cortese

rado; di color verde chiaro, con nervature dello stesso colore; lembo di medio spessore, un po' ondulato; denti irregolari, convessi da un lato e concavi dall'altro; a base larga, ben pronunciati. *Picciolo*: di lunghezza media e di grossezza più che media, con tomento aracnoideo molto rado, di color verde chiaro con leggere sfumature vinose.

Colorazione autunnale delle foglie: verde giallo-oro.

Grappolo a maturità industriale:

grandezza più che media, piuttosto spargolo; conico-piramidale, con una o due ali, lunghezza di circa 20-25 cm; peduncolo ben visibile, semi-legnoso (fino alla prima ramificazione); pedicelli di media lunghezza, di color verde-chiaro; cercine evidente, verde; pennello medio; di color giallo-dorato chiaro.

Acino: medio o più che medio,

leggermente ellissoide, con sezione trasversale circolare; buccia di media

consistenza, non molto pruinosa, di color giallo-dorato dalla parte del sole, verde-giallognolo nella parte all'ombra; ombelico persistente e prominente; polpa succosa, di sapore semplice, ma caratteristico, gradevole; separazione dell'acino dal pedicello facile.

Vinaccioli: da 2 a 4, piriformi, con becco sottile, di grandezza media.



Figura 2.9 Grappolo di Cortese

Tralcio legnoso: robusto, ma un po' fragile, con sezione ellittica, un po' appiattita; superficie liscia, non pruinosa; corteccia bene aderente, di color grigio cinereo, punteggiato; internodi di lunghezza media (10-12 cm), nodi globosi; gemme coniche abbastanza sporgenti; cercine peziolare largo; diaframma piano, midollo piuttosto abbondante.

2.4.2 Fenologia.

Condizioni d'osservazione: il clone studiato è in comune di Gavi, località Conti.

Ubicazione

Longitudine: 3° 39' E.

Latitudine: 44° 41' N.

Altitudine: 180-200 m s.l.m.

Esposizione: ovest; appezzamento: collinare, con 10-15 % di pendenza

Portinnesto: "Berlandieri" X "Riparia" Teleki 5 BB

Età: 6 anni

Sistema di allevamento: di media espansione, a filari (vigneto specializzato)

Forma di potatura: tipo Guyot

Terreno: di medio impasto, tendente all'argilloso

Fenomeni vegetativi*Germogliamento*: medio (seconda metà di aprile)*Fioritura*: media (verso la metà di giugno)*Invaiaitura*: media (verso la metà di agosto)*Maturazione dell'uva*: di 2a epoca (verso la metà di settembre)*Caduta delle foglie*: normale (prima quindicina di novembre)**2.4.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali.****Vigoria**: notevole.**Produzione**: normalmente abbondante e costante.**Posizione del primo germoglio fruttifero**: 1a gemma.**Numero medio di infiorescenze per germoglio**: 2.**Fertilità delle femminelle**: saltuaria, trascurabile.**Resistenza ai parassiti ed altre avversità**: normale per quelle parassitarie. Soffre relativamente meno di altri vitigni per la grandine e le gelate; però ama esposizioni soleggiate. L'uva non resiste molto alle piogge autunnali.**Comportamento rispetto alla moltiplicazione per innesto**: buono; particolarmente preferiti i "Berlandieri" X "Riparia 320 A" e "Kober 5 BB", e la "Rupestris du Lot".**2.5 Vitigno Chardonnay****2.5.1 Descrizione Ampelografica.**

La descrizione è stata effettuata presso l'azienda agricola dell'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (TN). Il vigneto, posto su terreno di medio impasto tendente al compatto, con esposizione Ovest/Sud-Ovest, era costituito da viti di Chardonnay innestate su 41B (Chasselas x Berlandieri), allevate a pergola trentina semplice. I dati rilevati sono stati confrontati con quelli osservati presso altri vigneti della zona di produzione (Pressano-Lavis) e della collezione ampelografica dell'I.S.V. a Susegana (TV).

Germoglio di 10-20 cm*Apice*: di media espansione, lanuginoso, verde biancastro, con bordo rosato.

Figura 2.10 Apice di Chardonnay

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): spiegate, glabre o appena pubescenti sulla pagina superiore, lanuginose sulla pagina inferiore; di color giallo bronzato che poi passa al verde con riflessi marcatamente dorati e infine verde.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): spiegate, un po' ondulate, glabre o con qualche pelo superiormente, pubescenti inferiormente; colore verde, lucenti; tondeggianti, trilobate, molto grandi, con seni laterali poco marcati, seno peziolare a U.

Asse del germoglio: eretto, verde.

Germoglio alla fioritura

Apice: espanso, pubescente, verde biancastro con orlo un po' carminato.

Foglioline apicali: spiegate, pubescente la prima, meno tomentose le altre due; verdi dorate o con sfumature bronzate, trilobate.

Foglioline basali: ondulate, glabre, di color verde con sfumature bronzee.

Asse del germoglio: curvo, glabro.

Tralcio erbaceo: verde, leggermente striato in bronzeo da un lato con nodi rossastri, circolare, liscio, glabro.

Viticci: trifidi, giallo-bronzei, intermittenti o subcontinui (formula: 0-1-2-0-1-2... oppure 0-1-2-3-0-1-2-3...).

Infiorescenza: un po' piramidale, lunga circa 10-12 cm.

Fiore: ermafrodita, regolare, autofertile (Cosmo, 1940).

Foglia: media o meno, pentagonale, tondeggiate, pressoché intera o con accenno a tre lobi, seno peziolare poco aperto ad U; seni laterali superiori appena accennati; angolo alla sommità del lobo terminale retto; lobi quasi mancanti, piegati a gronda con bordi rivolti in basso; lembo un po' piegato a gronda; pagina superiore glabra, verde medio, leggermente bollosa; pagina inferiore aracnoidea e con fiocchetti, verde chiaro; nervature verdi, leggermente rosate alla base sulla pagina inferiore; nervature di primo e secondo ordine leggermente sporgenti; denti poco pronunciati, irregolari, ai lati rettilinei.

Picciolo: medio di spessore medio, glabro, striato in rosso vinoso.

Colorazione autunnale delle foglie: gialla.



Figura 2.11 Foglia di Chardonnay

Grappolo a maturità industriale:

medio, lungo circa 12 cm, un po' compatto, piramidale, spesso alato; peduncolo corto, grosso, semilegnoso.

Acino: medio, sferoide, di forma non troppo regolare, con sezione trasversale regolare, circolare; buccia mediamente pruinosa, di colore giallo ambrato, di spessore medio, tenera; ombelico apparente, infossato; polpa non colorata, succosa, sapore speciale leggermente aromatico fino leggermente moscato.

Vinaccioli: fino a 3 per acino, medi, globosi, a becco grosso.



Figura 2.12 Grappolo di Chardonnay

Tralcio legnoso: grosso, a sezione tondeggiate, color bruno rossastro uniforme; internodi corti, nodi poco evidenti, violacei; gemme piccole, conico-tondeggianti, sporgenti.

Tronco: abbastanza robusto.

2.5.2 Fenologia.

Fenomeni vegetativi

Germogliamento: precoce.

Fioritura: precoce.

Invaiaura: precoce.

Maturazione dell'uva: fine II epoca (verso la metà settembre).

Caduta delle foglie: precoce.

2.5.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali.

Vitigno di elevata vigoria e fenologia precoce. La sua fertilità inizia sin dalle prime gemme basali (2a-3a) e presenta una media di 2-3 grappoli per germoglio. La produzione risulta molto regolare ed abbondante, con scarso apporto di uva di seconda fioritura. Discreta la gradazione zuccherina dell'uva (circa 18-19%) e buono il suo livello di acidità fissa (7,5-8,5%). Generalmente contenuti i valori del pH (3,1-3,2). Soffre le gelate primaverili e le zone eccessivamente umide nelle quali può mostrare fenomeni di colatura; in queste zone è facile osservare manifestazioni anche intense di Flavescenza dorata. Il suo grappolo compatto e la buccia sottile possono favorire la formazione di marciume durante la maturazione. Buona la resistenza alla peronospora, un po' meno alla Botrytis ed all'oidio. Buona anche la sua affinità con i più diffusi portinnesti.

Resistenza alle avversità climatiche: buona

Resistenza agli agenti parassitari: media

Comportamento nella moltiplicazioni vegetativa: buona affinità d'innesto con i più diffusi portinnesti.

2.6 Vitigno Grignolino

2.6.1 Descrizione Ampelografica.

La descrizione di questo vitigno è stata effettuata su due distinti cloni; il 1° sito in comune di Portacomaro presso Asti, cioè nella zona classica di questo vitigno; il 2° nel comune di Rosignano Monferrato, cioè in altra zona di coltura. Qui però si riportano solo i caratteri raccolti dal 1° clone (e confrontati su altre viti della stessa zona classica).

Germoglio di 10-20 cm

Apice: espanso, con tomento cotonoso, bianco, sfumato in rosso carminato.

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): un po' a gronda, cotonose inferiormente, bronzate, orlate di carminio.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): spiegate, cotonose inferiormente, verdi con orli rossicci.

Asse del germoglio: ricurvo, leggermente tomentoso, coi denti un po' rossicci.



Figura 2.13 Apice di Grignolino

Germoglio alla fioritura

Apice: un po' espanso. Foglioline apicali: spiegate, verdi con sfumature bronzate, con tomento aracnoideo, talvolta cotonoso; verdi, con sfumature bronzate. Foglioline basali: spiegate, con tomento aracnoideo, verdi, con nervature e parte dei denti rossastri.

Tralcio erbaceo: a sezione circolare, con contorno liscio, coperto di leggero tomento aracnoideo; verde, con striature rossastre.

Vitici: intermittenti (formula per lo più 0-1-2-0-1-2...), bifidi o trifidi, lunghi, sottili, striati di rosso.

Fiore: infiorescenze di media lunghezza, coniche, erette, d'aspetto robusto. Bottone florale globoso; fiori ermafroditi (autofertili); 5 (talvolta 6) stami; corolla verde, apertesi a cappuccio.

Foglia: di grandezza media o più; pentagonale; per lo più trilobata, ma anche quinquelobata, però con i due lobi inferiori poco marcati; seni laterali superiori a U o a lira, sovente aperti,



Figura 2.14 Foglia di Grignolino

talora quasi chiudentisi; seni inferiori aperti, sovente appena accennati; pagina superiore glabra, rugosa; inferiore con leggero tomento aracnoideo grigio-biancastro; lembo piegato leggermente a coppa; colore delle nervature principali parzialmente rosso; denti molto pronunciati, acuti, irregolari, convessi; colore della foglia verde scuro superiormente, più chiaro inferiormente (grigiastro).

Picciolo: medio o lungo, leggermente tomentoso, di colore rossiccio. Colorazione autunnale delle foglie: verde con macchie gialle.

Grappolo a maturità industriale: per lo più cilindrico o piramidale, sovente alato; grandezza più che media; serrato. Acini: meno che medi; subovali; buccia molto pruinoso, piuttosto sottile; di color rossiccio-violaceo cinereo, ma ineguale; polpa succosa, molto sapida a perfetta maturità (nettamente vinosa); pedicelli corti o medi, cercine evidente, rosso; separazione dell'acino dal pedicello piuttosto difficile.



Figura 2.15 Grappolo di Grignolino

Vinaccioli: per lo più 3, mezzani, piriformi.

Tralcio legnoso: di lunghezza media, robusto; a sezione ellittica (a volte circolare); corteccia resistente, aderente; superficie liscia, leggermente angolosa; glabra; lunghezza dei meristalli media (11-13 cm); colore nocciola, un po' rossiccio, uniforme; diaframma piano-convesso; midollo medio; gemme grosse, rotonde.

Tronco: pianta vigorosa.

2.6.2 Fenologia:

Fenomeni vegetativi

Germogliamento: medio (per lo più nella 1a decade di aprile).

Fioritura: media.

Invaiaura: media.

Maturazione dell'uva: III epoca (per lo più ai primi di ottobre).

2.6.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali

Vigoria: buona, in condizioni favorevoli.

Produzione: abbastanza regolare solo nel suo ambiente, se no, molto irregolare, più per limitata cacciata di grappoli che per colatura o filatura.

Posizione del primo germoglio fruttifero: per lo più 3° nodo.

Numero medio di infiorescenze per germoglio: 2.

Fertilità delle femminelle: insignificante.

Resistenza alle malattie: alla peronospora buona, anche più del "Barbera"; assai meno all'oidio.

Comportamento rispetto alla moltiplicazione per innesto: in generale buono. Portinnesti più usati, quelli vigorosi: "Rupestris du Lot", "Kober 5 BB", "Golia" (meno bene invece col "420 A").

2.7 Vitigno Nebbiolo

2.7.1 Descrizione Ampelografica

Il 'Nebbiolo' presenta un'elevata variabilità morfologica ed agronomica (Dalmasso et al., 1959; Schneider et al., 1991; Mannini, Argamante, 2000) che si manifesta sia tra biotipi di diversa provenienza geografica (Picotener/Picotendro in Valle d'Aosta, Prunent nell'Ossola, Chiavennasca in Valtellina, ecc.) sia tra biotipi coltivati nello stesso areale (Lampia, Michet e Rosè nell'Albese, Corosso e Cobiacono in Nord Piemonte, ecc.) (Mannini QUAD. VITIC. ENOL. UNIV. TORINO, 28, 2005-2006).

Germoglio di 10-12 cm

Apice: espanso, di colore bianco argenteo, con sfumature carminate ai bordi, più intense alle punte dei lobi.



Figura 2. 16 Apice di Nebbiolo

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): le prime due leggermente piegate a gronda, la terza spiegata. La tomentosità sulla pagina superiore va man mano riducendosi dalla prima fogliolina alla terza, passando da lanuginosa ad aracnoidea; cotonose sulla pagina inferiore. Il colore della pagina superiore va dal bianco-argenteo bronzato con orli ramati nella prima fogliolina, al verde chiaro bronzato con lievi sfumature ramate ai bordi nella terza. La pagina inferiore è di colore bianco-argenteo, con sfumature carminate ai lobi. Foglie piccole, in genere pentalobate, seno peziolare a V di media larghezza.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): pentalobate spiegate o leggermente piegate a doccia, con una lieve peluria lunga e rada sulla pagina superiore e tra il cotonoso ed il lanuginoso su quella inferiore; pagina superiore di colore verde chiaro; seno peziolare a V stretto.

Asse del germoglio: pressoché eretto o leggermente ricurvo; la tomentosità si attenua man mano che si allontana dall'apice. Internodi abbastanza lunghi.

Germoglio alla fioritura

Apice: espanso, lanuginoso, bianco-argenteo con riflessi bronzati ed orli in parte carminati.

Foglioline apicali: spiegate o leggermente piegate a gronda, aracnoidee superiormente e lanuginose inferiormente; la pagina superiore è di colore verde chiaro bronzato, l'inferiore bianco-sporco, con nervature bronzate.

Foglioline basali: spiegate, quasi glabre superiormente ed aracnoidee inferiormente. La pagina superiore è di colore verde bronzato lucido, l'inferiore verde chiaro.

Asse del germoglio: leggermente ricurvo, ricoperto da rada peluria.

Tralcio erbaceo: sezione trasversale circolare, con contorno un po'angoloso, verde con striature rosso-vinose nella parte rivolta al sole; nodi rosso-vinosi.

Viticci: intermittenti, bi-trifidi, lunghi, esili. (Formula: 0-1-2-0-1-2-0...).

Infiorescenza: tendente al grande (lunghezza cm 18-20); forma cilindrico-piramidale alata. Ciascun germoglio porta una, od eccezionalmente due infiorescenze.

Fiore: bottone florale di media grandezza, di forma globosa, ermafrodita; corolla di colore verde gialliccio, apertura a cappuccio.

Foglia: di grandezza media o grande: cm 15-18; di forma tra il pentagonale e l'orbicolare; le foglie dei nodi intermedi sono, in genere, trilobate; quelle dei nodi basali tendono al pentalobato, mentre le foglie della punta del germoglio e delle femminelle sono quasi intere; seno peziolare a V aperto, con lati concavi, od a U, meno spesso a lira; seni laterali superiori ad U o a lira, inferiori a V e appena accennati; pagina superiore glabra, leggermente vescicolosa, di color verde



Figura 2.17 Foglia di Nebbiolo

bottiglia opaco, con nervature di colore verde-chiaro, sfumate in rosa nel punto di inserzione al picciolo; pagina inferiore aracnoidea, di colore verde chiaro; nervature 1a-2a-3a cotonose e di colore verde chiaro, con sfumature rosee nel punto di inserzione al picciolo; dalla quarta in poi, le nervature non sono più sporgenti; lembo piano, abbastanza sottile, con lobi piani o leggermente involuti; angolo alla sommità del lobo mediano pressoché retto; nei lobi laterali acuto; dentatura di media grandezza, irregolare, acuta, con base di media larghezza.

Picciolo: di media lunghezza e grossezza, di color verde oliva con sfumature rosso-fecciose sul dorso, ricoperte da rada peluria; sezione trasversale con canale poco evidente. Colorazione autunnale delle foglie: gialliccia, defogliazione tardiva (metà novembre).

Grappolo a maturità industriale: di grandezza media o grande (lunghezza cm 18-20); di forma piramidale-allungata; alato, un po' compatto; presenta spesso un'ala alquanto sviluppata che in alcuni casi assume quasi l'aspetto di un secondo grappolo; peduncolo di lunghezza media o meno (cm 4-5), semilegnoso nella prima metà; pedicelli un po'corti, di media grossezza, colore verde chiaro con cercine non molto evidente, dello stesso colore e pochissimo verrucoloso; pennello di media grossezza e lunghezza, colore giallino.



Figura 2.18 Grappolo di Nebbiolo

Acino: di grandezza media (mm 12-14), rotondo ma con tendenza all'ellissoide, sezione trasversale circolare, ombelico persistente, buccia molto pruinosa, sottile ma resistente e tannica; colore violaceo scuro, ma che per la pruina appare quasi grigio; polpa succosa di sapore semplice, dolce, acidula, astringente, succo incolore.

Vinaccioli: da due a tre per acino, di media grandezza, piriformi, colore castano-chiaro, con becco non molto appuntito.

Tralcio legnoso: lungo, robusto, piuttosto elastico, glabro, con fenomeni di fasciazione abbastanza frequenti, superficie striata, corteccia poco pruinosa, staccantesi in strisce, punteggiata. Tralcio color cannella carico, con striature rosso-vinose; nodi abbastanza pronunciati di colore cannella rossastro. Meritalli lunghi (cm 12-15); gemme un po' tomentose e di media grandezza; diaframma leggermente convesso, midollo normale.

Tronco: vigoroso.

2.7.2 Fenologia

Condizioni di osservazione: Si considerano, per quanto riguarda l'ubicazione ed i fenomeni vegetativi, quelle della Tenuta di Fontana fredda nel comune di Serralunga d'Alba, dove trovasi il clone descritto. (I dati meteorologici sono quelli dell'Osservatorio meteorologico dell'Istituto Tecnico Agrario Specializzato di Alba, che dista km 8 dalla Tenuta di Fontana fredda).

Fenomeni vegetativi

Germogliamento: precoce (10-15 aprile); germoglia in genere con 10-12 giorni di anticipo sul "Barbera". (Il "Nebbiolo Lampia" è la cv. di "Nebbiolo" a germogliamento più precoce).

Fioritura: piuttosto precoce (prima metà di giugno).

Invaiaura: media (seconda metà di agosto).

Maturazione dell'uva: tardiva (IV epoca).

Caduta delle foglie: tardiva (metà novembre).

2.7.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali

Vigoria: più che media: il "Nebbiolo Lampia" è il più vigoroso del gruppo.

Produzione: un po' incostante. Se la primavera decorre favorevole (non fredda e non piovosa), la produttività è abbastanza buona, se invece l'annata decorre sfavorevole la produzione risulta scarsa, perché il "Nebbiolo Lampia" va soggetto alla filatura dei grappolini fiorali ed alla colatura dei fiori.

Posizione del primo germoglio fruttifero: 4° nodo (più raramente 3°).

Numero medio delle infiorescenze per germoglio: in genere una, solo eccezionalmente due.

Resistenza alle malattie: alquanto sensibile all'oidio, ma abbastanza resistente alla peronospora. Nelle annate ad autunno molto piovoso può soffrire per attacchi di Botrytis. Come tutti i veri "Nebbioli" è piuttosto sensibile agli sbalzi di temperatura, e preferisce località di collina bene esposte al sole, affinché la maturazione arrivi a bene completarsi, ma non eccessivamente aride. Per questo s'adatta bene in località elevate e anche quasi montane, purché bene soleggiate e riparate dai venti freddi.

Comportamento rispetto alla moltiplicazione per innesto: s'adatta bene al "420 A" e al "Kober 5 BB", meno bene alla "Rupestris du Lot".

2.8 Vitigno Ruché

2.8.1 Descrizione Ampelografica

Germoglio

Apice: glabro (o appena appena aracnoideo), verde con orli sfumati di rosso.

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): piegate a gronda, di colore verde giallastro, lucide, appena sfumate di rosso ai bordi, inferiormente quasi glabre.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): di colore verde chiaro, lucide, glabre.

Tralcio erbaceo: verde su entrambi i lati o appena sfumato di rosso su quello dorsale.



Figura 2.19 Apice di Ruché

Foglia adulta: medio-piccola, cuneiforme; più larga che lunga, trilobata o quinquelobata; seno peziolare aperto, a V o a graffa; seni laterali superiori a U o a lira (spesso con lembi sovrapposti), inferiori a U o a V; lembo nettamente piegato a coppa, di colore verde chiaro,



Figura 2.21 Foglia di Ruché



Figura 2.20 Grappolo di Ruché

opaco, con nervature verdi; la superficie, generalmente non molto bollosa; increspata lungo le nervature principali; denti pronunciati, a base media, irregolari, a margini da un lato concavi dall'altro convessi; pagina inferiore glabra.

Grappolo: medio-grande o grande, cilindrico allungato con ali ben sviluppate (talora un'ala lungamente pedunculata), mediamente spargolo nella parte prossimale, più compatto in quella mediana e distale; peduncolo medio-lungo, verde sfumato di rosso. Acino: medio-piccolo (1.6 g), da sferoidale a ellissoidale corto (diam.long./diam.equat. = 1.05), con buccia molto

pruinosa, di colore blu-nero violetto; sapore nettamente anche se non molto intensamente aromatico.

2.8.2 Fenologia

Germogliamento: media epoca (seconda decade di Aprile).

Fioritura: medio-precoce (prima decade di Giugno).

Invaiaitura: media epoca (seconda decade di Agosto).

Maturazione dell'uva: medio-precoce o media epoca (fine Settembre).

2.8.3 Caratteristiche ed Attitudini colturali

Vigoria: media; i tralci hanno corti internodi e presentano grande emissione di rami anticipati tanto da conferire alla vegetazione un aspetto affastellato.

Fertilità e produzione: la fertilità è elevata, anche a livello delle gemme basali, come pure la produzione, soggetta però ad una certa alternanza.

Allevamento e potatura: il Ruchè è generalmente allevato a controspalliera con potatura Guyot e capo a frutto di 10-12 gemme; si adatta però anche alle potature corte.

Suscettibilità ad avversità e fitopatie: viene considerato vitigno assai tollerante nei confronti della peronospora; l'uva giunge a maturazione rapidamente e, quando molto zuccherina, è soggetta agli attacchi delle vespe; il Ruchè teme le primavere fredde e piovose, che ne penalizzano l'allegagione determinando fenomeni di colatura. *Comportamento alla moltiplicazione*: buono con i portinnesti più diffusi.

Dal Ruchè si ottiene un prodotto alquanto particolare, caratterizzato da un colore rosso rubino brillante e dal profumo intenso, con note floreali (di rosa) e speziate, che fa da interessante contrasto al sapore secco e asciutto, privo di tannicità. Può anche servire a produrre un vino dolce o abboccato, piacevolmente aromatico (con note di rosa e di piccoli frutti).

CAPITOLO 3

METODOLOGIE DI ANALISI

3.1 Determinazione del pH.

Poiché il metodo si basa su una misura potenziometrica legata al grado di dissociazione degli acidi presenti, costituisce un indice di acidità reale e viene determinata attraverso un pHmetro. Si calibra lo strumento utilizzando nell'ordine le soluzioni tampone a pH 7, a pH 4 e a pH 2, avendo cura di sciacquare l'elettrodo con acqua distillata ed asciugarlo tra una soluzione e l'altra. In base alla temperatura dell'ambiente si effettuano le eventuali correzioni di pH.

Si immerge l'elettrodo nel vino, e dopo una lenta agitazione, si legge direttamente il valore di pH.

Il pHmetro utilizzato per le misure è un CRISON GLP21 con microelettrodo CRISON 5029.

3.2 Determinazione del grado alcolico.

Si definisce grado alcolico effettivo il numero di millilitri di alcol etilico contenuti in 100 mL di vino misurati a 20°C (in pratica è la % in volume di alcol etilico). La determinazione del grado alcolico effettivo viene effettuata secondo il metodo densimetrico mediante bilancia idrostatica.

Questo metodo consiste nella distillazione di 100 ml di vino, per separare l'alcol da tutti gli altri componenti non volatili; si ottiene così una miscela binaria idroalcolica, che viene riportata con acqua al volume originale, da cui si può risalire al contenuto in alcol determinandone la densità.

Mediante un matraccio tarato si prelevano 100 ml di vino, previamente portati a 20 °C e si versano nel pallone di distillazione insieme con le acque di lavaggio (circa 4 lavaggi).

Se l'acidità è troppo elevata occorre una preventiva neutralizzazione aggiungendo 10 ml di latte di calce (120 g di CaO/litro di acqua).

Si collega il pallone al refrigerante e si procede alla distillazione fino a che la quantità di distillato non sia pari a 2/3 del volume iniziale di vino. Come recipiente di raccolta si utilizza lo stesso matraccio adoperato e, per evitare perdite di alcol, si pongono sul fondo 10 ml di acqua in cui si fa pescare la parte terminale del refrigerante. A fine distillazione si pone il matraccio in bagno termostato a 20 °C, si porta a volume con acqua distillata e si legge la densità a 20°C con la bilancia idrostatica. Mediante apposite tabelle si risale al grado alcolico.

3.3 Determinazione dell'estratto secco.

L'estratto secco totale o sostanze secche totali è costituito dall'insieme di tutte le sostanze che, in condizioni fisiche determinate, non volatilizzano. Queste condizioni fisiche debbono essere fissate in modo tale che le sostanze componenti tale estratto subiscano il minimo di alterazione possibile.

L'estratto è espresso in grammi per litro e dev'essere determinato con l'approssimazione di 0,5 g.

L'estratto secco totale è calcolato indirettamente in base al valore della densità del mosto e, nel caso del vino, in base alla densità del vino dealcolizzato.

Questo estratto secco è espresso dalla quantità di saccarosio che, disciolta in una quantità d'acqua sufficiente ad avere un litro, dà una soluzione avente la stessa densità del mosto o del vino dealcolizzato. Si può risalire a questa quantità tramite dati tabulati.

La densità relativa d_{20}^{20} del "vino dealcolizzato" (d_r) è calcolata con la formula:

$$d_r = d_v - d_a + 1$$

dove d_v è la densità relativa del vino a 20 °C (corretta per l'acidità volatile), d_a è la densità relativa a 20 °C della miscela idroalcolica avente lo stesso titolo alcolometrico del vino.

Dal valore della densità d_{r20}^{20} del vino dealcolizzato tramite dati tabulati si può ricavare il peso dell'estratto secco totale in grammi per litro.

3.4 Determinazione dell'acidità totale.

L'acidità totale è definita come la somma delle acidità titolabili portando il pH del vino a 7 per addizione di una soluzione alcalina con titolo noto. Con questa analisi l'anidride carbonica non è compresa nell'acidità totale. La metodologia si basa su una titolazione acido / base in presenza di blu di bromotimolo, usato come indicatore.

Per lo svolgimento di questa tecnica è necessario eliminare dal vino il biossido di carbonio disciolto. Per questo si pongono in una beuta da vuoto 10 ml di vino sotto agitazione e si fa contemporaneamente il vuoto mediante una pompa ad acqua. L'agitazione deve durare 2 minuti.

Si versano in un cilindro graduato da 50 ml 30 ml di acqua distillata, 1 ml di soluzione di blu di bromotimolo 4 g/l ed una quantità di vino preparato come descritto in precedenza pari a 10 ml.

A questo punto si inizia la titolazione con una soluzione 0.1 M di idrossido di sodio sino ad ottenere il viraggio dell'indicatore. Si prende nota del numero di ml di soluzione di idrossido di sodio 0.1 M utilizzati per avere il viraggio (n).

L'acidità totale, espressa in milliequivalenti per litro (A), si ottiene con la seguente formula:

$$A = 10 \times n$$

L'acidità totale, espressa in grammi di acido tartarico per litro (A'), sarà:

$$A' = 0.075 \times A$$

Normalmente il valore è dato con una cifra decimale.

3.5 Determinazione spettrofotometriche

Per le determinazioni spettrofotometriche è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-visibile a doppio raggio JASCO V-550.

3.5.1 Determinazione dell'indice di antociani totali e dell'indice di flavonoidi totali.

Questo metodo di analisi si basa sul principio secondo il quale in ambiente acido tutti i pigmenti antocianici passano nella forma ionizzata e sono determinabili per via colorimetrica.

Gli antociani sono un gruppo di sostanze che presentano un massimo di assorbimento in ambiente alcolico-acido a 540 nm, mentre i flavonoidi presentano un massimo di assorbimento a 280 nm.

Il campione di vino da analizzare viene diluito 40÷50 volte con etanolo cloridrico (costituito da 70 parti di etanolo, 30 di acqua ed 1 di HCl concentrato).

Si registra lo spettro tra 230 e 700 nm del campione così diluito su 1 cm di cammino ottico e si determina il massimo di assorbanza a 540 nm.

L'indice di antociani totali, espresso come malvina cloridrato (mg/l) si calcola attraverso la formula:

$$\text{Indice di antociani totali} = A_{540} \times 16,17 \times d$$

Dove: A_{540} è l'assorbanza del campione a 540 nm su un percorso ottico di 1 cm, d è il numero di diluizioni effettuate, 16,17 è il fattore dedotto dall'assorbanza molare della malvina-3-O-glucoside ($\epsilon=33.700$ in metanolo).

Per la determinazione dei flavonoidi totali, il cui massimo di assorbimento cade a 280 nm, è necessario effettuare una correzione grafica tracciando una tangente in corrispondenza dei punti di flesso della curva di assorbanza e considerare come assorbanza corretta la lunghezza del segmento perpendicolare all'asse delle ordinate tracciato a partire dal massimo 280 nm fino alla tangente (figura 3.1).

L'indice di flavonoidi totali, espresso come (+)-catechina (mg/l) si calcola attraverso la formula

$$\text{Indice di flavonoidi totali} = A'_{280} \times 82,4 \times d$$

Dove: 82,4 è un coefficiente dedotto dall'assorbanza molare di una soluzione di (+) catechina, A'_{280} è l'assorbanza corretta a 280 nm e d è il numero di diluizioni.

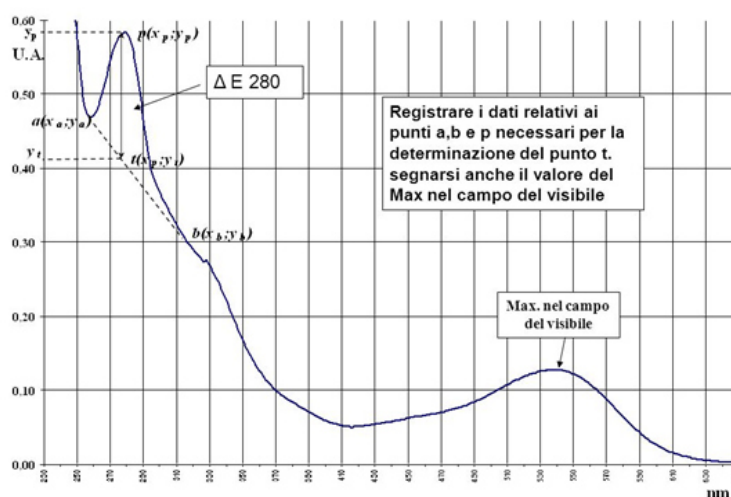


Figura 3.1 – Metodo grafico utilizzato per la determinazione dei flavonoidi totali

3.5.2 Determinazione del colore

E' importante poter definire oggettivamente il colore di una bevanda come il vino perché ciò ci permette di fare confronti tra più prodotti considerati in un certo istante, o tra il colore di uno

stesso prodotto considerato in momenti successivi. Per la determinazione degli indici di colore del vino occorre rilevare l'assorbanza a 420, 520 e 620 nm, operando sul vino tal quale. Le lunghezze d'onda di 420, 520 e 620 nm, corrispondono rispettivamente alla tonalità gialla, rossa e blu.

I parametri più significativi nella valutazione del colore di un vino sono l'Intensità Colorante (I. C.), che misura l'intensità del colore, e la Tonalità del colore chiamata anche "tinta" che esprime il rapporto tra la tonalità gialla e quella rossa.

Intensità Colorante

• Vini Bianchi

La determinazione serve per valutare l'andamento delle ossidazioni nei vini; tali alterazioni provocano un imbrunimento e quindi un aumento dell'assorbanza. I vini bianchi non alterati presentano valori compresi tra 0,05 e 0,15.

L'intensità colorante consiste nel valore dell'assorbanza letta a 420 nm (giallo dovuto ai tannini) su un vino limpido (centrifugato), con cammino ottico di 1 cm e con acqua distillata come riferimento ($I. C. = A_{420 \text{ nm}}$).

• Vini Rossi

L'intensità colorante consiste nella somma delle assorbanze lette a 420 nm (giallo dovuto ai tannini) e a 520 nm (rosso dovuto agli antociani) su un vino limpido (centrifugato), con cammino ottico di 1 mm e con acqua distillata come riferimento ($I. C. = A_{420 \text{ nm}} + A_{520 \text{ nm}}$). Di norma i vini rossi hanno intensità coloranti comprese tra 4 e 6.

Tonalità del colore

La tonalità del colore è fornita dal rapporto esistente tra le assorbanze a 420 nm e a 520 nm ($Tonalità = A_{420 \text{ nm}} / A_{520 \text{ nm}}$). Questo rapporto indica la ricchezza di colore giallo di un vino in rapporto al suo contenuto in rosso porpora, pertanto fornisce informazioni sul grado di evoluzione della componente colorante. I vini rossi hanno tonalità del colore normalmente comprese tra 0,5 e 0,8 nei vini giovani mentre si passa a valori superiori all'1 nei vini dopo un certo periodo di affinamento, quando il colore evolve verso tonalità aranciate (420 nm) a discapito di quelle rosse (520 nm).

3.6 Determinazione del profilo metabolico tramite Spettroscopia 1H NMR.

La spettroscopia 1H-NMR è in grado di fornire una rappresentazione del profilo metabolico in modo rapido e non distruttivo. La spettroscopia 1H-NMR consente inoltre (quando necessario) l'identificazione della struttura chimica dei metaboliti tramite tecniche NMR bidimensionali (2D NMR) e ricerca in opportuni database.

Per la preparazione dei campioni per l'analisi NMR, si sono aggiunti 100 µL di tampone (wine buffer: 1 M KH_2PO_4 , 0.1% 3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium salt (TSP) come standard interno, D_2O , e NaN_3) a 900 µL di vino e si è aggiustato il pH a 3.10 (± 0.02). Si sono poi prelevati 600 µL della miscela preparata e si sono posti in un tubo NMR da 5 mm (Wilmad WG-1228). In questa fase si è posta molta attenzione al valore di pH a cui venivano preparati i campioni. La taratura del pHmetro è stata ripetuta giornalmente e controllata su campioni di vino standard (wine reference). Piccole variazioni nel pH del campione, infatti, provocano spostamenti significativi nei segnali NMR dei metaboliti del vino.

Le misure NMR sono state eseguite utilizzando uno spettrometro Bruker AVANCE III 500 MHz equipaggiato con probe da 5 mm PABBO e unità per il controllo della temperatura BVT-3000. Gli spettri NMR sono stati registrati a 300 K; dopo aver inserito il campione all'interno dello strumento si sono attesi 5 minuti prima di iniziare le misure per far sì che il campione potesse raggiungere la corretta temperatura di misura.

Per ogni campione si sono ottimizzate le durate dell'impulso a 90° di osservazione (P1) e dell'impulso di presaturazione a 25 Hz (PLW9).

I campioni di vino sono quindi stati sottoposti a 5 diversi esperimenti 1H NMR.

Esperimento 1 L'esperimento 1 è un esperimento standard a singolo impulso con irraggiamento ad onda continua durante il tempo di rilassamento per la presaturazione del segnale dell'acqua. Per la presaturazione si è utilizzato un impulso con larghezza di 25 Hz. La misura viene eseguita con 1 scansione ed ha lo scopo di ottimizzare la posizione del centro dello spettro (O1) in cui viene applicato l'impulso di presaturazione. Variando O1 si è ottenuto il miglior abbattimento del segnale dell'acqua con la minor distorsione possibile delle altre zone dello spettro NMR.

Esperimento 2 L'esperimento 2 è simile al precedente. La misura viene registrata utilizzando il parametro O1 ottimizzato al punto precedente. Lo spettro viene registrato con 4 scansioni ed ha scopi molteplici: controllare l'omogeneità del campo magnetico, verificando la larghezza del segnale dello standard (TSP), definire l'esatta posizione delle sette righe dell'etanolo (1 segnale tripletto ed 1 segnale quartetto) da utilizzarsi per la preparazione dell'impulso di presaturazione sagomato che sarà utilizzato nel passaggio successivo.

Esperimento 3 Nell'esperimento 3 si è utilizzata una sequenza NMR che permettesse la contemporanea soppressione dei segnali dell'acqua e dell'etanolo. In particolare, durante il tempo di rilassamento, si è applicato un impulso di presaturazione sagomato che avesse uno spettro in frequenza con 8 bande che permettessero una soppressione molto selettiva del segnale dell'acqua e delle sette linee del tripletto e del quartetto dell'etanolo lasciando inalterato il resto dello spettro. La forma dell'impulso di presaturazione è stata ottimizzata per ogni singolo campione utilizzando l'apposita procedura Bruker. Per aumentare ancora di più l'efficienza della soppressione, la sequenza ha previsto anche l'impiego di due impulsi a gradiente che hanno il compito di defocalizzare l'eventuale segnale indesiderato residuo. Lo spettro viene poi registrato utilizzando 4 prescansioni e 64 scansioni. L'abbattimento dei segnali di acqua ed etanolo ha consentito di poter amplificare maggiormente il segnale con un notevole miglioramento del rapporto segnale/rumore.

Esperimento 4 L'esperimento 4 è una misura NMR bidimensionale J-resolved. Lo spettro è stato registrato utilizzando lo stesso impulso sagomato di presaturazione descritto al punto precedente. Questo esperimento è stato registrato con l'intento di ottenere informazioni precise sulla molteplicità e sul valore della costante di accoppiamento (J) dei diversi segnali NMR che compaiono nello spettro. Questo ha permesso una miglior identificazione dei segnali dei diversi metaboliti presenti nel vino. La misura viene effettuata con 16 prescansioni ed 8 scansioni per ciascuno dei 40 punti nella seconda direzione.

Esperimento 5 L'esperimento 5 è stato effettuato per la quantificazione dell'etanolo. Questo esperimento utilizza un singolo impulso di 30° ed è stato registrato con 8 scansioni.

Per ogni vino in studio si sono preparati 3 diversi campioni che sono stati analizzati in modo indipendente.

Per assicurare la qualità delle misure, giornalmente si è misurato un campione di vino standard (wine reference). Le misure su questo standard hanno permesso di controllare il funzionamento dell'intera procedura: la bontà della preparazione dei campioni (posizione ed intensità dei segnali) e la riproducibilità delle misure NMR (omogeneità del campo, soppressione dei segnali, ecc.)

3.7 Determinazione dei rapporti isotopici tramite Spettroscopia ^2H NMR e Spettrometria di massa IRMS

Nella fotosintesi, l'assimilazione di anidride carbonica da parte dei vegetali avviene secondo due principali tipi di metabolismo: il C3 (ciclo di Calvin) e il C4 (Hatch e Slack). Questi due meccanismi di fotosintesi presentano un frazionamento isotopico differente. I prodotti delle piante C4, quali gli zuccheri e l'alcole da fermentazione, presentano dei tenori di carbonio 13 più elevati di quelli dei loro omologhi provenienti dalle piante C3. La maggior parte dei vegetali, quali la vite e la barbabietola, appartengono al gruppo C3. La canna da zucchero e il granturco appartengono al gruppo C4. La misurazione del tenore di carbonio 13 consente quindi di rivelare e di valutare lo zucchero di origine C4 (zucchero di canna o isoglucosio di granturco) aggiunto ai prodotti derivati dall'uva (mosti di uve, vini, ecc.). Le informazioni combinate del tenore di carbonio 13 con quelle del contenuto di deuterio consentono anche di quantificare l'aggiunta di miscele di zuccheri o di alcoli originari delle piante C3 e C4.

Si possono citare attività di ricerca nel campo delle analisi isotopiche sui vini già a partire dagli anni ottanta, quando il prof G. Martin e suoi collaboratori dell'Università di Nantes adattarono le analisi degli isotopi leggeri già utilizzati in ricerche geologiche, ai prodotti agroalimentari ed in particolare a prodotti vitivinicoli, mediante la tecnica SNIF-NMR (Site-Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance) ed IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry). I rapporti isotopici utilizzati sono quelli del deuterio cioè D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ed $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ legati a fattori pedoclimatici, fisici e biochimici a cui le piante sono soggette. Queste tecniche sono state recepite ed ufficializzate dalla U.E. e successivamente riprese e pubblicate come metodi ufficiali dall'International Organization of Vine and Wine (OIV). Si tratta di tecniche complementari tra loro che sono state e sono attualmente utilizzate dai laboratori del settore per la repressione delle frodi, in quanto permettono di rilevare frodi, quali zuccheraggio artificiale ed annacquamento, difficilmente verificabili con i metodi chimici tradizionali. Successivamente le stesse sono state impiegate anche per stabilire l'origine geografica dei vini. Ultimamente l'utilizzo del rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ha dato informazioni utili per la valutazione dello stress idrico della vite. In accordo col reg.CE n 555/2008, gli stati della U.E. devono ogni anno fornire dati per una banca dati nazionale relativa ai loro vini che per l'Italia è formata da 400 campioni su cui ricavare i riferimenti isotopici nazionali.

Il mercato del settore vitivinicolo è stato sempre oggetto di regolamentazione da parte dell'Unione Europea. La normativa comunitaria viene successivamente integrata in ciascuno stato membro dalle leggi nazionali e dagli specifici disciplinari di produzione. Di recente è stata modificata l'O.C.M. vino che ne disciplina la produzione e la commercializzazione. Per garantire l'origine e l'assenza di sofisticazione e contraffazione dei vini, i laboratori operanti

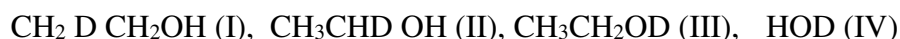
nel settore del controllo devono mettere a punto tecniche di analisi sempre più sofisticate ed innovative che permettano di rilevare eventuali sostanze contaminanti presenti anche solo in tracce. Le tecniche isotopiche (SNIF-NMR ed IRMS), a differenza delle tecniche di analisi chimica tradizionale, possono certificare con buona precisione l'assenza di sofisticazione e determinare l'origine geografica del prodotto valorizzandone il terroir.

In particolare i parametri che vengono presi in considerazione nell'analisi isotopica sono:

- i rapporti isotopici (D/H)_I, (D/H)_{II} (espressi in ppm) ed il loro rapporto R (adimensionale) ottenuti mediante la tecnica SNIF-NMR con cui ricaviamo informazioni sull'origine della specie vegetale che ha sintetizzato lo zucchero da cui proviene l'alcol di fermentazione. Questa informazione certifica la genuinità del vino, e con minore certezza il luogo di provenienza.
- il rapporto isotopico ¹³C/¹²C (espresso in ‰ Vs PDB) che viene misurato mediante tecnica IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry). Questo parametro è legato al tipo di zucchero da cui l'alcol si è generato, inoltre dà indicazioni sull'origine geografica.
- il rapporto isotopico ¹⁸O/¹⁶O (espresso in ‰ Vs SMOW) ottenuto mediante tecnica IRMS. Questo parametro è intimamente legato al terroir di origine del vino in quanto è quello che risente in maniera più accentuata dei parametri ambientali (clima, terreno, distanza dal mare, altitudine ecc..) ed è, pertanto, il più adatto a stabilire l'origine geografica del prodotto in esame.

3.7.1 Determinazione dei Parametri (D/H)_I e (D/H)_{II}

Gli atomi di deuterio contenuti negli zuccheri e nell'acqua di un mosto di uva si ridistribuiscono dopo la fermentazione nelle molecole I, II, III e IV del vino:



Si definiscono i parametri:

(D/H)_I: rapporto isotopico nella molecola I

(D/H)_{II}: rapporto isotopico nella molecola II

(DH)_w^Q: rapporto isotopico dell'acqua e del vino

$R = 2(D/H)_{II}/(D/H)_I$, esprime la distribuzione relativa del deuterio nelle molecole I e II; R viene direttamente misurato a partire dalle intensità h dei segnali e quindi $R = 3h_{II}/h_I$.

(D/H)_I caratterizza soprattutto la specie vegetale che ha sintetizzato lo zucchero ed in misura minore la geografia del luogo di raccolta (natura dell'acqua impiegata per la fotosintesi).

(D/H)_{II} rappresenta la climatologia del luogo di produzione delle uve (qualità dell'acqua piovana e condizioni meteorologiche) ed in misura minore, la concentrazione zuccherina del mosto iniziale.

(DH)_w^Q rappresenta la climatologia del luogo di produzione e la ricchezza in zucchero del mosto iniziale. La determinazione di questo parametro è stata abbandonata a favore del rapporto isotopico ¹⁸O/¹⁶O.

L'aggiunta di zuccheri esogeni (zuccheraggio a secco) prima della fermentazione del mosto si ripercuoterà sulla ridistribuzione del deuterio. Rispetto ai valori dei parametri relativi ad un

vino campione naturale della stessa zona, lo zuccheraggio con zucchero esogeno provocherà le seguenti variazioni:

Tabella 3.1- Variazione dei rapporti isotopici in seguito a zuccheraggio

Parametri Vino	(DH)_I	(DH)_{II}	(DH)_w^Q	R
- Naturale	→	→	→	→
- Arricchito	→	→	→	→
- zucchero di barbabietola	→	→	→	→
- zucchero di canna	→	→	→	→
- zucchero di mais	→	→	→	→

La determinazione dei parametri sopra definiti [(R), (D/H)_I, (D/H)_{II}], è effettuata tramite NMR del deuterio sull'etanolo estratto dal vino o dai prodotti di fermentazione del mosto, del mosto concentrato, del mosto concentrato rettificato ottenuti in determinate condizioni. Essa è eventualmente completata con la determinazione del rapporto isotopico dell'acqua estratta dal vino, (DH)_w^Q e del rapporto isotopico ¹³C/¹²C dell'etanolo.

La prima fase della misura consiste nel determinare il titolo alcolometrico del vino con l'approssimazione di 0,05 % vol. Si passa poi a distillare una quantità di vino adeguata (calcolata in base al grado alcolico del vino) in modo da ottenere 50 ml di distillato con grado alcolico compreso tra 92 e 94%. A questo punto si determina l'esatto grado alcolico del distillato. Per la preparazione del campione per la misura 2H NMR si prendono 3,2 ml di distillato a cui si aggiungono 1,3 ml di N,N-tetrametilurea (TMU) che rappresenta lo standard di riferimento avente rapporto isotopico D/H conosciuto e controllato. Si aggiungono inoltre 150 µl di esafluorobenzene necessario per la procedura di lock. La misura viene effettuata con uno spettrometro NMR Bruker Avance 300 con un magnete da 7.05 T. A questo campo magnetico la frequenza di risonanza di ²H è di 46,05 MHz. Lo spettro viene misurato a 302 K mediando 250 scansioni. Una volta registrato lo spettro NMR, si possono calcolare i parametri (D/H)_I e (D/H)_{II} ed il loro rapporto R seguendo le indicazioni del regolamento CEE 2676/90.

3.7.2 Determinazione del rapporto isotopico ¹³C/¹²C

Il metodo consente la misurazione del rapporto isotopico ¹³C/¹²C dell'etanolo del vino e di quello dell'etanolo ottenuto per fermentazione dei prodotti derivati della vite (mosto, mosto concentrato, mosto concentrato rettificato).

Il tenore di carbonio 13 è determinato sull'anidride carbonica risultante dalla combustione completa del campione. Le abbondanze dei principali isotopomeri di massa 44 (¹²C¹⁶O₂), 45 (¹³C¹⁶O₂ e ¹²C¹⁷O¹⁶O) e 46 (¹²C¹⁶O¹⁸O), risultanti dalle varie combinazioni possibili degli isotopi ¹⁸O, ¹⁷O, ¹⁶O, ¹³C e ¹²C, vengono determinate a partire dalle correnti ioniche misurate su tre collettori differenti di uno spettrometro di massa isotopica. I contributi degli isotopomeri ¹³C¹⁷O¹⁶O e ¹²C¹⁷O₂ possono essere trascurati, data la loro abbondanza molto scarsa. La corrente ionica per m/z = 45 viene corretta, per tener conto del contributo di ¹²C¹⁷O¹⁶O che

viene calcolato in funzione dell'intensità della corrente misurata per $m/z = 46$, considerando le abbondanze relative di ^{18}O e ^{17}O (correzione di Craig). La comparazione con un riferimento tarato in base al riferimento internazionale V-PDB consente il calcolo del tenore di carbonio 13 sulla scala relativa $\delta^{13}\text{C}$ (Tenore di carbonio 13 (^{13}C) espresso in parti per mille ‰). Il PDB, riferimento primario per la misura delle variazioni naturali dei tenori isotopici di carbonio 13, era un carbonato di calcio proveniente da un rostro di belemnite del periodo Cretaceo della formazione "Pee-Dee" dello Stato della Carolina del Sud (USA). Il suo rapporto isotopico ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o R PDB) è uguale a 0,0112372. Il PDB è esaurito da parecchio tempo, ma è rimasto il riferimento primario per esprimere le variazioni naturali dei tenori isotopici di carbonio 13, rispetto al quale vengono tarati i materiali di riferimento, disponibili presso l'Agenzia internazionale dell'energia atomica (AIEA) a Vienna (Austria). Le determinazioni isotopiche dell'abbondanza naturale di carbonio 13 sono pertanto espresse, per convenzione, rispetto al V-PDB.

La misura viene effettuata mediante l'analizzatore elementare (Carlo Erba NA 1500 NC) provvisto di un autocampionatore (FISON AS-800) il quale provvede al prelievo di 2 μl di distillato da inserire nella colonna di ossidazione. La misura prosegue con l'analisi del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sui prodotti di combustione del campione tramite spettrometro di massa IRMS (Micromass Optima VG ISOTECH).

3.7.3 Determinazione del rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

Per la determinazione del rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, 2 ml di vino vengono posti in ciascun contenitore dell'autocampionatore (ISOPREP 18). Sui contenitori viene fatto il vuoto per un certo periodo di tempo allo scopo di eliminare l'aria presente all'interno. Dopo la depressurizzazione viene inserita una quantità stabilita di anidride carbonica a titolo noto, la quale rimane in contatto (in agitazione) con il prodotto da analizzare per circa 6 ore. Trascorso questo periodo di tempo l'anidride carbonica risultante viene inviata allo spettrometro di massa IRMS per la misura.

3.8 Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti dalle analisi chimiche, isotopiche e spettroscopiche sono stati sottoposti ad analisi statistica. In particolare si è eseguita l'analisi delle componenti principali (PCA). I dati sono stati trattati in modo diverso a seconda della loro tipologia.

3.8.1 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici.

L'analisi alle componenti principali è stata eseguita utilizzando il software XLSTAT 7.5 (Addinsoft). Prima di eseguire la PCA le variabili sono state autoscalate. I dati mancanti sono stati sostituiti con il valor medio della variabile. Dal grafico delle proiezioni dei campioni sulle prime due componenti principali (score plot) si è potuta osservare l'eventuale presenza di raggruppamenti fra i campioni ed evidenziare similitudini/differenze tra di essi. L'analisi del grafico dei pesi delle prime due componenti principali (loadings plot) ha permesso di determinare i parametri più importanti nella separazione dei campioni.

3.8.2 *Analisi statistica dei dati spettroscopici.*

L'analisi statistica condotta sui dati spettrali ha permesso di evidenziare le differenze tra i campioni di vino in esame. Utilizzando il software Bruker AMIX 3.9 si sono estratte dallo spettro NMR una serie di variabili che sono state utilizzate per il trattamento statistico dei dati. In particolare tramite la procedura nota come bucketing si è diviso lo spettro NMR ottenuto nell'esperimento 3 in tante porzioni larghe ciascuna 0.04 ppm. L'integrazione del segnale per ogni singola porzione di spettro rappresenta una variabile per l'analisi statistica. Questa operazione è stata condotta nella regione spettrale da 0.5 a 10 ppm escludendo le zone dello spettro in cui cadono i segnali residui di acqua ed etanolo. Le variabili così ottenute sono state scalate con il metodo "Pareto scaling" e si è proceduto all'analisi delle componenti principali. Dal grafico delle proiezioni dei campioni sulle prime due componenti principali (score plot) si è potuta osservare l'eventuale presenza di raggruppamenti fra i campioni ed evidenziare similitudini/differenze tra di essi. L'analisi del grafico dei pesi delle prime due componenti principali (loadings plot) ha permesso di risalire alle zone dello spettro ^1H NMR responsabili della distribuzione dei campioni osservata nello score plot. Utilizzando i dati ottenuti sui metaboliti standard, si è potuto risalire a quali metaboliti del vino avessero segnali NMR in quelle particolari regioni spettrali. Al termine dell'analisi si sono potuti identificare singoli metaboliti o gruppi di metaboliti responsabili delle differenze riscontrate tra i campioni. Per meglio evidenziare il contributo dei singoli metaboliti alle differenze osservate tra i campioni, si è ripetuta l'analisi statistica dividendo lo spettro ^1H NMR in due parti da 0.5 a 5 ppm e da 5 a 10 ppm.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

Effetto vitigno ed annata di produzione

4.1 Creazione della Banca dati dei Metaboliti

I recenti progressi della chimica hanno prodotto un'enorme quantità di materiale scientifico, portando alla ribalta la necessità di nuovi sistemi di organizzazione, accesso e fruizione delle informazioni. Quindi, nella prima fase della tesi si è lavorato su una serie di composti puri per costruire un database di metaboliti che potesse servire come guida per l'identificazione di alcuni componenti del vino di rilevante interesse per la (ricerca) pratica enologica. Sono state effettuate misure ^1H NMR sui singoli metaboliti in matrice idroalcolica. Tali misure hanno consentito di creare un database di spettri ^1H NMR che ha permesso di identificare i componenti del vino a partire dallo spettro NMR.

I metaboliti considerati sono stati raggruppati in grosse classi di componenti nel vino: glucidi, acidi organici, alcoli, acidi fenolici ed amminoacidi. I glucidi sono costituiti da molecole polifunzionali a cui si deve la loro reattività chimica, biochimica e metabolica. Essi sono i precursori degli acidi organici, dei composti fenolici e degli amminoacidi aromatici. Gli acidi fenolici di tipo cinnamico e di tipo fenolico anche se di scarsa importanza quantitativa possono avere invece importanza qualitativa perché possono diventare esteri dell'alcol etilico e contribuire all'aroma del vino. Per esempio gli acidi idrossi-cinnamici, che nel succo della polpa possono raggiungere la concentrazione di qualche centinaio di mg/l, sono chiamati così poiché sono derivati dell'acido cinnamico. Per quanto riguarda gli amminoacidi possono diventare indicatori di maturità dell'uva: essi aumentano notevolmente nel corso della maturazione in particolare la prolina subisce un netto aumento una quindicina di giorni prima della data della vendemmia.

I composti (tabella 4.1) standard puri sono stati sciolti in una matrice simil-vino (soluzione idroalcolica al 12% in etanolo contenente 5 g/l di acido tartarico, pH 3.2) per ottenere soluzioni a titolo noto. Le soluzioni standard degli analiti sono state misurate in modo del tutto analogo ai campioni di vino. Ciò ha permesso di identificare i segnali dei 62 metaboliti del vino per confronto tra gli spettri della matrice simil-vino (bianco) e gli spettri ottenuti dalle soluzioni idroalcoliche dei composti standard. L'integrazione dei segnali NMR sui composti standard ed il confronto con le aree degli stessi segnali nei campioni di vino permette, oltre all'individuazione dei metaboliti, anche la loro quantificazione. La tabella 4.2 riporta i segnali ^1H NMR identificati per ogni singolo metabolita insieme con la loro assegnazione.

Nella seconda fase del lavoro si è passati all'analisi dei campioni reali di vino.

Tabella 4.1 Elenco metaboliti

N°	METABOLITA	Purezza %	Conc. Reale (g/l)	Conc [M]
1	glicerolo	99,5%	5,0042	0,0543
2	D-(+)-glucosio	99,5%	0,9990	0,0055
3	D-(-)-fruttosio	99,0%	1,0032	0,0056
4	saccarosio	99,0%	0,5003	0,0015
5	L-(+)-arabinosio	98,0%	0,4887	0,0033
6	D-(+)-xilosio	99,0%	0,2010	0,0013
7	D-(-)-ribosio	98,0%	0,1989	0,0013
8	D-(+)-mannosio	99,0%	0,2000	0,0011
9	acido malico	99,0%	0,8910	0,0066
10	acido lattico	98,0%	1,0218	0,0113
11	acido citrico	99,0%	0,5056	0,0026
12	acido succinico	99,0%	0,5029	0,0043
13	acido gluconico	99,0%	0,4996	0,0025
14	acido fumarico	99,0%	0,0099	0,0001
15	acido acetico	99,0%	0,4937	0,0082
16	acido galatturonico	97,0%	0,9687	0,0046
17	acido piruvico	98,0%	0,0524	0,0006
18	acido scichimico	98,0%	0,0557	0,0003
19	GABA	99,0%	0,2049	0,0020
20	acido glutammico	99,0%	0,0990	0,0007
21	acido ascorbico	99,7%	0,1057	0,0006
22	2,3-butandiolo	98,0%	0,4991	0,0055
23	isobutanolo	99,0%	0,0985	0,0013
24	metanolo	99,8%	0,2006	0,0063
25	1,3-propandiolo	97,0%	0,2018	0,0027
26	3-metil-1-butanolo	98,0%	0,3959	0,0045
27	2-feniletanolo	98,0%	0,1009	0,0008
28	furfurale	98,0%	0,0153	0,0002
29	HMF	97,0%	0,0151	0,0001
30	acetoino	95,0%	0,0467	0,0005
31	etilattato	98,0%	0,3048	0,0026
32	acetaldeide	99,0%	0,0366	0,0008
33	epicatechina	90,0%	0,0468	0,0002
34	(+)-catechina idrato	98,0%	0,0515	0,0002
35	acido gallico	98,0%	0,0525	0,0003
36	acido caffeico	97,0%	0,0509	0,0003
37	acido <i>p</i> -cumarico	98,0%	0,0520	0,0003
38	quercetina	95,0%	0,0499	0,0002
39	<i>trans</i> -resveratrolo	98,0%	0,0520	0,0002
40	kampferolo	98,0%	0,0491	0,0002
41	acido benzoico	99,0%	0,0912	0,0007
42	acido sorbico	99,0%	0,0918	0,0008
43	acido salicilico	99,0%	0,0921	0,0007
44	malvidina (in CD ₃ OD)	99,0%	0,1300	0,0004
45	acido <i>trans</i> -ferrulico	99,0%	0,0533	0,0003
46	acido siringico	95,0%	0,0501	0,0003
47	epicatechina gallato	98,0%	0,0484	0,0001
48	prolina	99,0%	1,0006	0,0087
49	arginina	98,0%	0,4978	0,0029
50	alanina	99,0%	0,1005	0,0011
51	leucina	98,0%	0,0980	0,0007
52	lisina HCl	99,0%	0,0990	0,0005
53	trigonellina HCl	99,0%	0,0530	0,0003
54	isoleucina	99,5%	0,0525	0,0004
55	acido aspartico	99,0%	0,0520	0,0004
56	treonina	99,0%	0,0523	0,0004
57	tirosina	99,0%	0,0990	0,0005
58	cisteina	97,0%	0,0975	0,0008
59	istidina	99,0%	0,0995	0,0006
60	etilacetato	99,5%	0,2020	0,0023
61	acido tartarico	99,5%	4,9750	0,0565
62	etanolo	99,9%	94,6800	2,0550

Tabella 4.2 Segnali 1HNMR dei metaboliti standard

n°	Composti	δ (molteplicità, costante di accoppiamento, assegnazione)
1	glicerolo	3.53(d, 6.5, CH ₂), 3.55(d, 6.50, CH ₂), 3.78 ¹ (m, CH)
2	D-(+)-glucosio	3.22 (d,d, 8.02, 9.9 C ₂ H), 3.40 (m, C ₁ H ²), 3.88 (d,d 2.10,12.3, C ₆ H) 4.62 (d,7.9, C ₁ H), 5.21 (d, 3.8, C ₁ H)
3	D-(-)- fruttosio	3.87 (d,d, 3.41 10.12, C ₄ H), 3.97 (m, C ₅ H), 4.00 (d,d, 0.9, 12.60, C ₆ H), 4.09 (d, 3.4, C ₃ H)
4	saccarosio	4.03 (t,8.50, C ₄ H ^{3F}), 4.19 (d, 8.7, C ₃ H ^{3F}), 5.39 (d, 3.8, C ₁ H ^{3G}),
5	L-(+)-arabinosio	3.83 – 4.00 (m, CH ²), 4.49 (d,7.8 C ₁ H), 5.21 (d,3.6, C ₁ H), 5.28 (d, 4.4, C ₁ H)
6	D-(+)-xilosio	3.20 (d,d, 7.9, 9.3, C ₂ H), 3.29 (d,d, 10.70, 11.4 saccarosio, C ₅ H ₂), 3.41 (t, 9.2, C ₃ H), 3.90 (d,d, 5.5, 11.4, C ₅ H ₂), 4.55 (d, 7.9, C ₁ H), 5.17 (d, 3.7, C ₁ H)
7	D-(-)-ribosio	3.82 – 3.98 (m, ²), 4.08 (m, C ₂ H), 4.19 (d,d, 4.8, 6.7, C ₃ H), 4.92 (d, 6.3, C ₁ H), 5.22 (d, 1.8 C)
8	D-(+)-mannosio	3.35 (m, C ₅ H), 3.56 (t, 9.6, C ₄ H), 3.81-3.92 (m, ²), 5.16 (d, 1.60, C ₁ H)
9	acido malico	2.79 (d,d, 7.1, 16.6, CH ₂) 2.88 (d,d, 4.6, 16.6, CH ₂) 4.53 (d,d 4.6, 7.1, CH)
10	acido lattico	1.40 (d, 7,CH ₃), 4.33 (q, 7 CH)
11	acido citrico	2.80 (d,15.70, CH ₂), 2.96 (d, 15.70, CH ₂)
12	acido succinico	2.65 (s)
13	acido gluconico	3.82 (d, 2.66, C ₆ H ₂), 4.10 (m, C ₃ H), 4.37(d, 3.9, C ₂ H)
14	acido fumarico	6.76 (s)
15	acido acetico	2.07 (s)
16	acido galatturonico	3.92 (d,d, 3.40, 10.3, C ₃ H), 4.24 (d,d, 1.14, 3.52, C ₄ H), 4.30 (d, 1.2, C ₅ H), 4.31 (d,d, 1.3, 3.3, C ₄ H), 4.64 (d, 1.2,C ₅ H), 5.19 (d, 3.5, C ₁ H), 5.24 (d, 4.70, C ₁ H), 5.30 (d, 3.8, C ₁ H)
17	acido piruvico	2.36 (s)

18	acido scichimico	2.22 (d,d 6.4, 18.2, C ₂ H ₂), 2.74 (d,d, 5.2, 18.2, C ₂ H ₂), 4.04 (m, C ₅ H), 6.80 (m, C ₆ H)
19	GABA	1.94 (m, C ₃ H ₂), 2.49 (t, 7.3, C ₂ H ₂), 3.04 (brs, C ₄ H ₂)
20	acido glutammico	2.15 (m, C ₃ H ₂), 2.56 (m, C ₄ H ₂), 3.83 (t, 6.5, C ₂ H)
21	acido ascorbico	4.05 (t,d, 1.8, 6.6, C ₆ H), 4.92 (d, 1.8, C ₅ H)
22	2,3-butandiolo	1.13 (d, 6.00, C ₁ H ₃)
23	isobutanolo, (2 – metil-1-propanolo)	0.86 (d, 6.70, CH ₃), 1.73 (sept, 6.7, CH), 3.36 (d, 6.6, CH ₂)
24	metanolo	3.34 (s)
25	1,3-propandiolo	1.78 (quint., 6.5, C ₂ H ₂)
26	3-metil-1-butanolo	0.88 (d, 6.6, CH ₃), 1.42 (q, 6.94, C ₂ H ₂), 1.64 (m, C ₃ H)
27	2-feniletanolo	2.85 (t, 6.70, C ₂ H ₂), 3.82 (t, 6.70, C ₁ H ₂), 7.30 (m, C _{orto} H, C _{para} H), 7.37 (m, C _{meta} H)
28	furfurale	6.75 (d,d, 1.7, 3.7, C ₄ H), 7.57 (d, 3.70, C ₃ H), 7.91 (m, C ₅ H), 9.49 (d, 0.7 CHO)
29	HMF	4.68 (s, CH ₂), 6.66 (d, 3.70 C ₄ H), 7.53 (d, 3.70, C ₃ H), 9.45 (s, CHO)
30	acetoino	1.36 (d, 7.1, C ₄ H ₃), 2.21 (s, C ₁ H ₃), 4.40 (q, 7.1, C ₃ H)
31	etillattato	1.39 (d, 7.00, CH ₃), 4.21 (q, 7.1, CH ₂ etile), 4.37 (q, 7.00, CH)
32	acetaldeide	2.23 (d, 3.00 CH ₃), 9.66 (q, 3.00, CHO)
33	epicatechina	2.75 (d,d, 2.20, 16.7 C ₄ H ₂), 2.92 (d,d, 4.5, 16.7, C ₄ H ₂), 4.32 (m, C ₃ H), 4.98 (s, C ₂ H), 6.07 (d, 2.3, C ₆ H) 6.10 (d, 2.3, C ₈ H), 6.93 (s, C _{6'} H, C _{5'} H), 7.03 (s, C ₂ H)
34	(+)-catechina idrato	2.55 (d,d, 7.91, 16.10, C ₄ H ₂), 2.85 (d,d, 5.4, 16.10, C ₄ H ₂), 4.23 (m, C ₃ H), 6.00 (d, 2.3, C ₆ H), 6.10 (d, 2.3, C ₈ H), 6.85 (d,d, 2.00, 8.3, C _{6'} H), 6.91 (d, 8.3, C _{5'} H), 6.93 (d, 2.00, C _{2'} H)
35	acido gallico	7.15 (s)

36	acido caffeico	6.35 (d, 16.1, C2H), 6.93 (d, 8.33, C5'H), 7.12 (d,d, 2.00, 8.30, C6'H), 7.19 (d, 2.00, C2'H), 7.60 (d, 16.1, C3H)
37	acido <i>p</i> -cumarico	6.38 (d,15.9, C2H), 6.93 (d,8.7, C3'H, C5'H), 7.58 (d, 8.7, C2'H, C6'H), 7.70 (d, 15.9, C3H)
38	quercetina	6.30 (d, 1.80, C6H), 6.52 (d, 1.80, C8H), 7.00 (d, 8.60, C5'H), 7.65 (d,d, 8.60, C6'H), 7.74 (d, 2.00, C2'H)
39	<i>trans</i> -resveratrolo	6.31 (t, 2.1, C4H), 6.64 (d, 2.1, C2H, C6H), 6.91 (d, 8.60, C3'H, C5'H), 6.96 (d, 16.4, C7H), 7.14 (d, 16.4, C8H), 7.50 (d, 8.60, C2'H, C6'H)
40	kampferolo	6.32 (d, 2.1, C6H), 6.55 (d, 2.1, C8H), 7.02 (d, 8.60, C3'H, C5'H), 8.08 (d, 8.90, C2'H, C6'H)
41	acido benzoico	7.54 (t, 8.20, C3H, C5H), 7.68 (t, 7.50, C4H),8.02 (d,d, 1.30, 8.20, C2H, C6H)
42	acido sorbico	1.84 (d, 4.90, C6H ₃), 5.83 (d, 15.2, C2H), 6.31 (m, C3H, C4H), 7.30 (m, C5H)
43	acido salicilico	6.97 (m, C3H, C5H), 7.49 (t,d, 1.7, 8.8, C4H), 7.85 (d,d, 1.7, 7.9, C6H)
44	malvidina	4.08 (s, OCH ₃), 6.72 (d, 2.00, C6H), 7.03 (d, 2.00, C8H), 8.12 (s, C2'H, C6'H), 8.71 (s, C4H)
45	acido <i>trans</i> -ferrulico	3.90 (s, OCH ₃), 6.41 (d, 16.00, C2H), 6.94 (d, 8.20, C5'H), 7.19 (d,d, 1.90, 8.2, C6'H)7.30 (d, 1.9, C2'H), 7.66 (d, 16.00, C3H)
46	acido siringico	3.90 (s, OCH ₃), 7.38 (s, C2H, C6H)
47	epicatechina gallato	6.10 (d, 2.2, C6H), 6.13 (d, 2.2, C8H), 6.84 (d, 8.3, C5'H), 6.93 (d,d, 1.8, 8.3, C6'H), 6.99 (s, gallato), 7.02 (d, 1.8, C2'H) (non osservabili C2,C3,C4)
48	prolina	2.00 (m, C4H ₂), 2.07 (m, C3H), 2.34 (m, C3H), 3.67 (m, C5H ₂), 4.13 (t, 7.4, C2H)
49	arginina	1.68 (m, C4H ₂), 1.91 (m, C3H ₂), 3.23 (m, C5H ₂), 6.70 (brs, NH ₂), 7.26 (s, NH)
50	alanina	1.49 (d, 7.2, C3H ₃), 3.85 (q, 7.2, C2H)
51	leucina	0.94 (d, 6.20, C5CH ₃), 0.96 (d, 6.10, CH ₃), 1.71 (m, C4H)
52	lisina	1.48 (m, C4H ₂), 1.71 (m, C5H ₂), 1.90 (m, C3H ₂), 3.01 (brs, C6H ₂)
53	trigonellina	4.43 (s, NCH ₃), 8.08 (t, 7.16, C5H), 8.84 (m, C4H, C6H), 9.14 (s, C2H)
54	isoleucina	0.93 (t, 7.4, C5H ₃), 1.00 (d, 7.00, CH ₃), 1.46 (m, C4H), 2.00 (m, C3H)

55	acido aspartico	2.94 (d,d, 7.00, 18.00, C3H), 3.00 (d,d, 4.6, 18.00, C3H), 4.05 (d,d, 4.5, 7.00, C2H)
56	treonina	1.32 (d, 6.6, C5H ₃), 4.27 (m, C3H)
57	tirosina	3.05 (d,d, 7.80, 14.80, C3H ₂), 3.20 (d,d, 5.20, 14.80, C3H), 3.99 (d,d, 5.20, 7.80, C2H), 6.87 (d, 8.50, C3'H, C5'H), 7.18 (d, 8.50, C2'H, C6'H)
58	cisteina	3.02 (d,d, 4.10, 14.90, C3H), 3.10 (d,d, 5.70, 14.90, C3H), 4.00 (d,d, 4.10, 5.70, C2H)
59	istidina	3.34 (m, C3H ₂), 4.04 (d,d, 6.40, 6.70, C2H), 7.38 (brs, C5'H), 8.65 (d, 1.30, C2'H)
60	etilacetato	1.24 (t, 7.2, CH ₃ etile), 2.07 (s, CH ₃ acetato), 4.13 (q, 7.2, CH ₂)
61	acido tartarico	4.60 (s, C2H, C3H)
62	etanolo	1.04 (t, 7.1 CH ₃), 1.30 (t, 7.1 CH ₃), 3.50 (q, 7.1 CH ₂), 3.78 (q, 7.1 CH ₂)

¹. Sovrapposto con Segnale Matrice, ². Anello, ³. F=Fruttosio, ³G=Glucosio

4.2 Selezione dei campioni

Il lavoro di studio sui vini è stato suddiviso in due fasi. Nella prima fase si è voluto studiare gli effetti del vitigno di provenienza, dell'annata di produzione e del periodo di invecchiamento. A questo scopo si sono identificati tre produttori le cui aziende si trovano in tre diverse zone del Piemonte nei comuni di Carpeneto (AL), Portacomaro (AT) e Cisterna d'Asti (AT). Per ognuno dei tre produttori si sono ottenuti campioni di vino provenienti da vitigni differenti, da diverse vendemmie e si sono ripetute le analisi dopo diversi periodi di conservazione. I campioni di vino ottenuti da ogni produttore sono stati confrontati tra di loro con tecniche di analisi chimiche, isotopiche (²H NMR, IRMS) e spettroscopiche (¹H NMR) per trovare elementi utili nel differenziarli alla luce dei criteri scelti (vitigno, annata, periodo di conservazione). I confronti sono stati effettuati solo tra i vini dello stesso produttore per limitare il più possibile le interferenze dovute alle diverse zone di produzione ed alle differenti pratiche di cantina.

Nella seconda fase dello studio, invece, si sono voluti valutare gli effetti della zona di produzione mantenendo costante il vitigno (Barbera o Dolcetto) e l'annata di produzione (2013). A questo scopo si sono confrontati campioni di vino Dolcetto del 2013 provenienti dal comune di Frossasco (44.933832 N, 7.349936 E), situato ad Ovest del Piemonte, e dal comune di Carpeneto (44.677586 N, 8.605501 E) più ad Est. Si sono confrontati, inoltre, campioni di vino Barbera, prodotti nel 2013, provenienti dal comune di Piverone (45.447822 N, 8.006353 E), situato a Nord del Piemonte, dal comune di Rosignano Monferrato (45.079728 N, 8.398093 E), più in centro, e dal comune di Carpeneto (44.677586 N, 8.605501 E) più a Sud. Un ulteriore confronto ha riguardato campioni di vino Barbera 2013 provenienti dalle zone di Cisterna d'Asti (44.825629 N, 8.001829 E), disposta ad Ovest, Rosignano Monferrato

(45.079728 N, 8.398093 E), più in centro, e Montù Beccaria (45.035635 N, 9.314562 E), situata ad Est.

In ultimo si sono voluti confrontare campioni di vino Barbera 2013 di diversi produttori le cui aziende si trovano in zone molto vicine per valutare se i metodi di studio proposti fossero comunque in grado di separare i vini in base alla loro provenienza. Per fare ciò si sono esaminati campioni di Barbera 2013 provenienti dal comune di Costigliole d'Asti (44.788013 N, 8.180298 E), Asti (44.924860 N, 8.186389 E) e Govone (44.803986 N, 8.099499 E). Il confronto è poi stato esteso ad altri tre campioni, due provenienti dal comune di Rosignano Monferrato (45.079728 N, 8.398093 E), ed uno dal comune di Vignale Monferrato (45.010894 N, 8.396438 E).

Le prove sperimentali, volte alla determinazione del contenuto in metaboliti, hanno riguardato i seguenti campioni di vino provenienti da cantine commerciali.

Per ogni vino sono state analizzate tre diverse bottiglie e da ogni bottiglia sono stati preparati tre campioni che sono stati analizzati in maniera indipendente. La preparazione dei campioni e l'analisi spettroscopica sono state condotte seguendo il protocollo descritto nel capitolo 3.

Tabella 4.3 – Campioni di vino analizzati e loro provenienza

Vino	Annata	Zona	Codifica
Barbera Piemonte	2012	Carpeneto (AL)	BA01-12
Nebbiolo Piemonte	2012	Carpeneto (AL)	NE01-12
Dolcetto Piemonte	2012	Carpeneto (AL)	DO01-12
Cortese Piemonte	2012	Carpeneto (AL)	CO01-12
Chardonnay Piemonte	2012	Carpeneto (AL)	CH01-12
Grignolino d'Asti	2012	Portacomaro (AT)	GR01-12
Ruchè di Castagnole Monferrato	2012	Portacomaro (AT)	RU01-12
Nebbiolo Langhe	2012	Cisterna d'Asti (AT)	NE02-12
Barbera d'Asti	2012	Cisterna d'Asti (AT)	BA02-12
Barbera del Monferrato	2012	Rosignano Monf. (AL)	BA03-12
Barbera Piemonte	2013	Carpeneto (AL)	BA01-13
Nebbiolo Piemonte	2013	Carpeneto (AL)	NE01-13
Dolcetto Piemonte	2013	Carpeneto (AL)	DO01-13
Cortese Piemonte	2013	Carpeneto (AL)	CO01-13
Chardonnay Piemonte	2013	Carpeneto (AL)	CH01-13
Grignolino d'Asti	2013	Portacomaro (AT)	GR01-13

Ruchè di Castagnole Monferrato	2013	Portacomaro (AT)	RU01-13
Nebbiolo Langhe	2013	Cisterna d'Asti (AT)	NE02-13
Barbera d'Asti	2013	Cisterna d'Asti (AT)	BA02-13
Barbera del Monferrato	2013	Rosignano Monf. (AL)	BA03-13
Barbera Piemonte	2013	Costigliole d'Asti (AT)	BA04-13
Dolcetto Piemonte	2013	Frossasco (TO)	DO02-13
Barbera Piemonte	2013	Asti (AT)	BA05-13
Barbera Piemonte	2013	Rosignano Monf. (AL)	BA06-13
Barbera Canavese	2013	Piverone (TO)	BA07-13
Barbera Oltrepò Pavese	2013	Montù Beccaria (PV)	BA08-13
Barbera Piemonte	2013	Vignale Monf. (AL)	BA09-13
Barbera Colli Tortonesi	2013	Tortona (AL)	BA10-13
Barbera Piemonte	2013	Govone (CN)	BA11-13
Barbera Piemonte	2014	Carpeneto (AL)	BA01 -14
Dolcetto Piemonte	2014	Carpeneto (AL)	DO01-14
Cortese Piemonte	2014	Carpeneto (AL)	CO01-14
Chardonnay Piemonte	2014	Carpeneto (AL)	CH01-14

4.3 Analisi dei vini della zona di produzione di Carpeneto (AL)

4.3.1 Analisi chimiche

I vini oggetto di studio sono stati analizzati in modo da ottenere una caratterizzazione chimico-fisica del prodotto. Nella tabella 4.4 sono riportati i valori medi per i parametri presi in esame. Le analisi dell'indice degli antociani e dei flavonoidi totali dei vini sono state effettuate come riportato da Di Stefano et al. (1989) e Di Stefano e Cravero (1989) con opportune modifiche (Di Stefano et al., 1997).

I campioni sono stati prodotti con uve coltivate nella regione Piemonte (Tenuta Cannona, località Carpeneto, provincia di Alessandria), provenienti da quattro diverse cultivar, di annate del 2012 e 2013 e seguendo protocolli di vinificazione standard tradizionali.

Tabella 4.4 Analisi chimiche e spettrofotometriche

vini	pH	Ac. Totale (g/L)	distillato (% vol)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
BA01-12	3,24	5,33	15,09	273	1579	0,430	0,709	0,144	0,606	1,140
NE01-12	3,23	6,37	13,53	17	758	0,053	0,033	0,006	1,581	0,086
DO01-12	3,27	4,43	15,77	233	1938	0,386	0,637	0,130	0,606	1,023
CO01-12	2,98	4,51	13,75	-	-	0,116	-	-	-	-
CH01-12	3,02	5,12	12,72	-	-	0,081	-	-	-	-
BA01-13	3,21	5,21	12,70	262	981	0,208	0,302	0,055	0,691	0,510
NE01-13	2,94	6,70	14,24	7	300	0,012	0,006	0,001	1,926	0,019
DO01-13	3,64	3,87	14,29	389	2451	0,275	0,376	0,085	0,733	0,651
CO01-13	3,38	4,67	12,65	-	-	0,083	-	-	-	-
CH01-13	3,34	6,44	12,98	-	-	0,071	-	-	-	-

I valori sperimentali ottenuti dall'analisi dei parametri presi in considerazione rispecchiano l'andamento della zona e dell'annata. In particolare, il pH varia da un minimo di 2.94 ad un massimo di 3.64 per le due annate. I vini bianchi variano per questi due anni presi in considerazione da 2.98 a 3.38. L'acidità totale per i vini rossi presenta un minimo di 3.87 g/L a un massimo di 6.70 g/L per i vini rossi. Quelli bianchi da un minimo di 4.51 g/L ad un massimo di 6.44 g/L. Il contenuto alcolico finale è di circa 15 e 16 % v/v ed è già elevato per i vini Barbera e Dolcetto rispettivamente del primo anno mentre per il secondo anno si sono attestati su valori più bassi, intorno ai 13,14 % v/v. Mentre i vini bianchi nelle due annate riportano valori intorno ai 13 % v/v. L'indice di antociani totali presenta valori minimi di 17 e 7 mg/L nel vino Nebbiolo a un valore massimo per il vino Dolcetto di 389 mg/L nel secondo anno di sperimentazione. Analoghe considerazioni si evidenziano per i flavonoidi totali che variano tra 300-2451 mg/L tra primo e secondo anno. Una caratteristica peculiare di questi vini è l'intensità colorante elevata; somma E420+E520 intorno a 1 per il primo anno e di 0.6 per il secondo. Il valore di intensità colorante, intesa come somma delle assorbanze a 420 e 520 nm su un percorso ottico di 1mm mostra delle differenze tra i vini nelle due annate. Oltre ai valori di intensità colorante superiore, la tonalità colorante di T, (E420/E520) evidenzia la minore influenza delle tinte giallo aranciate; i valori di intensità a 520 nm sono più elevati pur avendo un indice di antociani totali simile. Da questi dati si evince che il vino Nebbiolo non rispecchia nessuno dei parametri minimi nelle due annate per un vino rosso. In entrambe le annate le uve presentavano problemi di tipo fitosanitario; inoltre, durante la vinificazione si sono verificati probabilmente dei problemi di natura tecnica che non hanno consentito di ottenere un prodotto confrontabile con gli altri rossi della medesima cantina. Per questo si è deciso di escludere il vino Nebbiolo dalle analisi future.

4.3.2 *Analisi isotopiche*

Tabella 4.5 Dati isotopici

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	R	¹⁸ O/ ¹⁶ O δ ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
BA01-12	15,09	98,48	133,61	2,713	2,210
NE01-12	13,53	98,12	130,71	2,664	1,110
DO01-12	15,77	100,36	132,61	2,643	3,450
CO01-12	13,74	99,27	131,09	2,641	3,580
CH01-12	12,72	99,34	128,15	2,580	4,220
BA01-13	12,70	101,12	131,06	2,592	1,695
NE01-13	14,24	97,35	130,92	2,690	0,579
DO01-13	14,29	98,82	132,92	2,690	3,667
CO01-13	12,66	100,76	129,03	2,561	1,168
CH01-13	12,99	98,93	129,43	2,617	2,091

I parametri isotopici relativi agli isotopi leggeri consentono, in pratica, confrontando i valori ottenuti tra i campioni analizzati e quelli contenuti nella banca dati, di differenziare le zone di produzione. In tabella 4.5 vengono riportati i valori dei rapporti isotopici determinati per i vini oggetto dello studio delle annate 2012-2013. Il parametro isotopico (D/H)_I mostra valori simili per i campioni di entrambe le annate. Una situazione differente si presenta per il parametro isotopico δ ¹⁸O ‰ per tutti i vini, con valori minori nel secondo anno rispetto al primo anno, a causa di un andamento climatico differente. È necessario sottolineare anche in questo caso come i campioni di Nebbiolo si discostino notevolmente da tutti gli altri.

4.3.3 *Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici*

Sui dati delle analisi chimiche ed isotopiche ottenuti, si è eseguita l'analisi delle componenti principali. I campioni di vino rosso e di vino bianco sono stati confrontati indipendentemente. Osservando lo score-plot ottenuto per i vini rossi (Figura 4.1), si può notare come entrambe le componenti principali discriminino i prodotti. In particolare, la PC1 separa nettamente le annate di produzione dei vini. Lungo questa componente, i campioni del 2012 si posizionano con peso positivo, mentre quelli del 2013 con peso negativo. Lungo la PC2 invece si separano i vini provenienti dai due vitigni diversi, Dolcetto con peso positivo e Barbera con peso negativo.

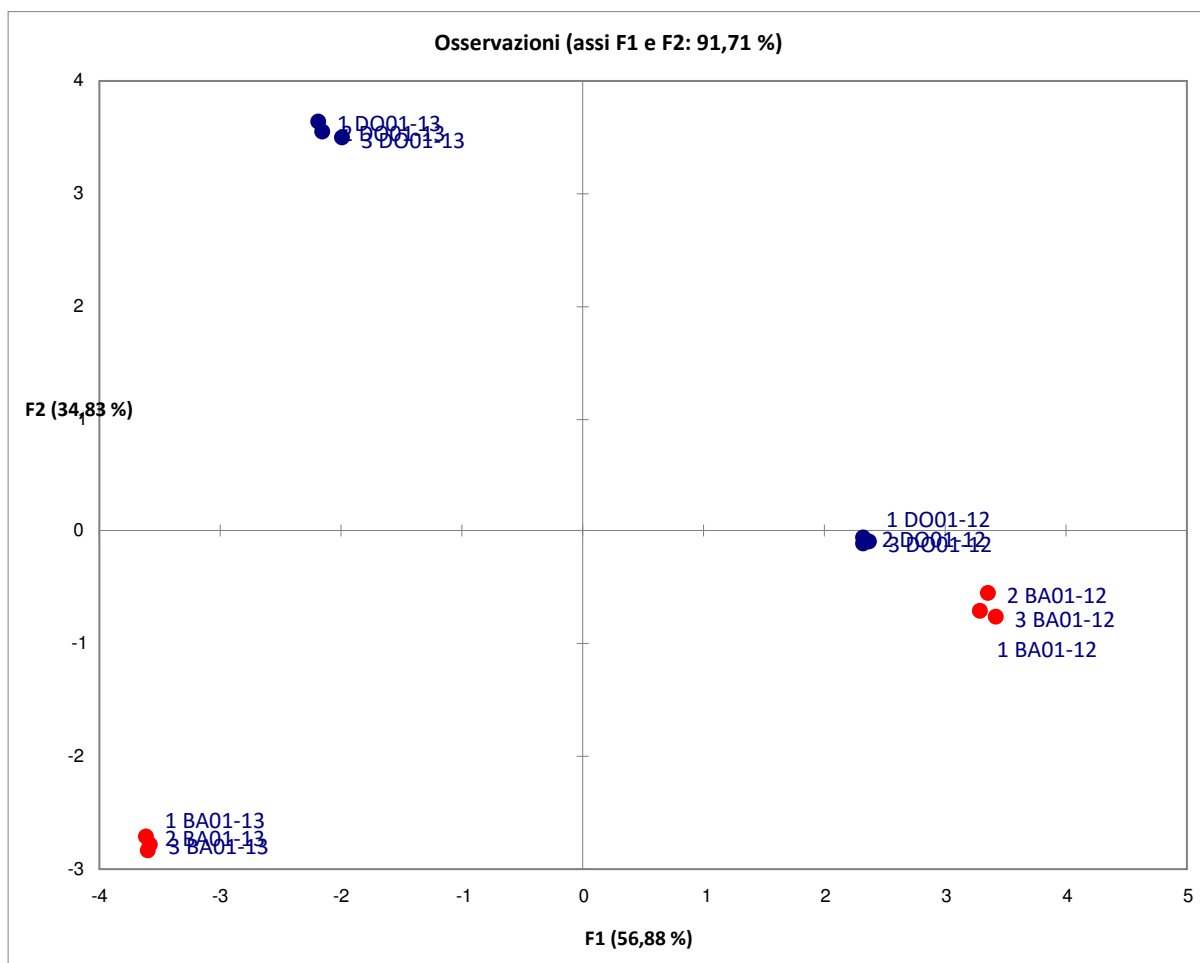


Figura 4.1 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

Se confrontiamo lo score-plot con il loading-plot (figura 4.2) possiamo trarre alcune considerazioni sui campioni analizzati.

In particolare, se esaminiamo la prima componente principale, i campioni del 2012 sono caratterizzati da un tenore alcolico maggiore e maggior intensità colorante, mentre il 2013 presenta delle note aranciate ed un tenore alcolico inferiore.

Ciò concorda con l'andamento climatico delle due annate; nel 2013, la piovosità elevata e le temperature contenute, non hanno permesso all'uva di raggiungere il medesimo grado di maturazione dell'anno precedente.

Se invece prendiamo in esame la seconda componente principale, possiamo notare come i campioni provenienti dai due vitigni si separino in base all'acidità ed al contenuto in polifenoli: i vini Barbera sono più acidi rispetto a quelli Dolcetto, caratterizzati da un tenore maggiore in antociani e flavonoidi totali.

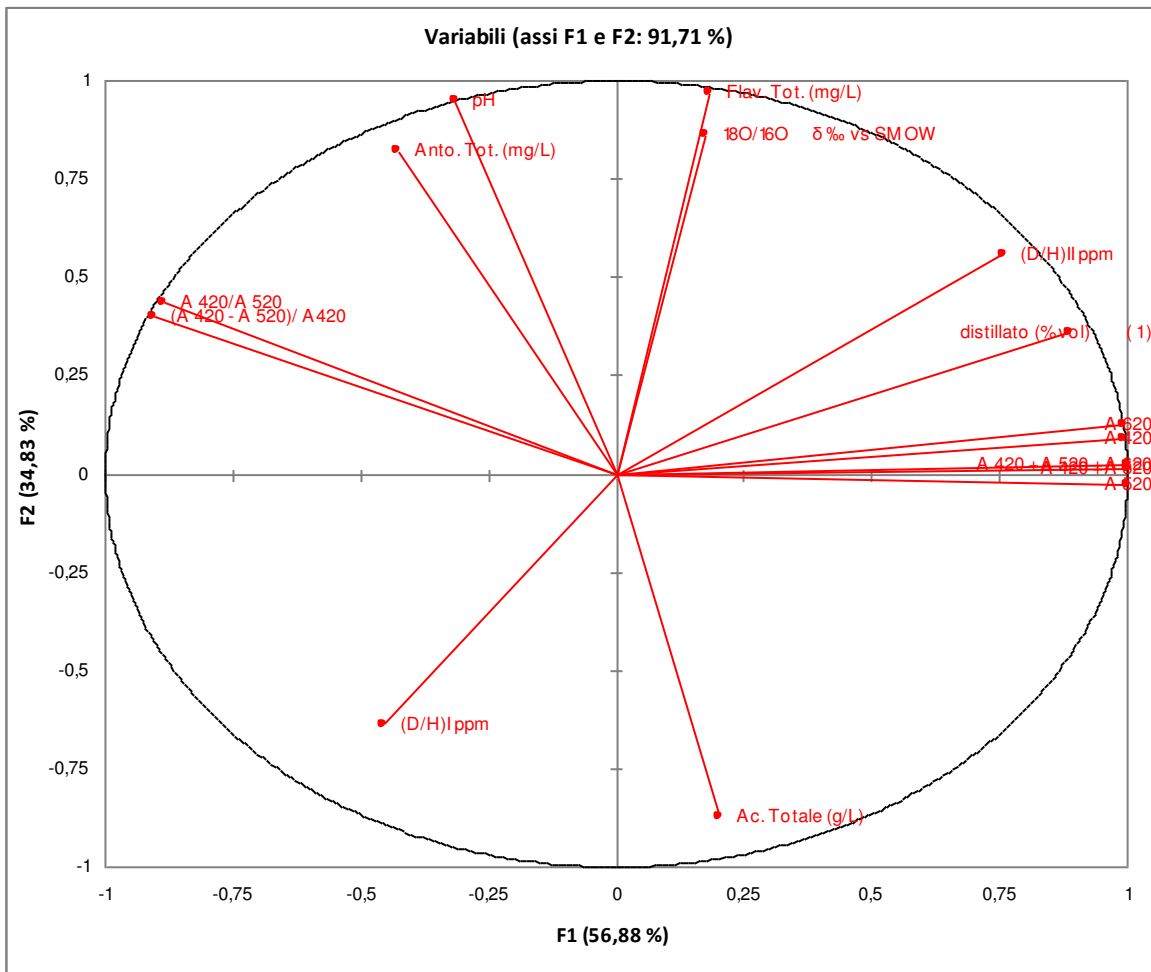


Figura 4.2 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici

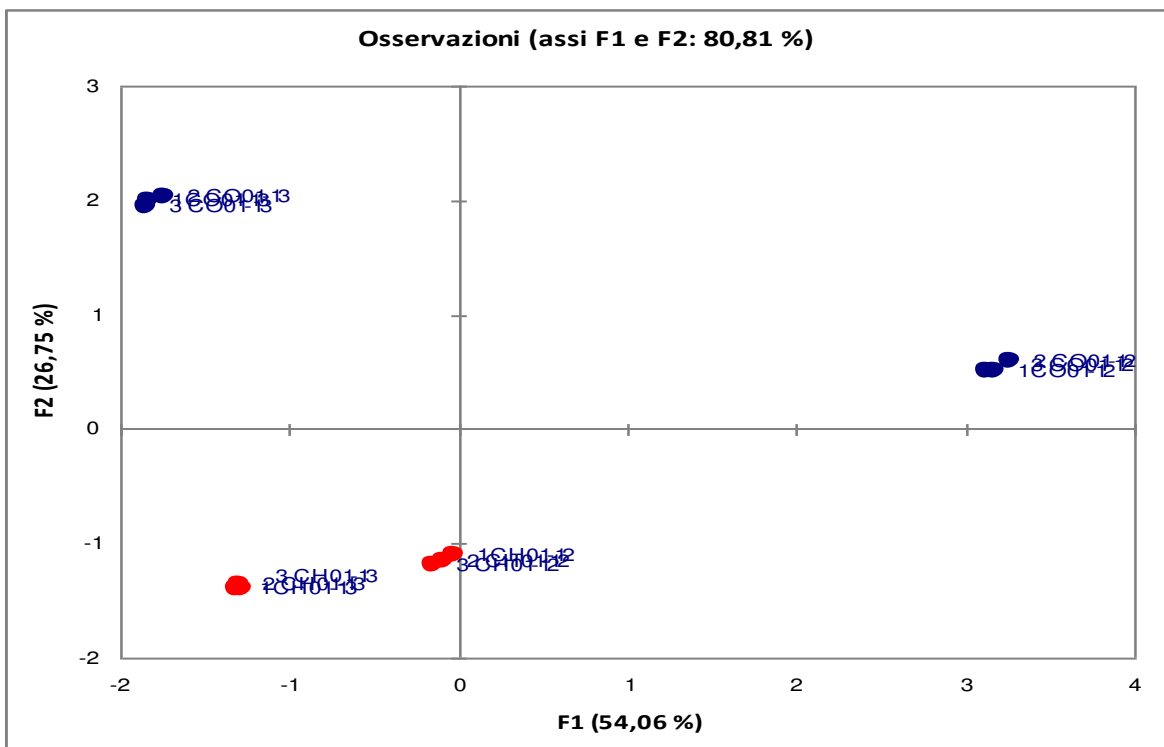


Figura 4.3 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

Osservando lo score-plot risultante dalla PCA sui vini bianchi (Figura 4.3), si può notare come, in questo caso, la PC1 separi nettamente le annate di produzione dei vini Cortese, mentre per gli Chardonnay non risulta una chiara separazione. Lungo questa componente, i campioni di Cortese del 2012 si posizionano con peso positivo, mentre quelli del 2013 con peso negativo. La PC2 invece separa nettamente i vini provenienti dai due vitigni diversi, Chardonnay (con peso negativo) e Cortese (con peso positivo).

Dal confronto tra lo score-plot e il loadings-plot (Figura 4.4) si possono trarre ulteriori considerazioni.

In particolare, la prima componente principale mette in evidenza come i campioni di Cortese 2012 siano caratterizzati da un tenore alcolico maggiore e maggior intensità colorante, mentre il 2013 presenta un pH superiore.

Se invece prendiamo in esame la seconda componente principale, possiamo notare come i campioni provenienti dai due vitigni si separino in base all'acidità ed al colore: i vini Chardonnay sono più acidi rispetto a quelli di Cortese, caratterizzati invece da una maggiore intensità colorante.

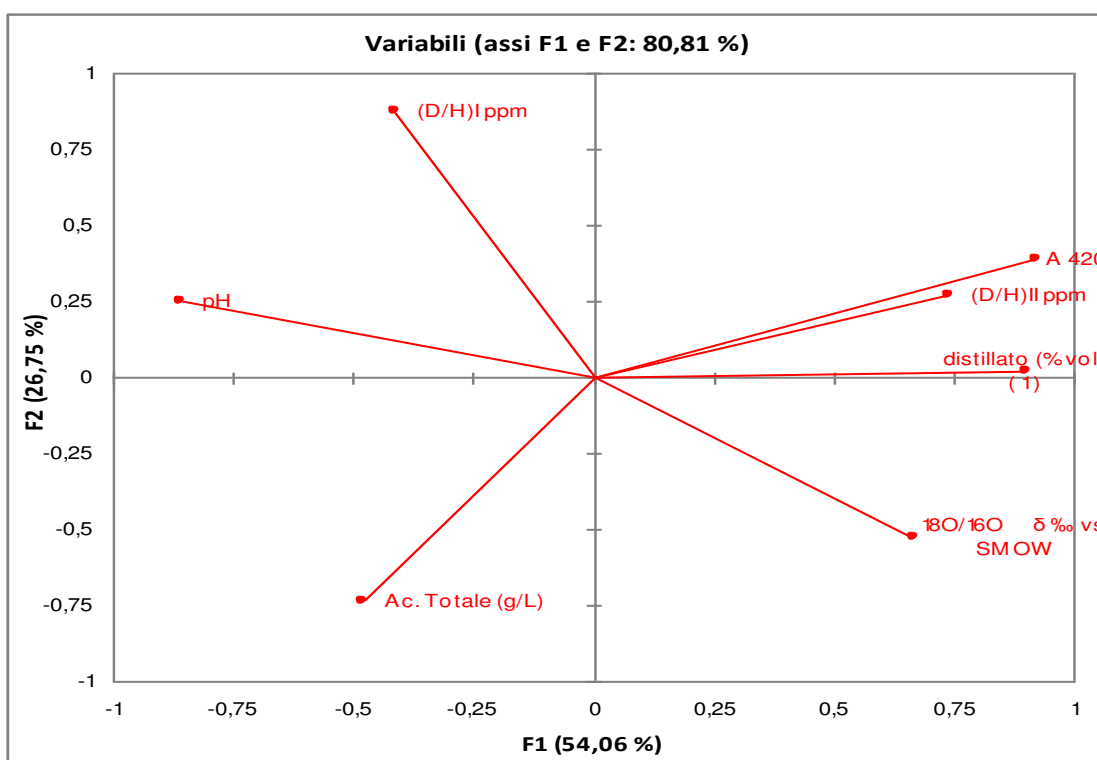


Figura 4.4 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

4.3.4 Analisi ^1H NMR per la discriminazione del vitigno.

Il proseguimento del lavoro ha riguardato lo studio tramite spettroscopia ^1H -NMR della diversa provenienza dei vini. In particolare si è voluto vedere se questa tecnica fosse in grado di evidenziare diversità nella composizione metabolica di vini provenienti da vitigni diversi. A questo scopo si sono confrontati tra loro i due vini rossi ed i due bianchi. L'effetto del vitigno, per questa zona, è stato effettuato sui vini della vendemmia 2014 per i quali non sono disponibili dati chimici ed isotopici.

Vini rossi.

Per i vini rossi si sono confrontati tra loro il Dolcetto e il Barbera della vendemmia 2014 e tre loro miscele con diverse percentuali dei due vini. La figura 4.5 riporta il grafico delle proiezioni ottenuto dall'analisi delle componenti principali (PCA) degli spettri NMR misurati.

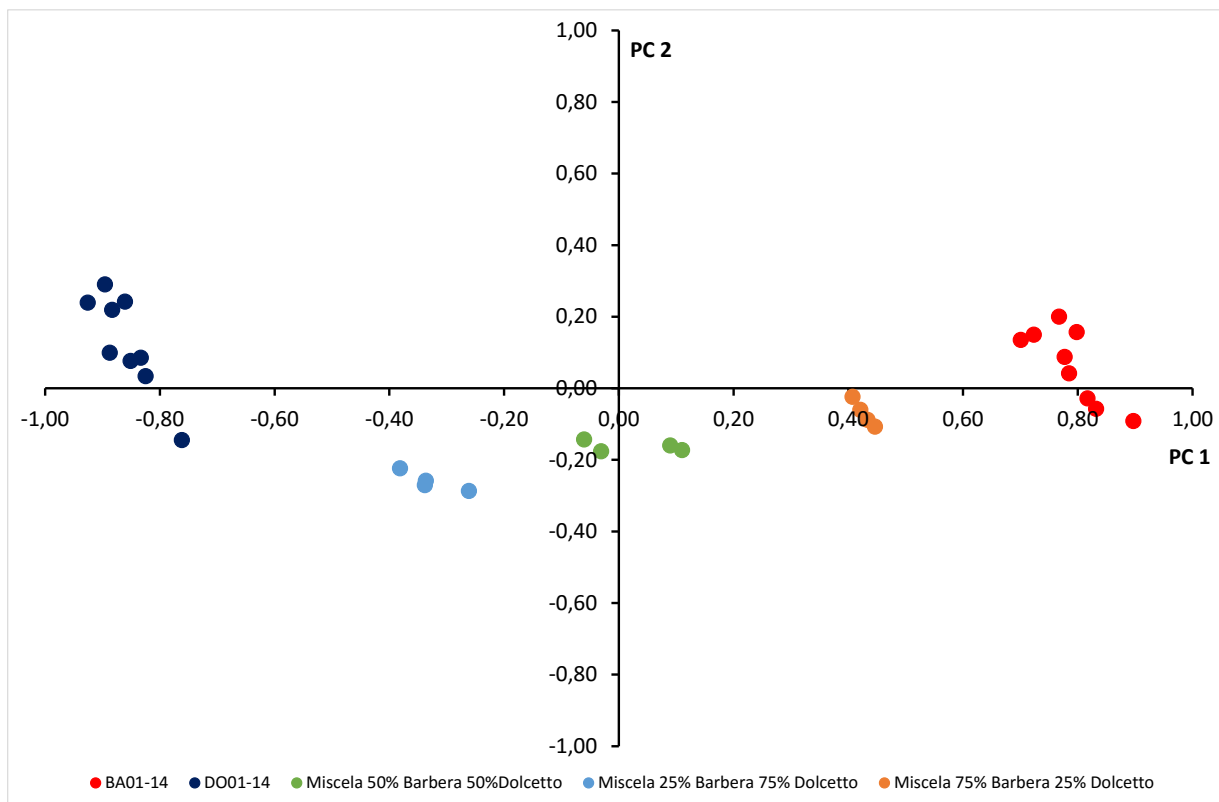


Figura 4.5 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su spettro intero (0,5-10 ppm).

Dalla figura si può vedere come la prima componente principale (PC 1), che spiega il 78% della varianza totale, sia in grado di separare i due vini in base al vitigno di provenienza. Il Dolcetto si trova all'estremo negativo di PC 1 mentre il Barbera si trova all'estremo positivo. Anche le miscele dei due vini vengono separate e la loro posizione lungo la PC 1 è proporzionale alla loro composizione percentuale. Non si osserva separazione dei campioni su PC 2.

La figura 4.6 riporta il grafico dei pesi per la PC 1. Da cui si possono evidenziare quali siano le zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC. Conoscendo le zone spettrali in cui cadono i segnali NMR dei diversi metaboliti del vino, si può risalire a quali siano quelli maggiormente implicati nella separazione dei vini osservata. In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), la prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.96 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), l'acido D-galatturonico (3.70, 3.92, 4.30, 5.30 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm) e l'arabinosio (4.21, 4.49, 3.85 – 4.00 ppm). Al contrario contribuiscono a PC 1 con peso negativo l'isobutanolo (0.87, 1.73 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), il GABA (1.94, 2.49, 3.04 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) ed il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm).

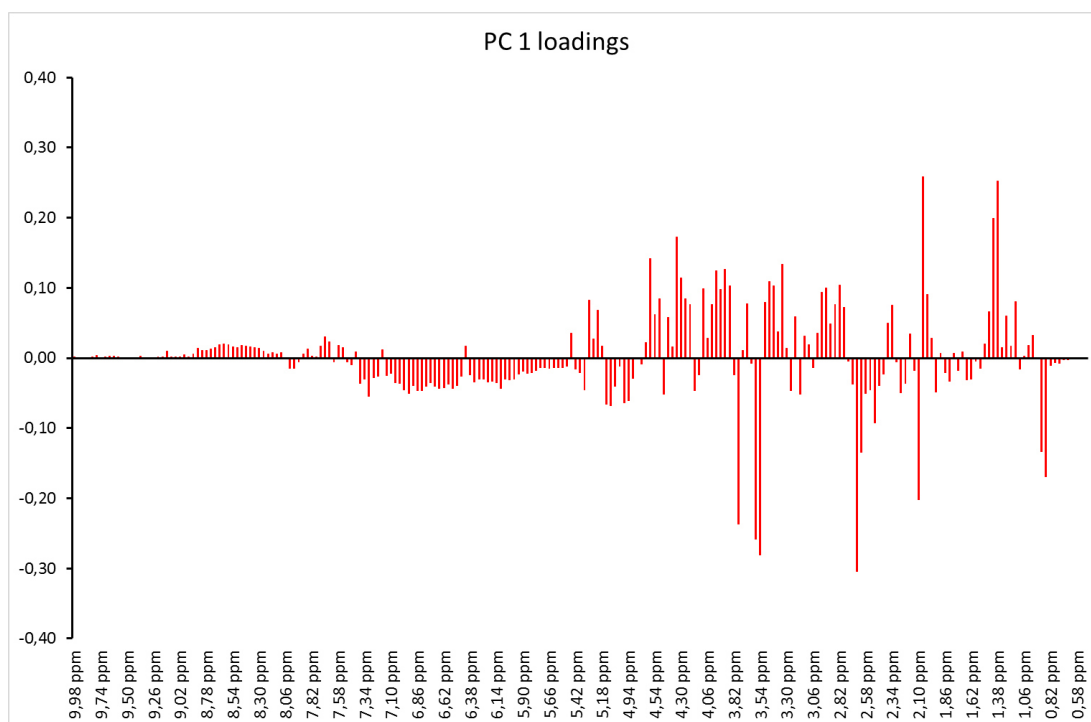


Figura 4.6 Grafico dei pesi di PC 1; spettro intero (0,5-10 ppm).

Per valutare meglio il contributo dei singoli metaboliti coinvolti nella separazione dei due vini, l'analisi statistica dei dati spettroscopici è stata ripetuta dividendo lo spettro NMR in due porzioni che vanno da 0.5 a 5 ppm e da 5 a 10 ppm.

In figura 4.7 si riporta il grafico delle proiezioni ottenuto sui dati NMR nella zona da 0.5 a 5 ppm.

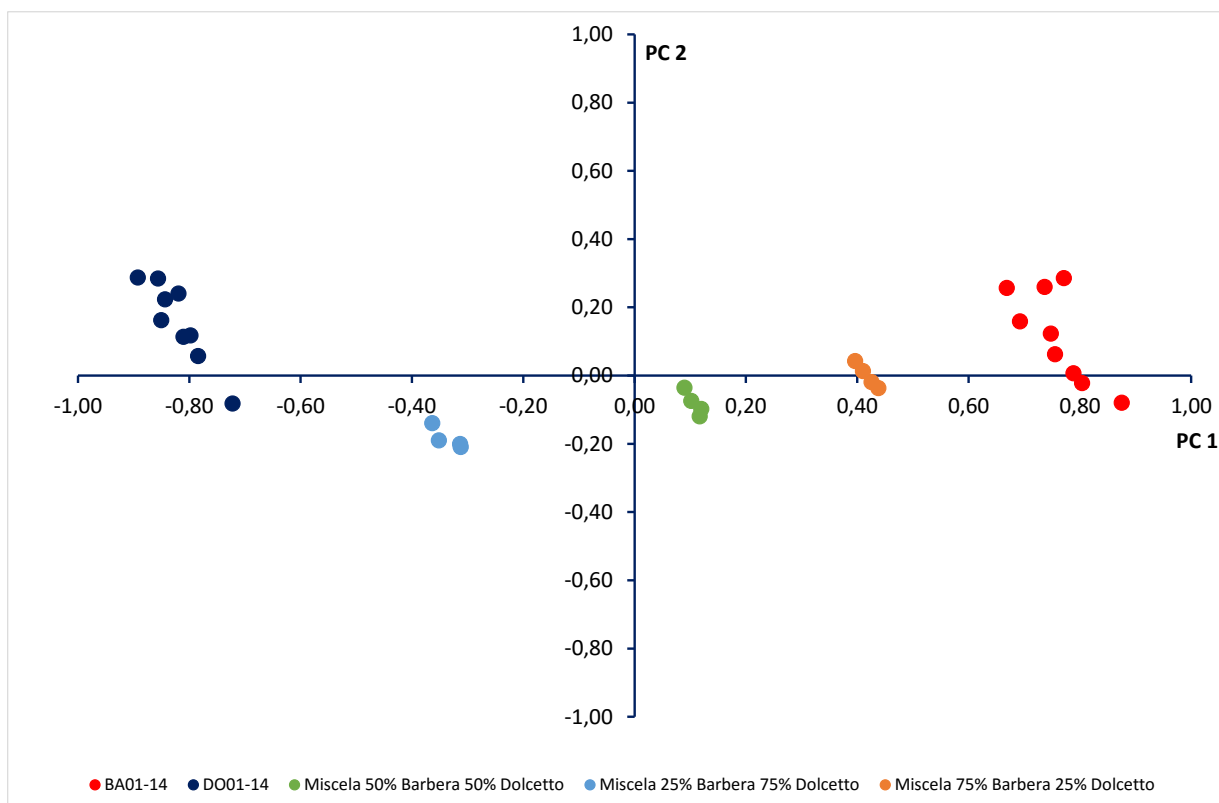


Figura 4.7 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-5 ppm.

Anche in questo caso, come si può osservare dalla figura, la PC 1, che spiega il 73.8% della varianza, è in grado di separare tra loro i due vini e le loro miscele. La distribuzione dei campioni lungo la PC 1 ricalca quella osservata nell'analisi PCA su spettro intero.

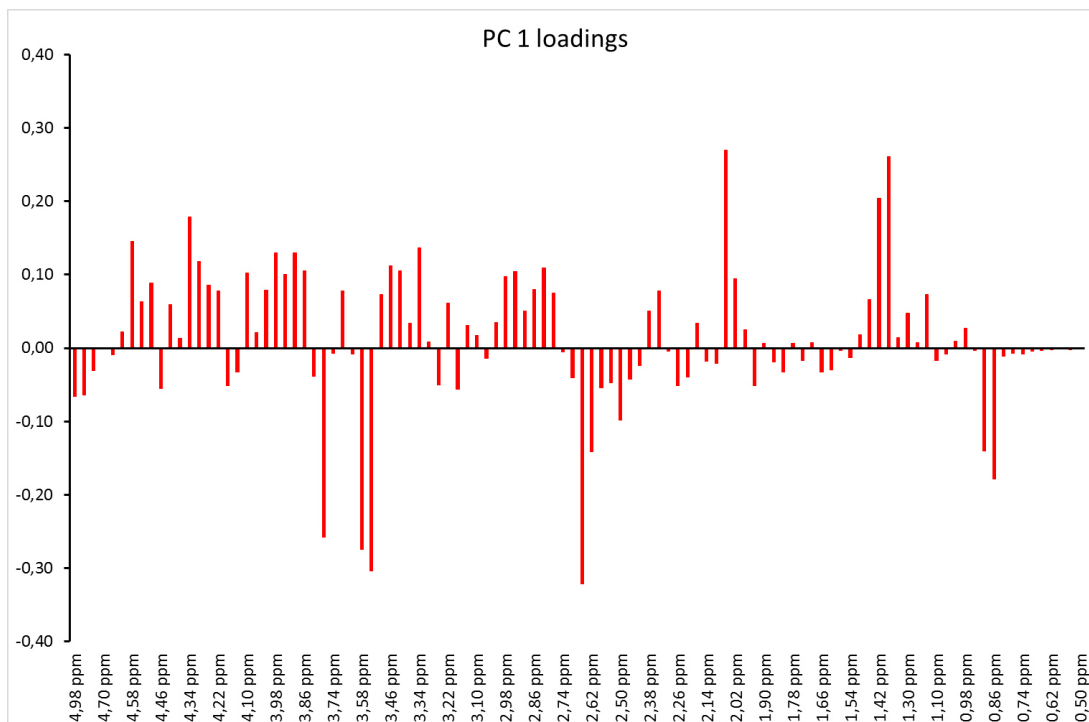


Figura 4.8 Grafico dei pesi di PC 1; zona spettrale 0,5-5 ppm.

Dalla figura 4.8, che riporta il grafico dei pesi per PC 1, si può osservare che vengono indicati come importanti per questa PC, gli stessi metaboliti già visti nelle misure su spettro intero. Fa eccezione il 2-feniletanolo i cui segnali principali non rientrano in questa zona spettrale.

La figura 4.9 riporta il grafico delle proiezioni ottenuto sui dati NMR nella zona da 5 a 10 ppm.

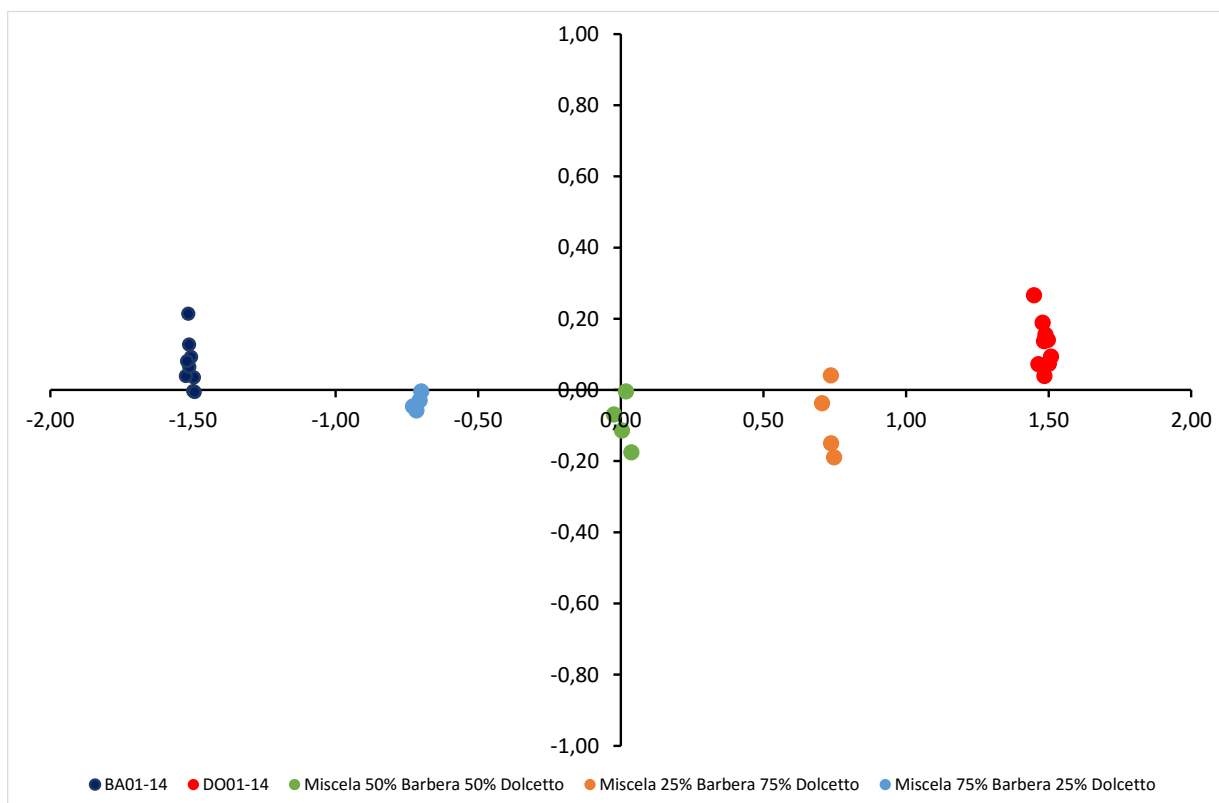


Figura 4.9 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 5-10 ppm.

Ancora una volta la PC 1, che spiega l'89.3 % della varianza, è in grado di separare tra loro i due vini e le loro miscele. La distribuzione dei campioni lungo la PC 1 ricalca quella osservata nelle due analisi PCA precedenti. I punti che rappresentano le diverse repliche delle misure NMR dei singoli campioni, risultano più raggruppati, probabilmente a causa dell'eliminazione delle interferenze sulla misura della procedura di presaturazione dei segnali di acqua ed etanolo che non cadono in questa zona spettrale.

La figura 4.10 riporta il grafico dei pesi per la PC 1.

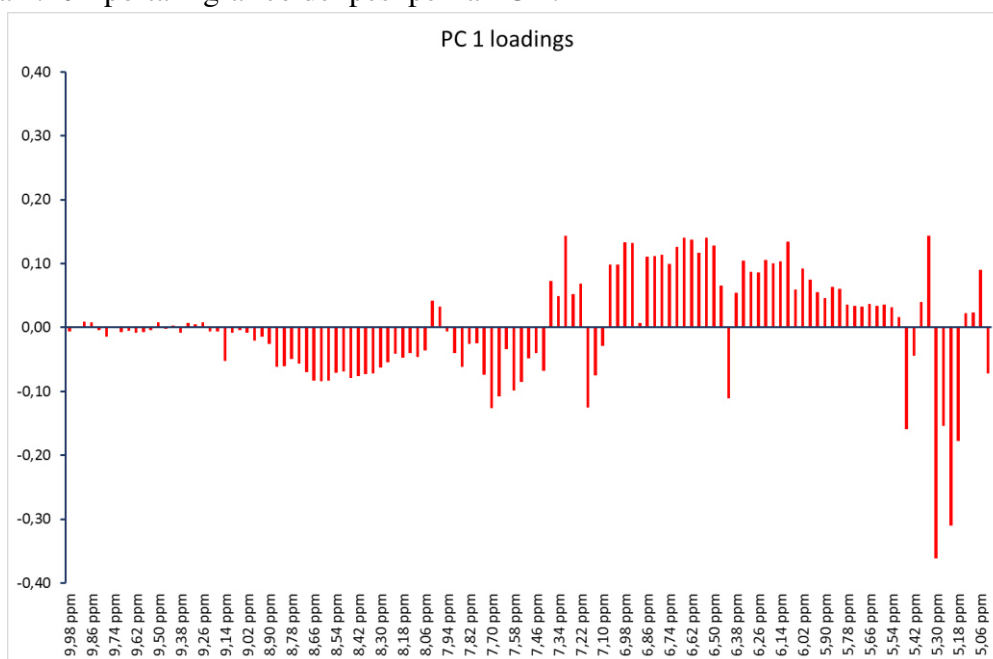


Figura 4.10 Grafico dei pesi di PC 1; zona spettrale 5-10 ppm.

Dalla figura si può notare come l'intera zona spettrale sia molto importante per la separazione dei vini. I metaboliti che hanno segnali NMR in questa zona appartengono alla famiglia dei metaboliti secondari della vite tra cui flavoni, antociani, tannini e polifenoli. L'intera classe di metaboliti secondari è importante per la separazione dei vini osservata. In particolare si possono identificare come metaboliti che danno un maggior contributo positivo alla PC 1 l'(-)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), il campferolo (6.32, 6.54, 7.02 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm). Con peso negativo su PC 1 troviamo invece l'arabinosio (5.21 ppm), l'acido D-galatturonico (5.30 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm) e la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm). Con peso negativo sulla PC 1 si trovano anche una serie di segnali da 8.1 a 8.9 ppm che originano dalle forme oligomere dei metaboliti secondari.

Vini bianchi.

Per i vini bianchi si sono confrontati tra loro il Cortese e lo Chardonnay della vendemmia 2014 e tre loro miscele con diverse percentuali dei due vini. La figura 4.11 riporta il grafico delle proiezioni ottenuto dall'analisi delle componenti principali (PCA) degli spettri NMR misurati. Dalla figura si può vedere come la prima componente principale (PC 1), che spiega l'89.5% della varianza totale, sia in grado di separare i due vini in base al vitigno di provenienza. Il Cortese si trova all'estremo negativo di PC 1 mentre lo Chardonnay si trova all'estremo positivo. Anche le miscele dei due vini vengono separate e la loro posizione lungo la PC 1 è proporzionale alla loro composizione percentuale. Non si osserva separazione dei campioni su PC 2.

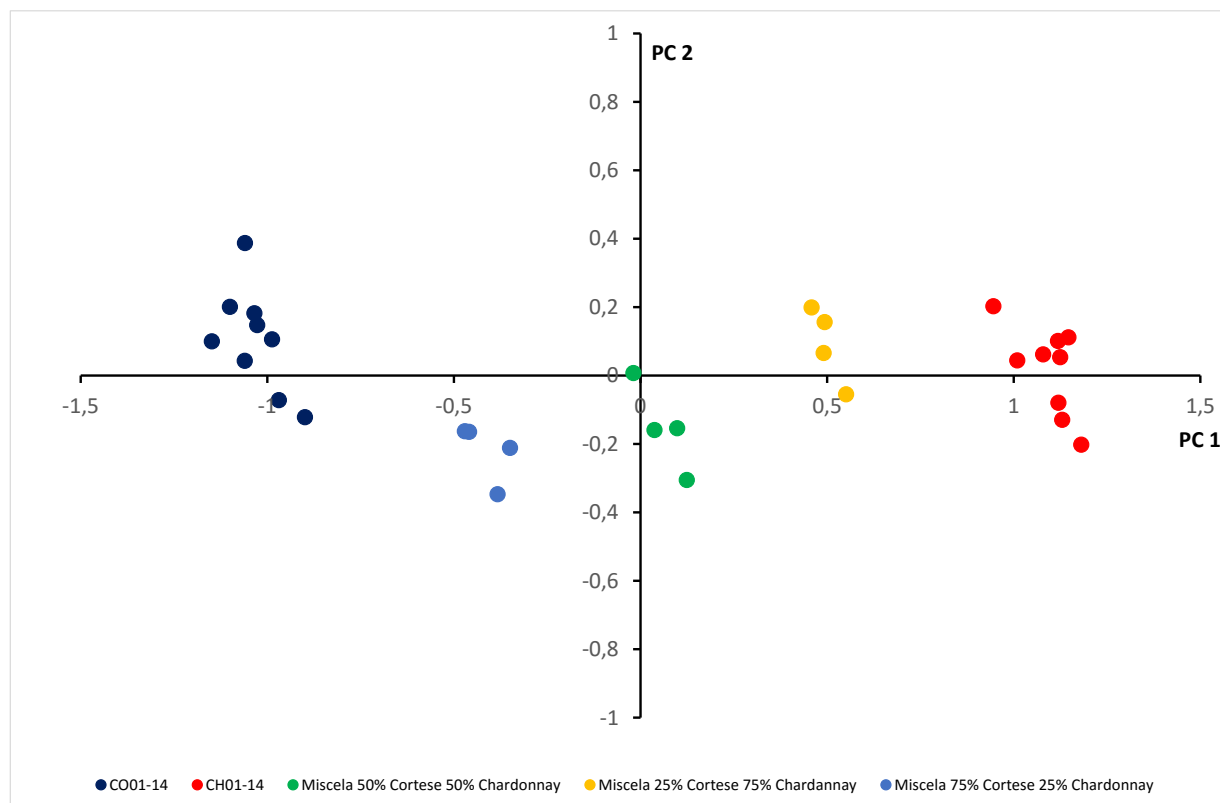


Figura 4.11 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su spettro intero (0,5-10 ppm).

In figura 4.12 si riporta il grafico dei pesi per la PC 1.

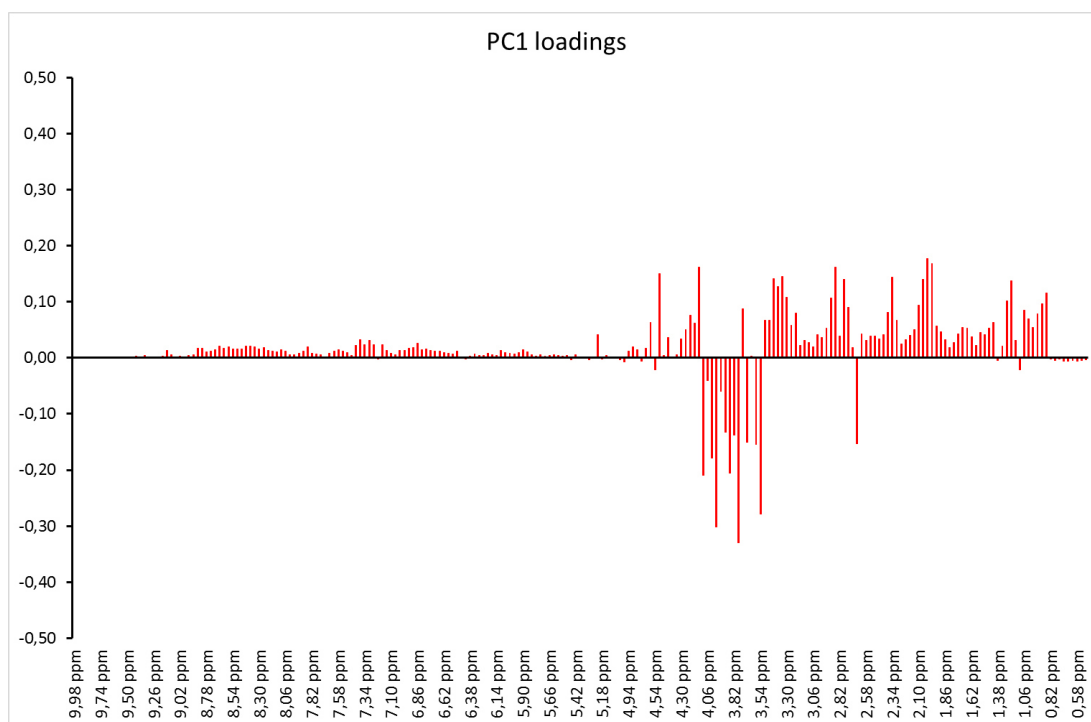


Figura 4.12 Grafico dei pesi di PC 1; spettro intero (0,5-10 ppm).

Dall'analisi del grafico dei pesi, si può vedere che danno contributo positivo alla PC 1 l'isopentanololo (0.88 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm), l'acido piruvico (1.54, 2.36 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), l'arabinosio (3.85-4.00, 4.49, 5.21 ppm). Con peso positivo sulla PC 1 si può osservare anche l'etanolo. Sebbene il segnale di questo componente del vino sia stato abbattuto tramite presaturazione, è comunque possibile individuarlo tramite i picchi della specie contenente l'isotopo con massa atomica 13 del carbonio ($^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CH}_2\text{-OH}$). I segnali di questa specie cadono a 1.04, 1.29, 3.50 e 3.78 ppm. Con peso negativo sulla PC 1 abbiamo l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) ed il fruttosio (3.80-4.10 ppm).

Anche con questi due vini l'analisi statistica PCA è stata ripetuta considerando separatamente le zone dello spettro tra 0.5 e 5 ppm e tra 5 e 10 ppm.

La figura 4.13 riporta il grafico delle proiezioni ottenuto analizzando la zona dello spettro NMR tra 0.5 e 5 ppm.

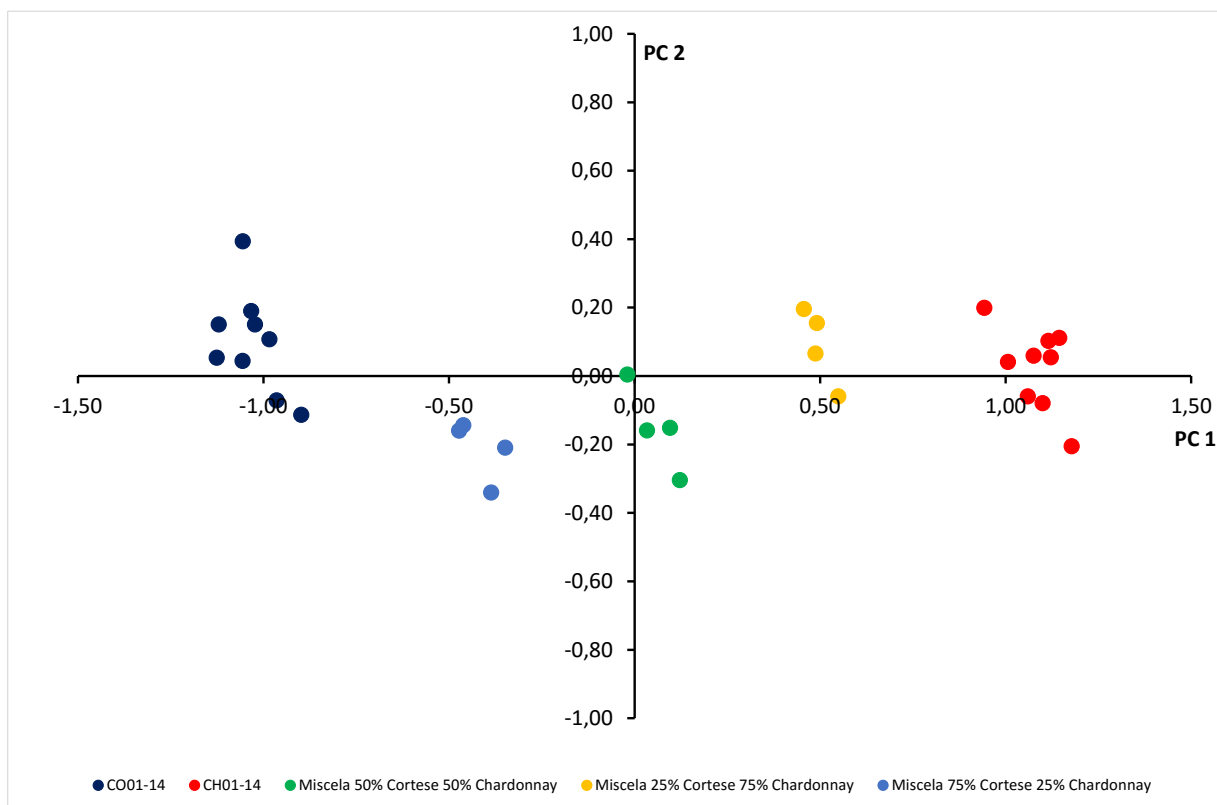


Figura 4.13 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-5 ppm.

Anche in questo caso, come si può osservare dalla figura, la PC 1, che spiega il 90,5% della varianza, è in grado di separare tra loro i due vini e le loro miscele. La distribuzione dei campioni lungo la PC 1 ricalca quella osservata nell'analisi PCA condotta sull'intero spettro. La figura 4.14 riporta il grafico dei pesi per la PC 1. Dal grafico dei pesi per PC 1, si può osservare che vengono indicati come importanti per questa PC, gli stessi metaboliti già visti nelle misure su spettro intero.

La figura 4.15 riporta il grafico delle proiezioni ottenuto considerando la regione dello spettro tra 5 e 10 ppm.

Dal grafico delle proiezioni si può osservare come anche in questo caso la PC 1 sia in grado di separare i due vini e le loro miscele. I campioni non risultano separati sulla PC 2.

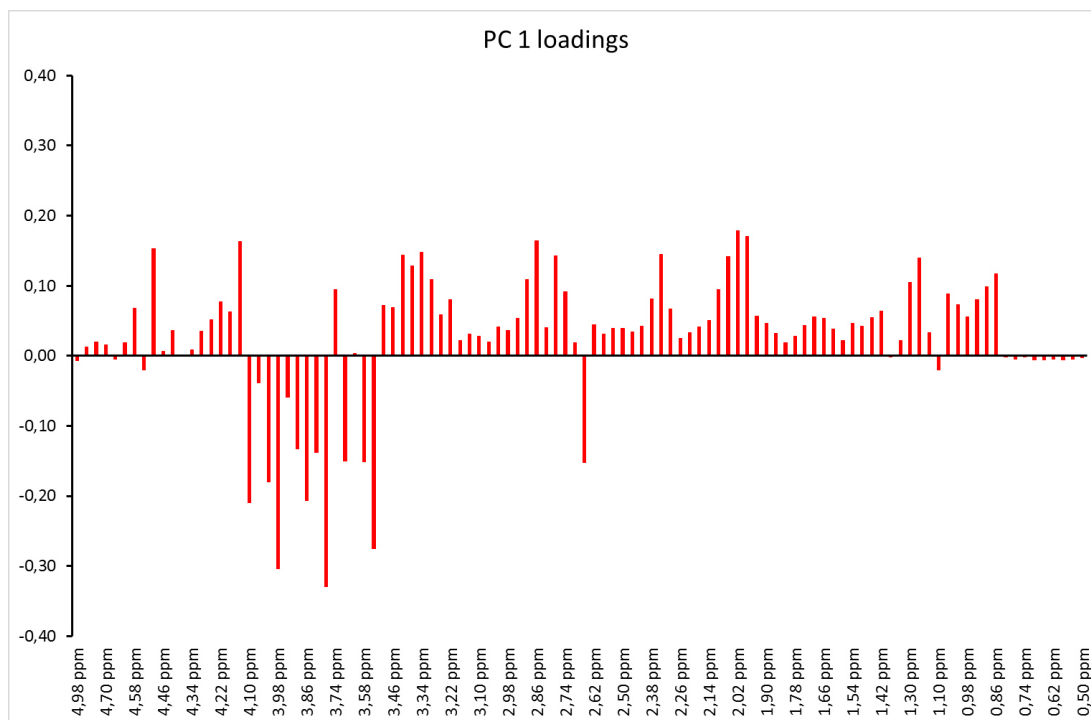


Figura 4.14 Grafico dei pesi di PC 1; spettro intero (0.5-5 ppm).

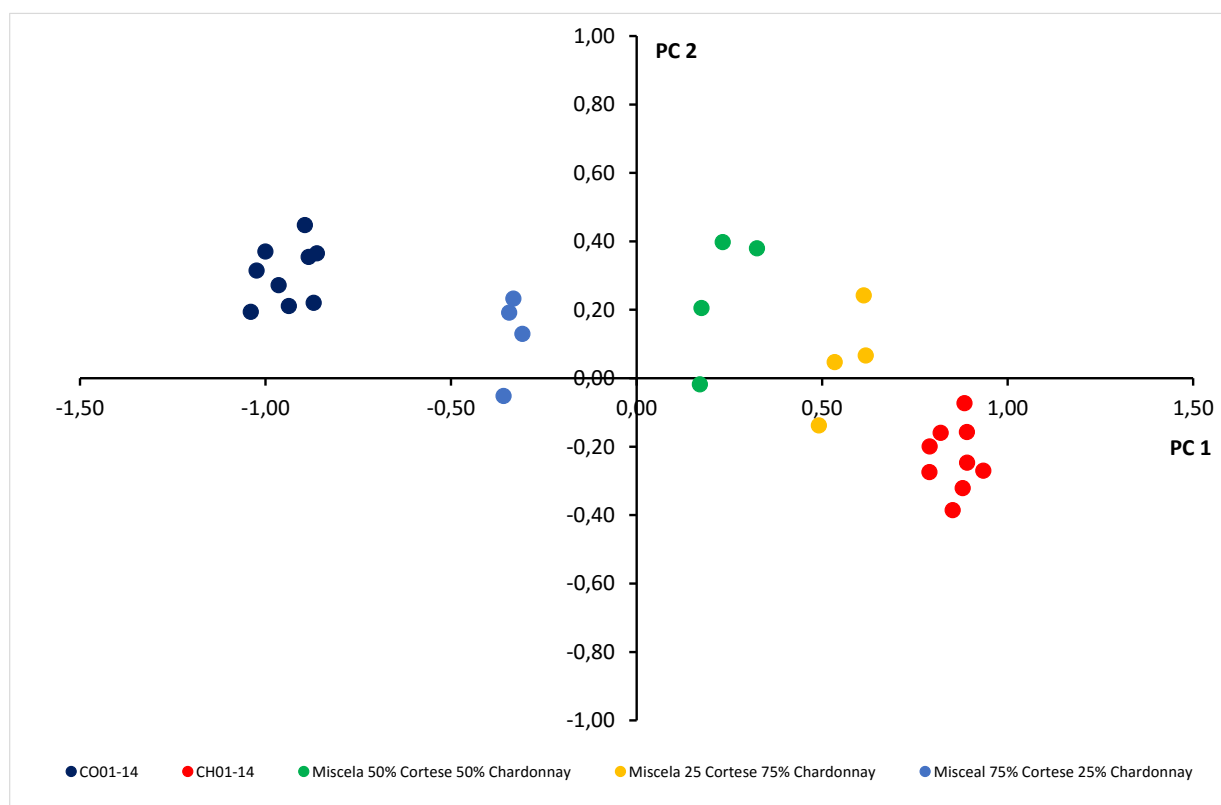


Figura 4.15 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 5-10 ppm.

In figura 4.16 è riportato il grafico dei pesi per la PC1 nella regione dello spettro NMR tra 5 e 10 ppm. Dal grafico dei pesi si può osservare che danno contributo positivo alla PC 1 l'arabinosio (5.21 ppm), la (+)-catechina (6.01, 6.09, 6.85, 6.90 ppm), il campferolo (6.32, 6.54, 7.02 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'istidina

(7.40, 8.66 ppm), l'acido formico (8.38 ppm) e la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm). Sempre con peso positivo abbiamo una serie di segnali da 8.1 a 8.9 ppm che originano dalle forme oligomere dei metaboliti secondari.

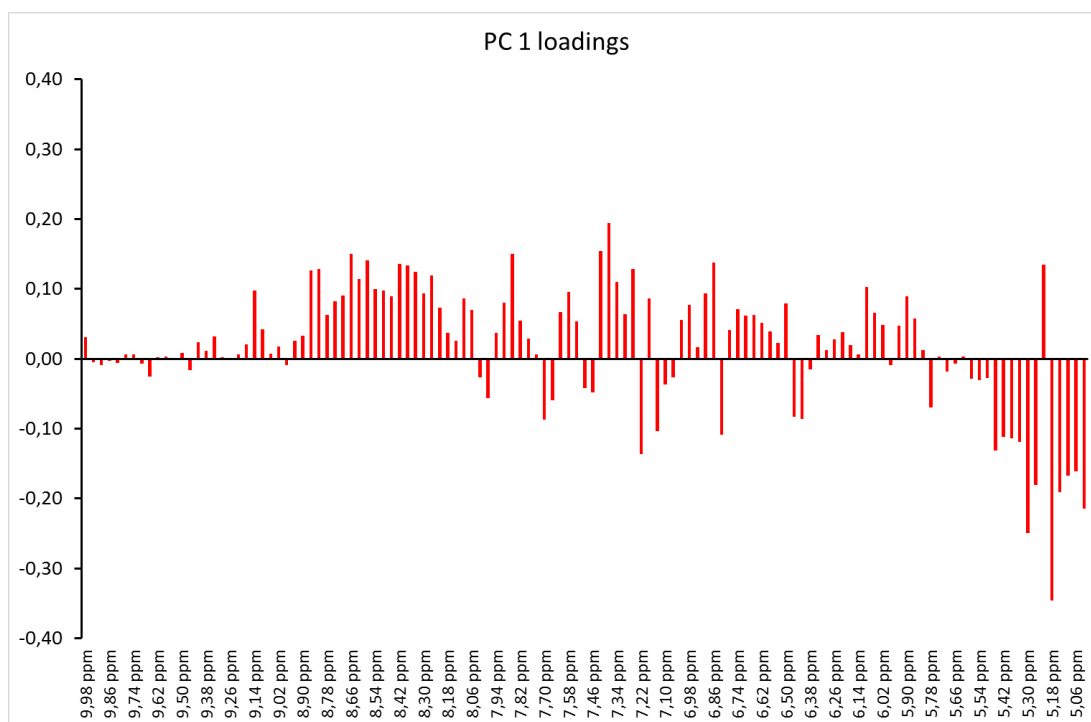


Figura 4.16 Grafico dei pesi di PC 1; spettro intero (5-10 ppm).

Con peso negativo sulla PC 1 abbiamo il ribosio (5.02, 5.25, 5.38 ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm) e l'acido gallico (7.15 ppm).

Analisi dei risultati ottenuti.

La spettroscopia ^1H NMR, unita all'analisi statistica delle componenti principali, è stata in grado di separare tra loro i campioni di vino rosso e di vino bianco provenienti da vitigni diversi. Allo stesso modo si sono potuti identificare campioni ottenuti miscelando tra loro i vini rossi e tra loro i vini bianchi.

L'analisi dei dati ha permesso di identificare i principali metaboliti che determinano la separazione dei campioni.

Per i vini rossi si è potuta riscontrare la maggior varianza spiegata dalla PC 1 (89,3 %) quando l'analisi delle PCA è stata condotta sulla regione dello spettro tra 5 e 10 ppm. Al contrario per i vini bianchi la maggior quantità di informazione spiegata dalla PC 1 (90,5 %) si è potuta osservare considerando la zona dello spettro NMR da 0.5 a 5 ppm. L'elevata percentuale di varianza spiegata dalla PC 1 nei due casi, unita alla separazione dei campioni che questa PC è in grado di fornire, indica come lo spettro NMR sia molto informativo per la separazione dei vini in base al vitigno. Per i vini rossi, la parte dello spettro più significativa è quella in cui cadono i segnali dei metaboliti secondari di cui questi vini sono molto ricchi. Per i vini bianchi, invece, le maggiori informazioni si ricavano dalla zona dello spettro NMR tra 0.5 e 5 ppm essendo questi vini poveri di metaboliti secondari.

4.3.5 Analisi ^1H NMR per la discriminazione dell'annata di produzione.

In questa parte del lavoro si è voluto valutare l'impiego della spettroscopia ^1H NMR per la discriminazione di vini provenienti da diverse campagne di produzione. In particolare si sono volute confrontare tra loro le annate di produzione 2012, 2013 e 2014 di Barbera, Dolcetto, Cortese e Chardonnay. I vini sono stati analizzati subito dopo l'imbottigliamento.

Vino Barbera.

La figura 4.17 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 dei diversi campioni ottenute considerando l'intero spettro NMR.

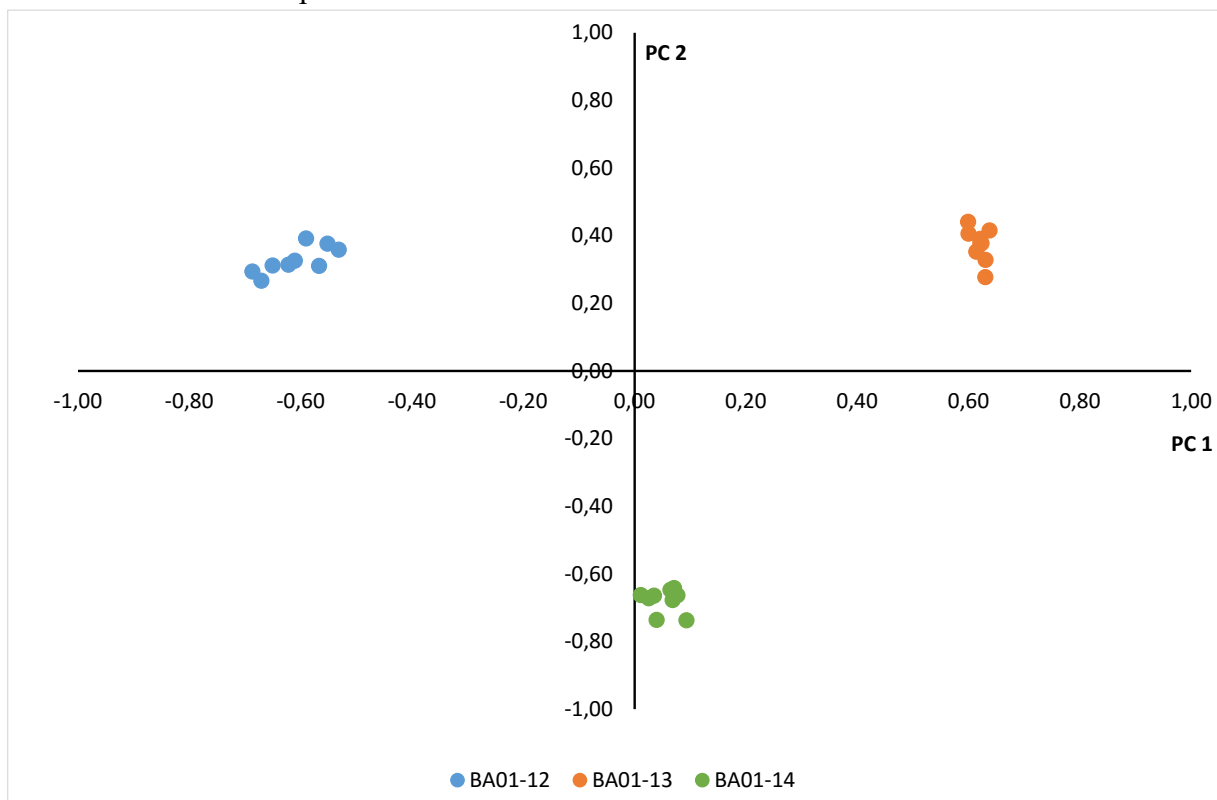


Figura 4.17 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-10 ppm.

Il grafico delle proiezioni mostra come la PC 1 e la PC 2, che insieme spiegano il 72.8 % della varianza, siano in grado di separare i campioni di Barbera delle tre diverse annate di produzione. In particolare la PC 1 separa molto bene i campioni della vendemmia del 2012, a valori negativi, da quelli della vendemmia 2013, a valori positivi. La PC 2, invece, separa il vino prodotto nella vendemmia 2014, a valori negativi, dai rimanenti che hanno proiezione positiva su questa PC.

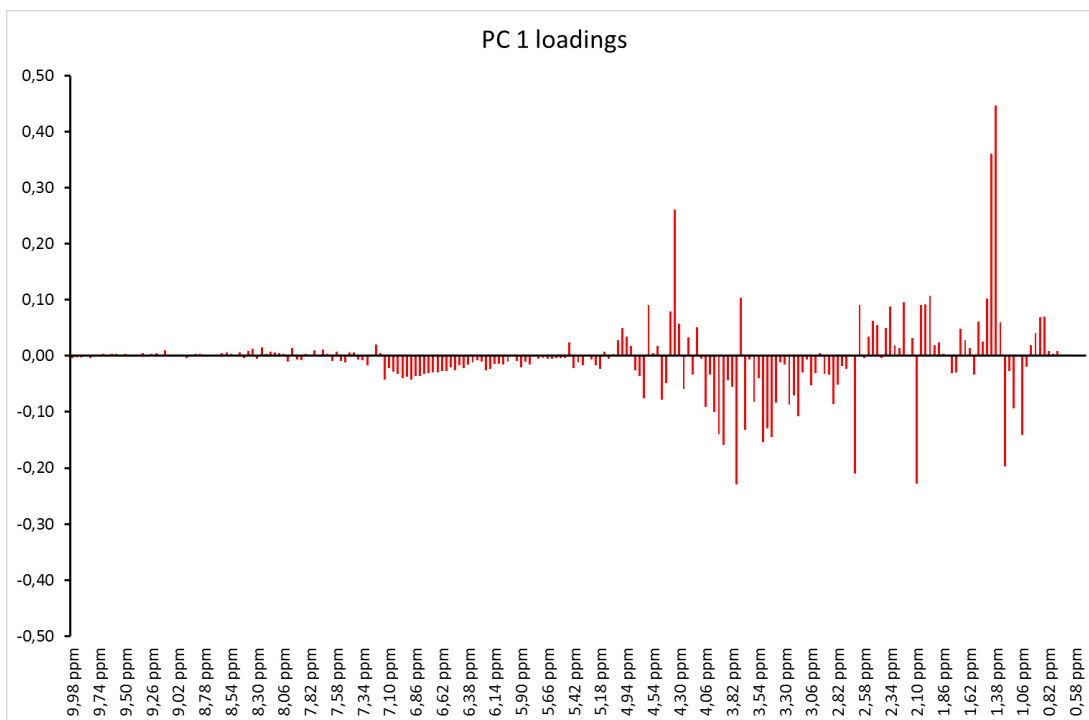


Figura 4.18 Grafico dei pesi di PC 1; spettro intero (0,5-10 ppm).

In figura 4.18 è riportato il grafico dei pesi per PC 1. Da questo grafico si può vedere che il metabolita con maggior peso positivo su PC 1 è l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm). Con peso negativo sulla PC 1 troviamo l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.34, 3.77 ppm) ed il fruttosio (3.80 - 4.10 ppm).

In figura 4.19 si può osservare l'andamento dei pesi per la PC 2.

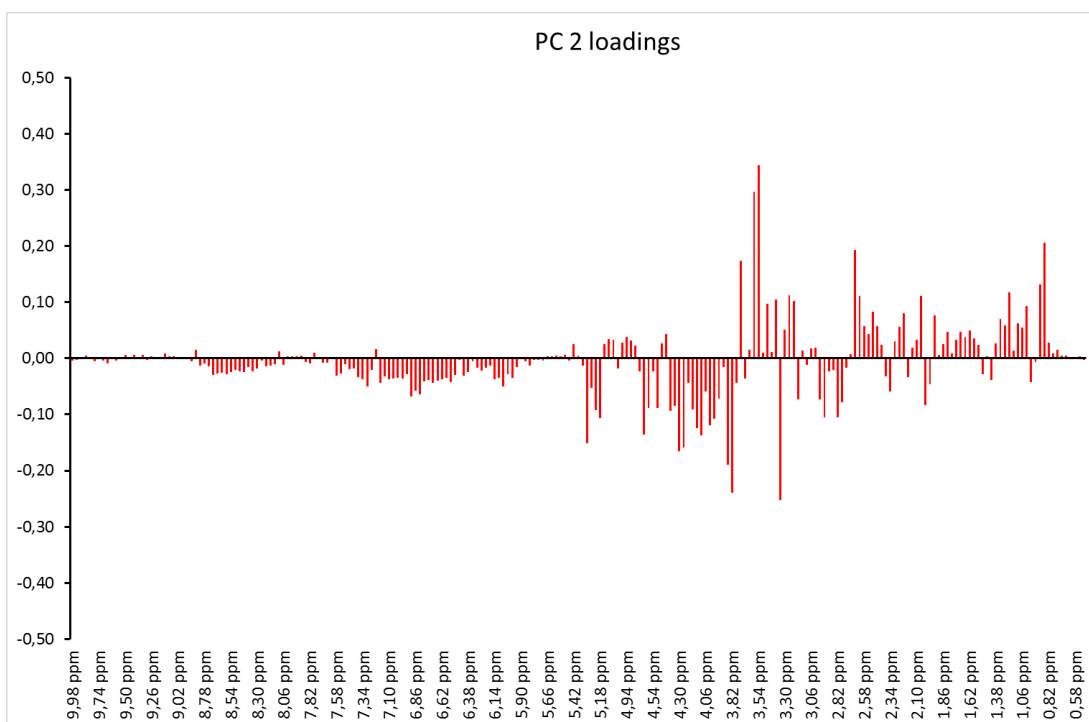


Figura 4.19 Grafico dei pesi di PC 2; spettro intero (0,5-10 ppm).

Dal grafico dei pesi si può osservare che contribuiscono positivamente alla PC 2 l'isobutanolo (0.87, 1.73 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm) ed il glicerolo (3.34, 3.77 ppm). Con peso negativo abbiamo invece l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), il metanolo (3.34 ppm) e l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30, 5.30 ppm).

Per evidenziare meglio il contributo dei singoli metaboliti alla separazione dei campioni, l'analisi statistica dei dati è stata ripetuta considerando separatamente le regioni dello spettro NMR da 0,5 a 5 ppm e da 5 a 10 ppm.

La figura 4.20 riporta il grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 per la zona spettrale 0,5 – 5 ppm.

Anche in questo caso le prime due componenti principali, che spiegano il 72,7 % della varianza, sono in grado di separare i campioni di vino Barbera provenienti dalle tre annate diverse di produzione. La distribuzione dei campioni lungo le due componenti principali è analoga a quella osservata sull'intero spettro NMR.

In figura 4.21 si può osservare l'andamento dei pesi per PC 1. Dal grafico si può vedere come vengano indicati importanti per questa PC gli stessi metaboliti già visti nelle misure su spettro intero.

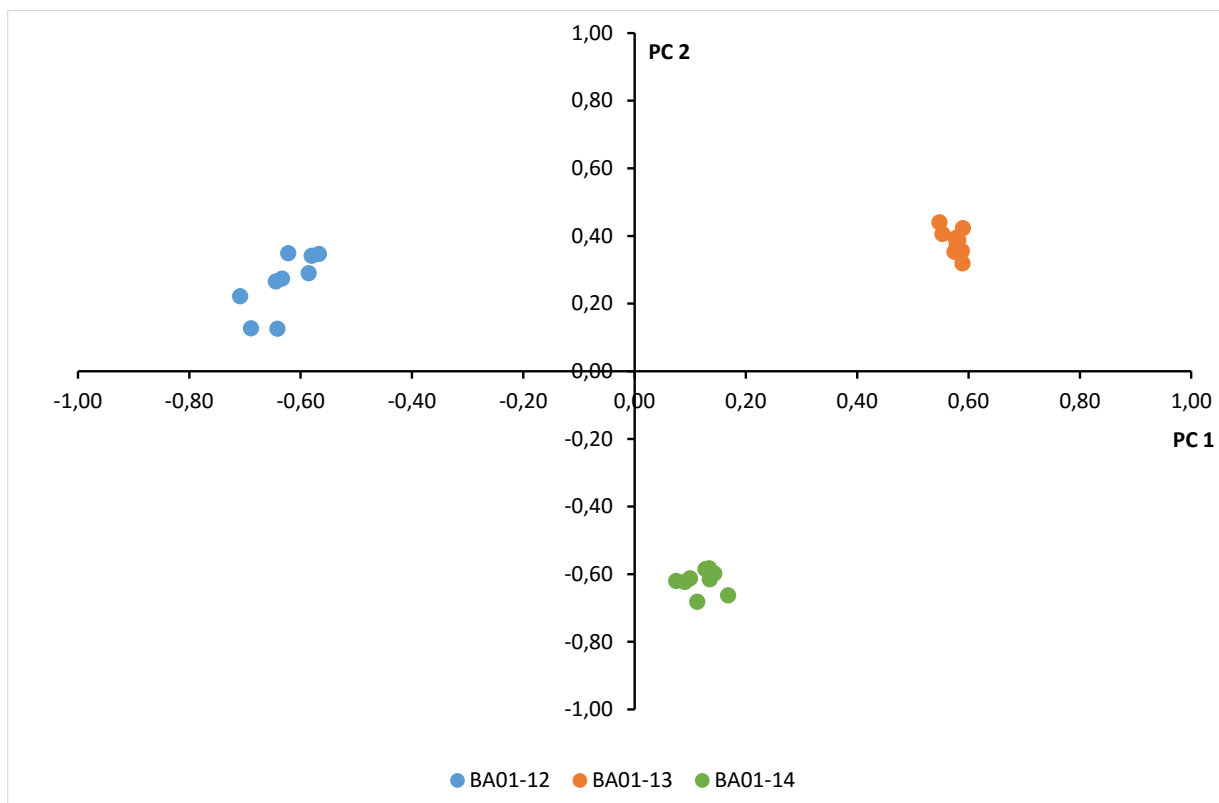


Figura 4.20 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-5 ppm.

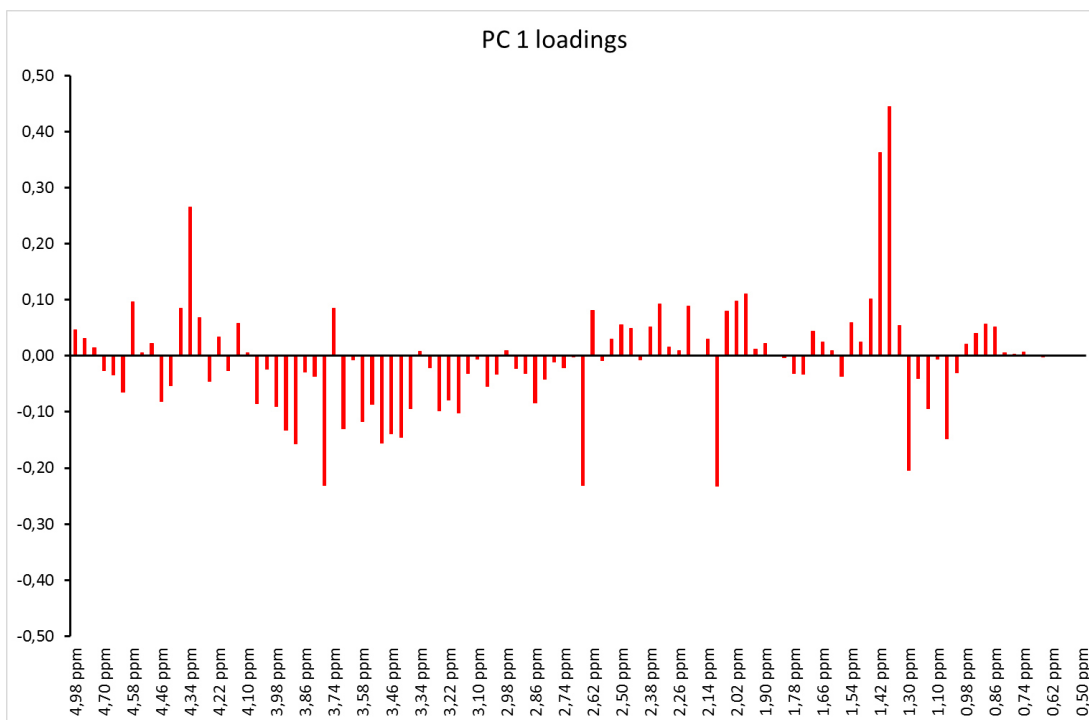


Figura 4.21 Grafico dei pesi di PC 1; regione dello spettro da 0,5 a 5 ppm.

In figura 4.22 possiamo osservare il grafico dei pesi per la PC 2. Con peso positivo sulla PC 2 abbiamo l'isobutanolo (0.87, 1.73 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm) ed il glicerolo (3.34, 3.77 ppm). Con peso negativo abbiamo invece il metanolo (3.34 ppm), il fruttosio (3.80 – 4.10 ppm) e l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30, 5.30 ppm).

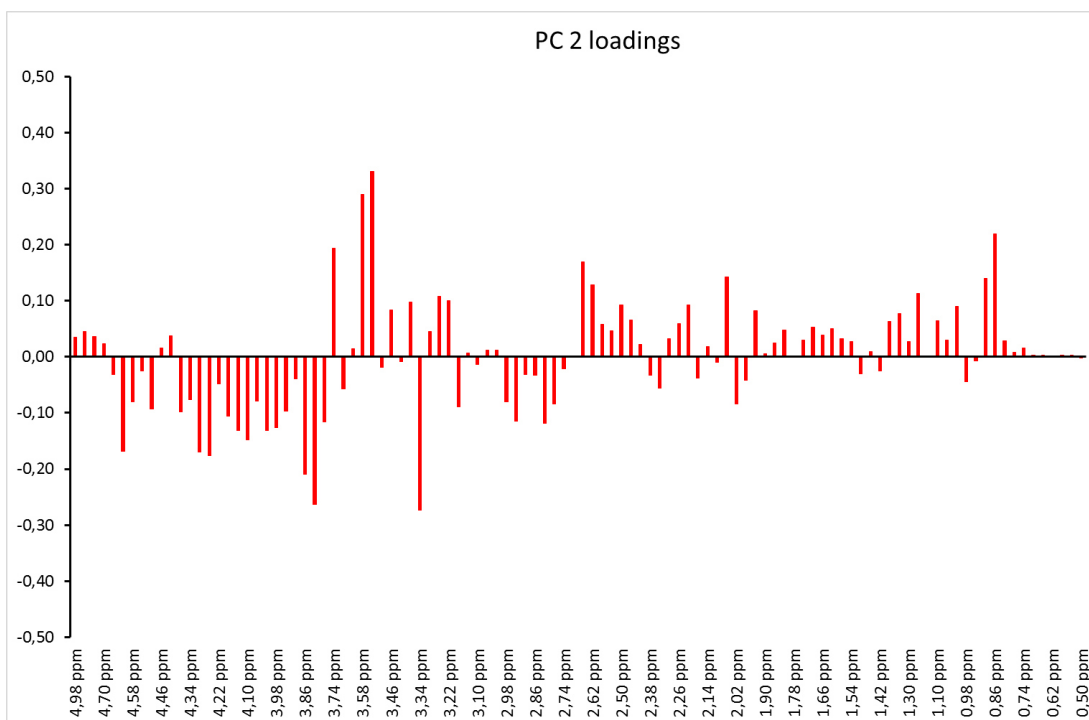


Figura 4.22 Grafico dei pesi di PC 2; regione dello spettro da 0,5 a 5 ppm.

La figura 4.23 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 relativo alla zona spettrale da 5 a 10 ppm.

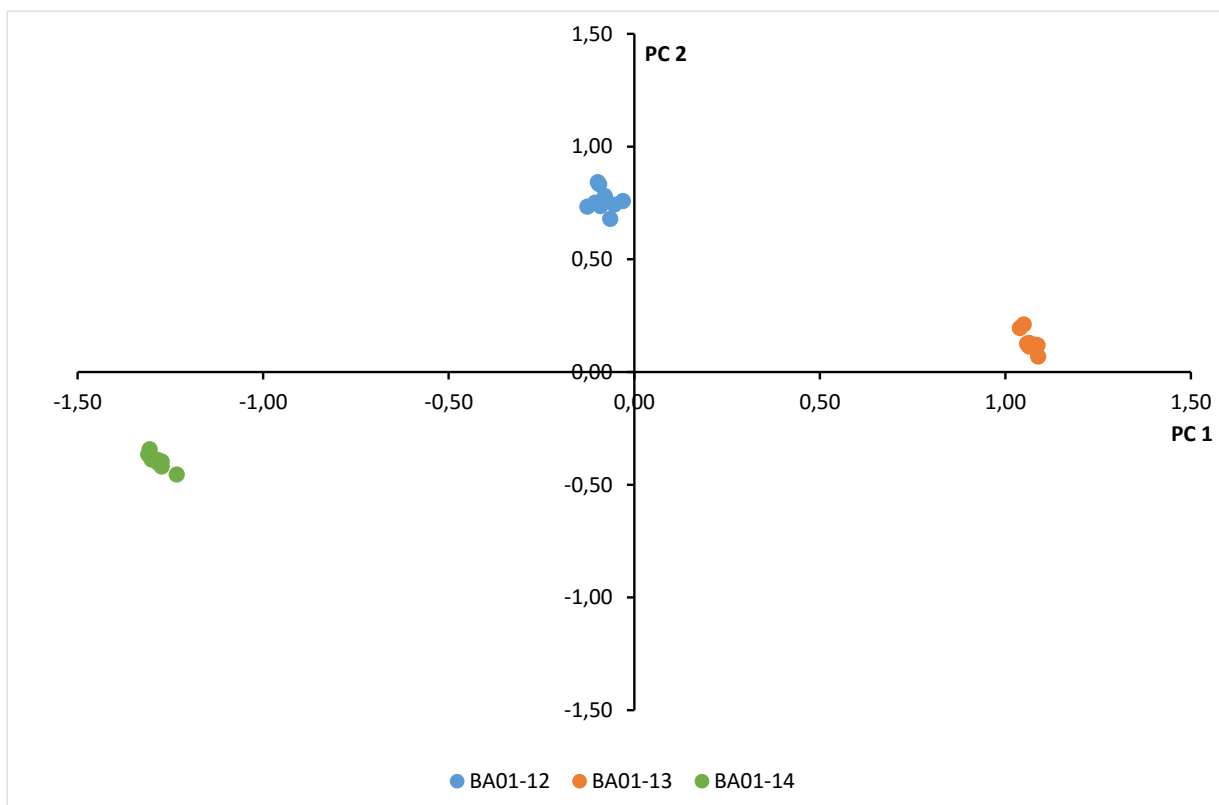


Figura 4.23 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 5-10 ppm.

Dal grafico delle proiezioni possiamo notare una diversa disposizione dei raggruppamenti di campioni provenienti della stessa annata di produzione. In particolare la PC 1 separa il vino Barbera prodotto nel 2014, a valori negativi, da quello prodotto nel 2013, a valori positivi. La seconda componente principale separa il vino del 2012 dagli altri due.

La figura 4.24 riporta il grafico dei pesi per la PC 1 nella zona spettrale 5 – 10 ppm.

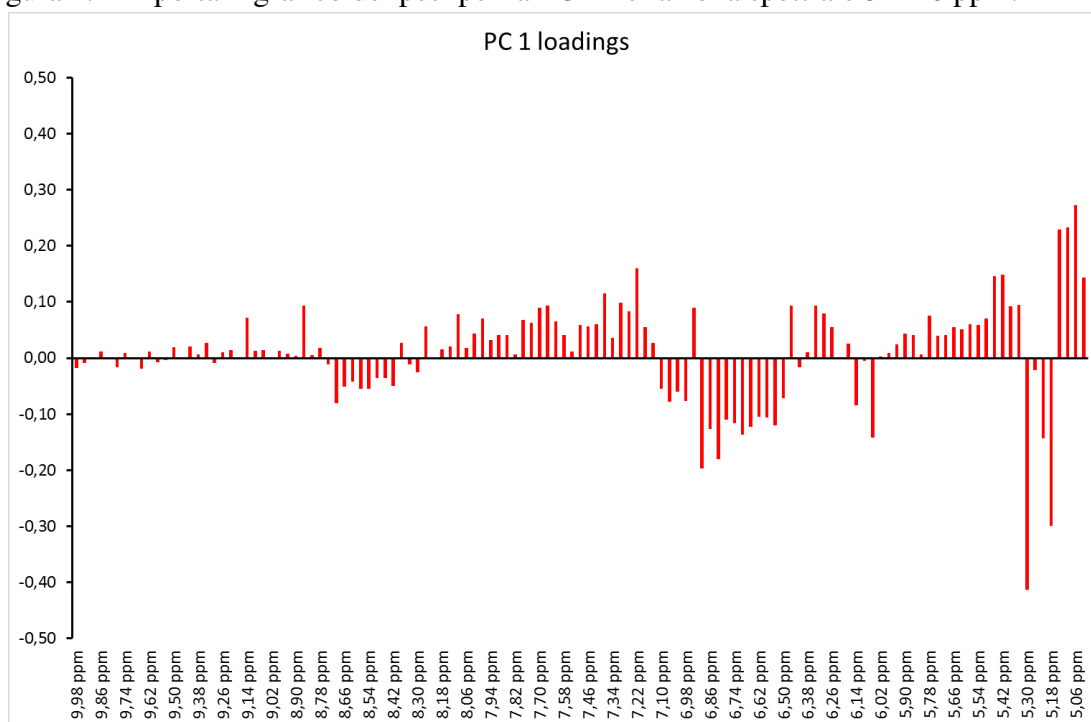


Figura 4.24 Grafico dei pesi di PC 1; regione dello spettro da 5 a 10 ppm.

Dal grafico dei pesi si osserva che hanno peso positivo per la PC 1 il saccarosio (5.39 ppm), il *trans*-resveratrolo (6.31, 6.93, 7.15, 7.50 ppm) e la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm). Con peso negativo sulla PC 1 possiamo riconoscere l'acido D-galatturonico (5.30 ppm), l'(-)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm) e l'acido shikimico (6.81 ppm).

La figura 4.25 riporta il grafico dei pesi per la PC 2 nella regione spettrale da 5 a 10 ppm.

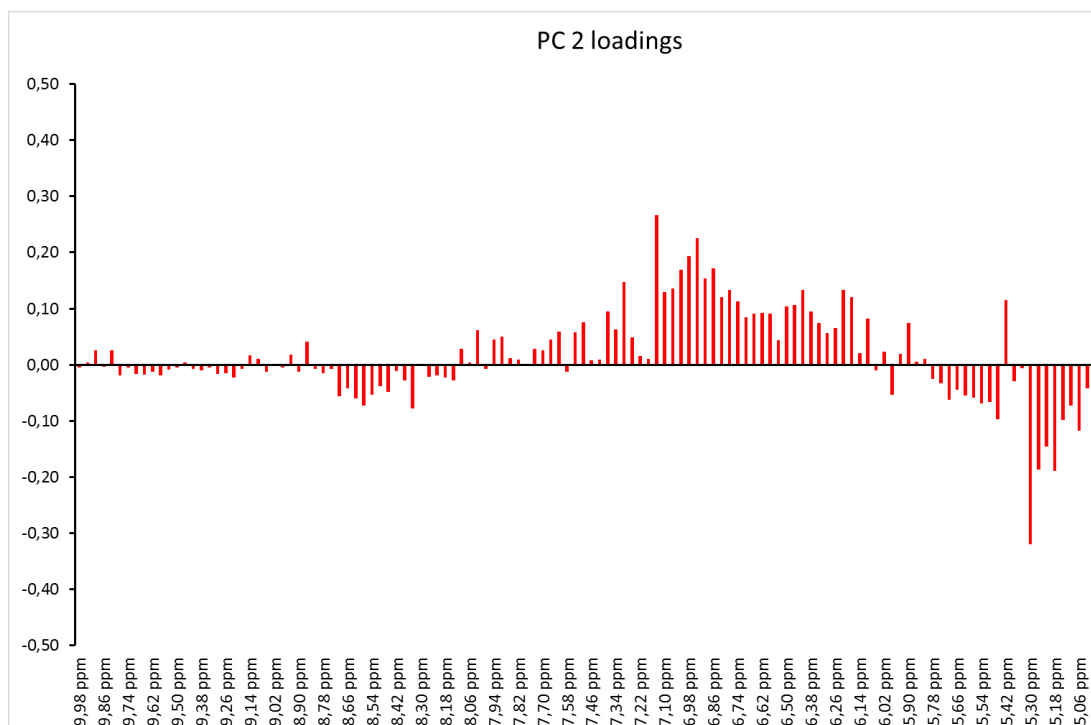


Figura 4.25 Grafico dei pesi di PC 2; regione dello spettro da 5 a 10 ppm.

Dal grafico dei pesi si può vedere che i maggiori contributi positivi alla PC 2 vengono da (-)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04), acido gallico (7.15 ppm) e 2-feniletanolo (7.30, 7.37). Il metabolita con maggior peso negativo è l'acido D-galatturonico (5.30 ppm).

Vino Dolcetto.

La figura 4.26 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2, dei diversi campioni di vino Dolcetto, ottenute considerando l'intero spettro NMR.

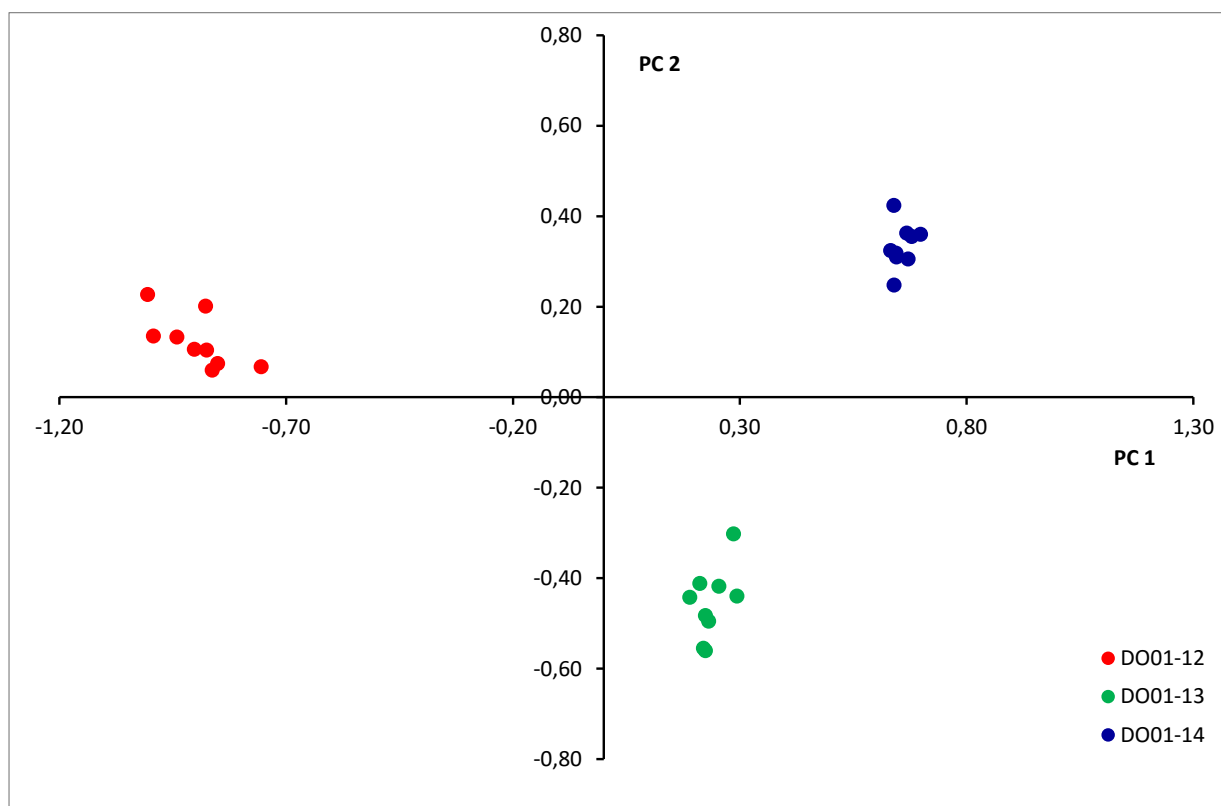


Figura 4.26 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-10 ppm.

Il grafico delle proiezioni mostra come la PC 1 e la PC 2, che insieme spiegano il 89.0 % della varianza, siano in grado di separare i campioni di Dolcetto delle tre diverse annate di produzione. In particolare la PC 1 separa molto bene i campioni della vendemmia del 2012, a valori negativi, da quelli della vendemmia 2014, a valori positivi. La PC 2, invece, separa il vino prodotto nella vendemmia 2012 e 2014, a valori positivi, dal vino del 2013 che ha proiezioni negative su questa PC.

In figura 4.27 è riportato il grafico dei pesi per PC 1, da cui si può vedere che i metaboliti con maggior peso positivo su PC 1 sono l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.34, 3.77 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm). Con peso negativo sulla PC 1 troviamo l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), la prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'arabinosio (5.21, 4.49, 3.85 – 4.00) ed il fruttosio (3.80 - 4.10 ppm).

In figura 4.28 si può osservare l'andamento dei pesi per la PC 2. Dal grafico dei pesi si può osservare che contribuiscono positivamente alla PC 2 l'isopentanololo (0.88 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30 – 5.30 ppm) ed infine l'acido tartarico (4.60 ppm). Con peso negativo abbiamo invece l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm) ed il glicerolo (3.34, 3.77 ppm).

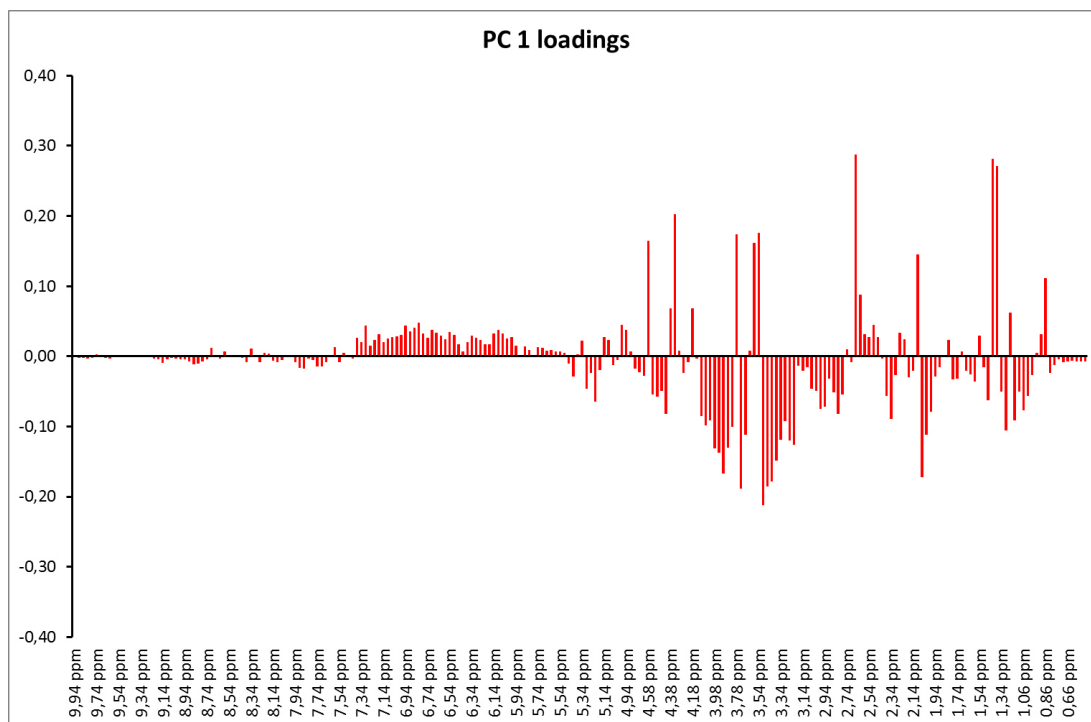


Figura 4.27 Grafico dei pesi di PC 1; spettro intero (0,5-10 ppm).

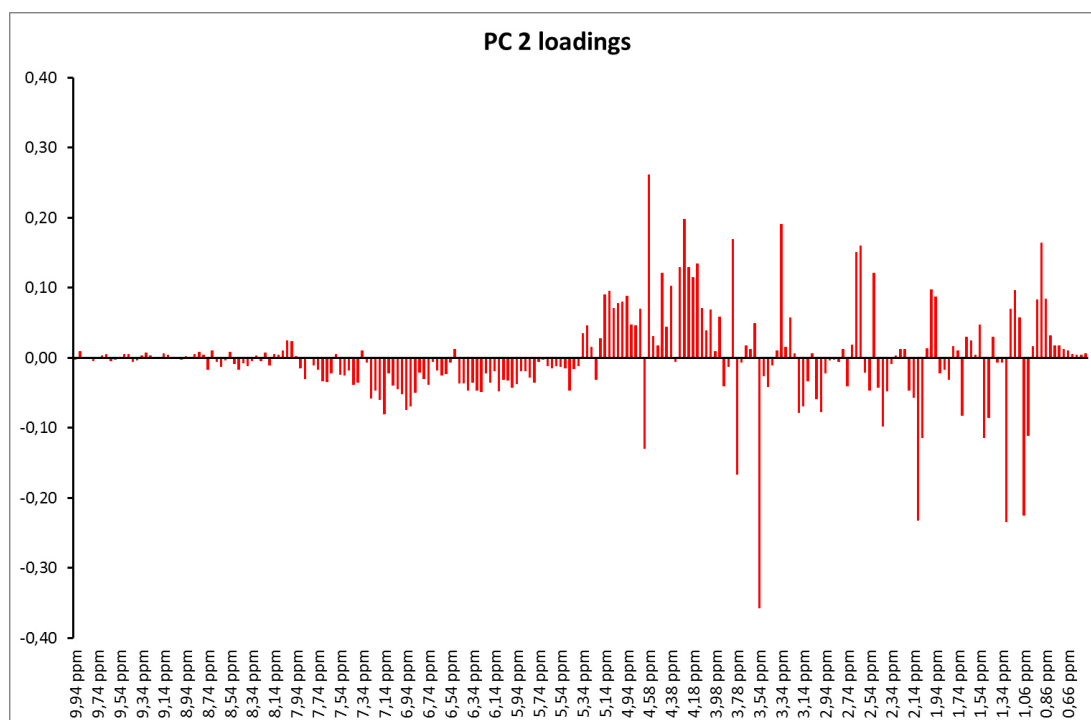


Figura 4.28 Grafico dei pesi di PC 2; spettro intero (0,5-10 ppm).

Per evidenziare meglio il contributo dei singoli metaboliti alla separazione dei campioni, l'analisi statistica dei dati è stata ripetuta considerando separatamente le regioni dello spettro NMR da 0,5 a 5 ppm e da 5 a 10 ppm.

La figura 4.29 riporta il grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 per la zona spettrale 0,5 – 5 ppm.

Le prime due componenti principali, che spiegano il 89,2 % della varianza, sono in grado di separare i campioni di vino Dolcetto provenienti dalle tre annate diverse di produzione. La distribuzione dei campioni lungo le due componenti principali è analoga a quella osservata sull'intero spettro NMR.

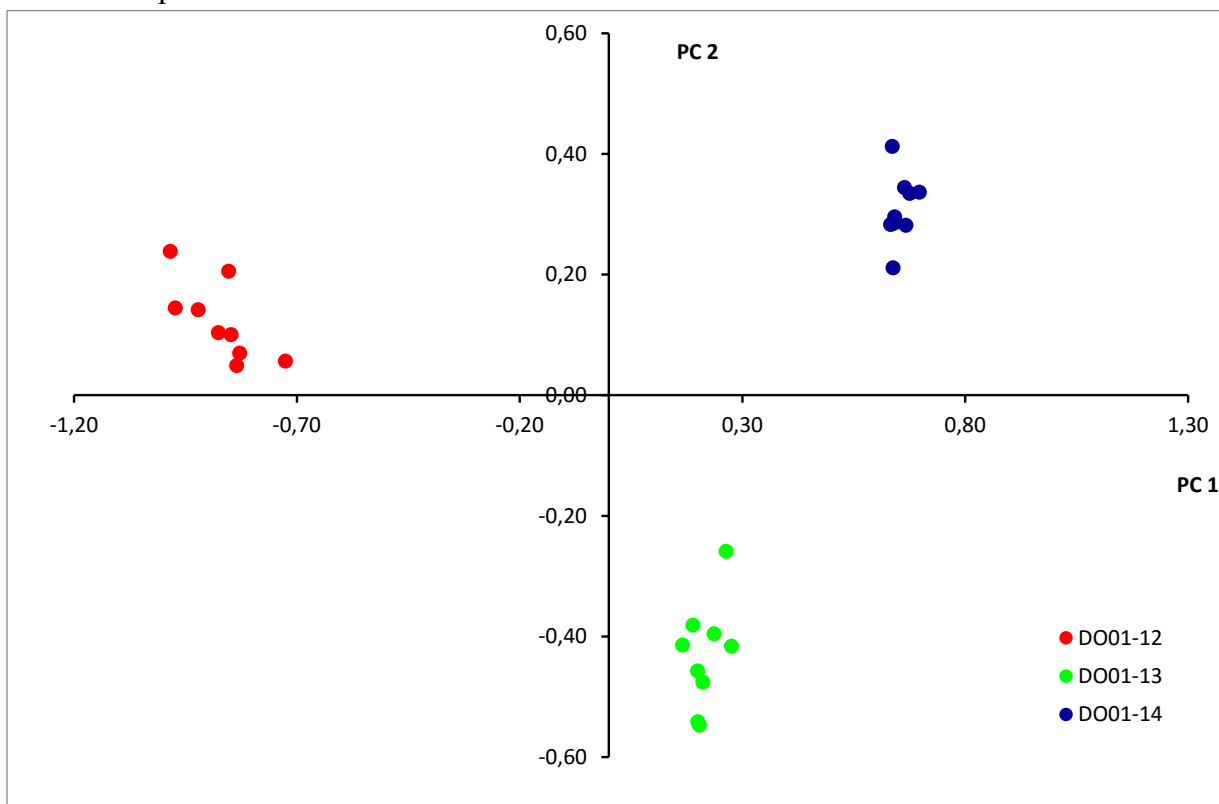


Figura 4.29 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-5 ppm.

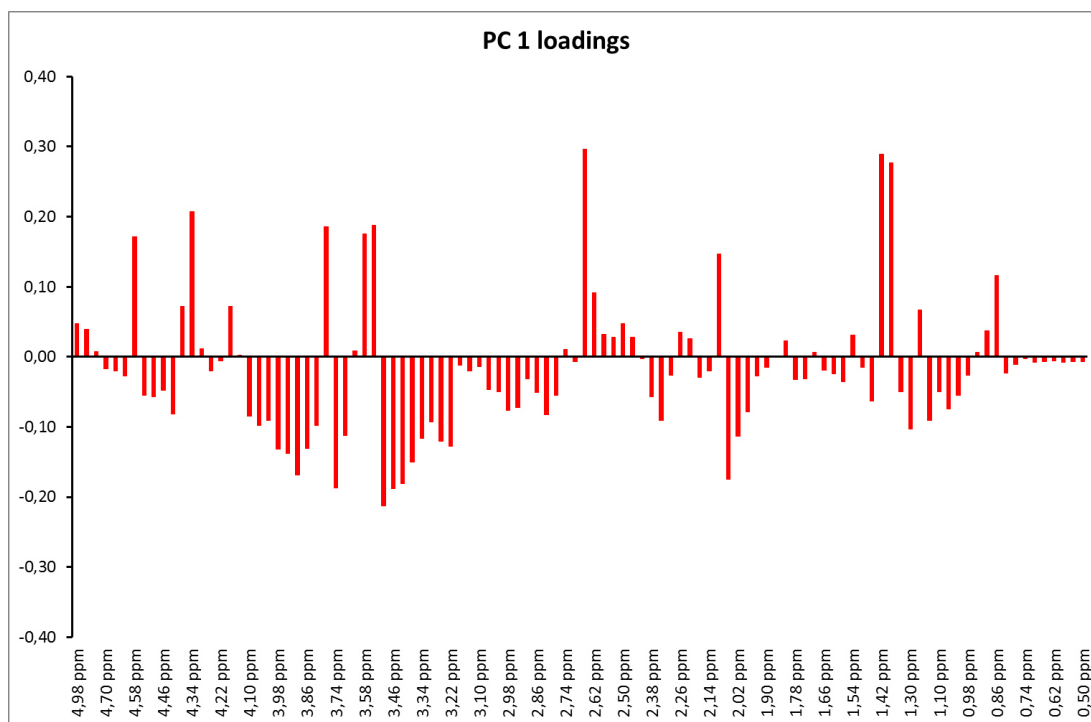


Figura 4.30 Grafico dei pesi di PC 1; regione dello spettro da 0,5-5 ppm.

In figura 4.30 si può osservare l'andamento dei pesi per PC 1. Dal grafico si può vedere quali metaboliti vengano indicati importanti per questa PC. Si può vedere che i metaboliti con maggior peso positivo su PC 1 sono l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.34, 3.77 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm). Con peso negativo sulla PC 1 troviamo l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), la prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), il metanolo (3.34 ppm), il fruttosio (3.80 - 4.10 ppm) ed infine l'arabinosio (5.21, 4.49, 3.85 - 4.00).

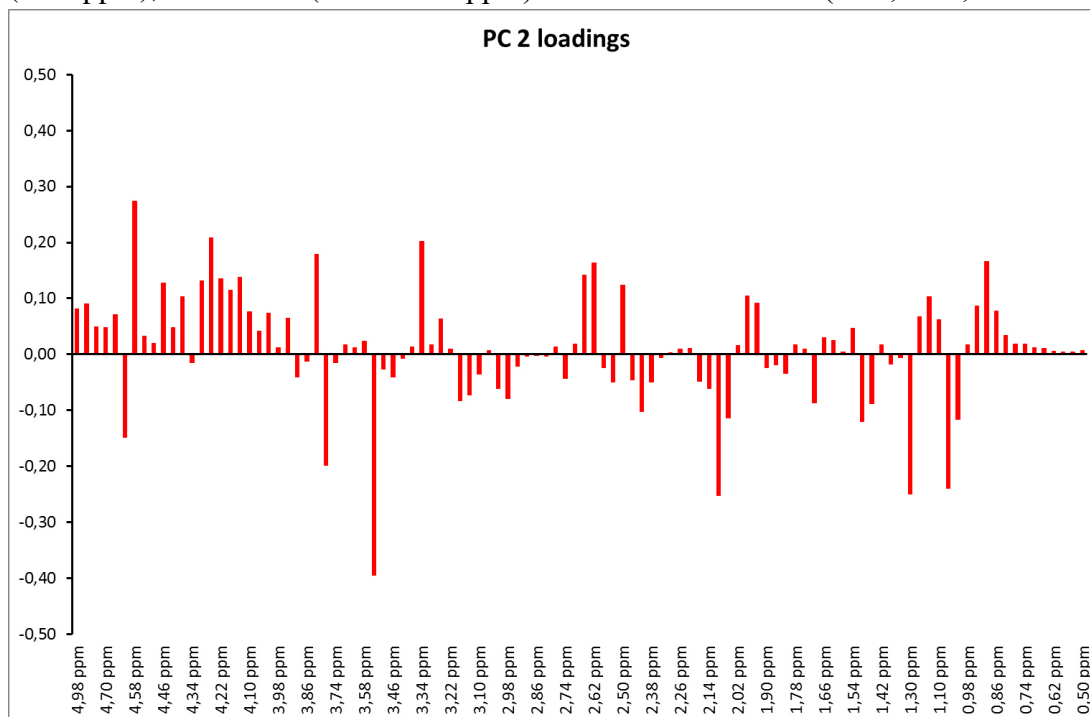


Figura 4.31 Grafico dei pesi di PC 2; regione dello spettro da 0,5-5 ppm.

In figura 4.31 si può osservare l'andamento dei pesi per la PC 2. Dal grafico si evince che contribuiscono positivamente alla PC 2 l'isopentano (0.88 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30 - 5.30 ppm) ed infine l'acido tartarico (4.60 ppm). Con peso negativo abbiamo invece l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm) e il glicerolo (3.34, 3.77 ppm).

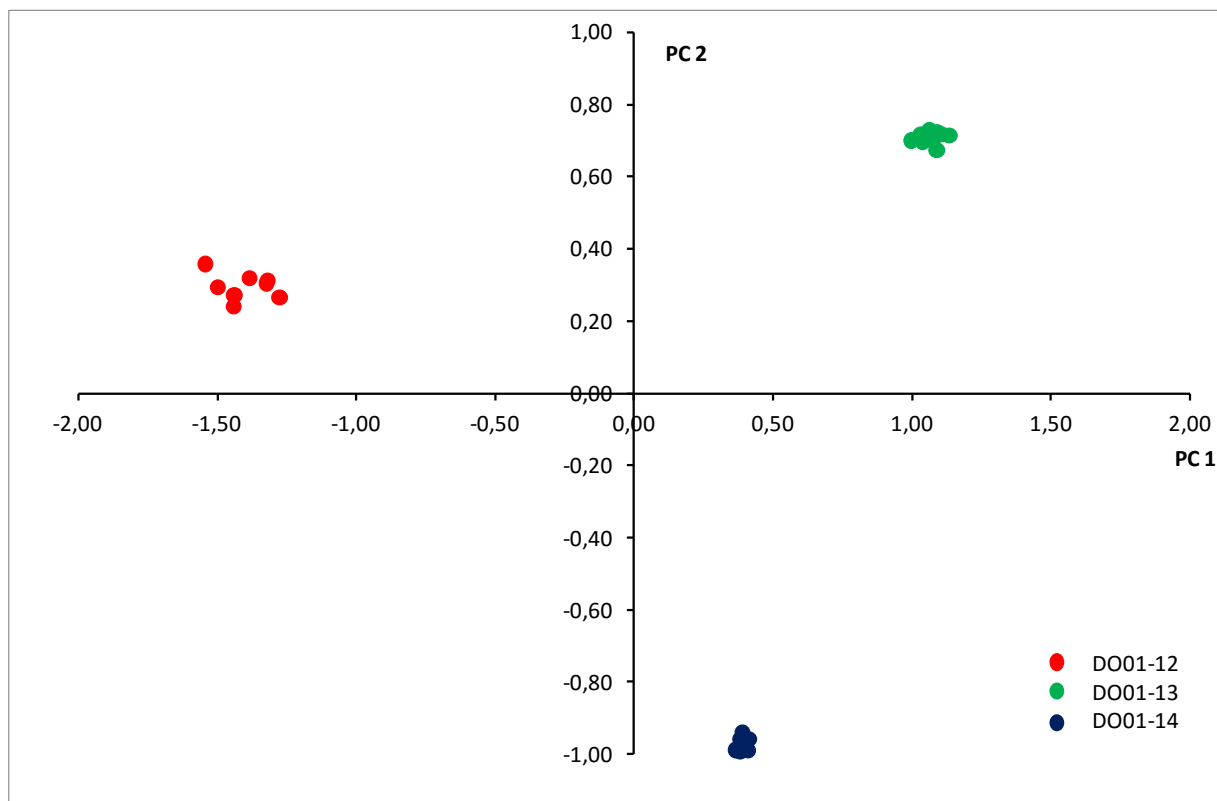


Figura 4.32 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 5-10 ppm.

La figura 4.32 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2, che sono in grado di spiegare il 92,8% della varianza, relativo alla zona spettrale da 5 a 10 ppm. In questa circostanza si evidenzia come la PC 1 sia in grado di separare i campioni di vino del 2012 che si trovano a valori negativi da quelli del 2013 che si trovano a valori positivi. La PC 2 è in grado di separare i campioni di Dolcetto delle annate 2012-2013 che si trovano a valori positivi dai campioni del 2014 che si posizionano a valori negativi.

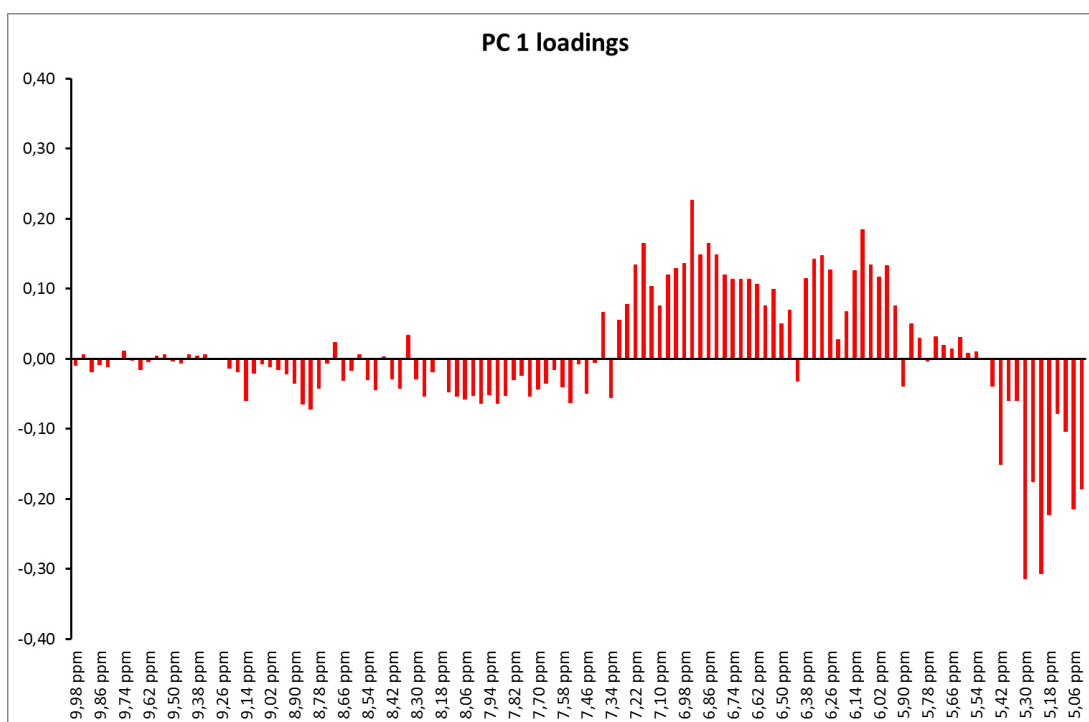


Figura 4.33 Grafico dei pesi di PC 1; regione dello spettro da 5 a 10 ppm.

Nel grafico 4.33 si evidenziano i principali metaboliti su PC 1 con peso positivo, tra cui si riscontrano (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), e la tirosina (6.87, 7.18 ppm). Il metabolita con peso negativo principale è rappresentato dall'acido galatturonico (5.30 ppm).

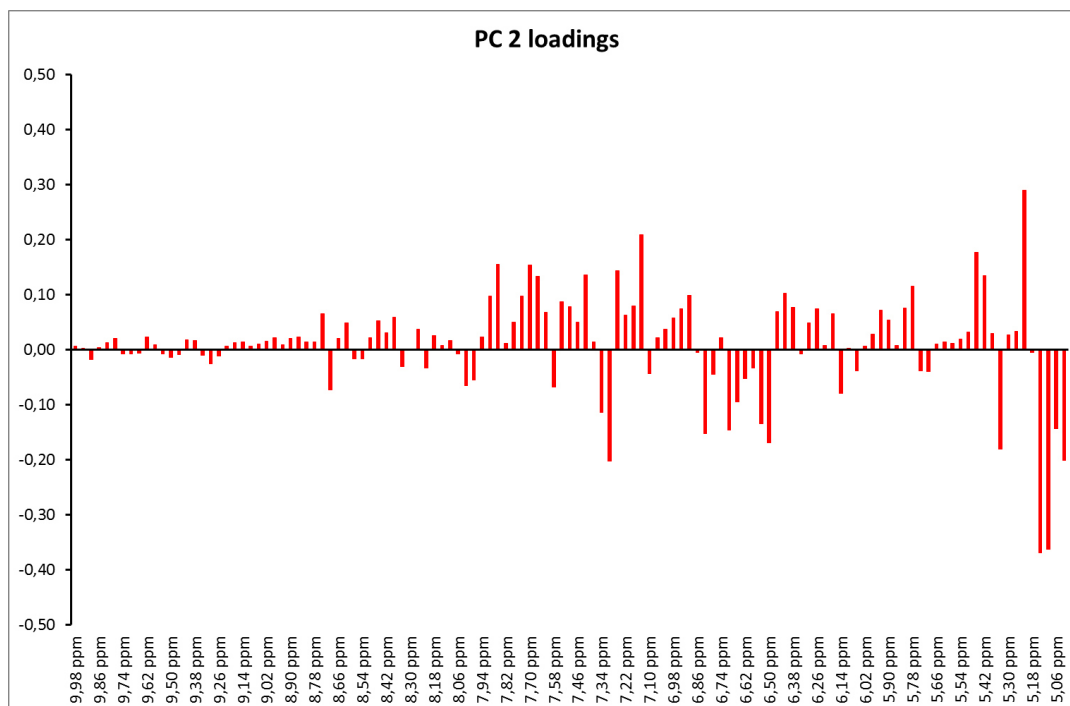


Figura 4.34 Grafico dei pesi di PC 2; regione dello spettro da 5 a 10 ppm.

Nel grafico 4.34 sono riportati i pesi dei principali metaboliti su PC 2. Tra i metaboliti con peso positivo possiamo riconoscere l'arabinosio (4.49, 5.21 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm) e l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm). Mentre per quanto riguarda i metaboliti che hanno peso negativo possiamo osservare l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), e il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm).

Analisi dei risultati ottenuti sui vini rossi

La spettroscopia ^1H NMR unita all'analisi statistica delle componenti principali si è mostrata uno strumento utile per la separazione dei vini rossi a seconda della loro annata di produzione. Le percentuali di varianza spiegata da PC 1 e PC 2 risultano maggiori (circa 90 %) per il Barbera rispetto al Dolcetto (circa 73 %). Questo può lasciare ad intendere che vi siano maggiori differenze (rilevabili tramite ^1H NMR) tra i vini Barbera delle tre diverse annate di produzione di quante ce ne siano per i vini Dolcetto. Anche per questo tipo di studio, la parte più informativa dello spettro NMR si è mostrata essere quella da 5 a 10 ppm in cui cadono i segnali dei metaboliti secondari. Le differenze riscontrate nei vini di diverse annate di produzione possono derivare dalle differenti condizioni climatiche di queste ultime. La radiazione solare, la temperatura media annua, il vento, la piovosità, l'umidità dell'aria e l'evaporazione sono fenomeni importanti per l'evoluzione delle caratteristiche della vite e dell'uva da essa prodotta. Queste caratteristiche si ripercuotono sul processo di vinificazione e sul prodotto finale.

Dalle analisi dei grafici dei pesi per la PC 1 e la PC 2 nei diversi casi, è stato possibile mettere in evidenza quali siano i metaboliti importanti per la separazione dei campioni. I metaboliti di

volta in volta evidenziati sono in accordo con quanto già riportato nei dati delle analisi routinarie riportati nella tabella 4.3.

Vino Cortese.

Nella seconda parte del lavoro si sono analizzati gli effetti dell'annata sui vini bianchi.

La figura 4.35 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 dei diversi campioni ottenute considerando l'intero spettro NMR.

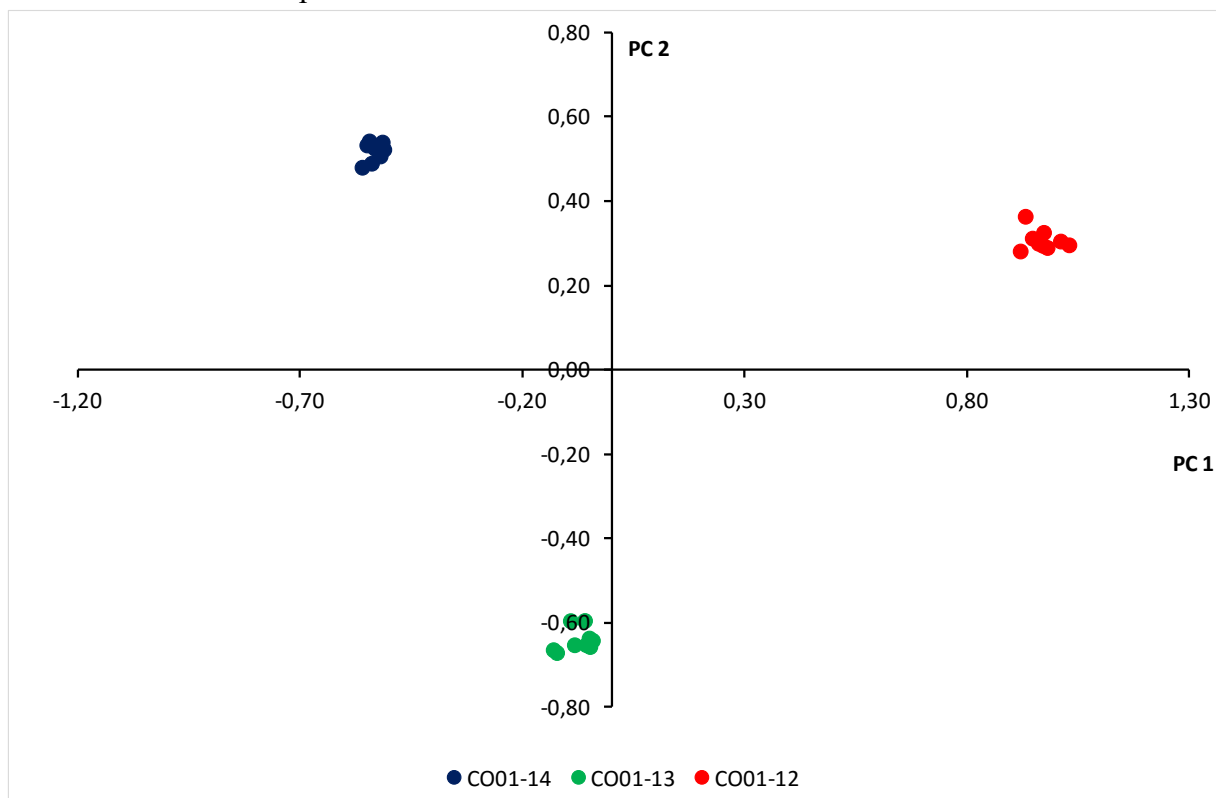


Figura 4.35 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2 su intervallo spettrale 0,5-10 ppm.

Il grafico delle proiezioni mostra come la PC 1 e la PC 2, che insieme spiegano il 82,3 % della varianza, siano in grado di separare i campioni di Cortese delle tre diverse annate di produzione. Dal grafico si può osservare come la PC 1 sia in grado di distinguere i campioni di vino Cortese prodotti nell'annata 2014, che si riscontrano a valori negativi, dai campioni del 2012 che invece si trovano a valori positivi. La PC 2 è in grado di differenziare i campioni di vino prodotti sia nel 2014 che nel 2012, che si trovano a valori positivi, dai campioni del 2013 che sono evidentemente a valori negativi.

In figura 4.36 è riportato il grafico dei pesi per PC 1. Da questo grafico si può vedere che i metaboliti con maggior peso positivo su PC 1 sono l'isopentano (0.88 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm) e il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm). Invece tra i maggiori metaboliti con peso negativo si possono osservare la leucina (0.95, 1.72 ppm), la prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm) e il fruttosio (3.80, 4.10 ppm).

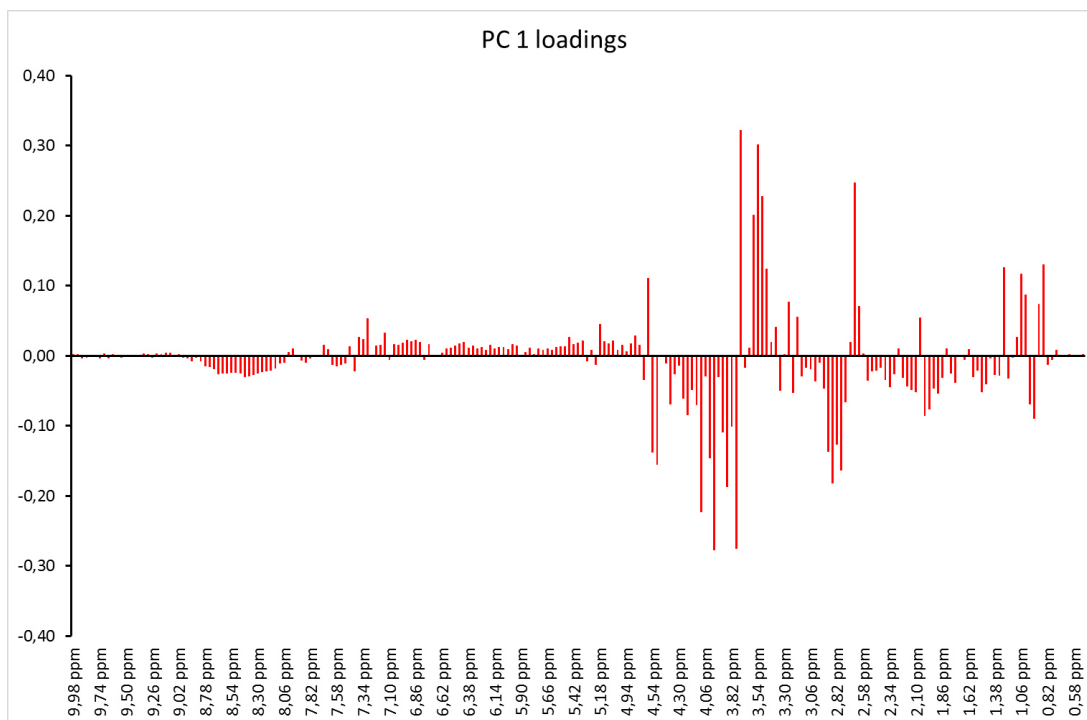


Figura 4.36 Grafico dei pesi per PC 1 nella porzione dello spettro da 0,5 a 10 ppm.

In figura 4.37 è riportato il grafico dei pesi per PC 2 da cui si possono evidenziare i principali metaboliti con peso positivo, tra cui l'isopentanololo (0.88 ppm), l'arginina (1.65, 3.23, 6.70, 7.26 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), il mannosio (3.92-3.96, 5.18 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm) e il 2-feniletanololo (7.30, 7.37 ppm). Tra i metaboliti principali su PC 2 con peso negativo possiamo osservare l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), la prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm) e l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30, 5.30 ppm).

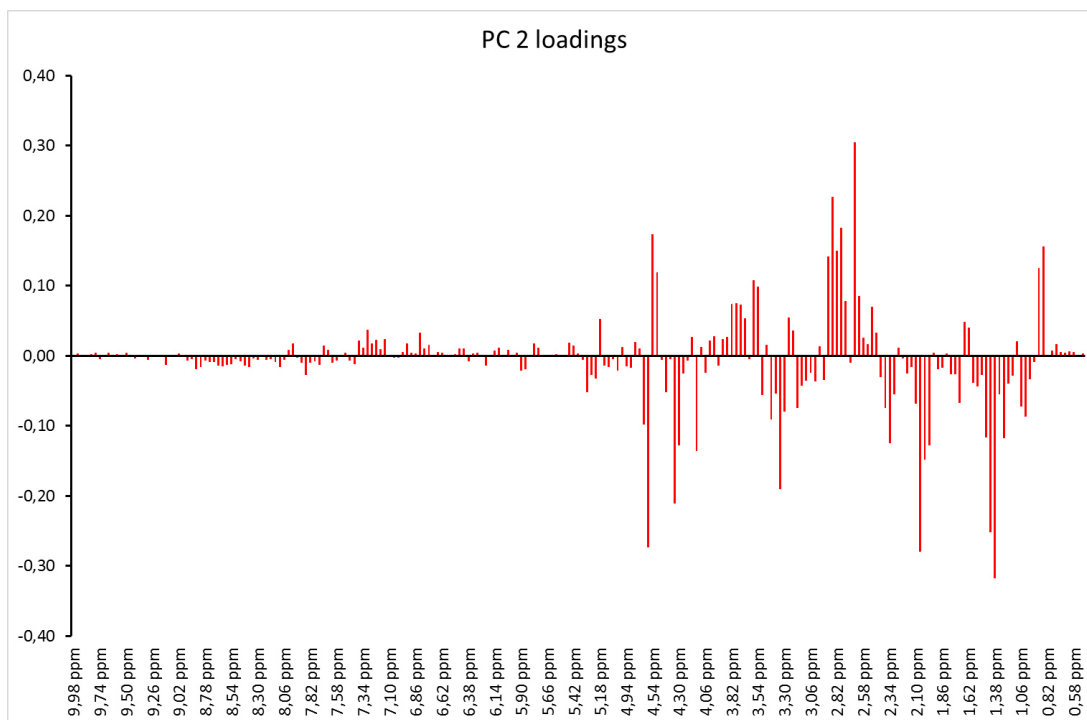


Figura 4.37 Grafico dei pesi per PC 2 nella porzione dello spettro da 0,5 a 10 ppm.

Per evidenziare meglio il contributo dei singoli metaboliti alla separazione dei campioni, l'analisi statistica dei dati è stata ripetuta considerando separatamente le regioni dello spettro NMR da 0,5 a 5 ppm e da 5 a 10 ppm.

La figura 4.38 riporta il grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 per la zona spettrale 0,5 – 5 ppm.

Le prime due componenti principali, che spiegano il 91,4 % della varianza. Dal grafico si evince come la PC 1 sia in grado di separare i campioni di vino Cortese, in particolar modo separa i campioni del 2014 che si trovano a valori negativi dai campioni del 2012 che si trovano invece a valori positivi. La PC 2 separa i campioni delle annate 2014 e 2012 dai campioni dell'annata 2013 i quali si trovano a valori negativi rispetto agli altri che si riscontrano a valori positivi.

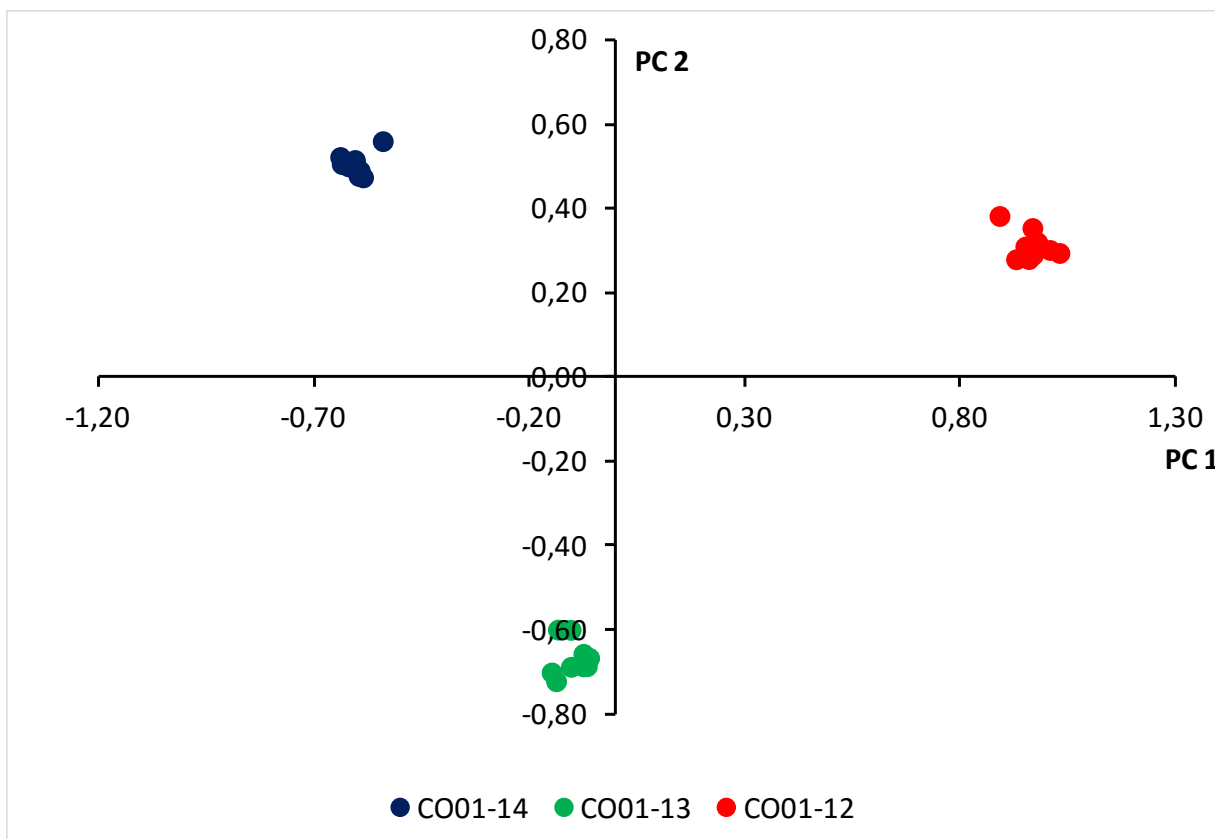


Figura 4.38 Grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 per la zona spettrale 0,5 – 5 ppm.

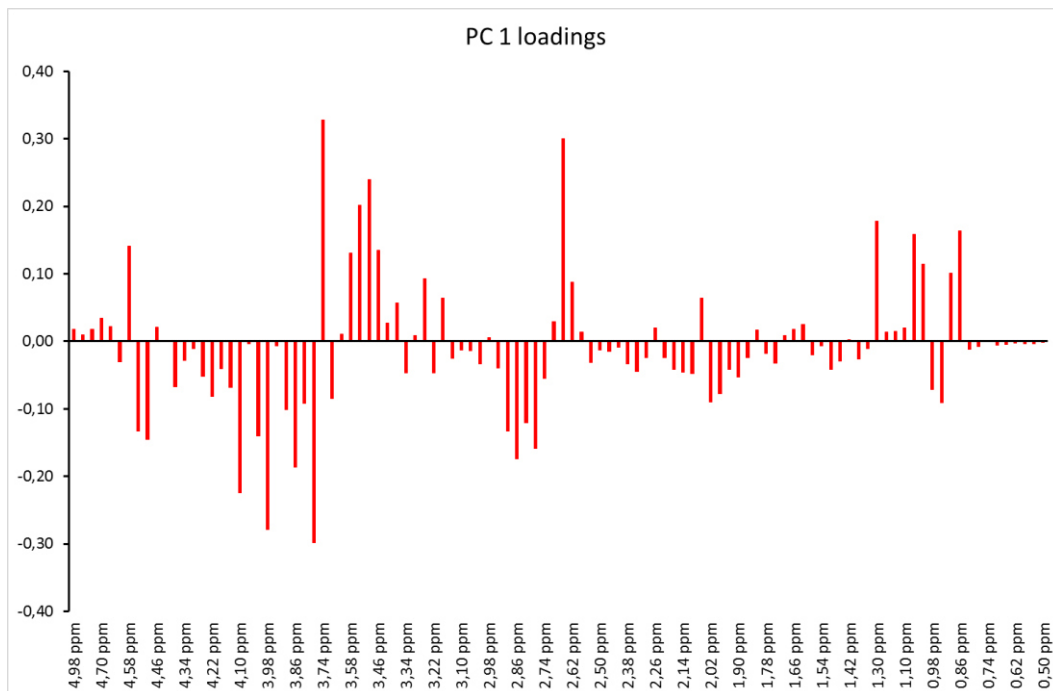


Figura 4.39 Grafico dei pesi per PC 1 nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm.

Nella figura 4.39 sono riportati i pesi dei principali metaboliti riscontrabili su PC1 nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. Tra i principali metaboliti con pesi positivi riscontriamo la presenza dell'isopentano (0.88 ppm), dell'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), dell'acido succinico (2.65 ppm), del glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e dell'acido tartarico (4.60 ppm). Mentre tra i metaboliti principali con peso negativo possiamo osservare la leucina (0.95, 1.72 ppm), la

prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), e il fruttosio (3.80, 4.10 ppm).

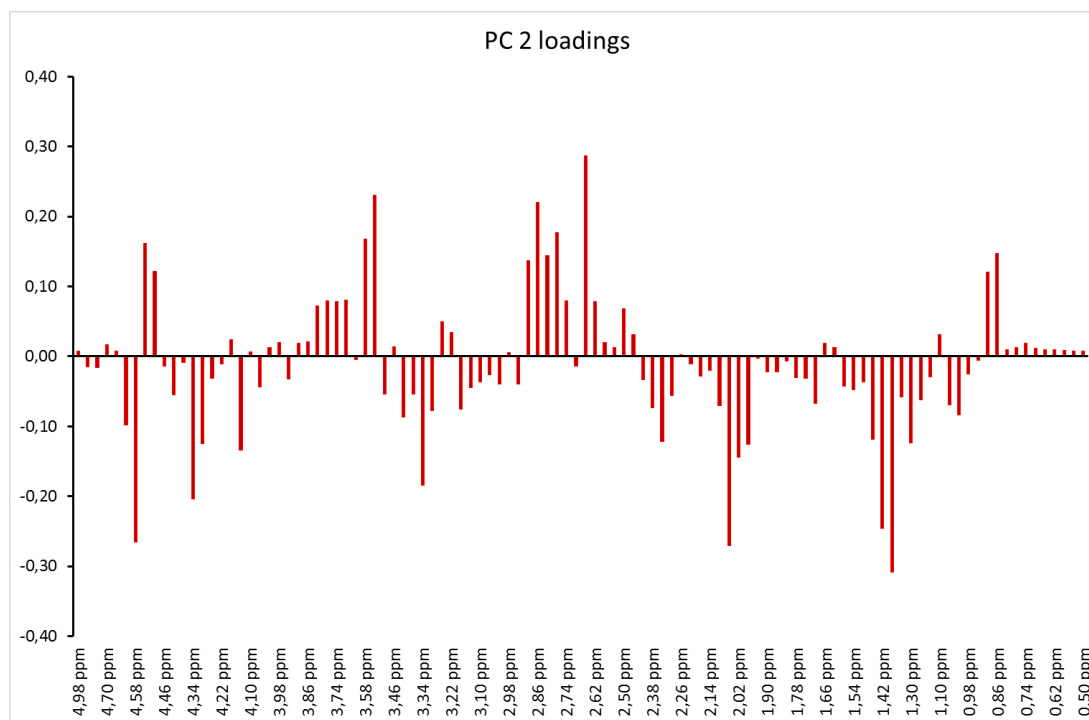


Figura 4.40 Grafico dei pesi per PC 2 nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm.

Nella figura 4.40 sono riportati i pesi dei principali metaboliti riscontrabili su PC2 nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. Tra i principali metaboliti con pesi positivi possiamo osservare l'isopentano (0.88 ppm), l'arginina (1.65, 3.23 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), e il glicerolo (3.54, 3.77 ppm). Mentre i metaboliti con peso negativo che hanno una maggiore rappresentanza sono l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), la prolina (2.03, 2.35, 3.36 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm).

La figura 4.41 riporta il grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 per la zona spettrale 5 – 10 ppm.

Le prime due componenti principali spiegano l'88,3 % della varianza. La PC 1 è in grado di separare i campioni di vino Cortese dell'annata 2013-2014 che si trovano a valori negativi, dai campioni di vino del 2012 che si trovano invece a valori positivi. La PC 2 è in grado di separare in maniera più evidente i campioni del 2014 che si trovano a valori positivi su PC 2 da quelli del 2013 che invece hanno valori negativi.

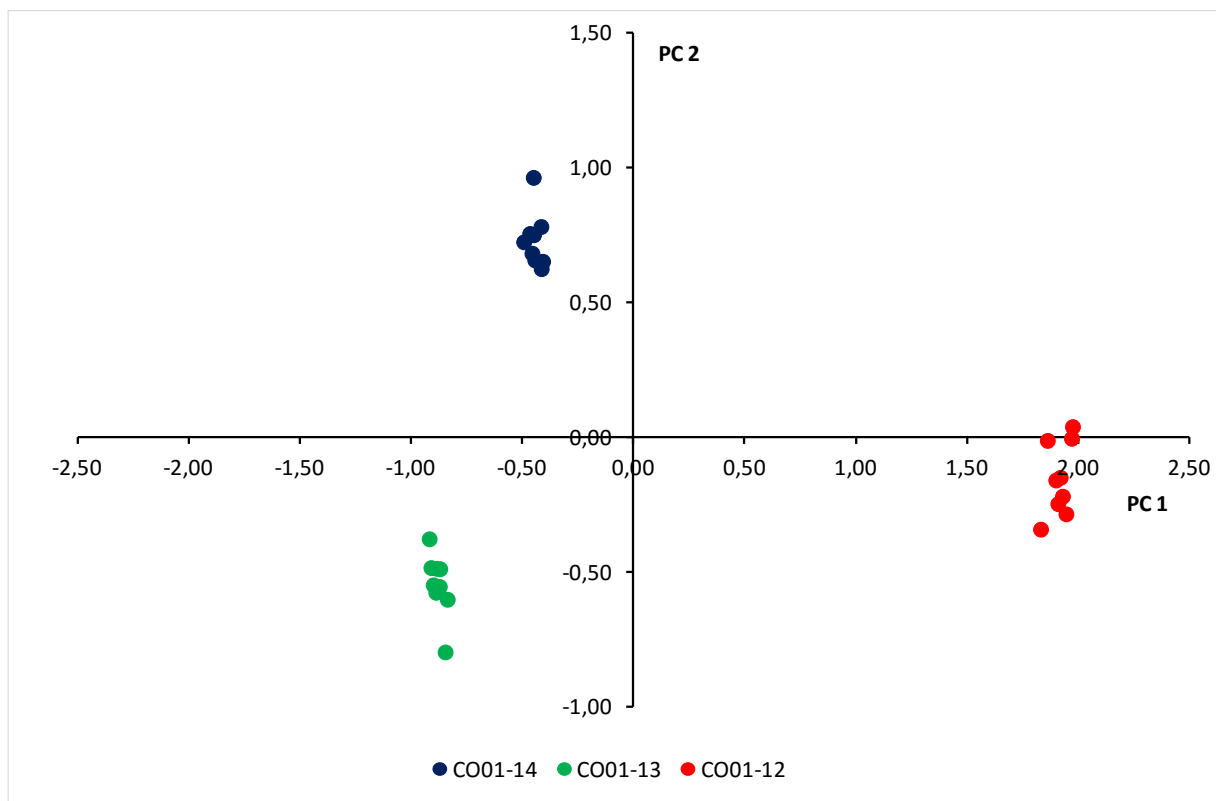


Figura 4.41 Grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 per la zona spettrale 5 – 10 ppm.

Nel grafico 4.42 si evidenziano i principali metaboliti su PC 1 con peso positivo, tra cui si riscontrano il campferolo (6.32, 6.54, 7.02 ppm), l'acido ferulico (6.40, 6.94, 7.20, 7.68 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acido sirigico (7.38 ppm) e la tirosina (6.87, 7.18 ppm). Mentre tra i principali metaboliti con peso negativo possiamo osservare, l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'istidina (7.40, 8.66 ppm), l'acido formico (8.38 ppm) ed infine la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm).

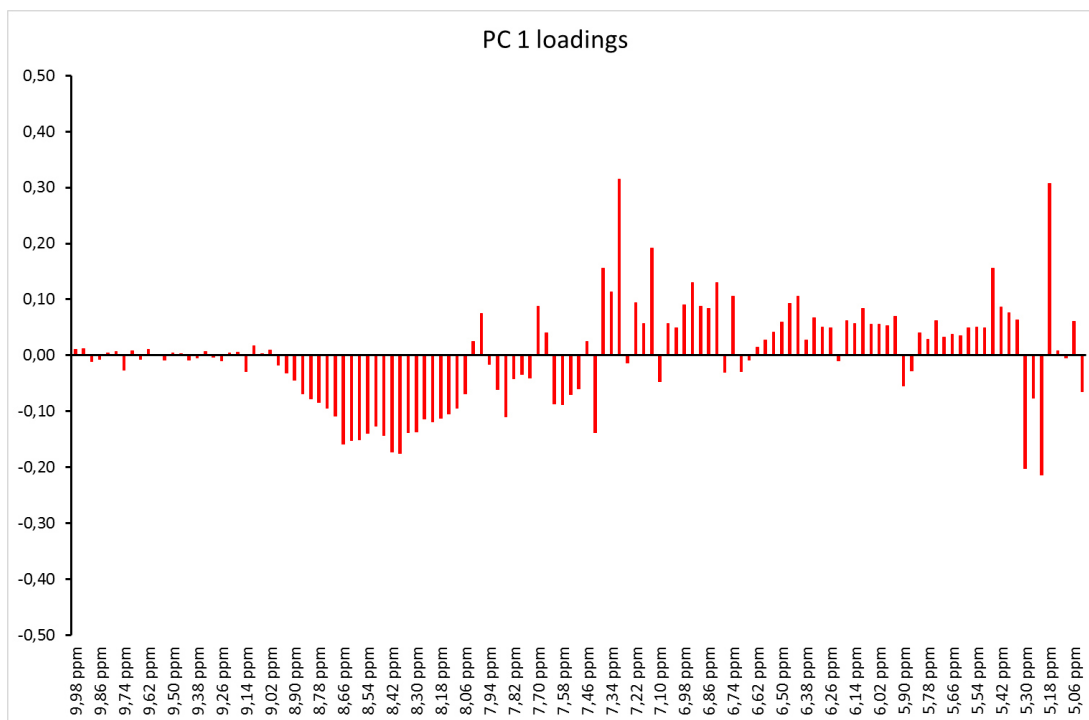


Figura 4.42 Grafico pesi dei principali metaboliti su PC 1 nella porzione spettrale da 5 a 10 ppm.

Nella figura 4.43 sono riportati i pesi dei principali metaboliti su PC 2 nella porzione spettrale da 5 a 10 ppm. I metaboliti con peso positivo che danno un maggior contributo sono l'acido shikimico (6.81 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), l'acido sirigico (7.38 ppm), e l'acido benzoico (7.54, 7.68, 8.00 ppm). Mentre tra quelli più incidenti con peso negativo riscontriamo due metaboliti che sono l'acido galatturonico (5.30 ppm) e la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm).

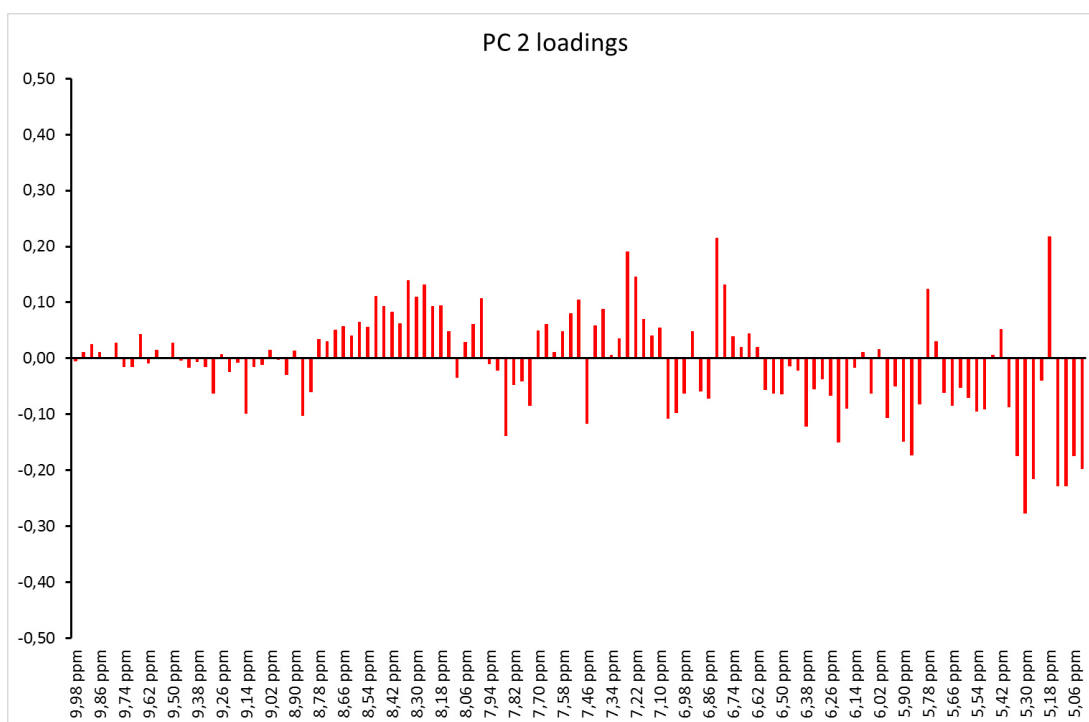


Figura 4.43 Grafico pesi dei principali metaboliti su PC 2 nella porzione spettrale da 5 a 10 ppm.

Vino Chardonnay.

La figura 4.44 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 relativo alla zona spettrale da 0,5 a 10 ppm, che sono in grado di spiegare il 79,3 % della varianza. E' possibile evincere come la PC 1 sia in grado di separare i campioni di vino Chardonnay dell'annata 2014 che si riscontrano a valori negativi, dai campioni delle annate 2013-2012 che si trovano invece a valori positivi. Mentre la PC 2 è in grado di separare in maniera più evidente i campioni dell'annata 2012 che si trovano a valori negativi da quelli dell'annata 2013 che si riscontrano, invece, a valori positivi.

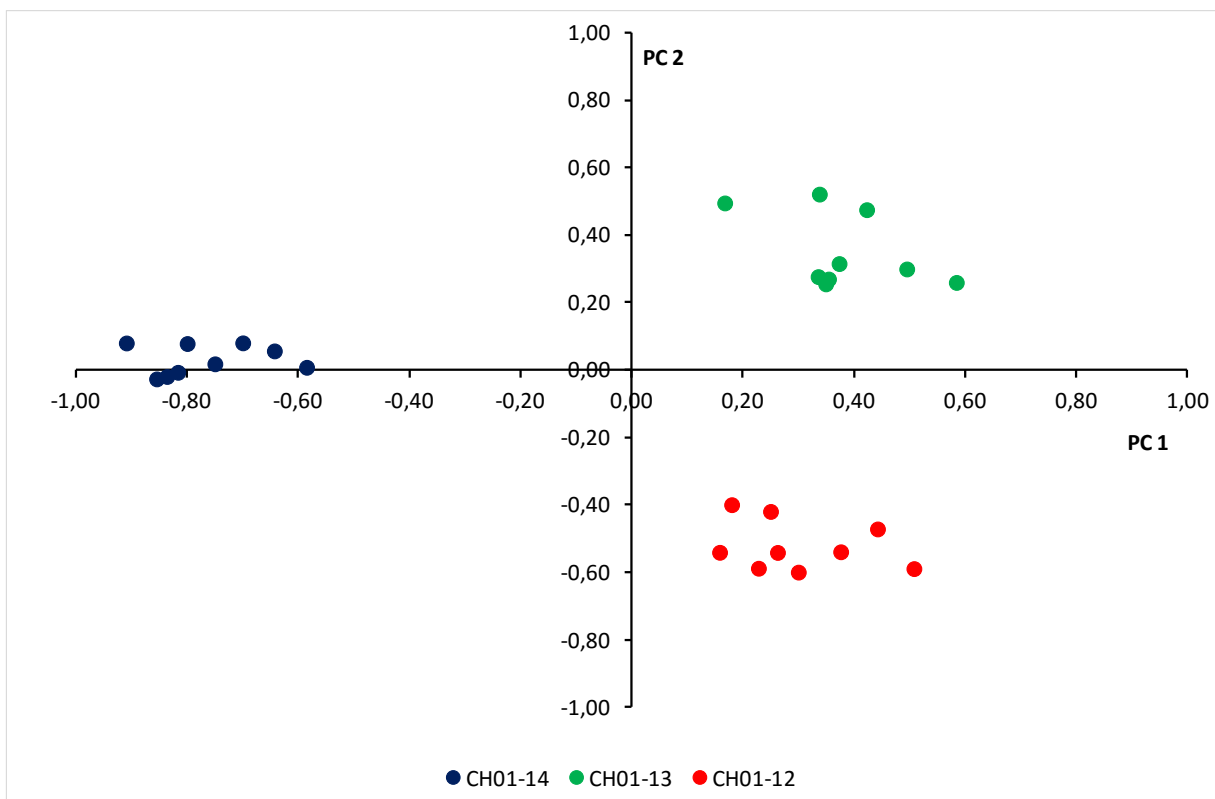


Figura 4.44 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 su zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

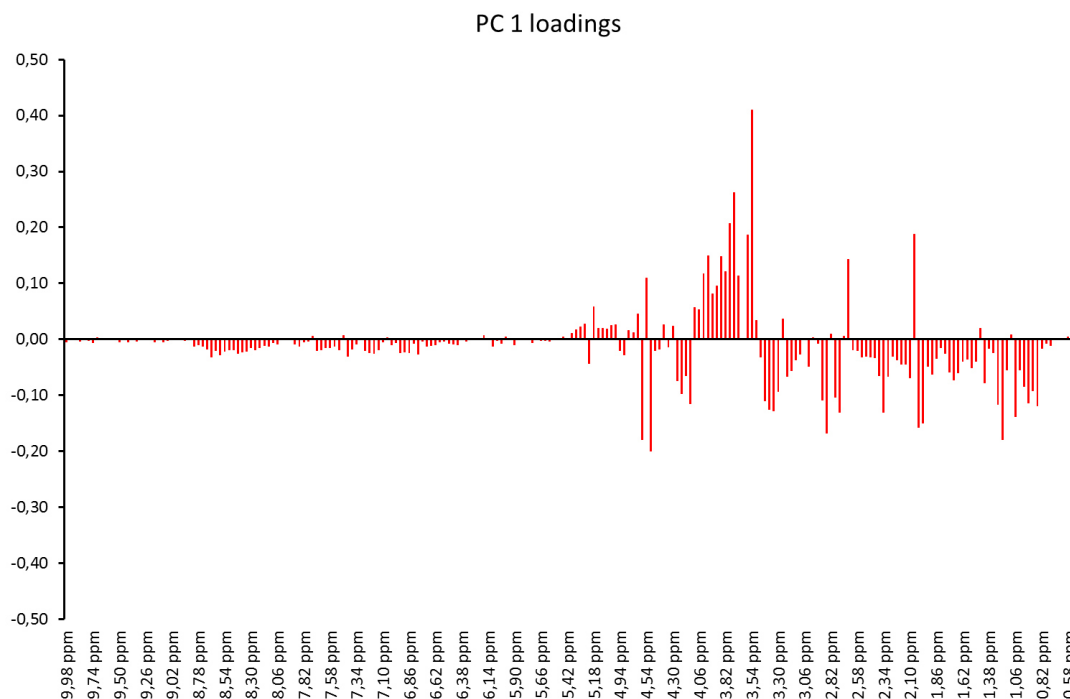


Figura 4.45 Grafico dei pesi per PC 1 nella porzione dello spettro da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.45 riporta il grafico dei pesi per PC 1 nella porzione dello spettro da 0,5 a 10 ppm. Da tale grafico è possibile osservare quali siano i metaboliti principali con peso positivo, tra i quali l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e il fruttosio (3.80, 4.10 ppm). E tra quelli con peso negativo possiamo osservare l'isopentanololo (0.88 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), l'acido piruvico (1.54, 2.36 ppm) l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm) e l'arabinosio (3.85 – 4.00, 4.49, 5.21 ppm).

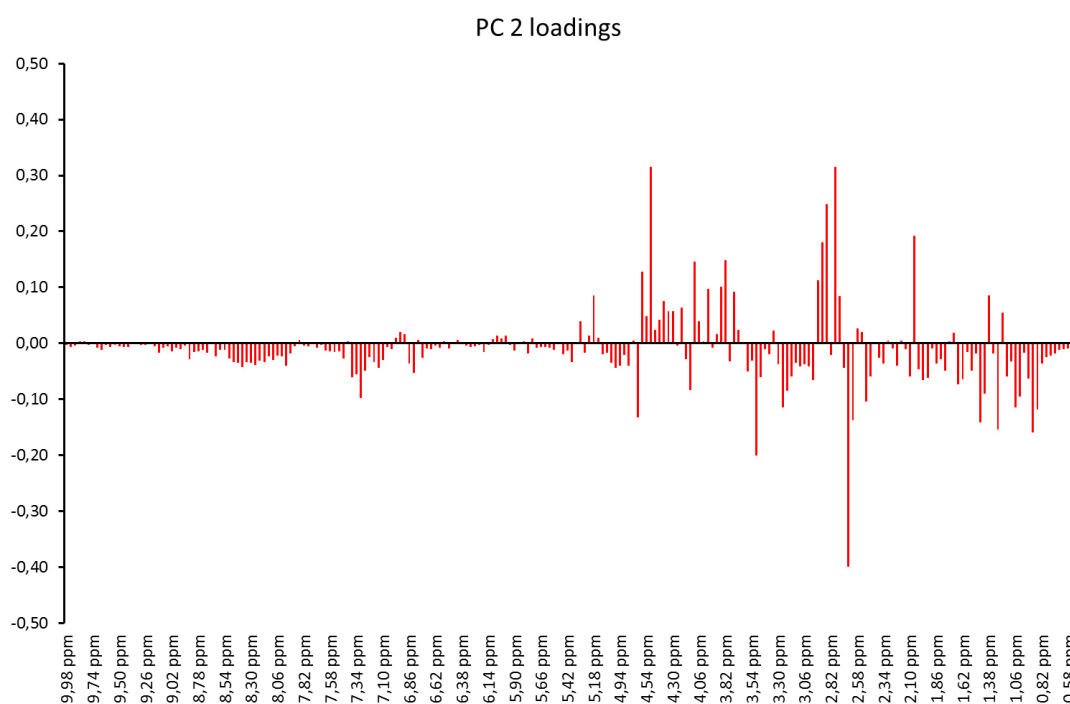


Figura 4.46 Grafico dei pesi per PC 2 nella porzione dello spettro da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.46 riporta il grafico dei pesi per PC 2 nella porzione dello spettro da 0,5 a 10 ppm. Dall'osservazione di tale grafico emergono i metaboliti più indicativi con peso positivo che sono l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm) e l'acido gluconico (3.82, 4.10, 4.38, 4.55 ppm). Mentre tra quelli con peso negativo riscontriamo l'isopentanololo (0.88 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), il GABA (1.94, 2.49, 3.04 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm), l'acido shikimico (6.81 ppm) e il 2-feniletanololo (7.30, 7.37 ppm).

La figura 4.47 riporta le proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la porzione dello spettro da 0,5 a 5 ppm. Le prime due componenti principali in questa circostanza sono in grado di spiegare circa il 75,2 % della varianza. Si può osservare come effettivamente le proiezioni, evidenziate in questa regione spettrale, siano molto simili a quelle osservate nel grafico delle proiezioni riguardante lo spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

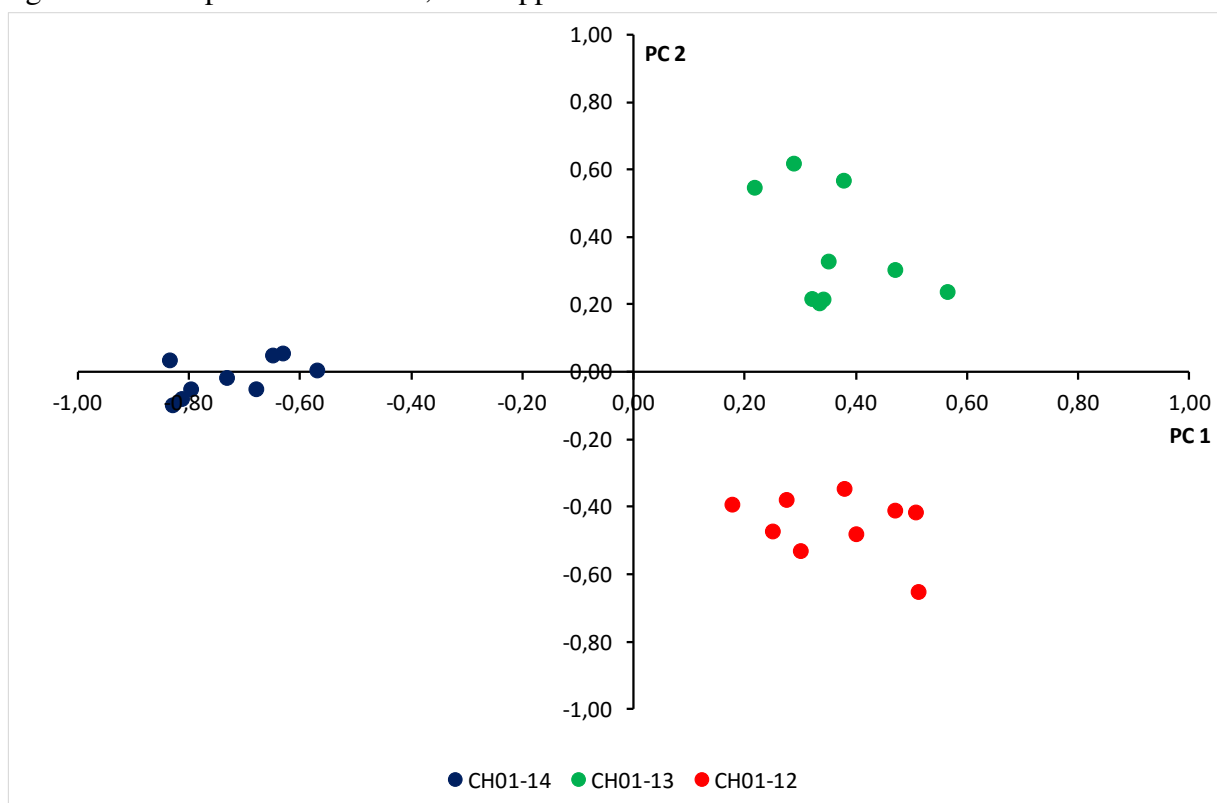


Figura 4.47 Grafico delle proiezioni nella zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

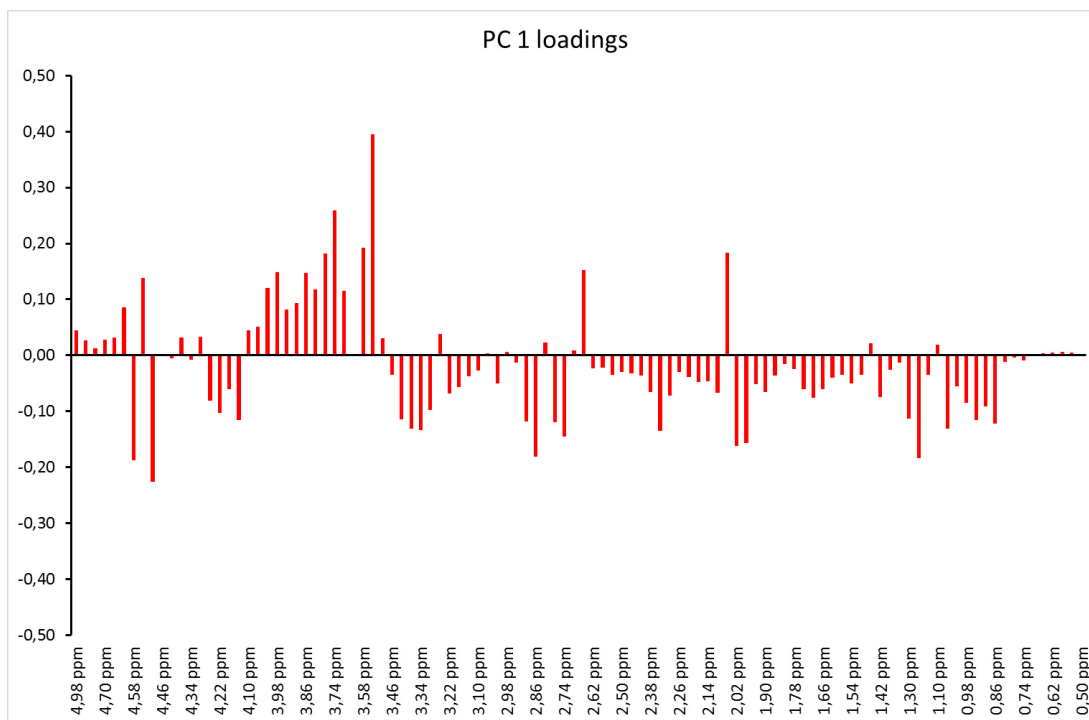


Figura 4.48 Grafico dei pesi su PC 1 su porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm.

L'immagine 4.48 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1 nella zona spettrale da 0,5 a 5 ppm. E' possibile evidenziare che i più influenti metaboliti con peso positivo siano l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e il fruttosio (3.80, 4.10 ppm). Mentre tra i metaboliti caratterizzati da peso negativo riscontriamo l'isopentanololo (0.88 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm), l'acido piruvico (1.54, 2.36 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm) ed infine l'arabinosio (3.85 – 4.00, 4.49, 5.21 ppm).

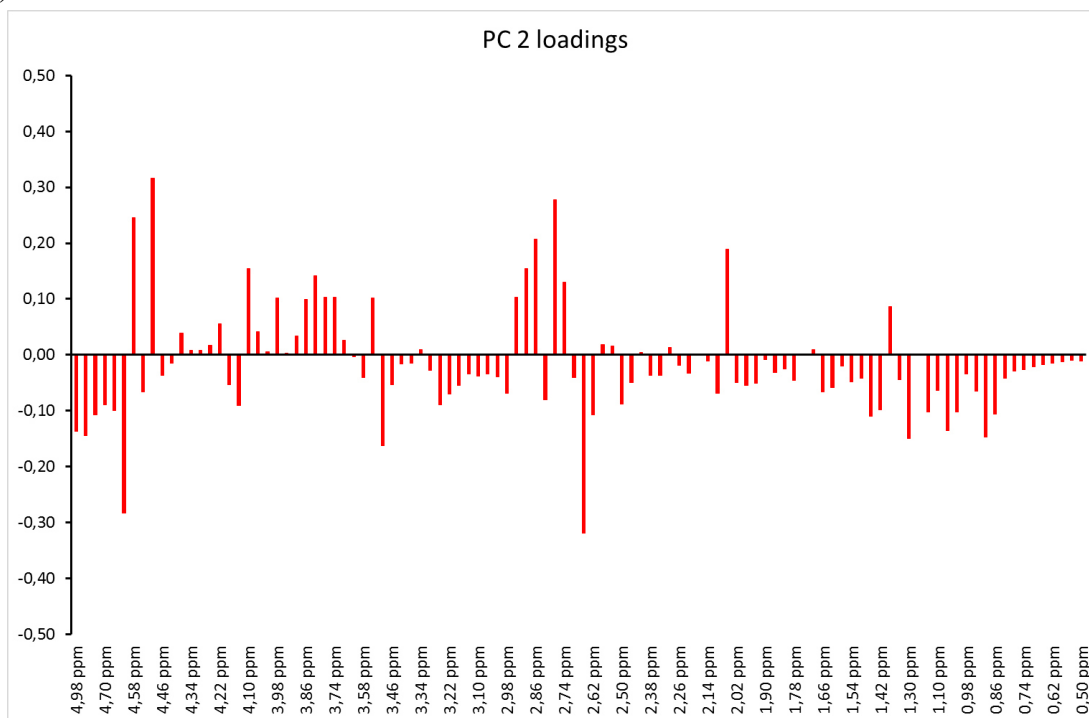


Figura 4.49 Grafico dei pesi su PC 2 della zona spettrale compresa tra 0,5 e 5 ppm.

In figura 4.49 sono, invece, riportati i pesi dei principali componenti su PC 2 per quanto riguarda la zona dello spettro da 0,5 a 5 ppm. Per i metaboliti maggiormente indicativi che hanno peso positivo possiamo riscontrare l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), ed il fruttosio (3.80, 4.10 ppm). Tra i metaboliti caratterizzati da peso negativo è possibile osservare l'isopentanololo (0.88 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'arginina (1.65, 3.23 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm).

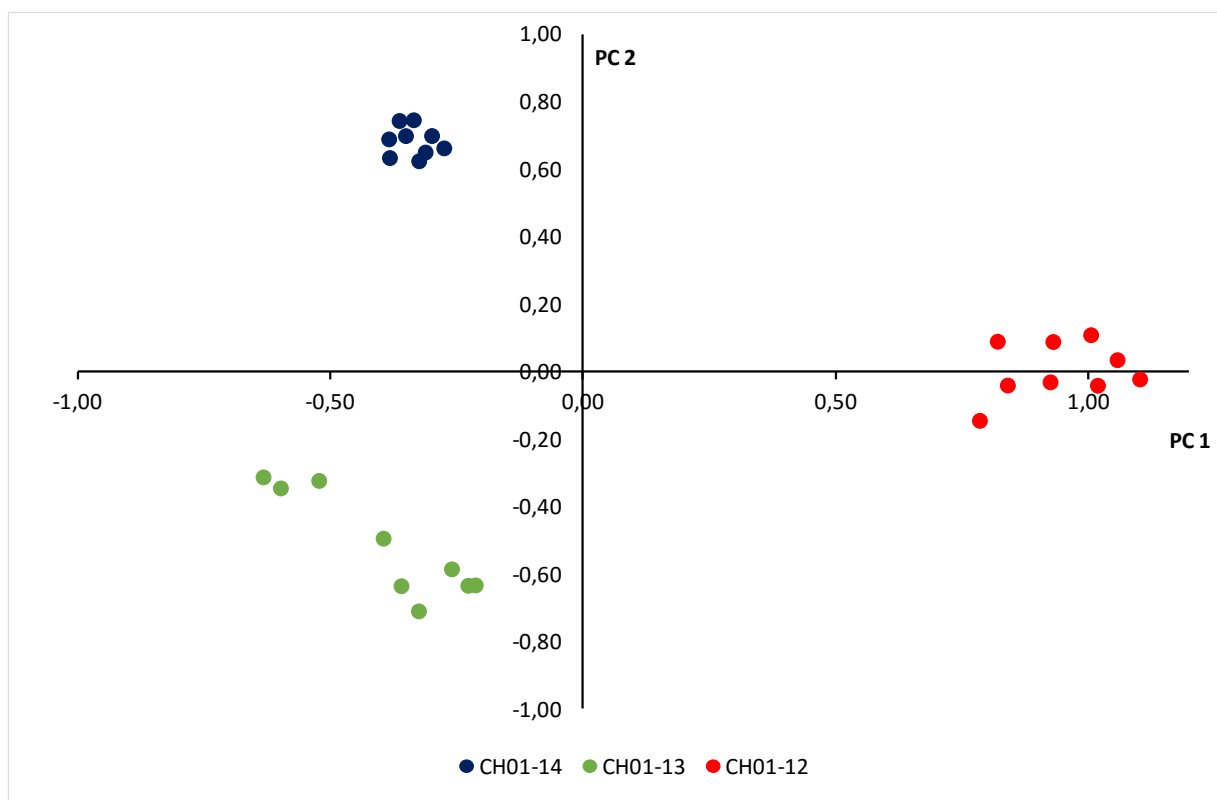


Figura 4.50 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 su porzione dello spettro da 5,5 a 10 ppm.

L'immagine 4.50 riporta le proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardanti la porzione spettrale da 5,5 a 10 ppm. PC1 e PC 2 in questa circostanza sono in grado di spiegare il 65,5 % della varianza. E' possibile notare come la PC 1 sia in grado di separare i campioni di vino dell'annata 2012 che si riscontrano a valori positivi da quelli del 2013 e 2014 che invece sono caratterizzati da valori negativi. Mentre la PC 2 è in grado di separare i campioni del 2013 che hanno valori negativi da quelli del 2014 che sono caratterizzati dall'aver valori positivi.

La figura 4.51 riporta i pesi dei principali componenti su PC 1, per quanto riguarda la zona spettrale da 5,5 a 10 ppm. Tra i metaboliti con peso positivo possiamo osservare il 2-feniletanololo (7.30, 7.37 ppm), e l'acido formico (8.38 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo emergono invece l'(+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'acido fumarico (6.76 ppm), l'acido salicilico (6.97, 7.50, 7.86 ppm) e l'istidina (7.40, 8.66 ppm).

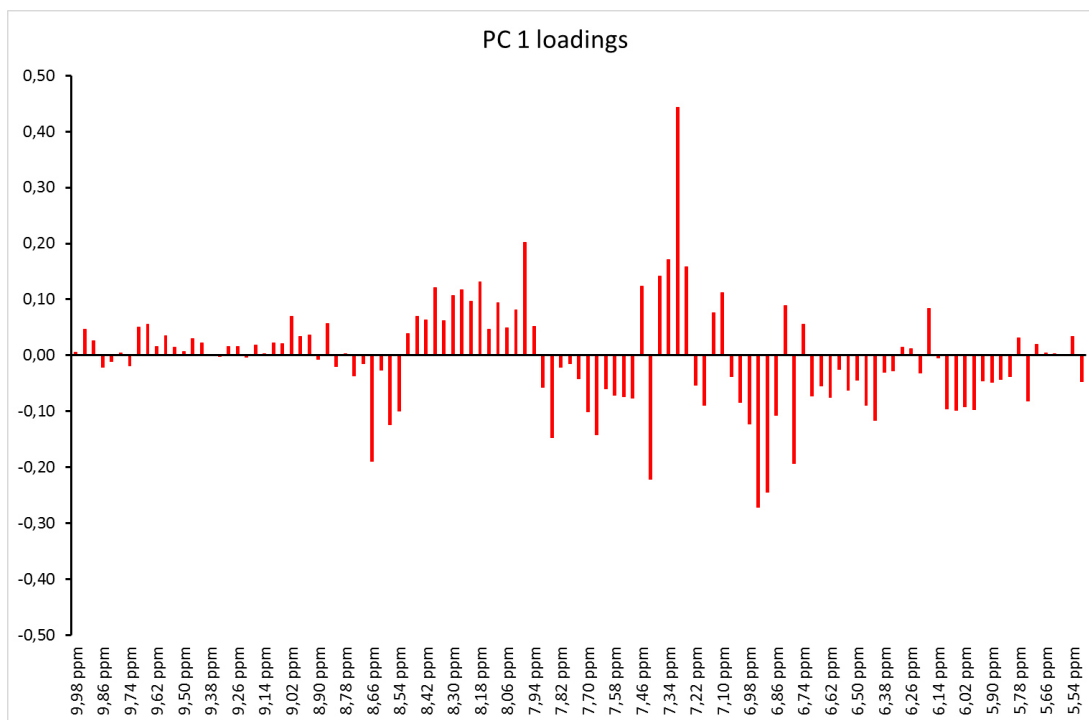


Figura 4.51 Grafico dei pesi su PC 1 nella zona spettrale da 5,5 a 10 ppm.

L'immagine 4.52 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 2 considerando la porzione dello spettro da 5,5 a 10 ppm. Tra i metaboliti con peso positivo possiamo distinguere l'arginina (6.70, 7.26 ppm), l'istidina (7.40, 8.66 ppm) e l'acido formico (8.38 ppm). Tra quelli invece caratterizzati da peso negativo possiamo riscontrare l'acido shikimico (6.81 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm) e la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm).

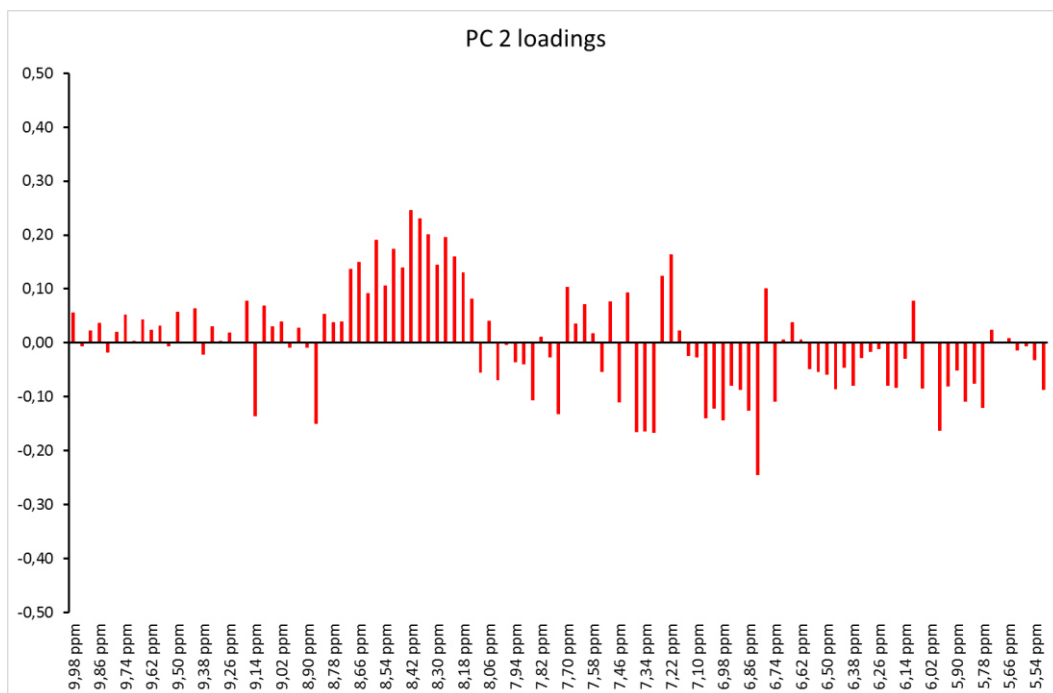


Figura 4.52 Grafico dei pesi su PC 2 riguardante la porzione spettrale da 5,5 a 10 ppm.

Analisi dei risultati ottenuti sui vini bianchi

Anche per i vini bianchi la spettroscopia NMR e l'analisi statistica PCA sono state in grado di separare i vini in base all'annata di produzione. Per i vini bianchi la zona più informativa dello spettro NMR si è mostrata essere quella tra 0.5 e 5 ppm. Questi vini infatti sono più poveri di quelli rossi di metaboliti secondari. Le differenze nella varianza spiegata dalle prime due componenti principali per il Cortese (circa 91 %) e lo Chardonnay (circa 68%) indica che per il Cortese ci sono differenze più marcate per i vini prodotti nelle tre diverse annate. Anche in questo caso le differenze osservate tra i vini possono essere ricondotte a fattori climatici e/o diverse procedure di vinificazione.

Dal confronto dei grafici dei pesi di PC 1 e PC 2 nei diversi casi è stato possibile indicare i principali metaboliti responsabili delle differenze tra i campioni.

4.3.6 Analisi 1H NMR per la valutazione degli effetti dovuti all'invecchiamento.

In questa parte del lavoro si è voluto valutare se la spettroscopia NMR fosse in grado di rilevare i cambiamenti che avvengono nel vino con il tempo. A questo scopo si sono analizzati i due vini rossi ed i due vini bianchi prodotti nella vendemmia del 2012 subito dopo l'imbottigliamento (analisi 2013) e dopo un periodo di conservazione di 12 (analisi 2014) e 24 (analisi 2015) mesi. La conservazione dei campioni è stata fatta in apposito frigorifero a 12 °C ed al riparo dalla luce.

Vino Barbera.

L'immagine 4.53 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2, che spiegano il 75,9% della varianza, prendendo in considerazione l'intera zona spettrale da 0,5 a 10 ppm. Dal grafico delle proiezioni si nota come i campioni siano meno raggruppati in confronto alle analisi precedenti. E' possibile osservare come le prime due PC siano in grado di separare, anche se in maniera poco marcata, i vari campioni con diversi periodi di conservazione. Su PC 1 si può evidenziare che i campioni analizzati nel 2015 si riscontrino, più chiaramente, a valori negativi, mentre per i campioni analizzati nel 2013 e nel 2014 non è possibile fare una netta distinzione. Anche su PC 2 i raggruppamenti risultano essere poco differenziati anche se è possibile osservare come questa riesca a separare, i campioni di vino analizzati nel 2014, che si riscontrano a valori negativi, da quelli del 2013 e 2015 che si riscontrano a valori positivi.

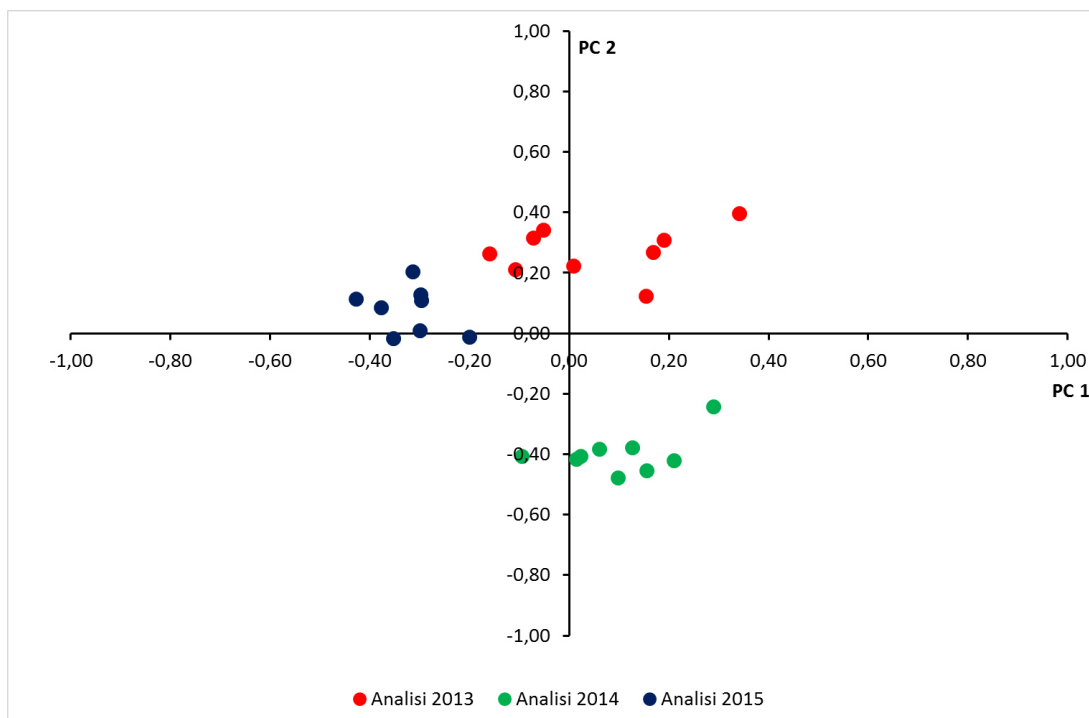


Figura 4.53 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 su spettro intero (0,5 a 10 ppm)

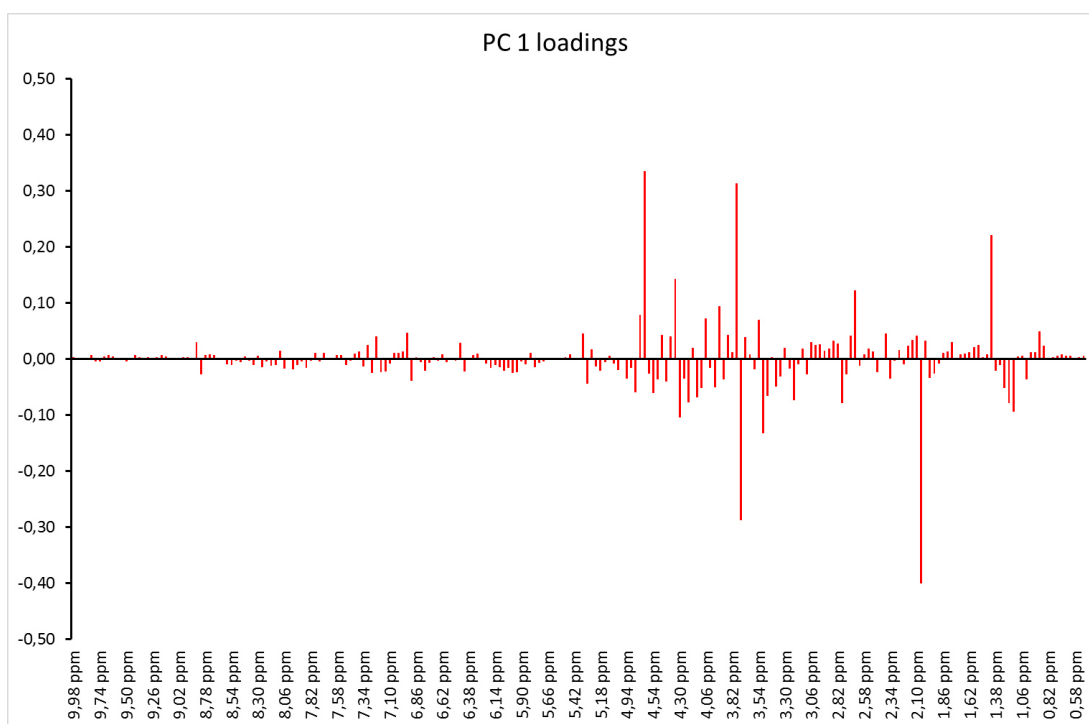


Figura 4.54 Grafico dei pesi relativi a PC1 su porzione spettrale da 0,5 a 10 ppm.

L'immagine 4.54 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1, nella zona spettrale tra 0,5 a 10 ppm. Tra questi possiamo riscontrare, con peso positivo l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo, invece, evidenziare l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm) e l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm).

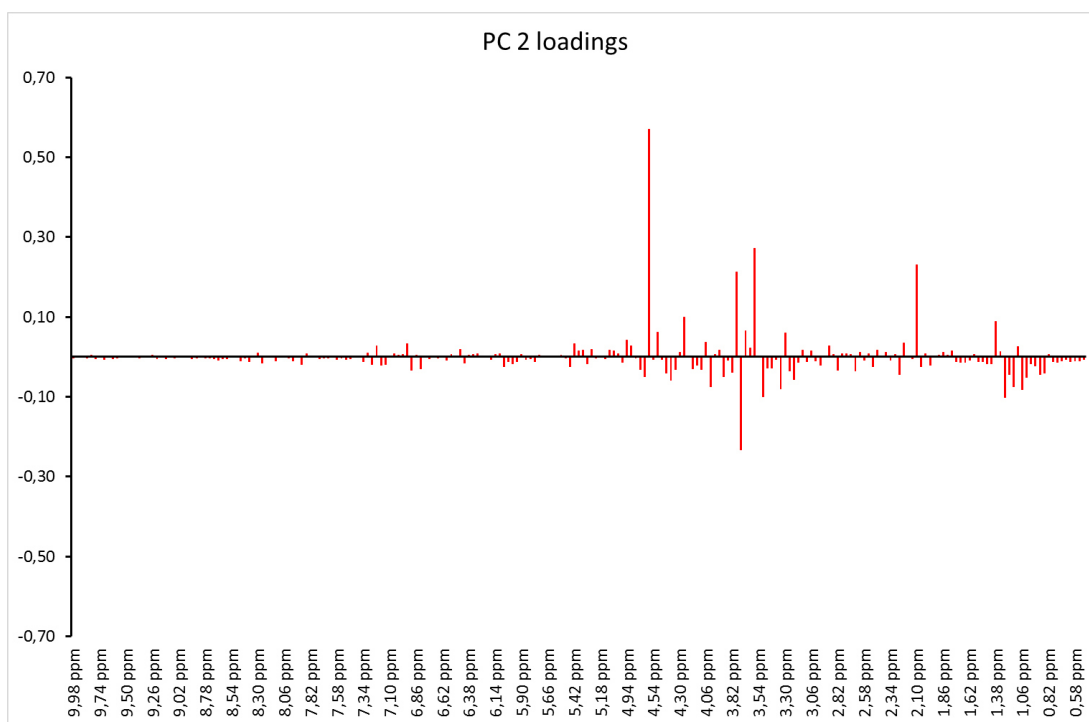


Figura 4.55 Grafico dei pesi su PC 2 relativa alla zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

L'immagine 4.55 riporta i pesi su PC 2 riguardanti la zona spettrale tra 0,5 e 10 ppm. Tra i metaboliti più influenti con peso positivo possiamo osservare l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm). Il metabolita con peso negativo è l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm).

La figura 4.56 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2, che spiegano il 70,1 % della varianza, prendendo in considerazione la zona spettrale da 0,5 a 5 ppm. Anche in questa circostanza è possibile osservare come la PC 1 e la PC 2 siano in grado di separare, seppure in maniera poco marcata, i vari campioni appartenenti ai diversi periodi di analisi. La PC 1, infatti, è in grado di separare i campioni delle analisi 2013-2015 che si trovano a valori negativi, dai campioni analizzati nel 2014 che si trovano a valori positivi. Tuttavia, dall'osservazione del grafico è possibile evincere che i campioni del 2013 abbiano un raggruppamento più disperso. Anche su PC 2 i raggruppamenti risultano essere poco separati. Seppur con minime differenze, la PC 2 separa i campioni analizzati nel 2013 da quelli analizzati nel 2015.

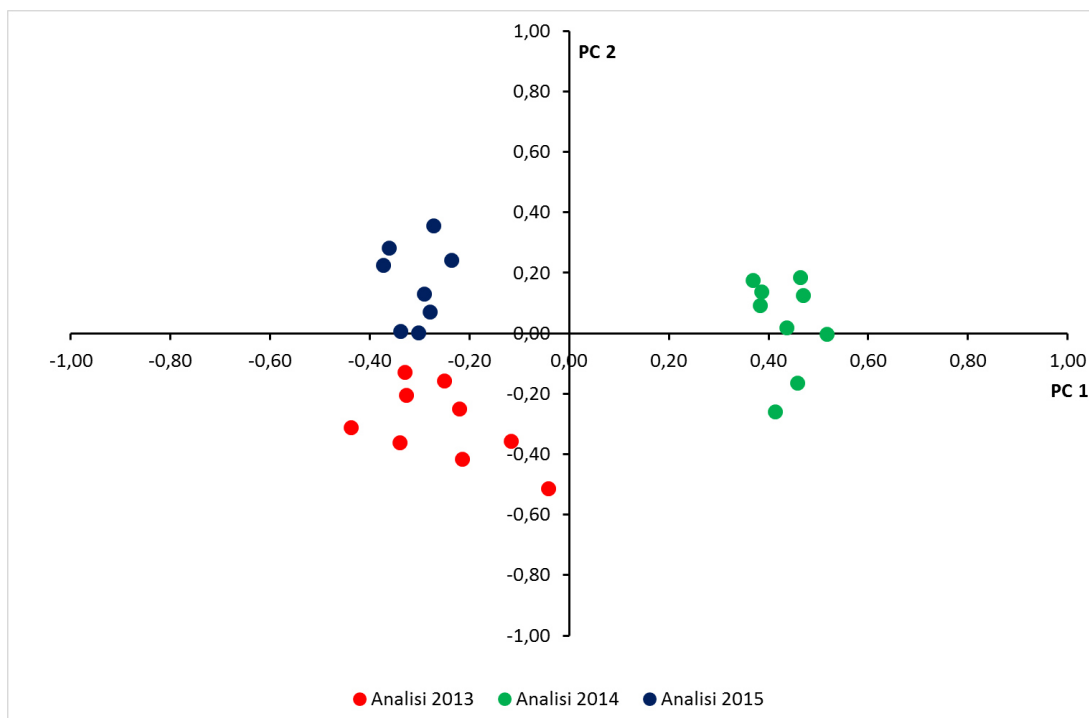


Figura 4.56 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm.

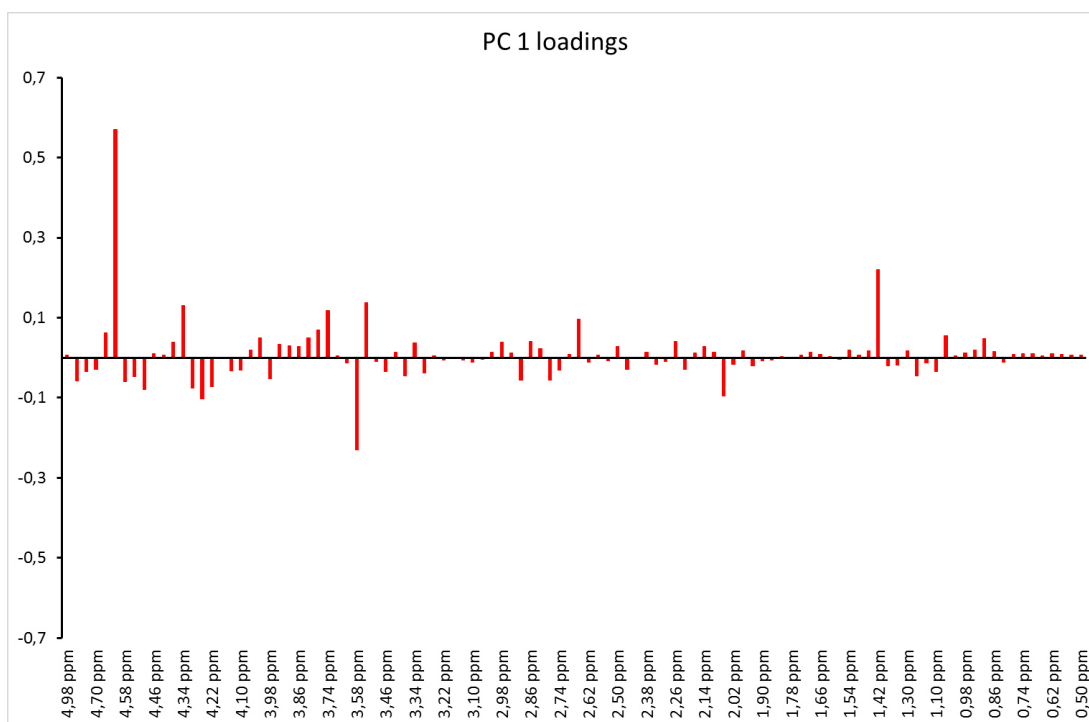


Figura 4.57 Grafico dei pesi su PC 1 riguardante la zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

L'immagine 4.57 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1, nella zona spettrale tra 0,5 a 5 ppm. Tra questi, con peso positivo, possiamo riscontrare l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo osservare l'acido acetico (2.06 ppm) e il glicerolo (3.54, 3.77 ppm).

L'immagine 4.58 riporta i pesi su PC 2 riguardante la zona spettrale tra 0,5 e 10 ppm. Tra i metaboliti più influenti con peso positivo possiamo osservare l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm) e l'acido acetico (2.06 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo, invece, osservare il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm).

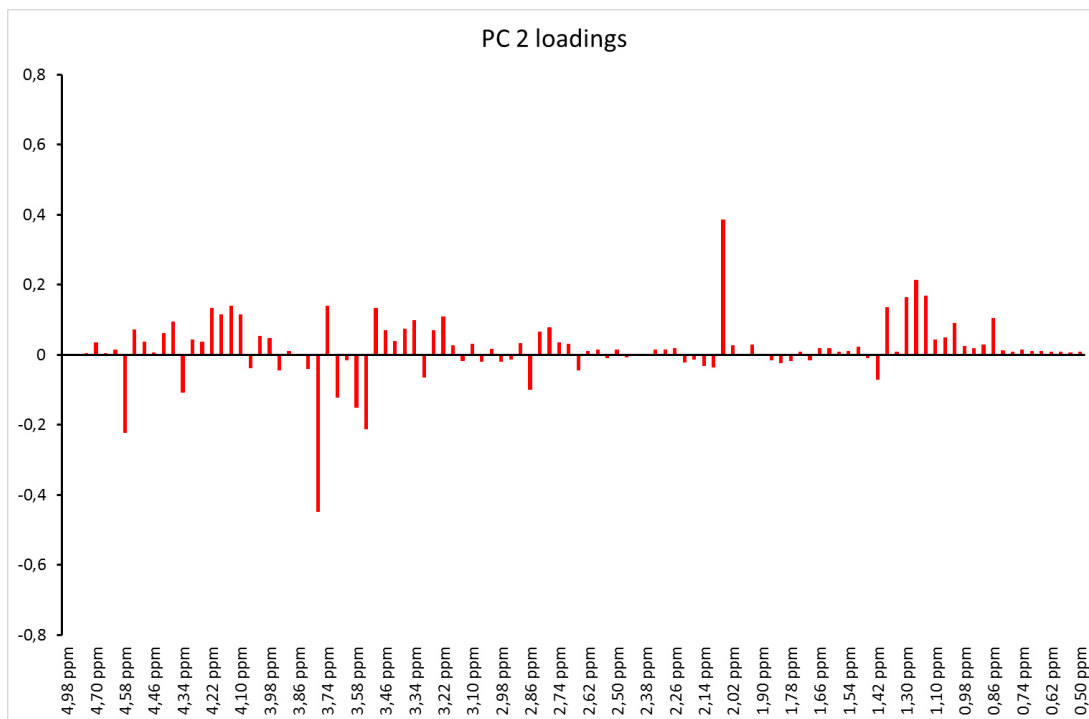


Figura 4.58 Grafico dei pesi su PC 2 riguardante la zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

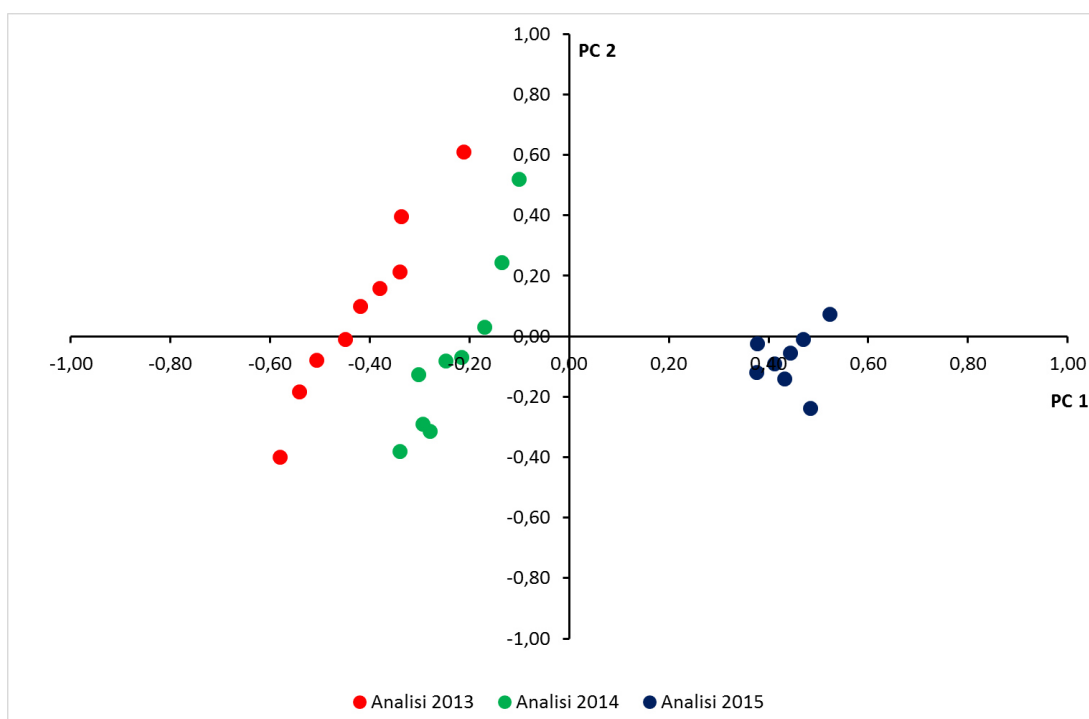


Figura 4.59 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 su porzione spettrale da 5 a 10 ppm.

La figura 4.59 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 ottenute prendendo in considerazione la zona spettrale da 5 a 10 ppm. E' possibile osservare come la PC 1, che spiega il 55 % della varianza, sia in grado di separare i vari campioni in base alla loro età. La posizione dei campioni lungo la PC 1 è proporzionale, infatti, alla durata del periodo di conservazione. I campioni analizzati nel 2013 si trovano all'estremo negativo di PC 1 mentre i campioni analizzati nel 2015 si trovano a valori positivi.

La PC 2 non è in grado di separare i gruppi di campioni tra loro. I raggruppamenti dei campioni appartenenti ai tre diversi periodi di analisi risultano "allungati" nella direzione di PC 2. Questo è particolarmente evidente per i campioni delle analisi 2013 e 2014. Una possibile spiegazione di questo fenomeno può trovarsi considerando la variabilità intrinseca al metodo di analisi. La PC 2, cioè, sembra spiegare l'errore nella misura, evidenziando differenze tra le diverse repliche dell'analisi, piuttosto che reali diversità tra i campioni.

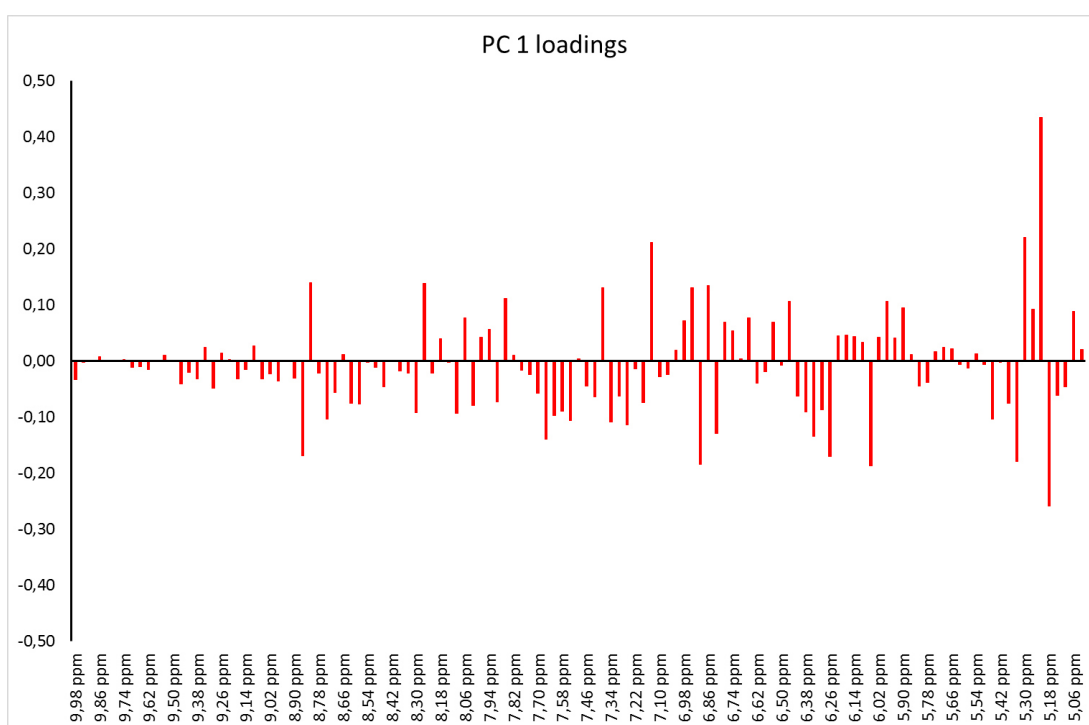


Figura 4.60 Grafico dei pesi su PC 1 nella zona spettrale da 5 a 10 ppm.

L'immagine 4.60 riporta i pesi dei principali metaboliti con peso positivo su PC 1, nella zona spettrale tra 5 a 10 ppm. Tra questi possiamo riscontrare l'arabinosio (5.21, ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'acido salicilico (6.67, 7.50, 7.86 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm) e la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo, invece, evidenziare lo xilosio (5.17 ppm), il *trans*-resveratrolo (6.31, 6.93, 7.15, 7.50 ppm) e l'acido shikimico (6.81 ppm).

Vino Dolcetto.

In figura 4.61 è riportato il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2, considerando la zona spettrale da 0,5 a 10 ppm. Le prime due componenti principali sono in grado di spiegare il 68,0 % della varianza. Anche in questo caso la separazione effettuata su PC 1 e PC 2 risulta essere poco marcata. I campioni dei diversi periodi di analisi sono dispersi e si può notare una parziale sovrapposizione dei gruppi. E' possibile osservare come la PC 1 sia in grado di

separare i campioni di vino Dolcetto delle analisi 2013-2015 che si riscontrano a valori negativi dai campioni di vino analizzati nel 2014 che si trovano a valori positivi. Per quanto riguarda invece la separazione effettuata su PC 2 possiamo osservare come, seppur sia presente una notevole dispersione dei campioni, vi sia una grossolana separazione tra i campioni analizzati nel 2013 e quelli analizzati nel 2015.

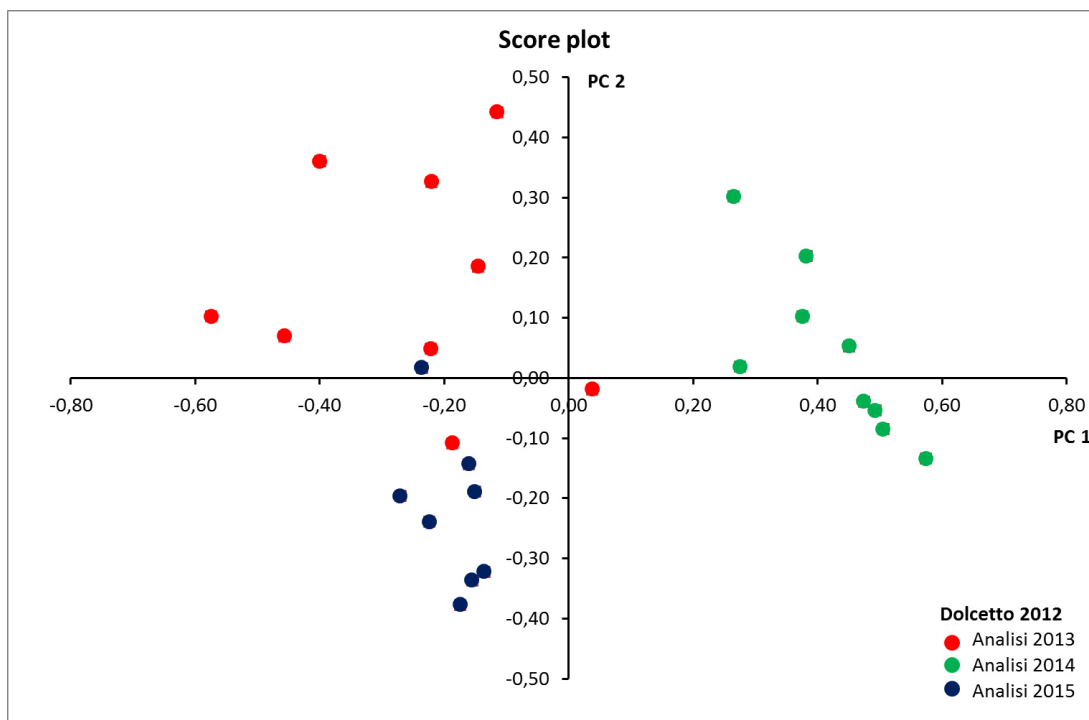


Figura 4.61 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 considerando lo spettro intero (0,5 a 10 ppm)

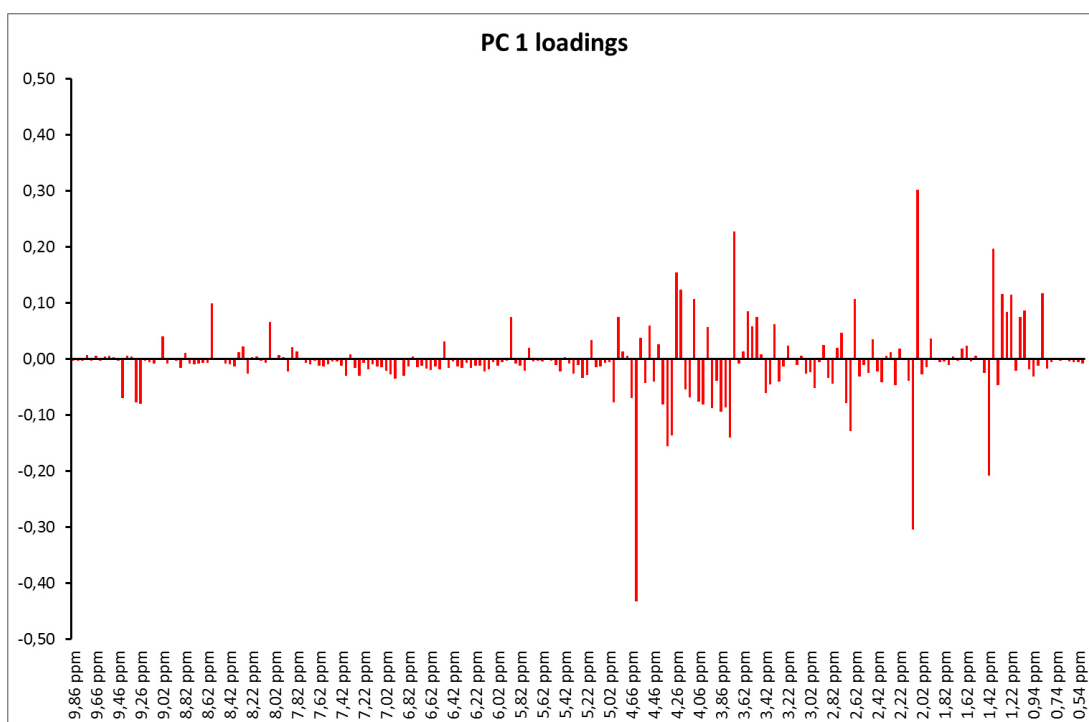


Figura 4.62 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro intero

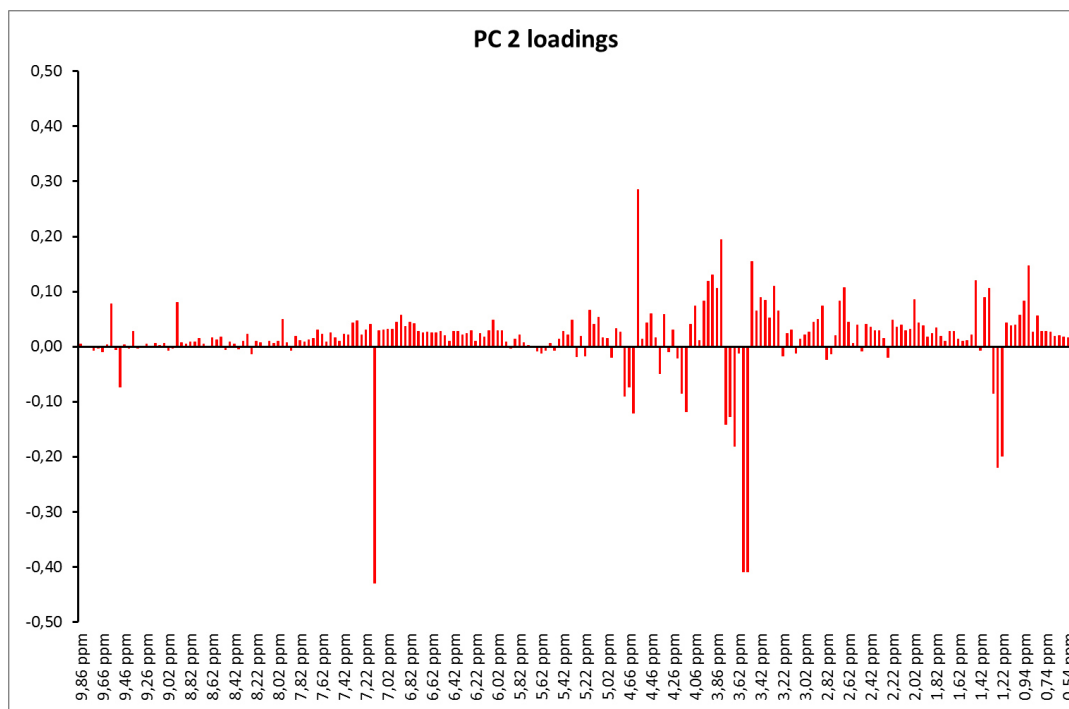


Figura 4.63 Grafico dei pesi per PC 2 considerando l'intero spettro.

L'immagine 4.62 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1, nella zona spettrale tra 0,5 a 10 ppm. Tra questi possiamo riscontrare l'isopentanololo (0.88 ppm), l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), l'etil-lattato (1.39, 4.21 ppm) e l'acido succinico (2.65 ppm) con peso positivo. Tra i metaboliti con peso negativo possiamo, invece, evidenziare l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm).

L'immagine 4.63 riporta i pesi dei principali metaboliti con peso positivo su PC 2, nella zona spettrale tra 0,5 a 10 ppm. Tra questi possiamo riscontrare l'isopentanololo (0.88 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo, invece, evidenziare l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e l'acido gallico (7.15 ppm).

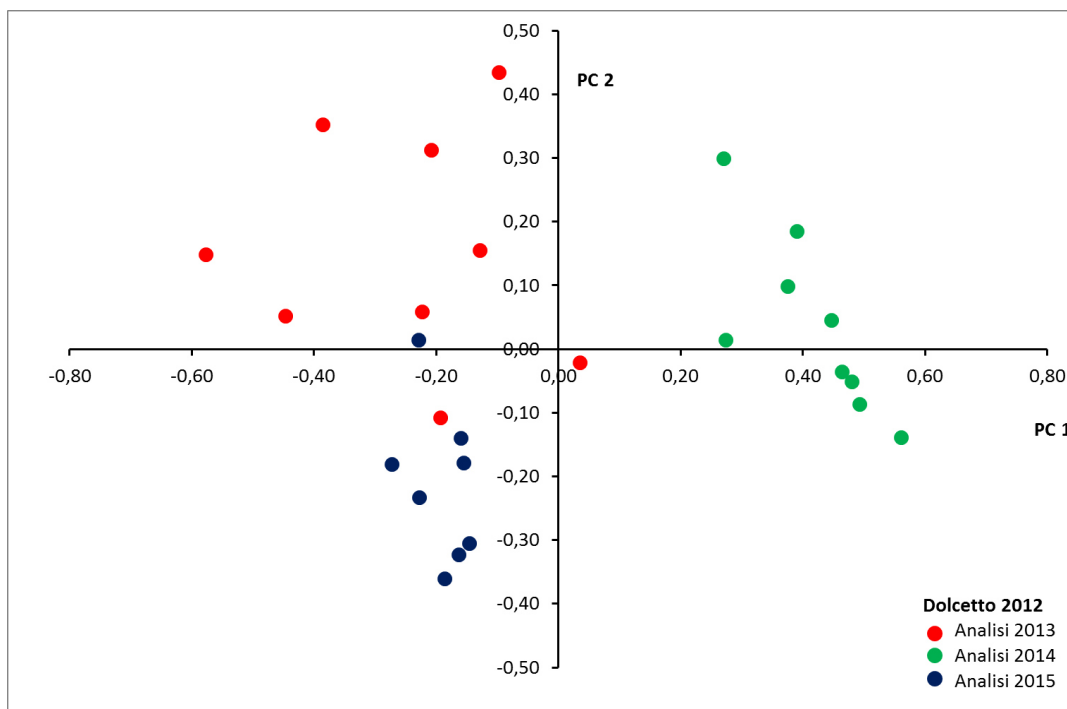


Figura 4.64 Grafico delle proiezioni per PC 1 e PC 2 relativo alla porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm.

La figura 4.64 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 dei dati ottenuti analizzando la zona spettrale da 0.5 a 5 ppm. Dal grafico si può osservare che la distribuzione dei campioni sia analoga a quella già descritta per l'intero intervallo spettrale.

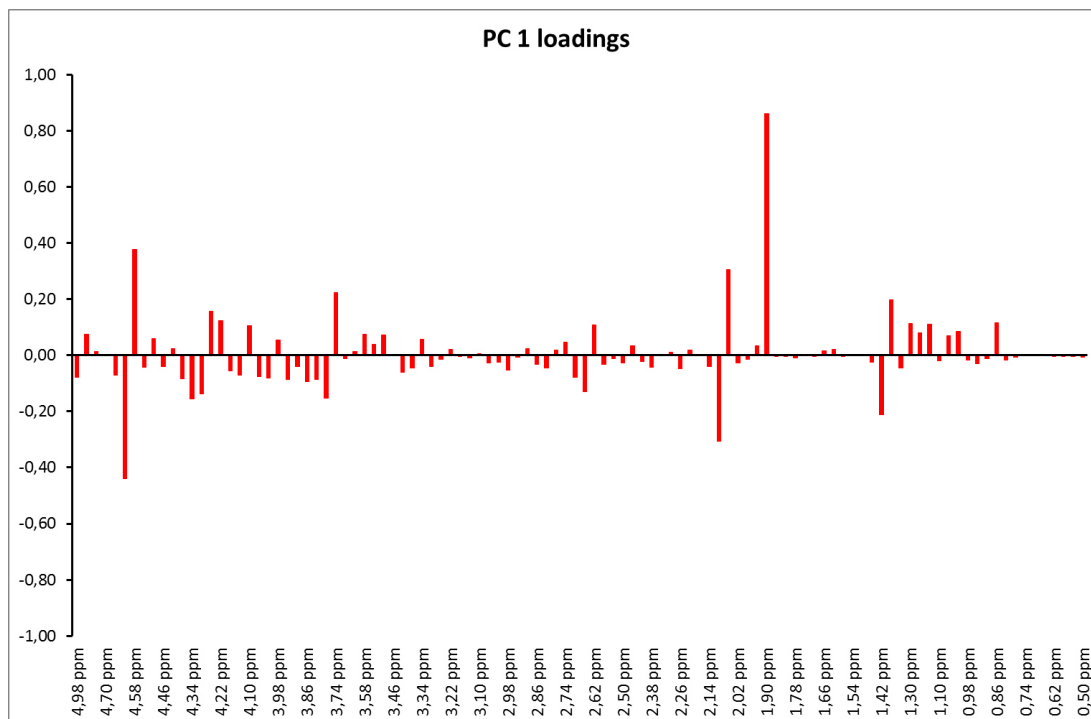


Figura 4.65 Grafico dei pesi per PC 1 riguardante la porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm

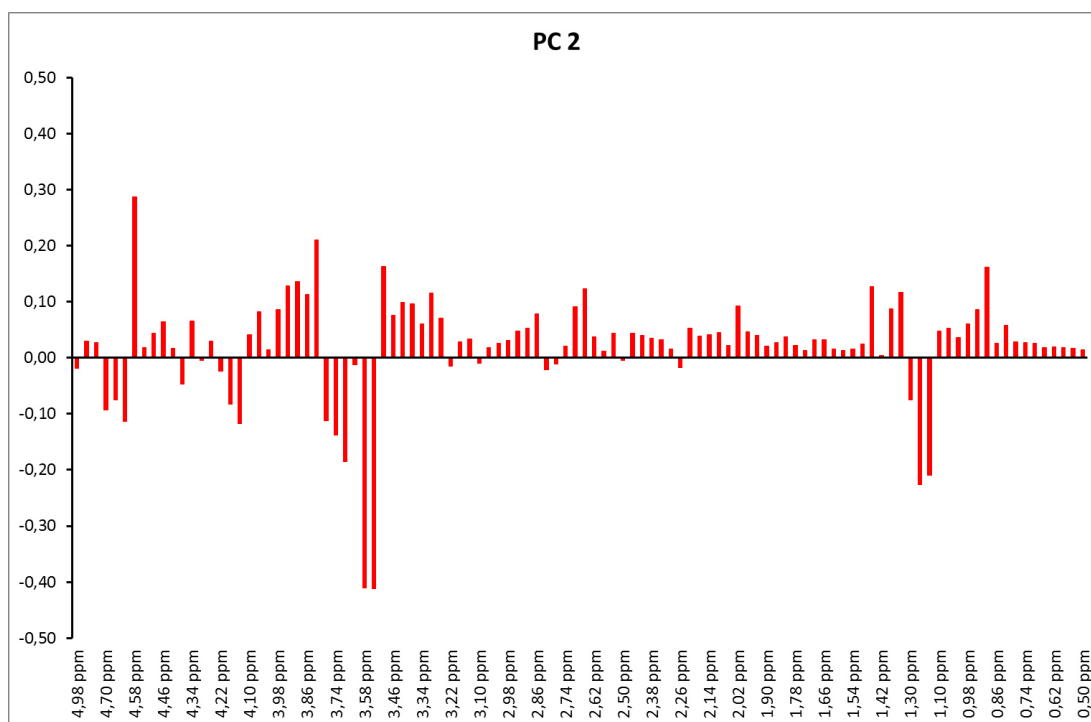


Figura 4.66 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

La figura 4.65 e riporta i pesi dei principali metaboliti nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. Osservando il grafico è possibile affermare che i metaboliti siano, sia nei pesi positivi che negativi, gli stessi riscontrati nel grafico dei pesi per PC 1 nello spettro intero (0,5 a 10 ppm). La figura 4.66 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 2 nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. Tra i metaboliti maggiormente influenti, con peso positivo, possiamo osservare l'isopentanololo (0.88 ppm), la treonina (1.32 ppm), l'alanina (1.49, 3.86 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm). Mentre tra i metaboliti maggiormente caratterizzanti, con peso negativo possiamo riscontrare l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm) e il glicerolo (3.54, 3.77 ppm).

La figura 4.67 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 dei dati ottenuti analizzando la zona spettrale da 5 a 10 ppm. Le prime due componenti principali spiegano il 50,4% della varianza. Dal grafico si può osservare che PC 1 separa in maniera netta i campioni analizzati nel 2015 da quelli analizzati nel 2013 e 2014. Sebbene con minor efficacia, anche i campioni analizzati nel 2014 e nel 2013 si separano lungo la PC 1. La PC 1, quindi, potrebbe essere indicata come in grado di separare i campioni in funzione del periodo di invecchiamento. La PC 2 separa i campioni analizzati nel 2013 da quelli analizzati nel 2014.

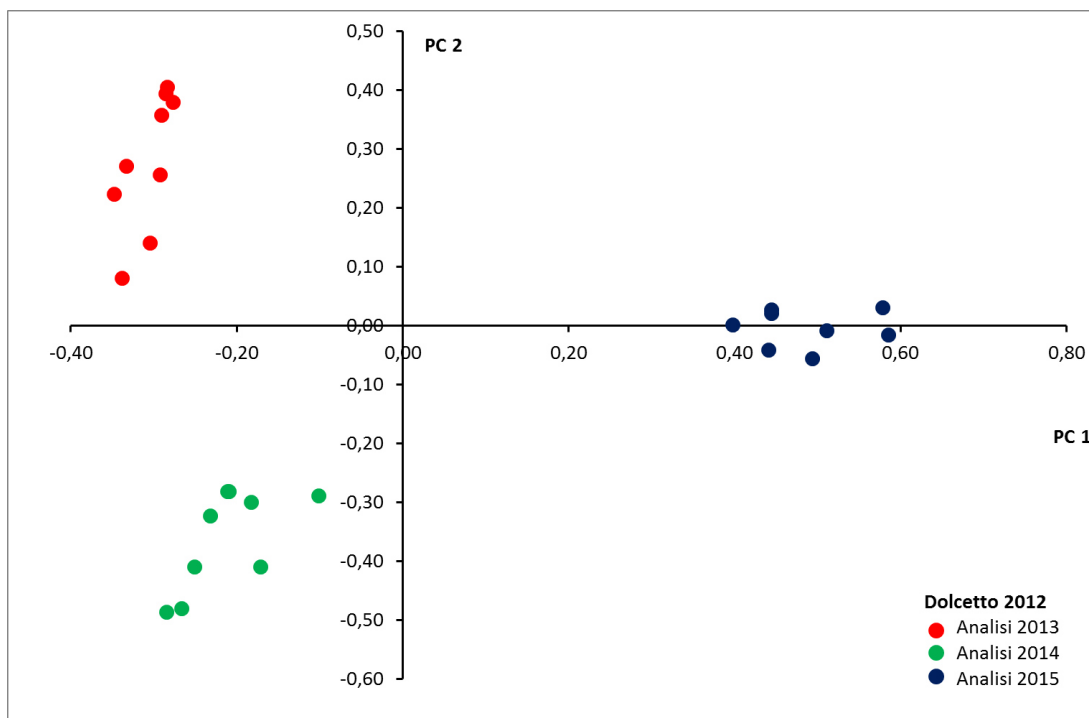


Figura 4.67 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la zona spettrale da 5 a 10 ppm.

La figura 4.68 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1 nella zona spettrale da 5 a 10 ppm. Tra i metaboliti con peso positivo si possono evidenziare l'arabinosio (5.21 ppm) e l'acido gallico (7.15 ppm). Mentre tra i metaboliti con peso negativo riscontriamo l'(+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm) e il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm).

L'immagine 4.69 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 2 nella zona spettrale da 5 a 10 ppm. Tra i metaboliti con peso positivo riscontriamo l'arabinosio (5.21 ppm), l'(+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), l'acido siringico (7.38 ppm) ed il furfurale (7.57, 7.91, 9.49 ppm). Tra quelli con peso negativo osserviamo l'acido gallico (7.15 ppm) e il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm).

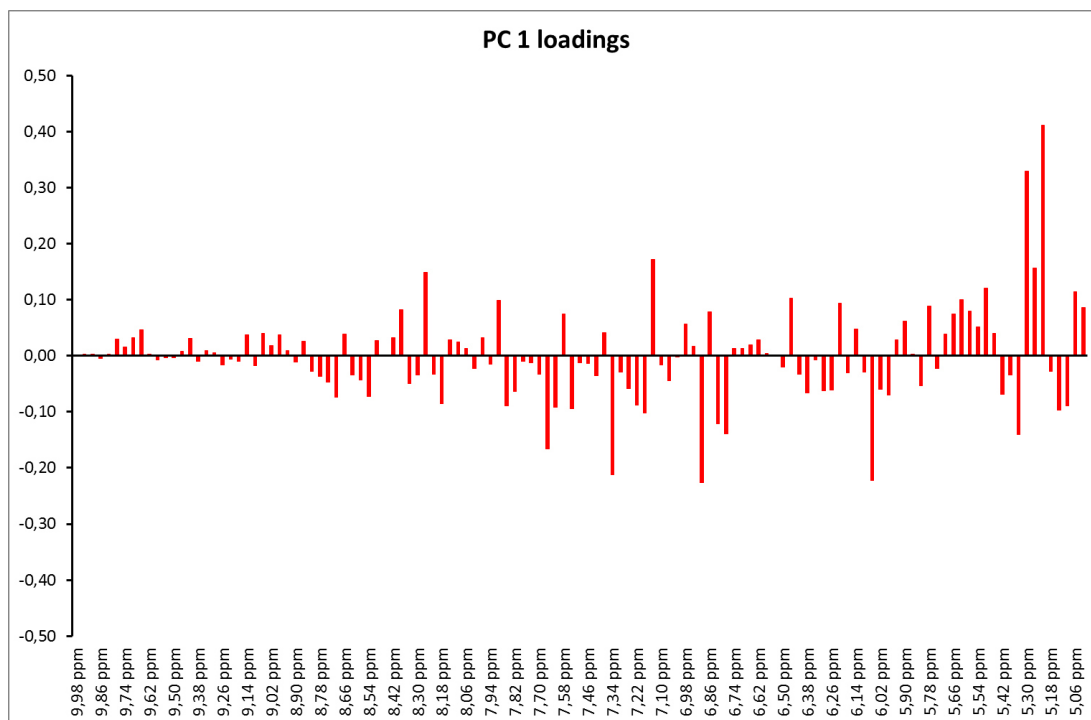


Figura 4.68 Grafico dei pesi per PC 1 su zona spettrale da 5 a 10 ppm.

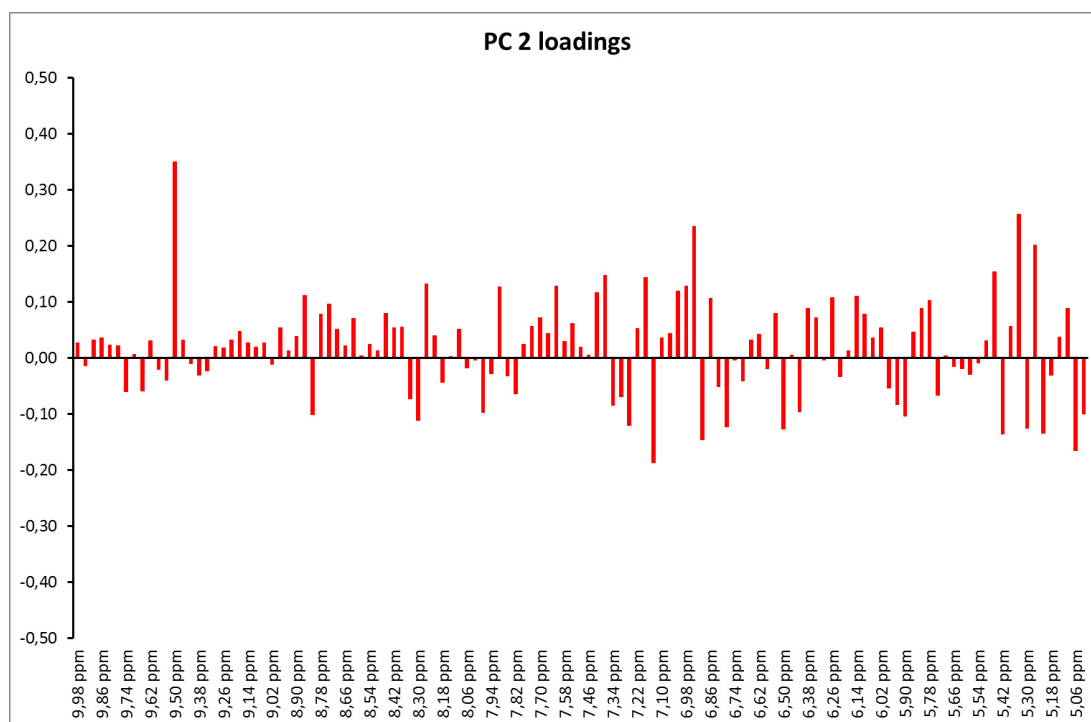


Figura 4.69 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 5 a 10 ppm.

Analisi dei risultati ottenuti sui vini rossi.

L'analisi dei dati NMR ottenuti sui vini rossi con diverso periodo di conservazione ha dimostrato che, sebbene con difficoltà, sia possibile rilevare differenze tra i campioni. Le analisi condotte su spettro intero e sulla zona spettrale compresa tra 0.5 e 5 ppm hanno dato risultati non sempre ottimali. I dati ottenuti nell'intervallo spettrale da 5 a 10 ppm hanno permesso di ottenere una migliore separazione dei campioni. Anche in questo caso, questa

porzione dello spettro ^1H NMR, in cui cadono i segnali dei metaboliti secondari, si è dimostrata la più ricca di informazioni utili alla separazione dei campioni.

I risultati non sempre pienamente soddisfacenti ottenuti in questa parte del lavoro sono in parte riconducibili alle condizioni di stoccaggio dei campioni durante il periodo di conservazione (12°C , al riparo dalla luce). In queste condizioni l'invecchiamento dei vini è molto rallentato. Per cui, anche dopo 24 mesi, le differenze tra i campioni sono molto piccole.

Vino Cortese.

La figura 4.70 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 ottenute considerando la zona spettrale da 0,5 a 10 ppm. Le prime due componenti principali spiegano il 61,3 % della varianza. La PC 1 separa i vini analizzati nel 2014, a valori negativi, da quelli analizzati nel 2013 e 2015, a valori positivi. La PC 2, invece, separa le serie di analisi del 2013 da quelle del 2015.

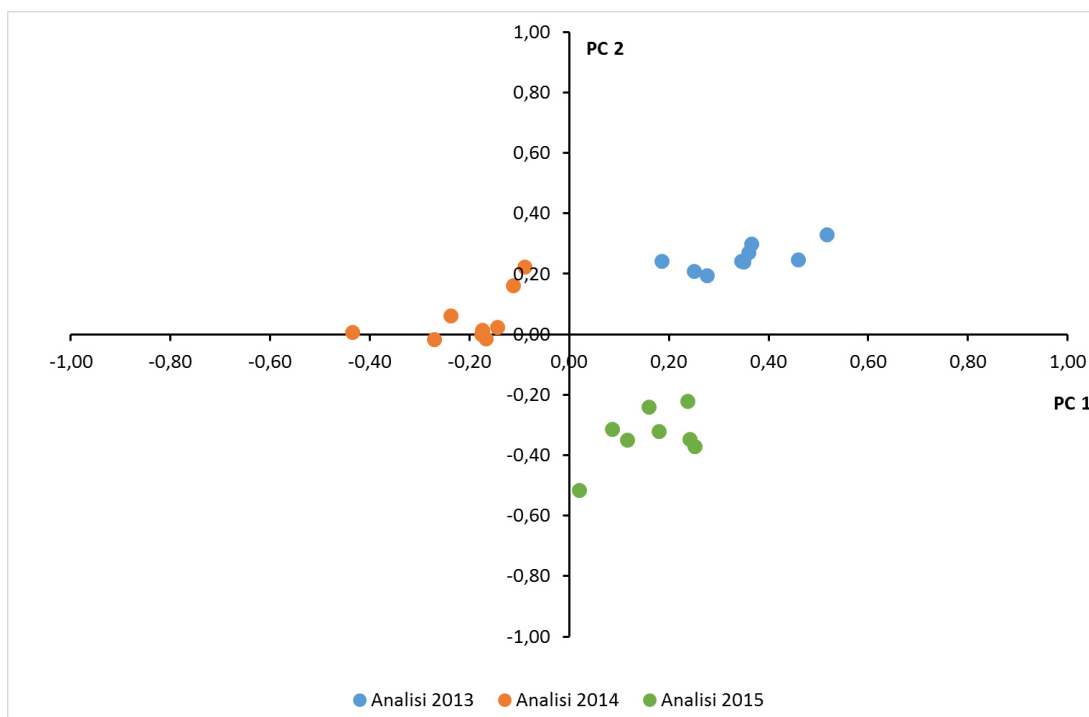


Figura 4.70 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.71 riporta i principali metaboliti per PC 1 nella porzione spettrale da 0,5 a 10 ppm. Tra i metaboliti più importanti con peso positivo possiamo osservare l'isopentanololo (0,88 ppm), l'acido acetico (2,06 ppm), l'acido succinico (2,65 ppm), l'acido citrico (2,81, 2,95 ppm), il glicerolo (3,54, 3,77 ppm), il fruttosio (3,80, 4,10 ppm) e l'acido shikimico (6,81 ppm). Tra i metaboliti principali con peso negativo emergono l'etanolo (1,04, 1,29, 3,50, 3,77 ppm) e l'acido fumarico (6,67 ppm).

La figura 4.72 riporta i principali metaboliti per PC 2 nella porzione spettrale da 0,5 a 10 ppm. Tra i metaboliti più importanti con peso positivo possiamo osservare l'acido malico (2,79, 2,89 ppm), il glicerolo (3,54, 3,77 ppm), l'acido tartarico (4,60 ppm) e l'acido shikimico (6,81

ppm). Tra i metaboliti principali con peso negativo emergono l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm), l'arabinosio (da 3.85 a 4.00, 4.49, 5.21 ppm) e l'acido fumarico (6.76 ppm).

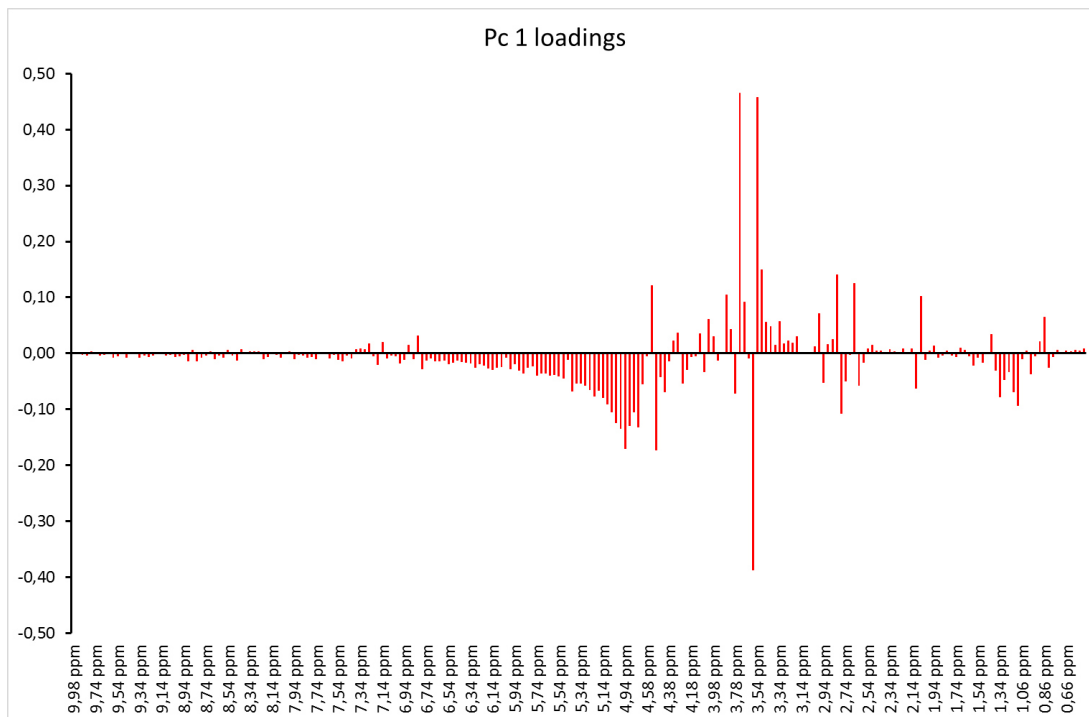


Figura 4.71 Grafico dei pesi per PC 1 su zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

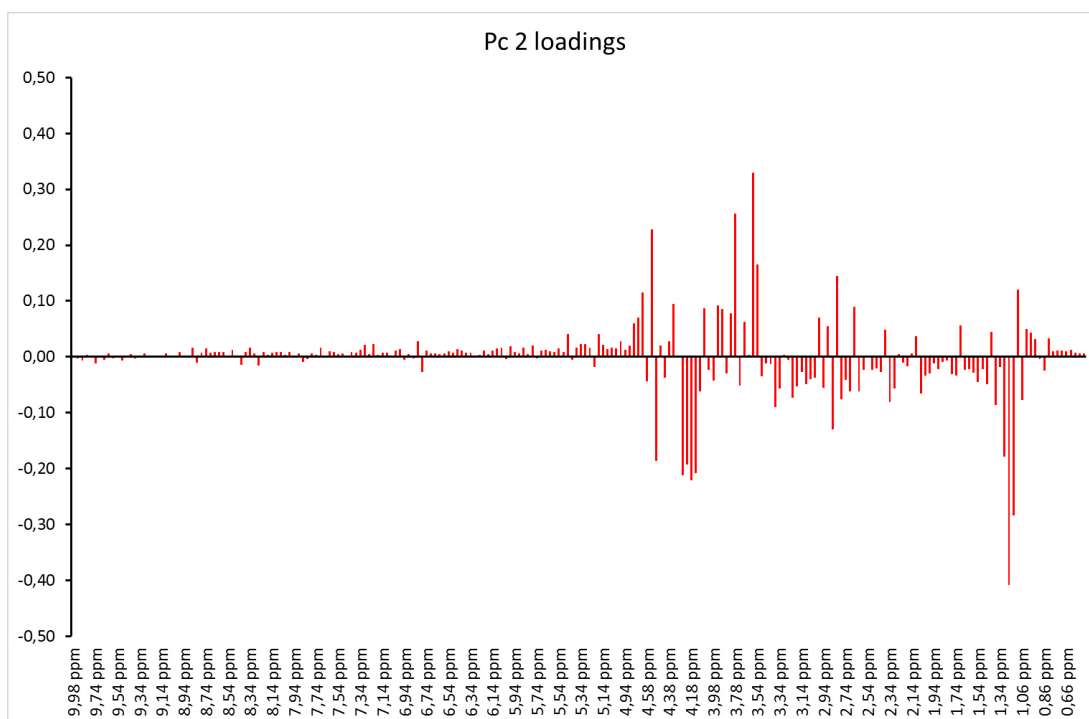


Figura 4.72 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.73 riporta il grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 ottenute considerando la zona spettrale da 0.5 a 5 ppm. Le prime due componenti principali spiegano il 63.2 % della varianza. La PC 1 separa i vini a seconda del periodo di invecchiamento. A valori negativi abbiamo i vini analizzati nel 2013, intorno allo zero quelli analizzati nel 2014, ed a valori positivi quelli analizzati nel 2015. La PC 2 evidenzia un'ulteriore differenza, seppur lieve, tra le serie di analisi del 2014 da quelle del 2013 e 2015.

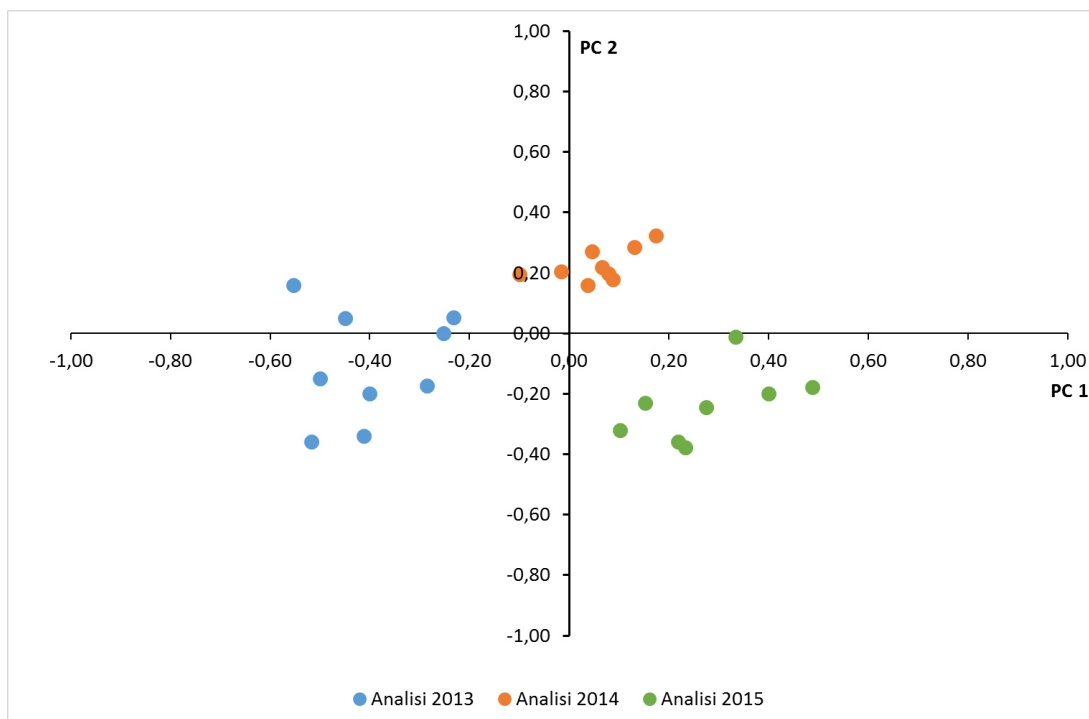


Figura 4.73 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

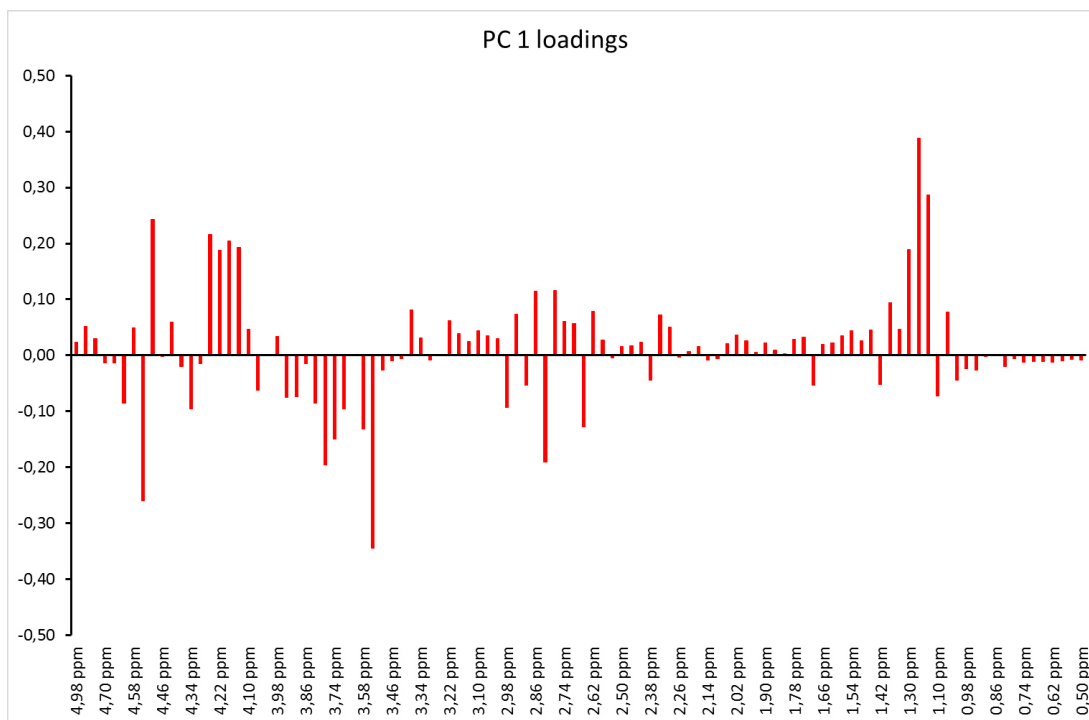


Figura 4.74 Grafico dei pesi per PC 1 su zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

La figura 4.74 riporta i pesi dei metaboliti maggiormente influenti, su PC 1, nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. Tra i metaboliti più importanti caratterizzati da pesi positivi possiamo notare l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm) e l'acido citrico (2.81, 2.95 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo osservare l'acido succinico (2.65, ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e l'acido tartarico (4.60 ppm).

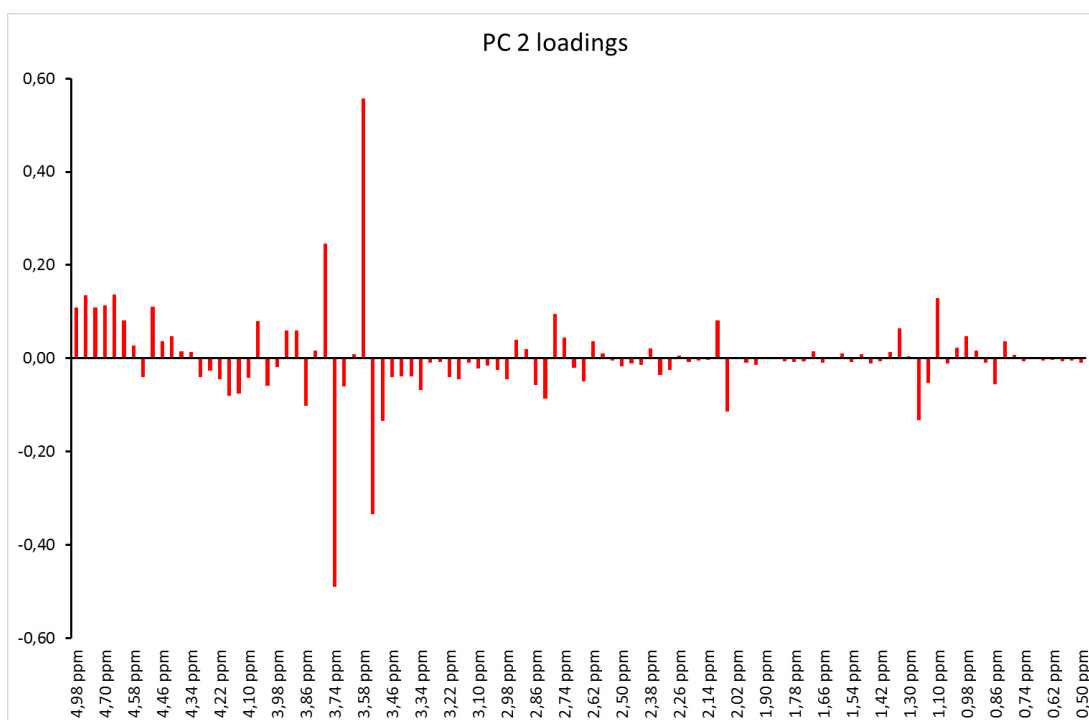


Figura 4.75 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

La figura 4.75 mostra i pesi dei metaboliti maggiormente influenti, su PC 2, nella porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. Tra i metaboliti più importanti caratterizzati da pesi positivi possiamo notare soltanto l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm). Tra i metaboliti con peso negativo possiamo osservare l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm) e il glicerolo (3.54, 3.77 ppm).

La figura 4.76 riporta il grafico delle proiezioni sulle prime due componenti principali che insieme spiegano il 59,3 % della varianza. Le singole repliche delle misure risultano meno raggruppate dei due casi precedenti. Seppure con una maggior incertezza, anche in questo caso i campioni si dispongono lungo la PC 1 in modo proporzionale al periodo di conservazione. La separazione dei campioni lungo la PC 2 non è molto netta. Si può osservare che i campioni analizzati nel 2013 sono gli unici ad avere tutti proiezione positiva lungo questa PC.

La figura 4.77 indica i pesi dei metaboliti maggiormente influenti, su PC 1, nella porzione spettrale da 5 a 10 ppm. Tra i metaboliti con peso positivo possiamo osservare l'arabinosio (5.21 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm) e il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), mentre l'unico metabolita con peso negativo maggiormente riscontrato è stato l'acido sorbico (5.82, 6.31 ppm).

La figura 4.78 indica i pesi dei metaboliti maggiormente influenti, su PC 2, nella porzione spettrale da 5 a 10 ppm. Tra i metaboliti con peso positivo è possibile osservare l'acido shikimico (6.81 ppm) e l'acido gallico (7.15 ppm), mentre tra quelli con peso negativo è possibile evidenziare l'arabinosio (5.21 ppm) il saccarosio (5.39 ppm) e l'acido fumarico (6.76 ppm).

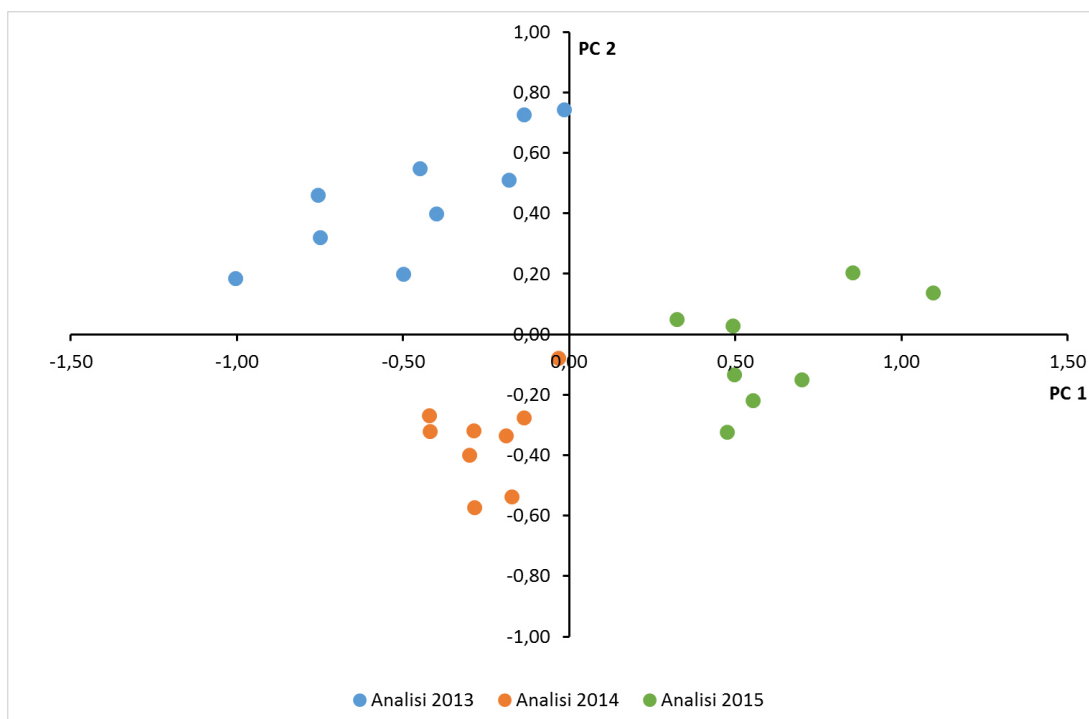


Figura 4.76 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la zona spettrale da 5 a 10 ppm.

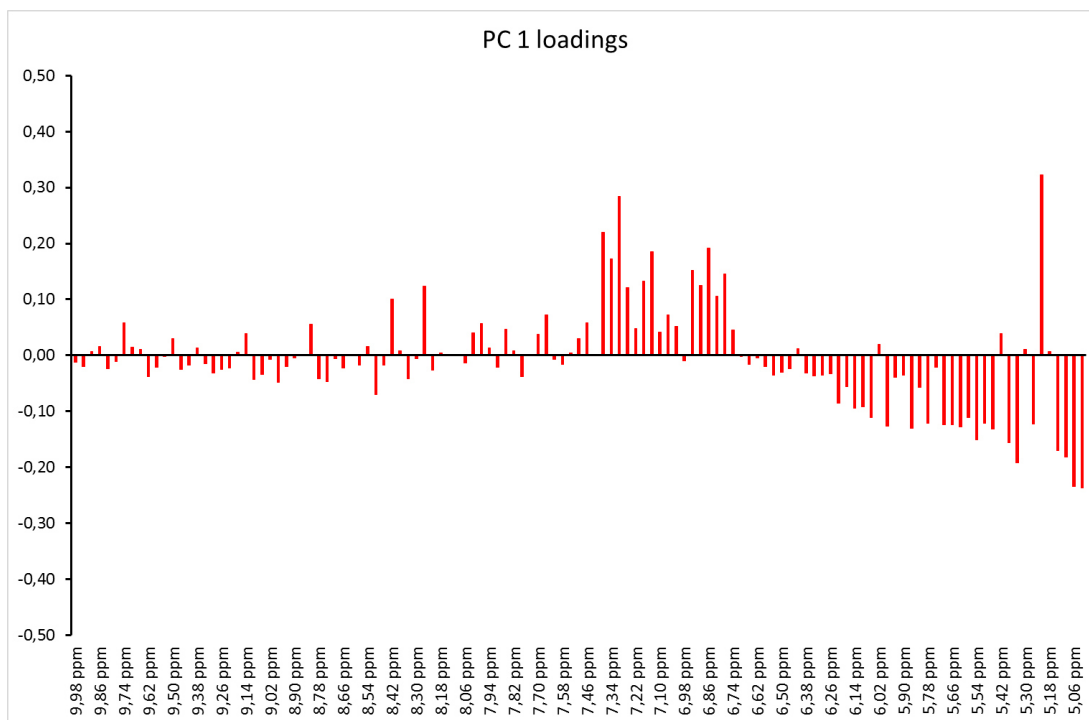


Figura 4.77 Grafico dei pesi per PC 1 su zona spettrale da 5 a 10 ppm.

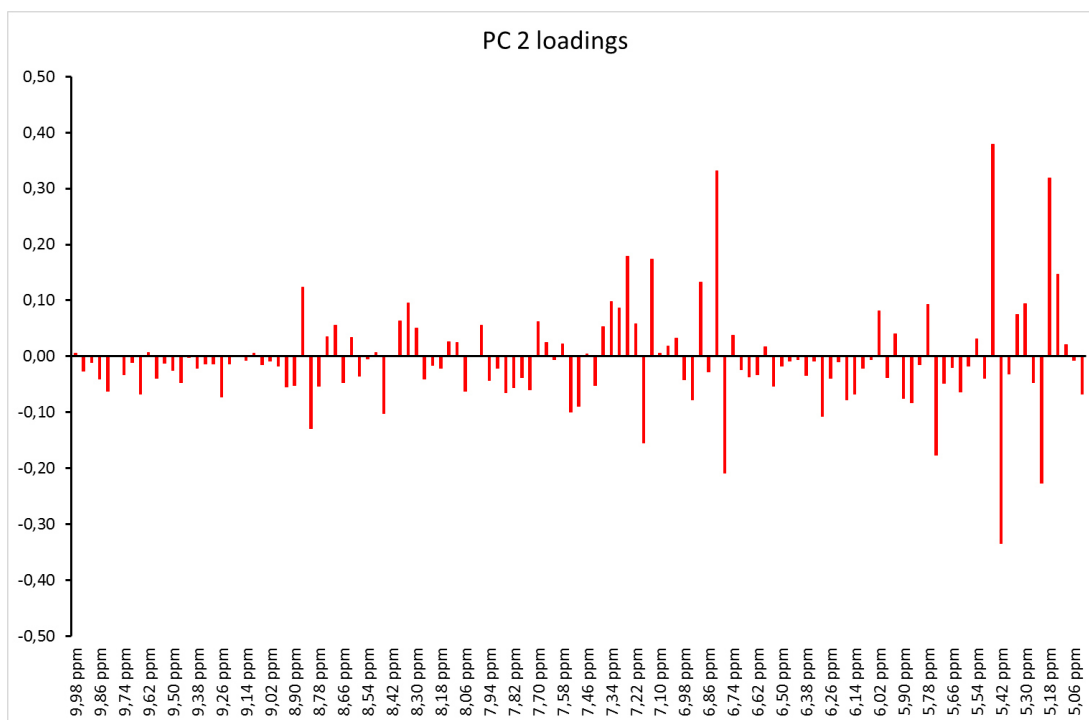


Figura 4.78 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 5 a 10 ppm.

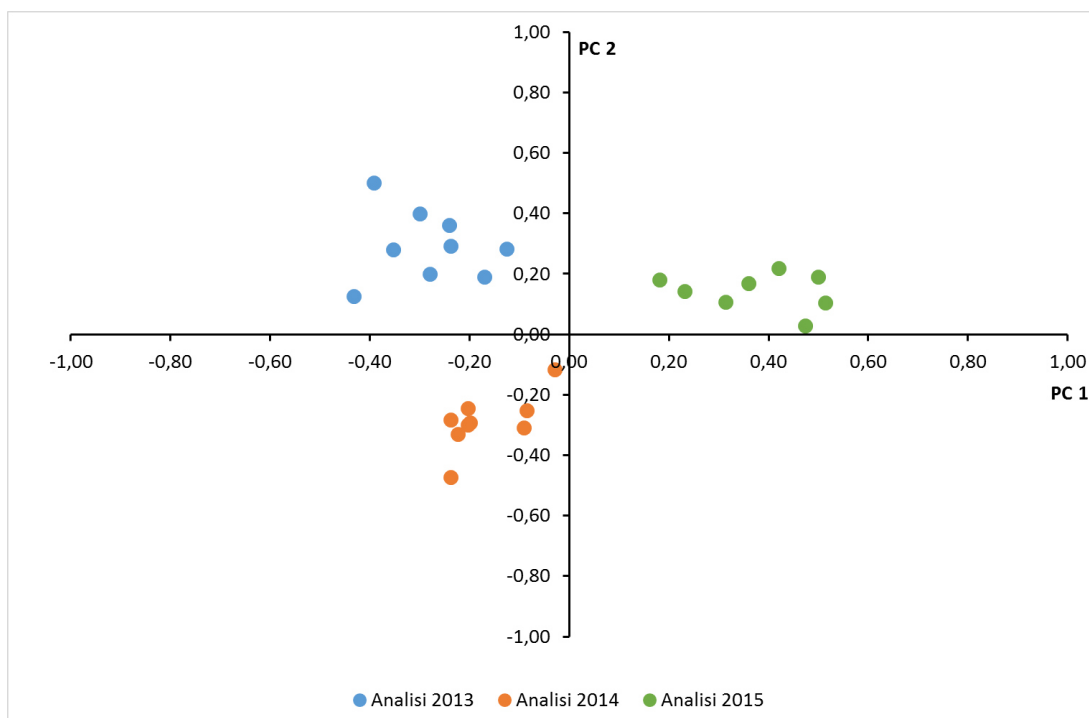
Vino Chardonnay

Figura 4.79 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

Il grafico 4.79 riporta le proiezioni su PC 1 e PC 2 nella zona dello spettro da 0,5 a 10 ppm. In questa circostanza le prime due componenti principali sono in grado di spiegare il 66,7 % della varianza. E' possibile osservare come la PC 1 sia in grado di separare i campioni di Chardonnay analizzati nel 2013 -2014, che si trovano a valori negativi, dai campioni analizzati nell'annata 2015 che si riscontrano a valori positivi. La PC 2 è in grado di separare, seppur in maniera meno marcata, i campioni di vino dell'analisi 2013, che si trovano a valori positivi, dai campioni analizzati nell'annata 2014 che si trovano a valori negativi.

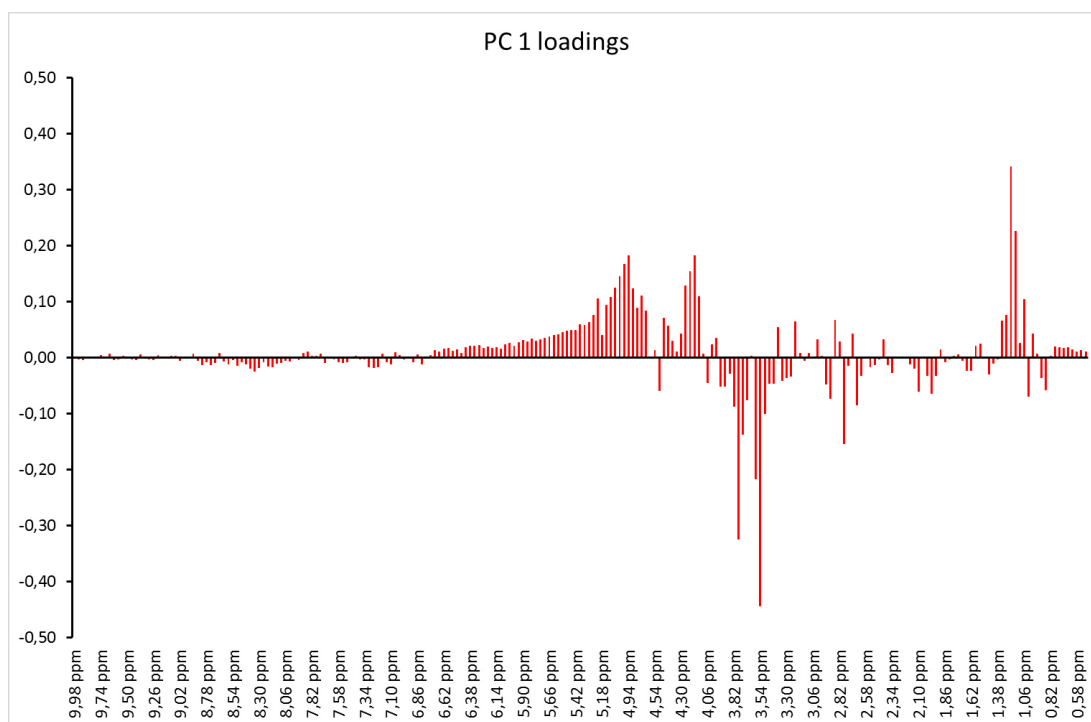


Figura 4.80 Grafico dei pesi per PC 1 su zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.80 riporta il grafico dei pesi per PC 1, prendendo in considerazione l'intera zona spettrale (0,5 – 10 ppm). Dall'immagine è possibile osservare quali siano i metaboliti con peso positivo che contribuiscono maggiormente alla separazione dei campioni, tra questi è possibile distinguere l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.77 ppm), l'acetato di etile (1.24, 2.06, 4.13 ppm) e la treonina (1.32 ppm), mentre tra i metaboliti più influenti con peso negativo si evidenziano l'isopentanololo (0.88 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm) ed infine il glicerolo (3.54, 3.77 ppm).

La figura 4.81 riporta il grafico dei pesi per PC 2 prendendo in considerazione l'intera zona spettrale (0,5 – 10 ppm). Mediante l'osservazione di questo grafico è possibile evidenziare quali siano i metaboliti con peso positivo maggiormente influenti; tra questi riscontriamo l'isopentanololo (0.88 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e l'acido shikimico (6.81 ppm). Con peso negativo troviamo il 2-3 butandiolo (1.13 ppm).

L'immagine 4.82 riporta le proiezioni su PC 1 e PC 2 per la porzione spettrale da 0,5 a 5 ppm. La PC 1 e la PC 2 sono in grado di spiegare il 68,3% della varianza. In questo caso la separazione effettuata da PC 1 e PC 2, sulla zona spettrale da 0.5 a 5 ppm, risulta essere simile a quella effettuata dalle stesse componenti principali su spettro intero (0.5 – 10 ppm). Osservando il grafico delle proiezioni si può desumere un accenno di separazione dei tre raggruppamenti di campioni, corrispondenti ai tre periodi di analisi, lungo la PC 1.

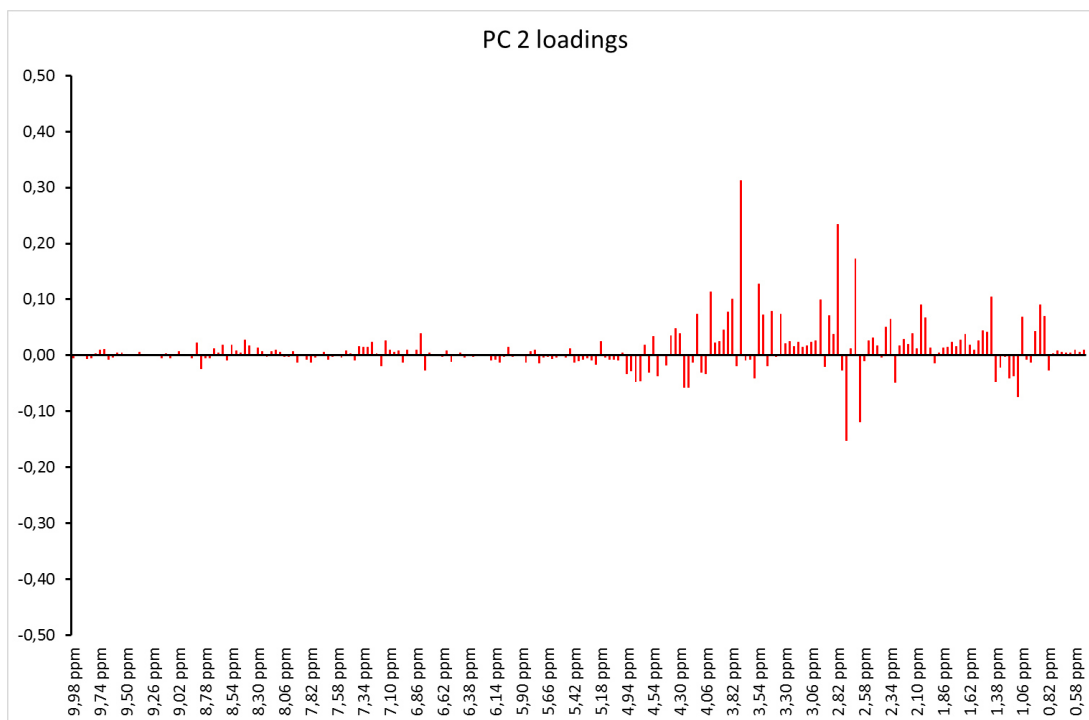


Figura 4.81 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 0,5 a 10 ppm.

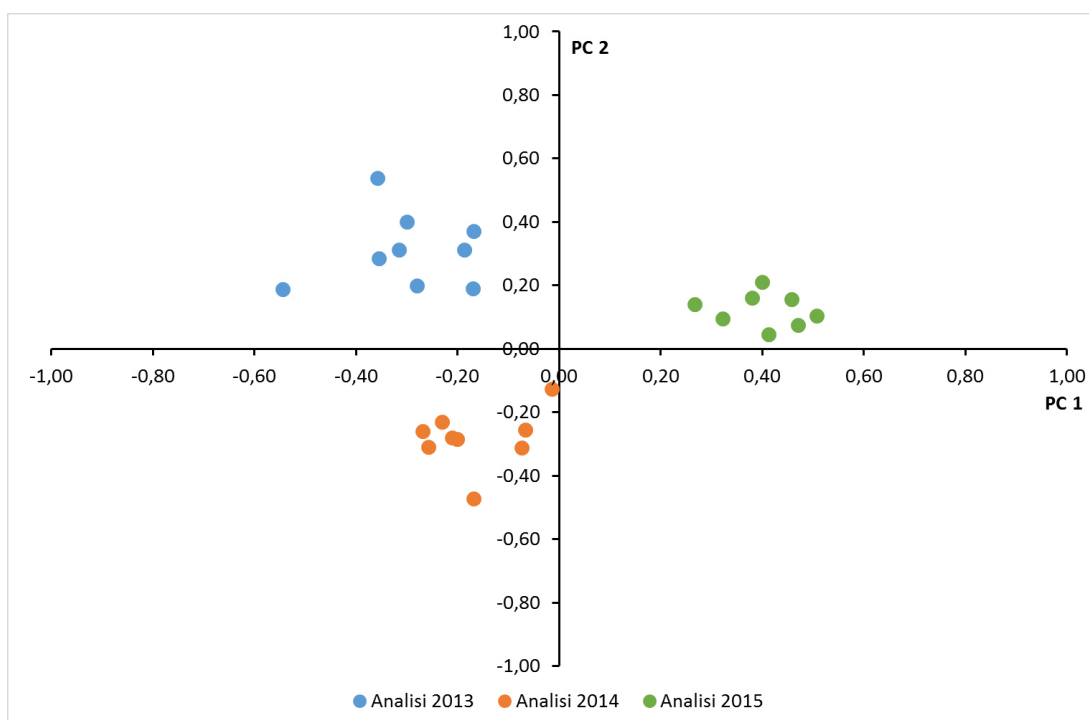


Figura 4.82 Grafico delle proiezioni su PC 1 e PC 2 riguardante la zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

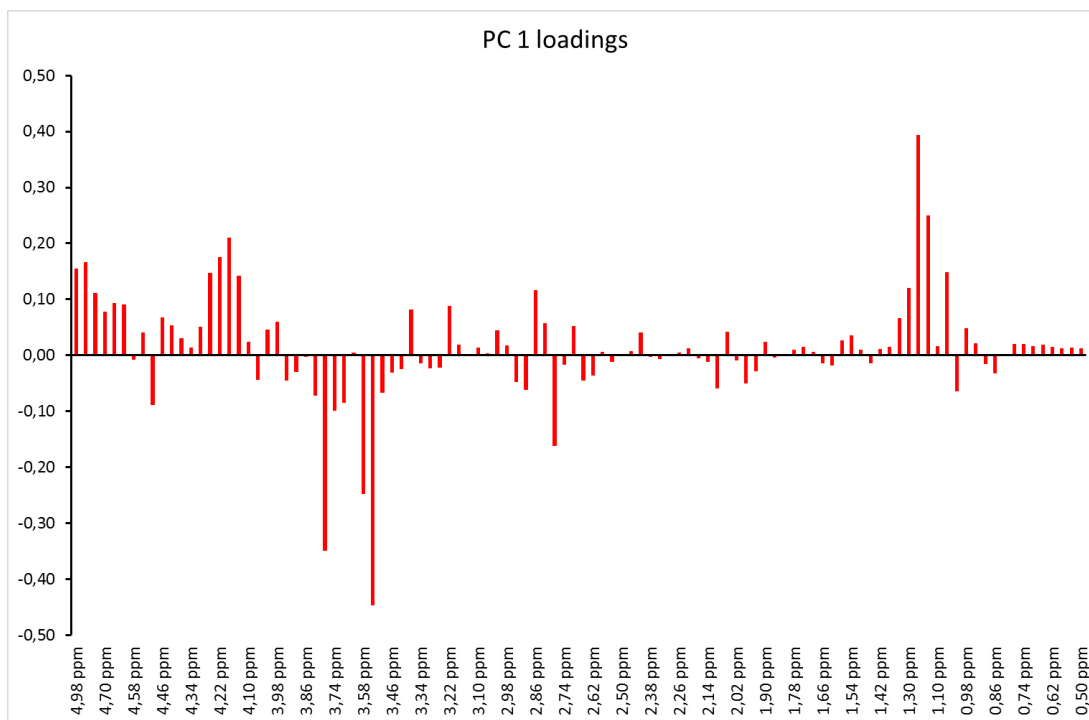


Figura 4.83 Grafico dei pesi per PC 1 su zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

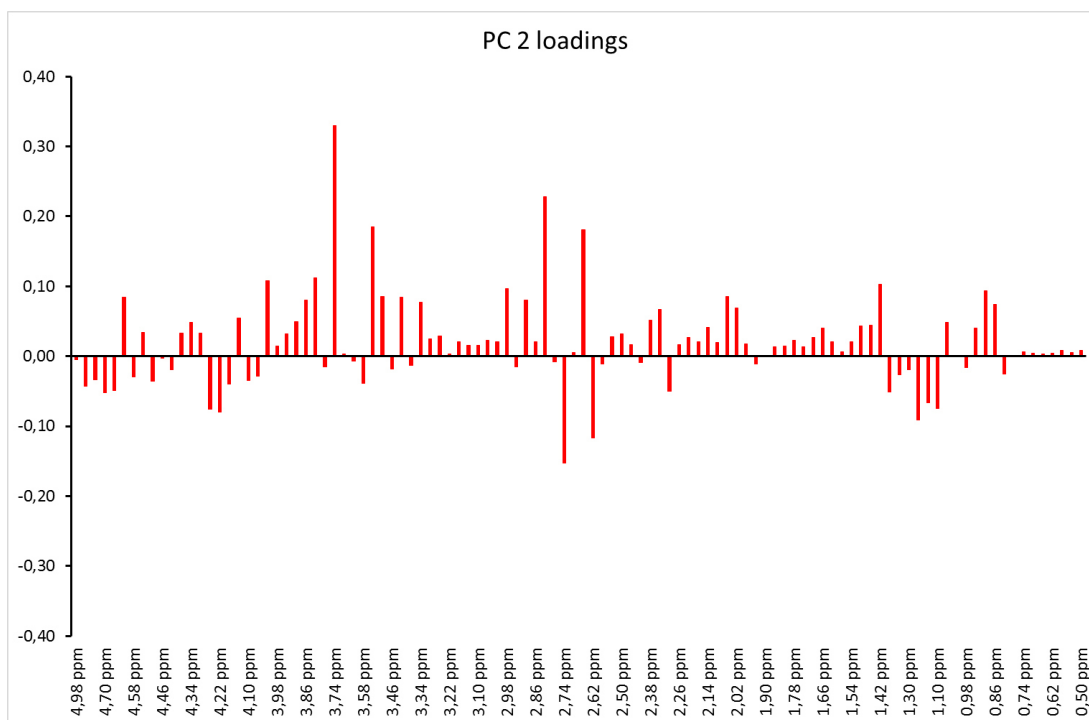


Figura 4.84 Grafico dei pesi per PC 2 su zona spettrale da 0,5 a 5 ppm.

Il grafico 4.83 riporta i pesi, su PC 1, dei principali metaboliti con peso positivo sulla zona spettrale compresa tra 0.5 e 5 ppm. Mediante l'analisi dei singoli metaboliti si è evidenziato come quelli riscontrati in questa zona spettrale rispecchiassero esattamente quelli riscontrati nella zona spettrale da 0,5 a 10 ppm sulla stessa PC. Tale situazione non risulta, però, essere analoga per quanto riguarda i metaboliti con peso negativo, che risultano essere diversi. Tra questi possiamo riscontrare l'acido succinico (2.65 ppm) e il glicerolo (3.54, 3.77 ppm).

Nel grafico 4.84 sono invece riportati i metaboliti con peso positivo su PC 2. Anche in questa circostanza si è evidenziato che queste componenti risultano essere uguali a quelle già evidenziate nel grafico dei pesi per PC 2 su spettro intero, ad eccezione dell'acido shikimico, che non cade in questa zona spettrale. Anche per quanto concerne i metaboliti con peso negativo su PC 2, nella zona spettrale da 0,5 a 5 ppm, è possibile evidenziare che siano gli stessi riscontrati su PC 2 per l'intero spettro.

L'analisi statistica dei dati spettrali nella regione dello spettro tra 5 e 10 ppm non ha portato a risultati soddisfacenti. Le prime due componenti principali, infatti non separano in alcun modo i campioni in base all'epoca di analisi e non si evidenziano raggruppamenti spiegabili.

Analisi dei risultati ottenuti sui vini bianchi.

La spettroscopia NMR ed il trattamento statistico dei dati hanno fornito informazioni utili a differenziare i campioni a seconda della durata del periodo di conservazione. Il vino Cortese ha mostrato una miglior separazione dei campioni con diverso periodo di invecchiamento. La zona dello spettro ^1H NMR che ha fornito migliori risultati nella separazione dei campioni è stata quella da 0,5 a 5 ppm. In questa zona dello spettro cadono i segnali degli acidi organici, degli zuccheri e dei principali amminoacidi. Questi metaboliti rappresentano il maggior costituente dei vini bianchi.

Anche per i vini bianchi, i risultati non sempre pienamente soddisfacenti sono in parte riconducibili alle condizioni di stoccaggio dei campioni durante il periodo di conservazione (12°C, al riparo dalla luce). In queste condizioni l'invecchiamento dei vini è molto rallentato. Per cui, anche dopo 24 mesi, le differenze tra i campioni sono molto piccole.

4.4 Analisi dei vini della zona di produzione di Portacomaro (AT)

I vini considerati per questa zona di produzione sono Grignolino e Ruchè delle vendemmie 2012 e 2013.

4.4.1 Analisi chimiche ed isotopiche

Nelle tabelle 4.6 e 4.7 sono presentati i dati delle analisi chimiche ed isotopiche di due vini (appartenenti ad annate diverse), prodotti dalla medesima azienda e le uve coltivate nella stessa zona. Le considerazioni che si possono trarre riguardano principalmente il quadro polifenolico: tutti i vini sono stati vinificati al raggiungimento della medesima maturità tecnologica (alcol, pH e acidità costante nei due anni sia per il Grignolino che per il Ruchè). Mentre però il Ruchè mantiene le sue caratteristiche di colore e polifenoli nei due anni, il Grignolino presenta una notevole variazione in questi metaboliti

Tabella 4.6 Analisi chimiche e spettrofotometriche

Vini	pH	Ac. Totale (g/L)	distillato (% vol)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
GR01-12	3,32	4,30	12,66	46	2137	0,096	0,071	0,013	1,351	0,166
RU01-12	3,32	4,08	13,51	171	1957	0,244	0,317	0,064	0,769	0,561
GR01-13	3,51	4,13	12,72	58	1688	0,097	0,080	0,016	1,207	0,177
RU01-13	3,57	3,97	13,81	204	1925	0,234	0,310	0,059	0,757	0,544

Tabella 4.7 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	¹⁸ O/ ¹⁶ O δ ‰ vs SMOW
GR01-12	12,67	98,75	130,81	2,67
RU01-12	13,51	98,21	132,23	2,35
GR01-13	12,72	100,46	130,55	2,17
RU01-13	13,80	98,59	130,20	1,70

4.4.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici.

Se esaminiamo lo score plot ottenuto attraverso l'analisi delle componenti principali (Figura 4.85), possiamo notare come le due tipologie di vino si separino nettamente sulla PC1.

Inoltre, anche l'annata ha prodotto differenze rivelabili sulla PC2.

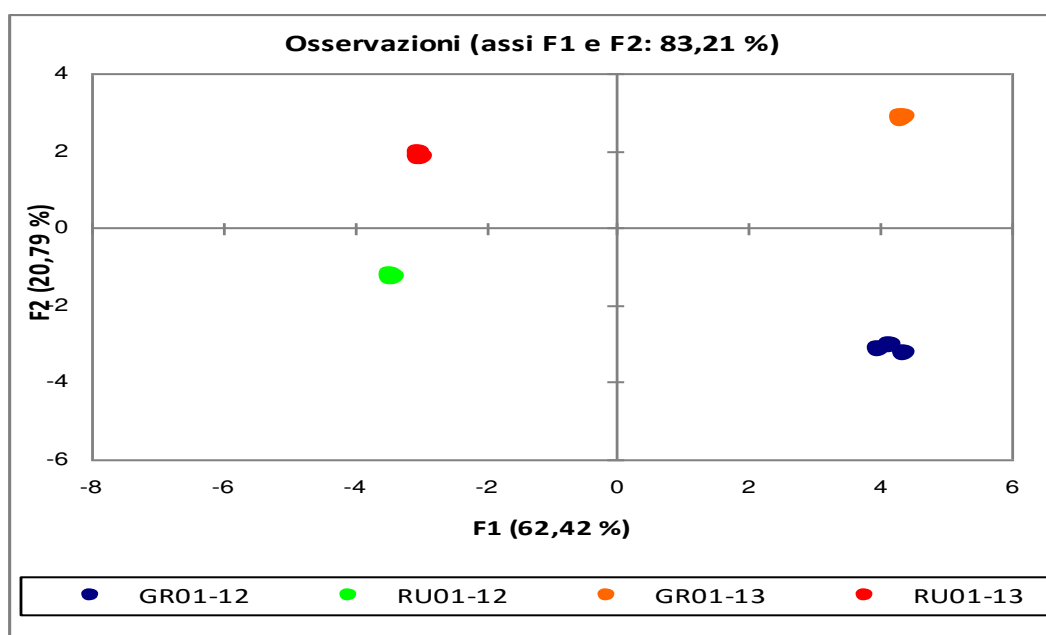


Figura 4.85 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

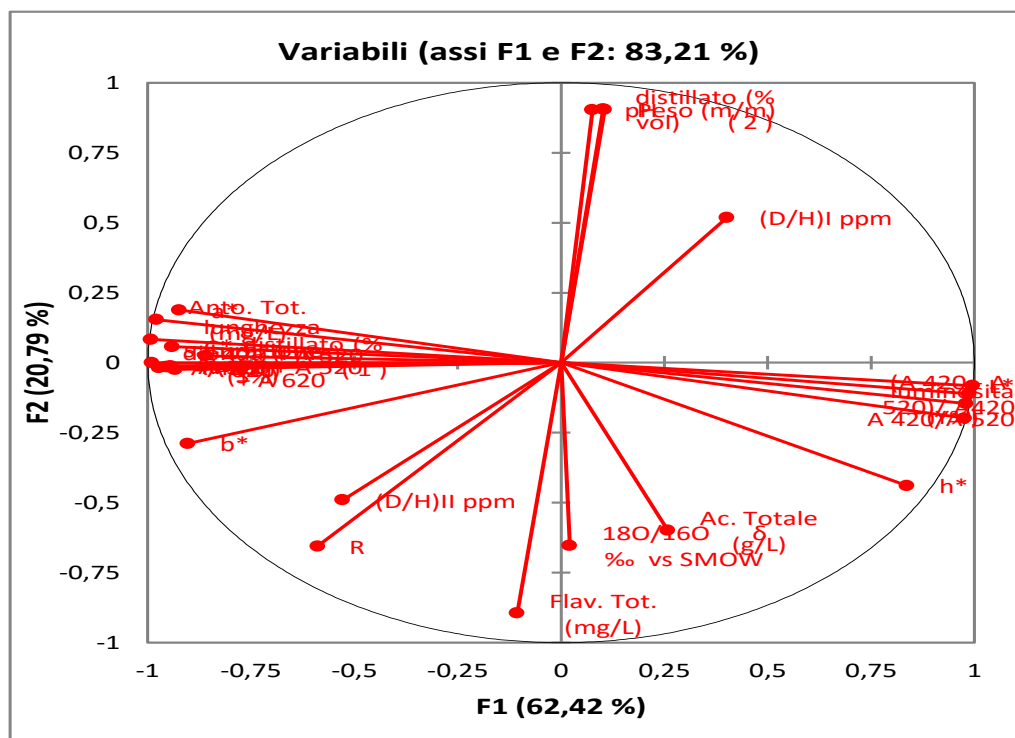


Figura 4.2 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

Dal confronto con il loading-plot (Figura 4.86), possiamo mettere in luce i fattori maggiormente influenti sulla loro separazione: quelli relativi al colore differenziano nettamente le due tipologie (PC1), mentre l'alcol e l'acidità sono variabili influenzate maggiormente dall'annata.

4.4.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti del vitigno e dell'annata di produzione.

Dalla figura 4.87 si può vedere come le prime due componenti principali (PC 1 e PC 2), che spiegano il 73,37% della varianza totale, siano in grado di separare i due vini in base al vitigno e all'annata di provenienza. La PC 1 separa i campioni in base al vitigno: il Grignolino si trova a valori negativi mentre il Ruchè si trova a valori positivi. Si osserva inoltre, una separazione dei campioni su PC 2 per quanto riguarda l'annata di produzione.

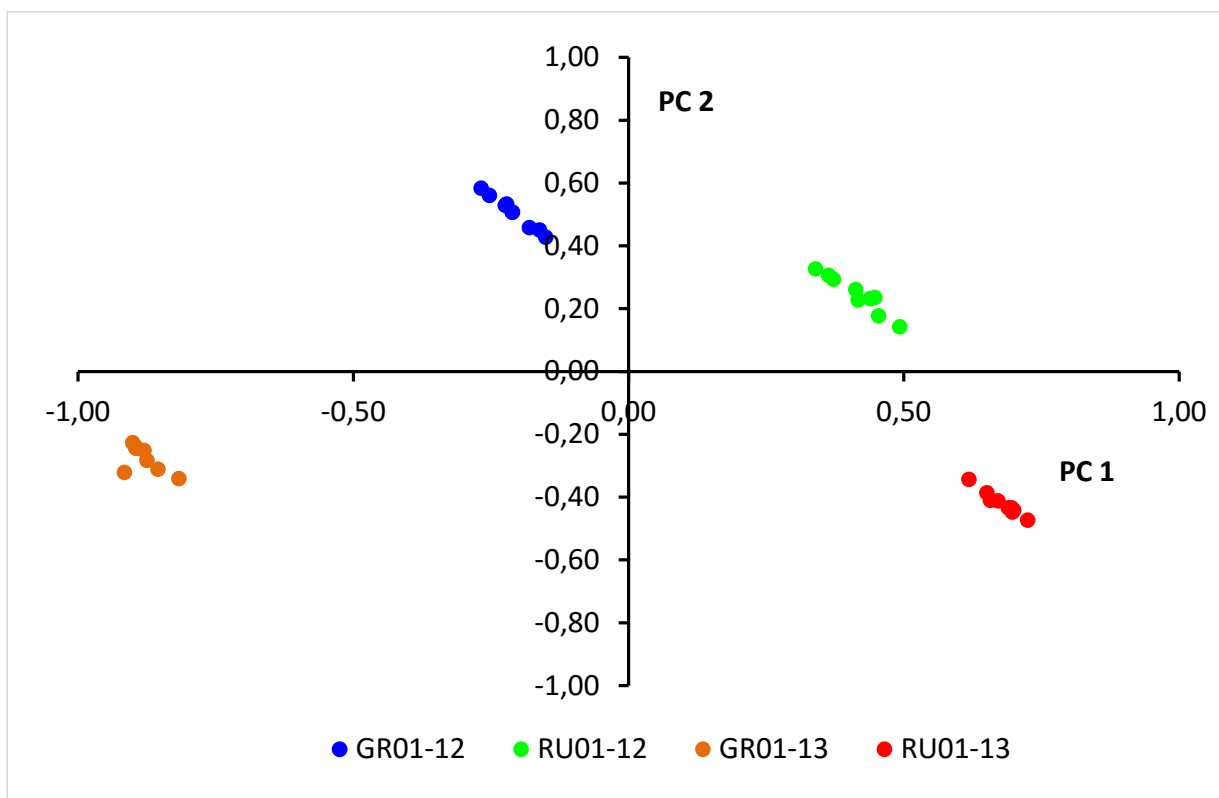


Figura 4.87 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro intero.

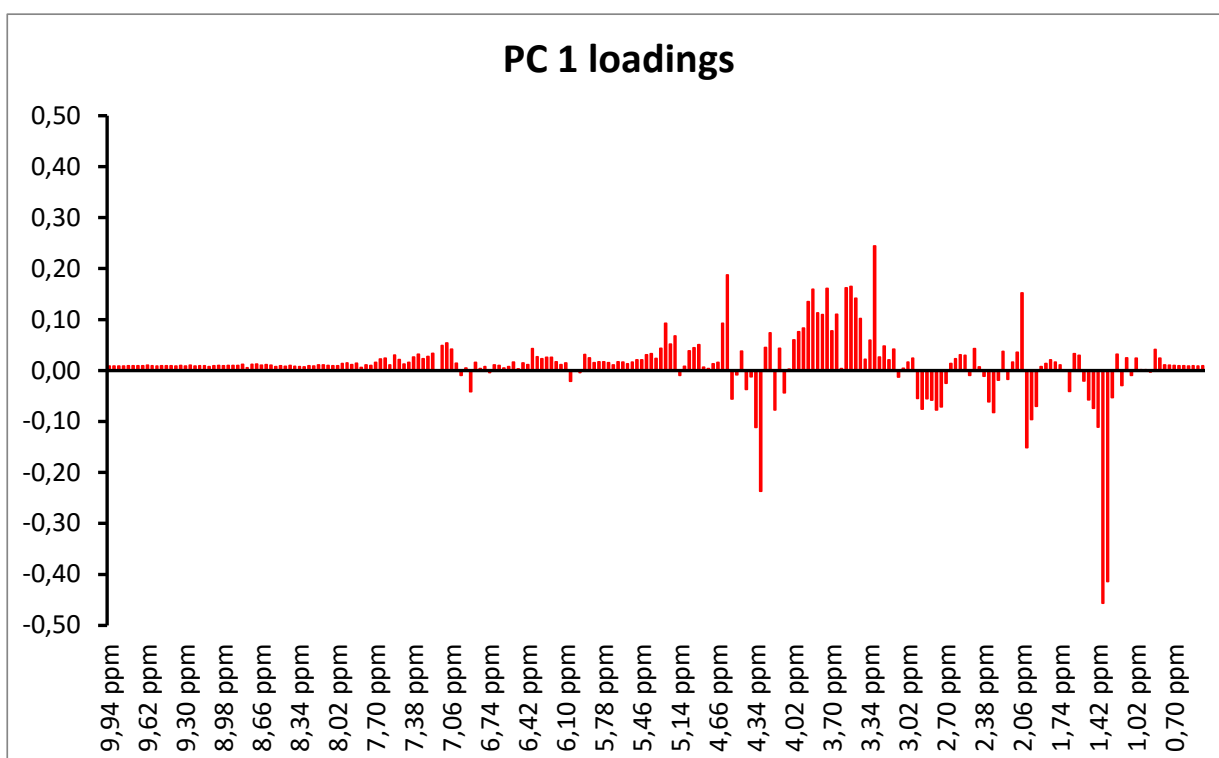


Figura 4.88 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.88 riporta il grafico dei pesi per la PC 1, da cui si possono evidenziare quali siano le zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC. Conoscendo le zone

spettrali in cui cadono i segnali NMR dei diversi metaboliti del vino, si può risalire a quali siano quelli maggiormente implicati nella separazione dei vini osservata.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acido glutammico (2.15, 2.56, 3.83 ppm), l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'acido tartarico (4.58 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm).

Al contrario contribuiscono a PC 1 con peso negativo: l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'etillattato (1.38, 4.18, 4.34 ppm), l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), l'acido malico (2.70, 2.88, 4.53 ppm).

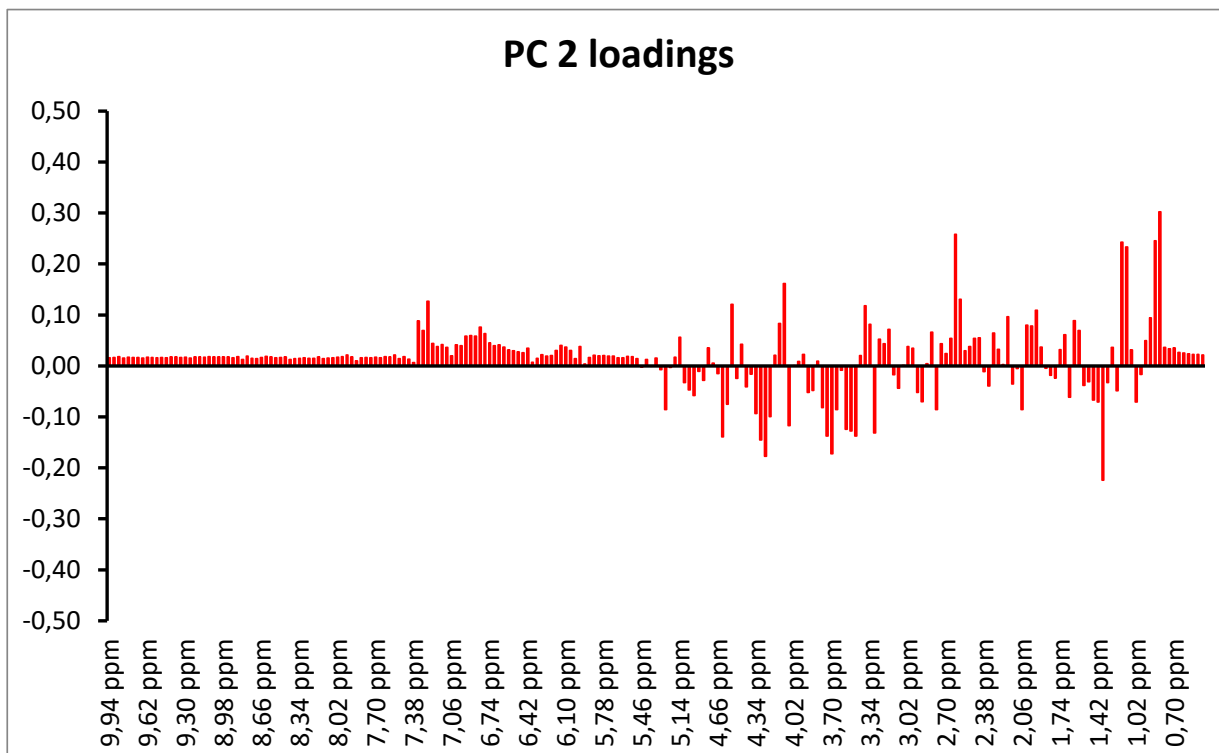


Figura 4.89 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 4.89 riporta il grafico dei pesi per la PC 2, in relazione alle zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 2 con peso positivo: l'etil acetato (1.24, 2.07, 4.13 ppm) l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'arginina (1.70, 3.26, 7.26 ppm), l'acido succinico (2.62 ppm), lo D-(+)-xilosio (3.18, 3.26, 3.42, 4.54 ppm).

Al contrario contribuiscono a PC 2 con peso negativo: il glicerolo (3.53, 3.55, 3.78 ppm), l'etillattato (1.38, 4.22, 4.34 ppm), l'L-(+)-arabinosio (3.78, 4.50, 5.26 ppm), l'acetoino (1.36, 2.21, 4.40 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido tartarico (4.60).

L'analisi statistica è stata ripetuta considerando la zona spettrale tra 5 e 10 ppm che, dalle misure sui vini della zona precedentemente considerata, si è dimostrata la più informativa per i vini rossi.

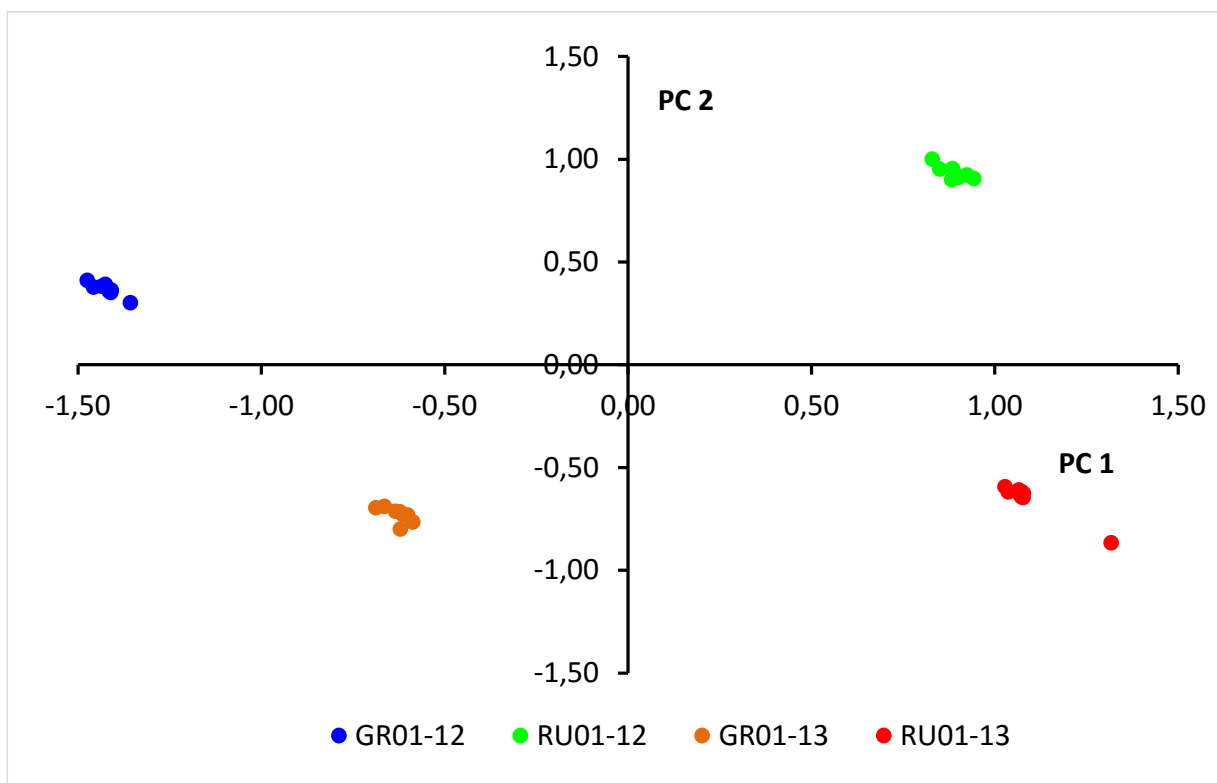


Figura 4.90 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

Considerazioni analoghe a quelle relative alla figura 4.87 si possono fare anche sulla figura 4.90 si può vedere come le prime due componenti principali (PC 1 e PC 2), che spiegano l'86.31% della varianza totale, siano in grado di separare i due vini in base al vitigno e all'annata di provenienza. Si è diviso lo spettro a metà per verificare se sia i vitigni che le annate di produzione vengano discriminate anche in questa parte dello spettro che interessa maggiormente i metaboliti di natura secondaria. La PC 1 separa i campioni in base al vitigno: il Grignolino si trova a valori negativi mentre il Ruchè si trova a valori positivi. Si osserva, inoltre, una separazione dei campioni su PC 2 per quanto riguarda l'annata di produzione.

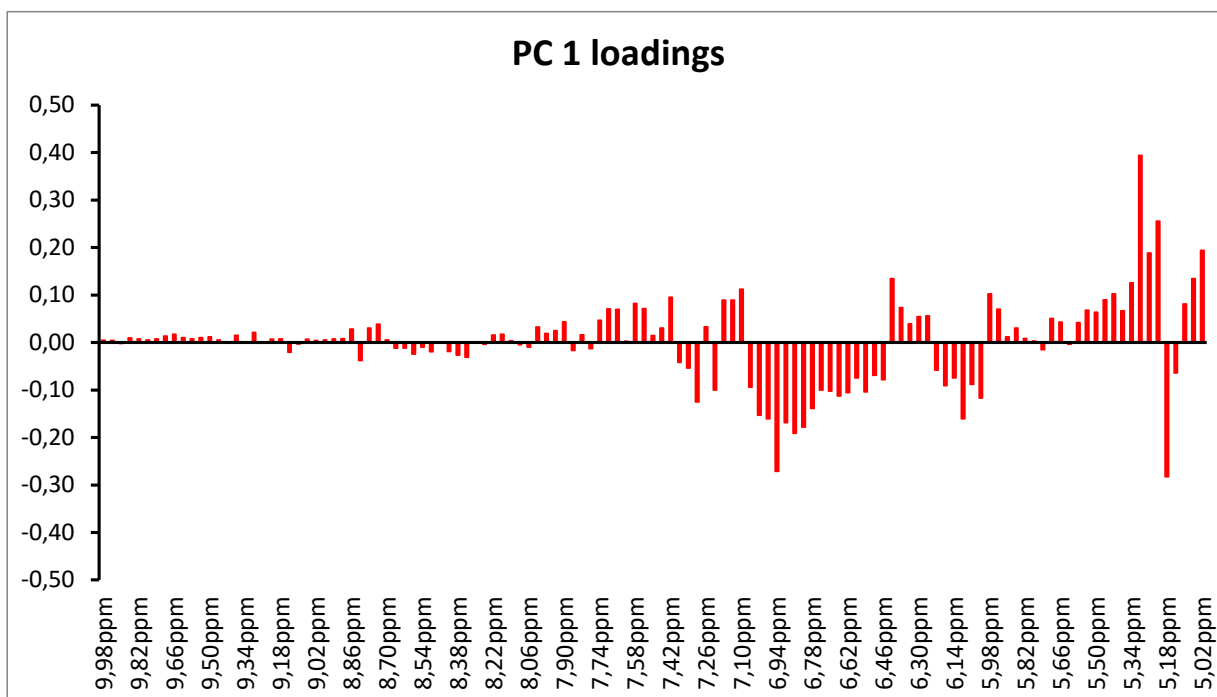


Figura 4.91 Grafico dei pesi per PC 1, spettro da 5 a 10 ppm.

La figura 4.91 riporta il grafico dei pesi per la PC 1. Si possono evidenziare le zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC e risalire a quali siano i metaboliti maggiormente implicati nella separazione dei vini.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: il ribosio (5.22 ppm), l'acido galatturonico (5.19, 5.24, 5.30 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), con peso negativo: il D-mannosio (5.16 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.84, 6.93, 6.99 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm).

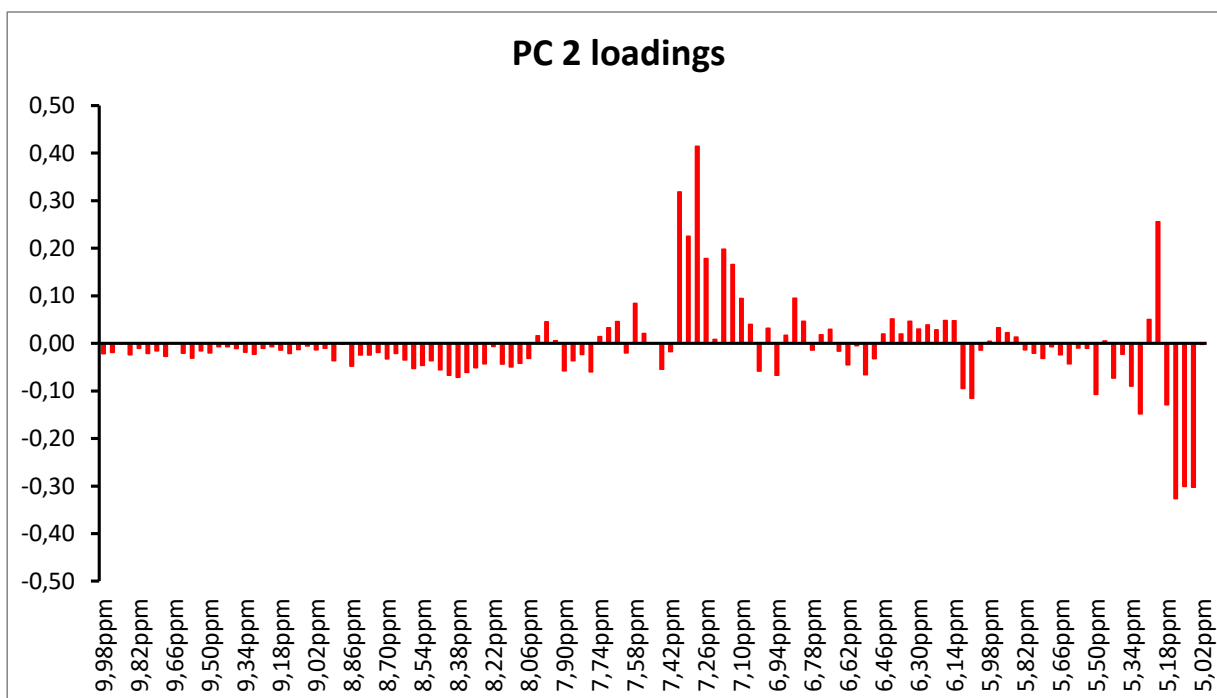


Figura 4.92 Grafico dei pesi per PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

Nella figura 4.92 è riportato il grafico dei pesi per la PC 2. Si evidenziano le zone dello spettro NMR con maggior peso su questa PC e in tal modo si può risalire ai metaboliti maggiormente implicati nella separazione dei vini.

In particolare contribuiscono alla definizione di PC 2 con peso positivo: la tirosina (6.87, 7.18 ppm), il ribosio (5.22 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm) e con peso negativo: l'acido galatturonico (5.19, 5.24, 5.30 ppm), la (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm).

4.4.4 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti dell'invecchiamento.

Per la valutazione degli effetti dell'invecchiamento si sono analizzati campioni di vino Ruchè e Grignolino della vendemmia 2012 subito dopo l'imbottigliamento e dopo un anno di conservazione.

Vino Ruchè

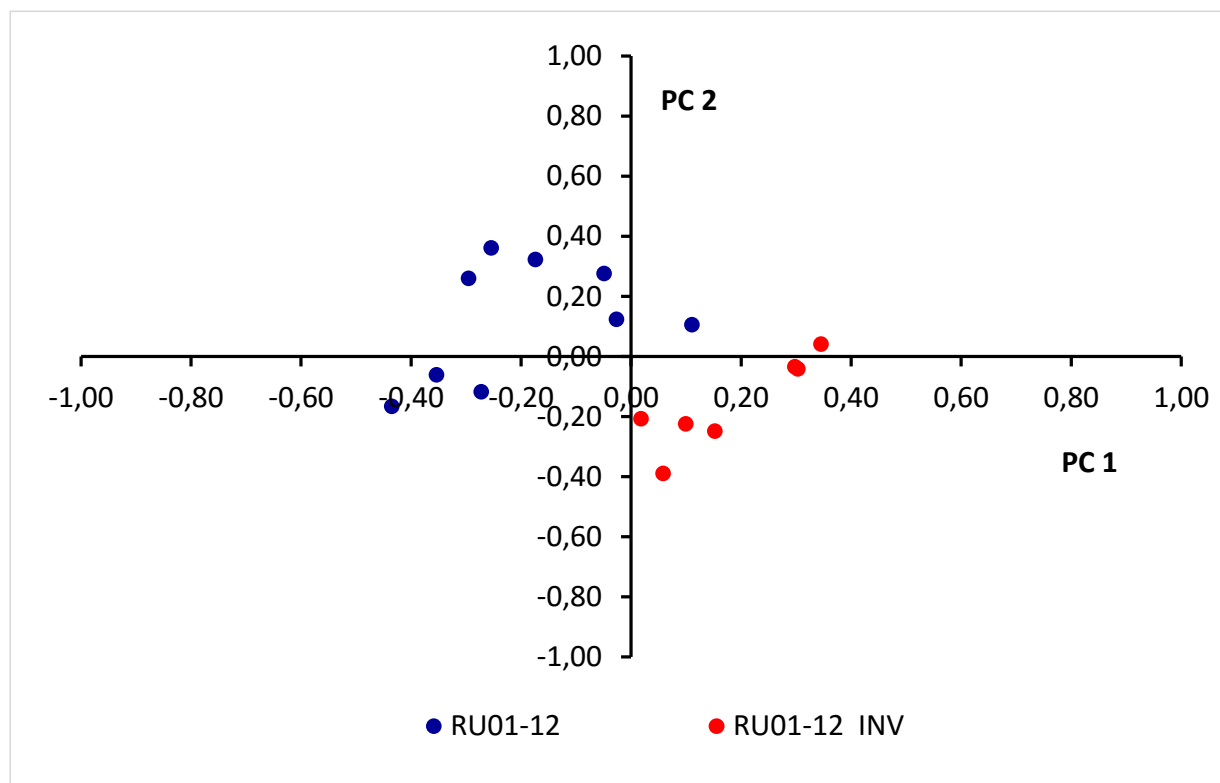


Figura 4.93 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro intero da 0.5 a 10 ppm.

La figura 4.93 mostra come l'invecchiamento di un anno dei vini porti ad una separazione tra i campioni analizzati, anche se in realtà ci si attendeva una divisione non così netta dal momento che le condizioni di conservazione erano molto rigorose (12°C ed umidità costante).

Analizzando la figura, in cui si riporta la distribuzione dei campioni su PC 1 e PC2 che spiegano il 70.61% della varianza totale, possiamo evidenziare come i campioni analizzati nei due anni siano separati.

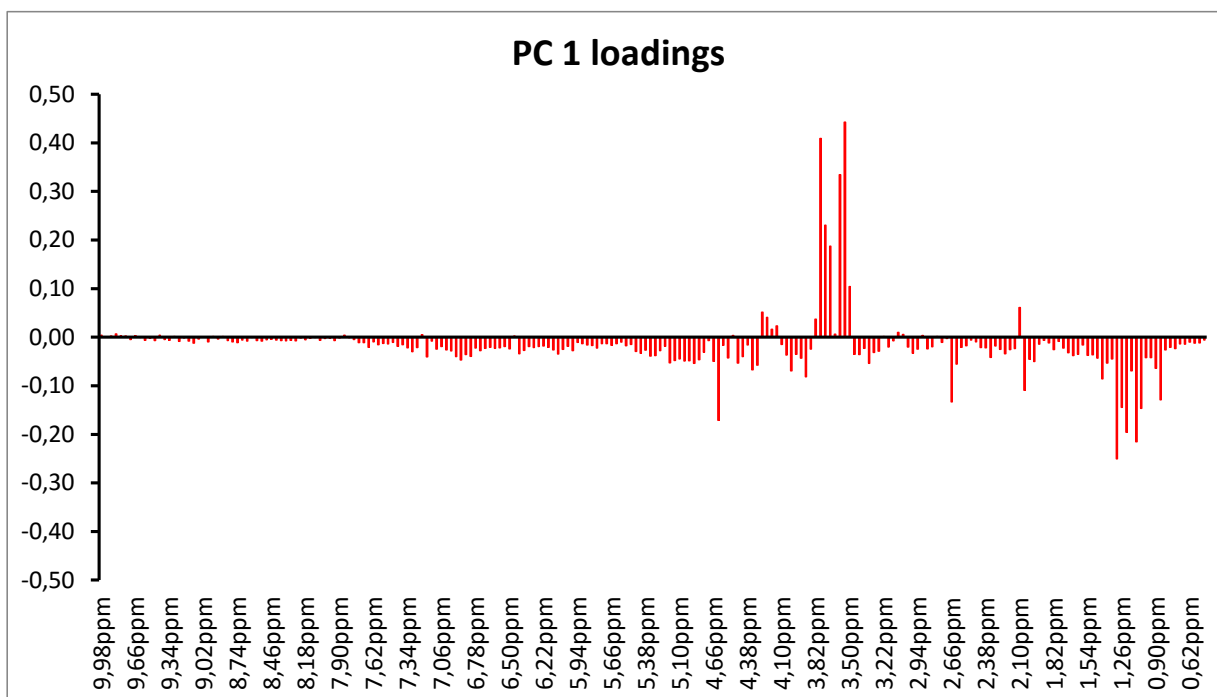


Figura 4.94 Grafico delle proiezioni PC 1, spettro intero da 0.5 a 10 ppm.

La figura 4.94 che riporta il grafico dei pesi per la PC 1, mette in evidenza le zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC e permette di risalire a quali siano i metaboliti maggiormente implicati in questa separazione dei vini.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: il glicerolo (3.54, 3.77 ppm) e con peso negativo: l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), l'arginina (1.70, 3.26, 7.26 ppm), l'acido tartarico (4.60), l'etanolo (1.04, 1.30, 3.50, 3.78 ppm).

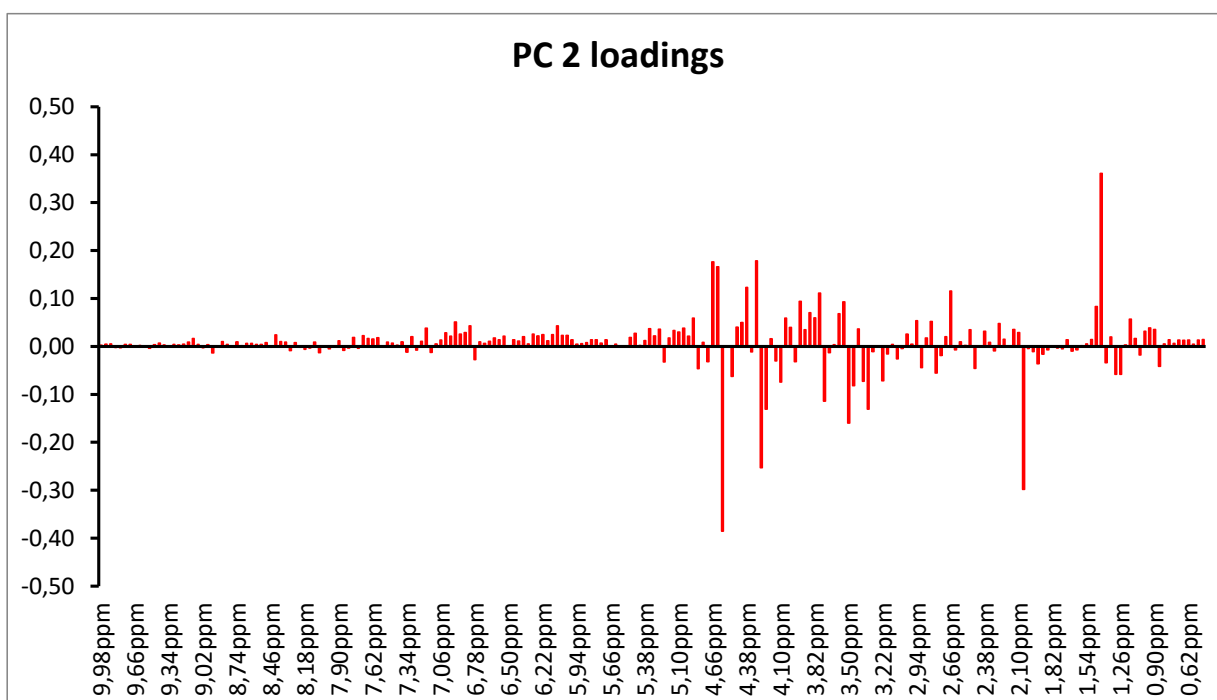


Figura 4.95 Grafico delle proiezioni PC 2, spettro intero da 0.5 a 10 ppm.

Nel grafico 4.95 sono invece riportati i metaboliti con peso positivo e negativo su PC 2. Per quanto concerne i metaboliti con peso positivo su PC 2, nella zona spettrale da 0,5 a 10 ppm, possiamo evidenziare l'L-(+)-arabinosio (3.78, 4.50, 5.21, 5.28 ppm), l'acido galatturonico (3.92, 4.24, 4.30, 4.31, 5.19.5.24, 5.30 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34ppm), il glicerolo (3.53, 3.55, 3.78ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), il 2-feniletanolo (2.85, 3.82, 7.30, 7.37 ppm).

Tra i metaboliti con peso negativo possiamo mettere in luce principalmente l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido tartarico (4.60), l'etil acetato (1.24, 2.07, 4.13ppm), la treonina (1.32, 4.27 ppm).

L'analisi statistica dei dati spettroscopici è stata ripetuta considerando la regione spettrale da 5 a 10 ppm.

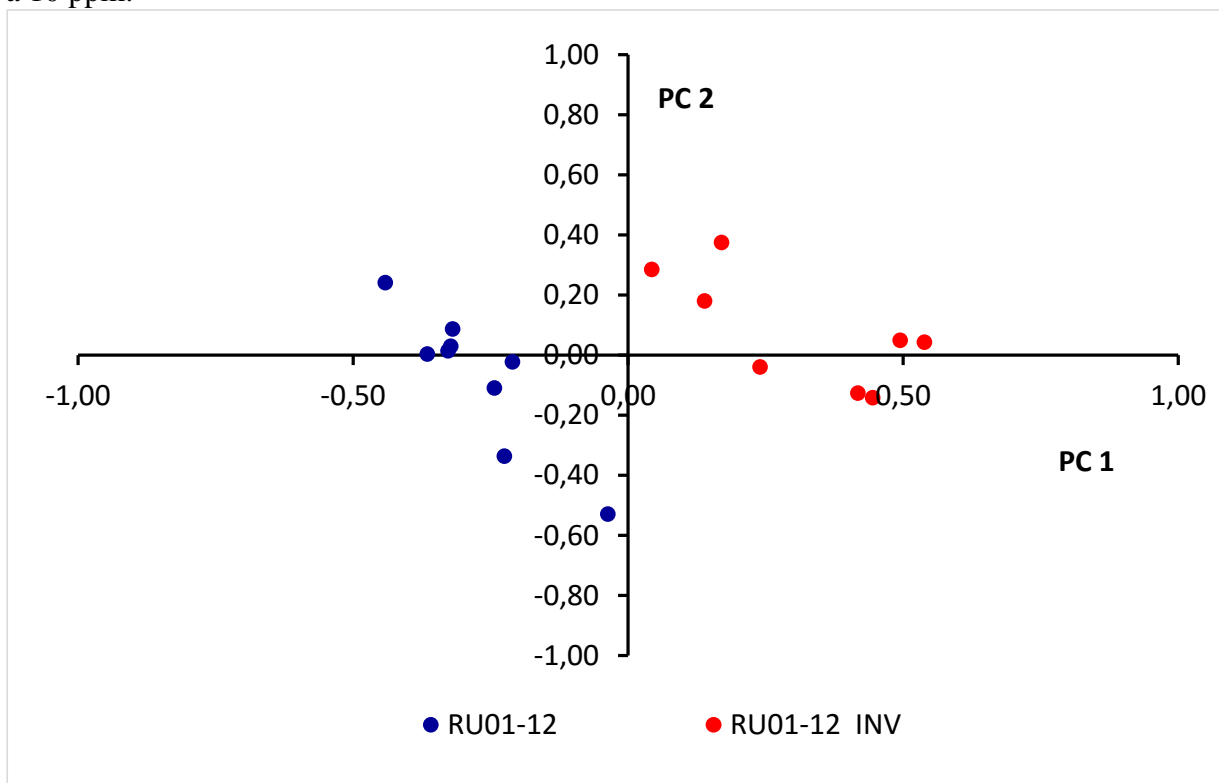


Figura 4.96 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

Rispetto allo spettro intero (Figura 4.96), questa PCA, che prende in considerazione la parte dello spettro che interessa maggiormente i metaboliti di natura secondaria, spiega una percentuale minore di varianza (50,89%); è comunque ben visibile una netta separazione tra i campioni analizzati nel 2013 e quelli analizzati dopo un anno di invecchiamento lungo la PC1.

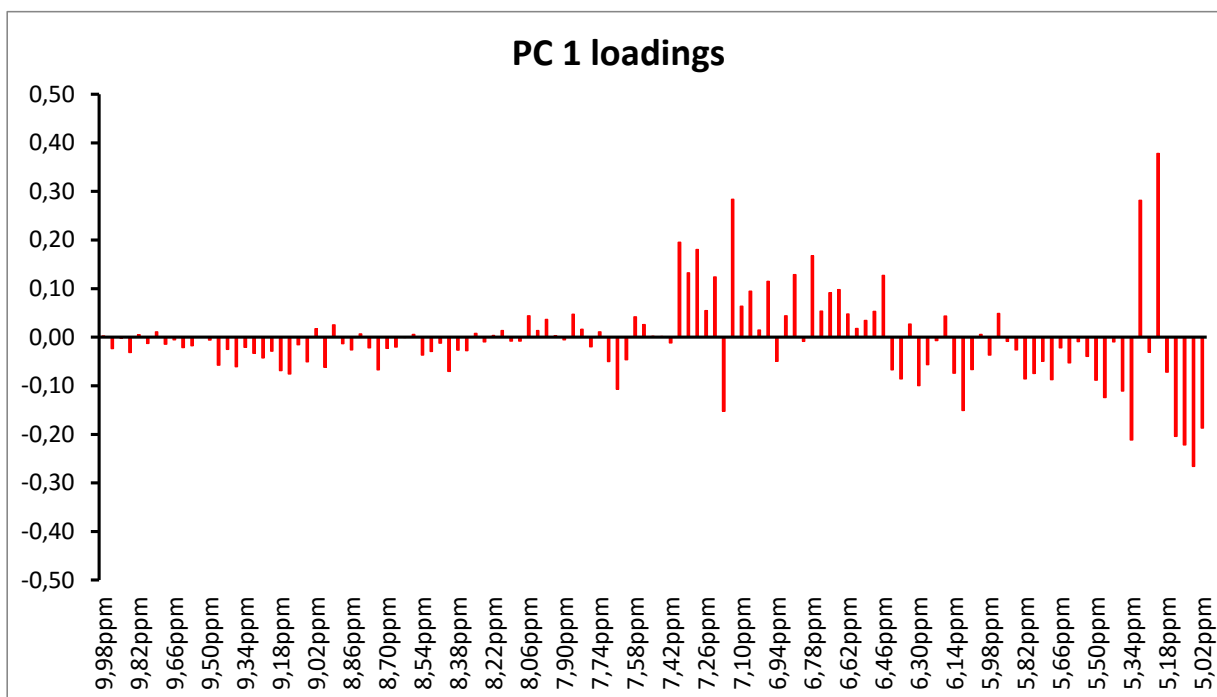


Figura 4.97 Grafico dei pesi per PC 1, spettro da 5 a 10 ppm.

La figura 4.97 che riporta il grafico dei pesi per la PC 1, mette in luce le zone dello spettro NMR che hanno maggior influenza su PC1 e permette di risalire ai metaboliti maggiormente implicati in questa separazione dei campioni.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'L-(+)-arabinosio (5.21, 5.28 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), il *trans*-resveratrolo (6.31, 6.64, 6.91, 6.96, 7.14, 7.50 ppm), il kampferolo (6.32, 6.55, 7.02, 8.08, 8.90 ppm) e negativo: il D- mannosio (5.16 ppm), il saccarosio (5.39 ppm).

Vino Grignolino

La figura 4.98 rappresenta le proiezioni della PCA con una varianza totale spiegata dalla prima componente principale del 54.07%. Da questa si può notare, anche in questo caso, che i campioni di Grignolino analizzati dopo un anno di conservazione si separino in base alla PC1 da quelli analizzati subito dopo l'imbottigliamento.

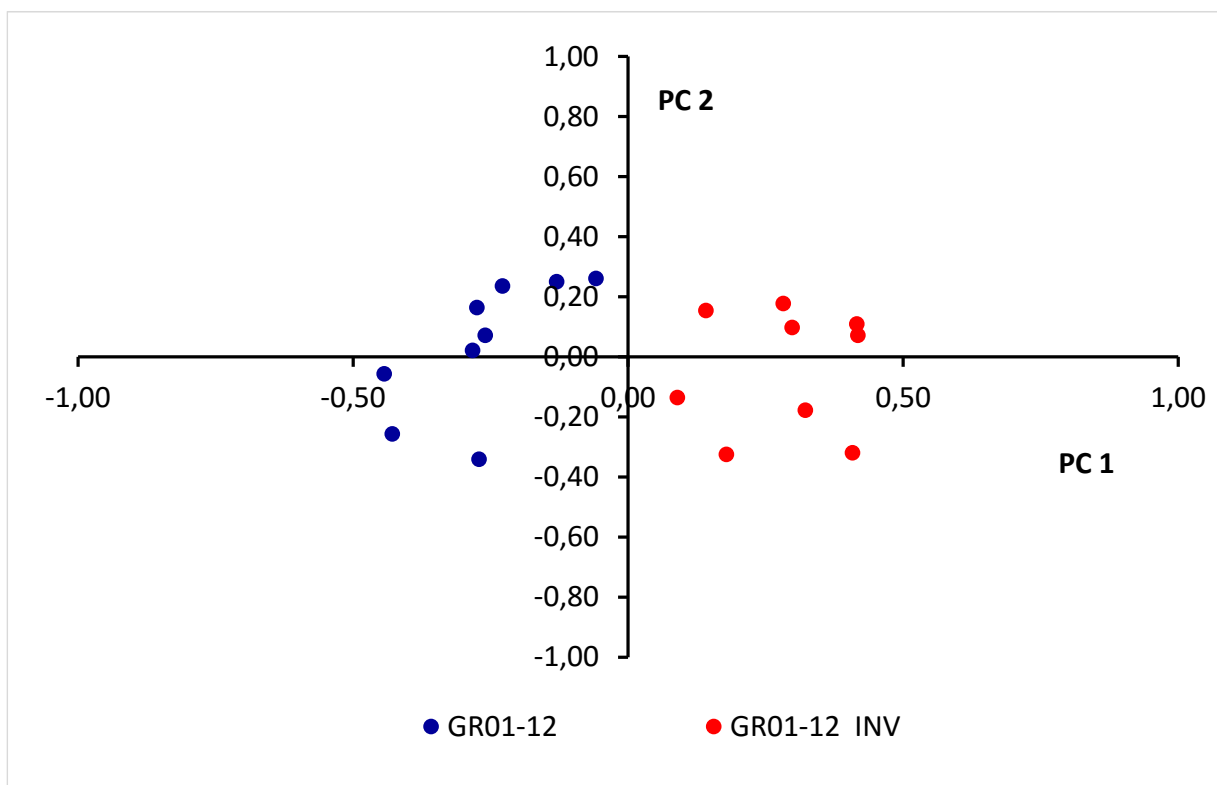


Figura 4.98 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0.5 a 10 ppm.

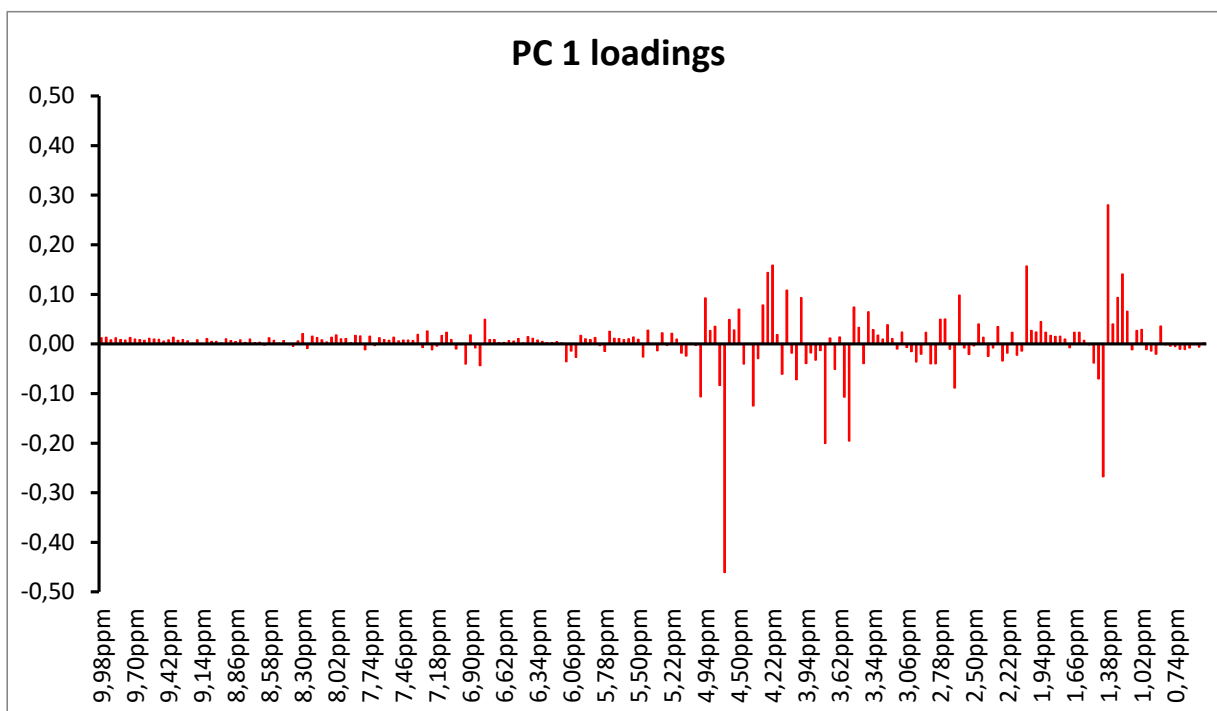


Figura 4.99 Grafico delle proiezioni PC 1, spettro da 0.5 a 10 ppm.

La figura 4.99 riporta il grafico dei pesi dei principali metaboliti per la PC 1. Si evidenziano le zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC risalendo ai metaboliti maggiormente implicati in questa separazione dei vini.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'etilattato (1.38, 4.18, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06

ppm), la treonina (1.32, 4.27 ppm), il metanolo (3.34ppm), l'acido gallico (7.15 ppm) e con peso negativo: l'acido lattico (1.40, 4.34ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.84, 6.93, 6.99 ppm), l'acido glutammico (2.15, 2.56, 3.83 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), il glicerolo (3.53, 3.55, 3.78ppm), l' L-(+)-arabinosio (3.78, 4.50, 5.26 ppm).

Anche in questo caso si è ripetuta l'analisi statistica considerando la zona spettrale da 5 a 10 ppm per meglio evidenziare il contributo dei metaboliti secondari.

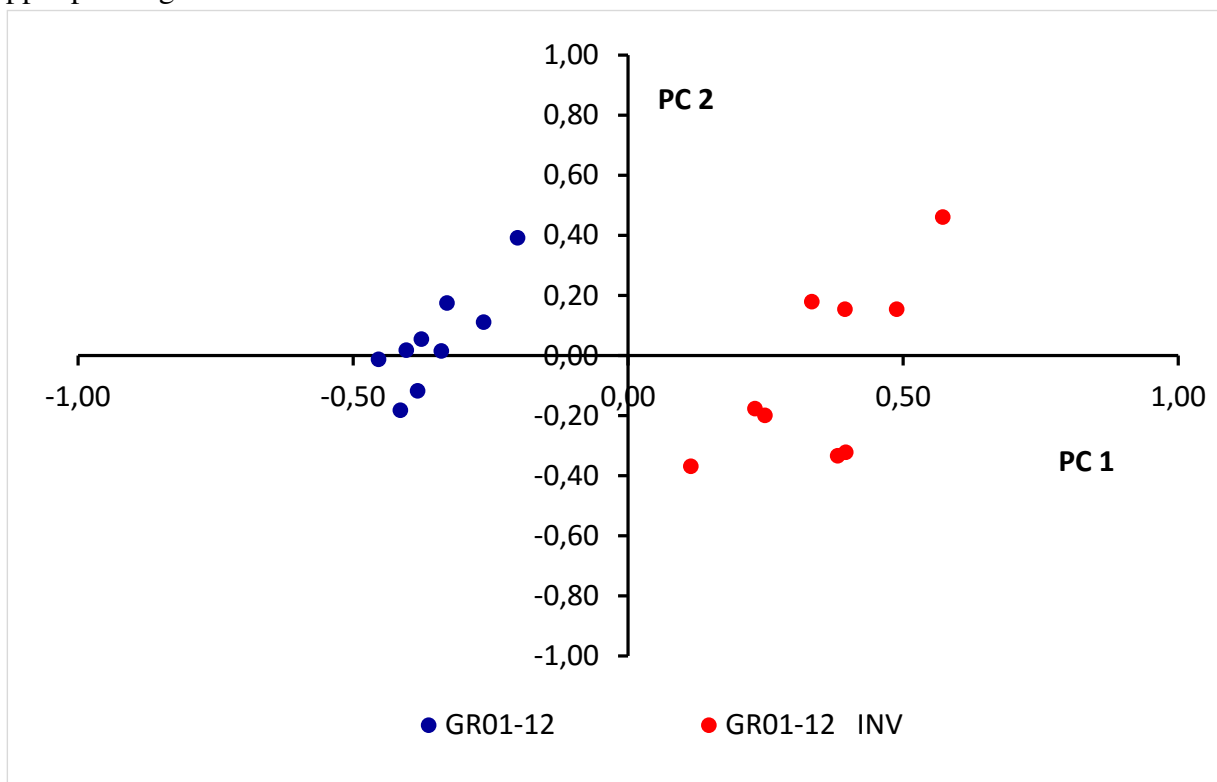


Figura 4.100 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

La figura 4.100 riporta la distribuzione dei campioni lungo PC 1 e PC 2 ottenute considerando la porzione spettrale da 5 a 10 ppm. Si può notare una separazione evidente tra le analisi effettuate nei due anni con la prima componente principale che spiega il 42% della varianza totale. Rispetto alla PC 1 i campioni di vino Grignolino del primo anno si posizionano a valori negativi mentre quelli analizzati dopo un anno si trovano a valori positivi.

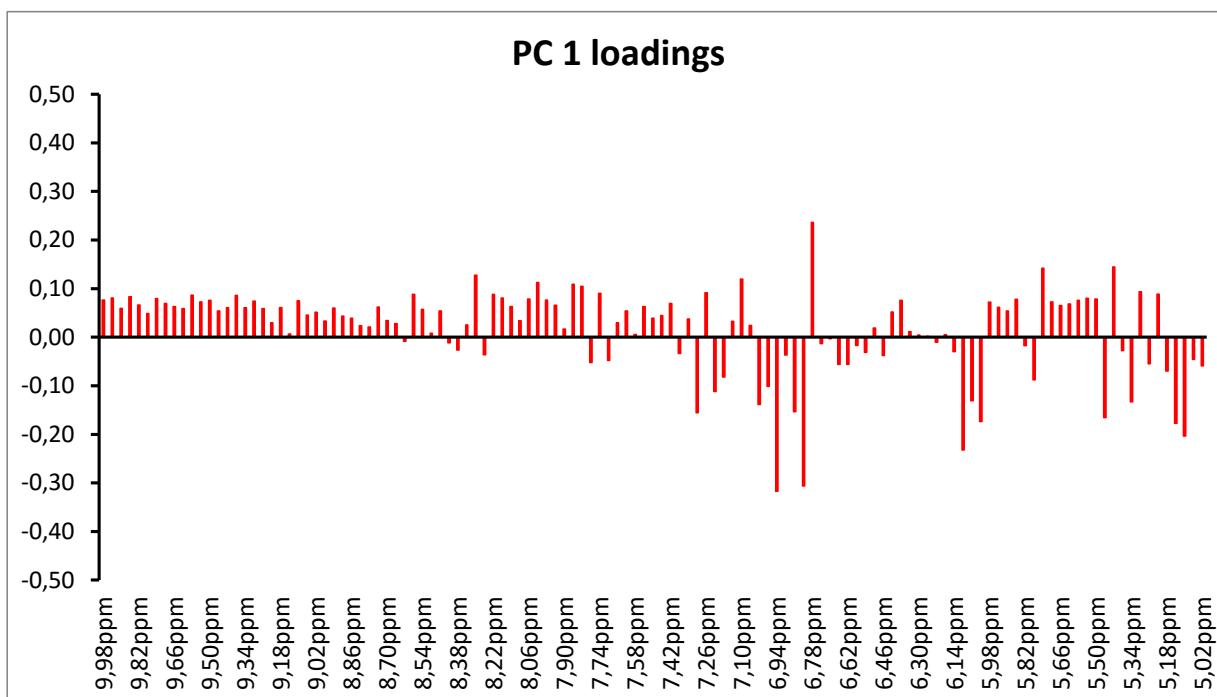


Figura 4.101 Grafico dei pesi per PC 1, spettro da 5 a 10 ppm.

Per la prima componente principale dal grafico dei pesi, (figura 4.101) si evidenziano i principali metaboliti. Contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm), mentre con peso negativo: il D-mannosio (5.16 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.84, 6.93, 6.99 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), il saccarosio (5.39 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm).

4.5 Analisi dei vini della zona di produzione di Cisterna d'Asti (AT)

Per questa zona di produzione si sono considerati campioni di Nebbiolo e di Barbera delle annate 2012 e 2013.

4.5.1 Analisi chimiche ed isotopiche

Tabella 4.8 Analisi chimiche e spettrofotometriche

VINI	pH	Ac. Totale (g/L)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
NE02-12	3,54	3,81	113	1965	0,189	0,201	0,045	0,943	0,390
BA02-12	3,53	4,06	238	1336	0,307	0,375	0,081	0,818	0,682
NE02-13	3,83	3,60	102	1814	0,162	0,186	0,032	0,875	0,348
BA02-13	3,70	3,79	272	1539	0,229	0,283	0,057	0,810	0,512

Nelle tabelle 4.8 e 4.9 sono mostrati i dati delle analisi chimiche ed isotopiche di due vini (appartenenti ad annate diverse), prodotti da uve provenienti dalla stessa zona.

Per quanto riguarda le analisi di routine, possiamo evidenziare come il pH sia maggiore nel 2013 rispetto al 2012, in accordo con un abbassamento dell'acidità totale. L'alcol rimane pressoché costante sia nei due anni che per le due varietà. Se passiamo ad analizzare gli antociani ed i flavonoidi totali possiamo concludere che essi si mantengono costanti nelle due annate e le notevoli differenze riscontrate tra i diversi vini sono imputabili a differenze di tipo genetico tra le cultivar. La Barbera è caratterizzata da un colore più intenso (dovuto alla presenza di un tenore superiore in antociani), mentre il Nebbiolo, più scarico di colore, è contrassegnato da un contenuto superiore in flavonoidi totali. I valori isotopici dei vini rientrano nelle media dei valori individuati nelle banche dati per la zona in esame.

Tabella 4.9 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	R	¹⁸ O/ ¹⁶ O δ ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
NE02-12	13,16	100,61	128,73	2,559	3,120
BA02-12	13,33	100,10	129,27	2,583	1,950
NE02-13	13,41	99,58	128,58	2,582	-0,830
BA02-13	13,13	99,38	127,81	2,572	-0,513

4.5.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici

Per meglio evidenziare le informazioni sulle differenze tra i campioni contenute nei dati delle analisi chimiche ed isotopiche, si è eseguita l'analisi PCA.

Se esaminiamo lo score plot ottenuto attraverso l'analisi delle componenti principali (Figura 4.102), possiamo notare come le due tipologie di vino si separino nettamente sulla PC1. L'annata di produzione, invece, è discriminata dalla PC 2.

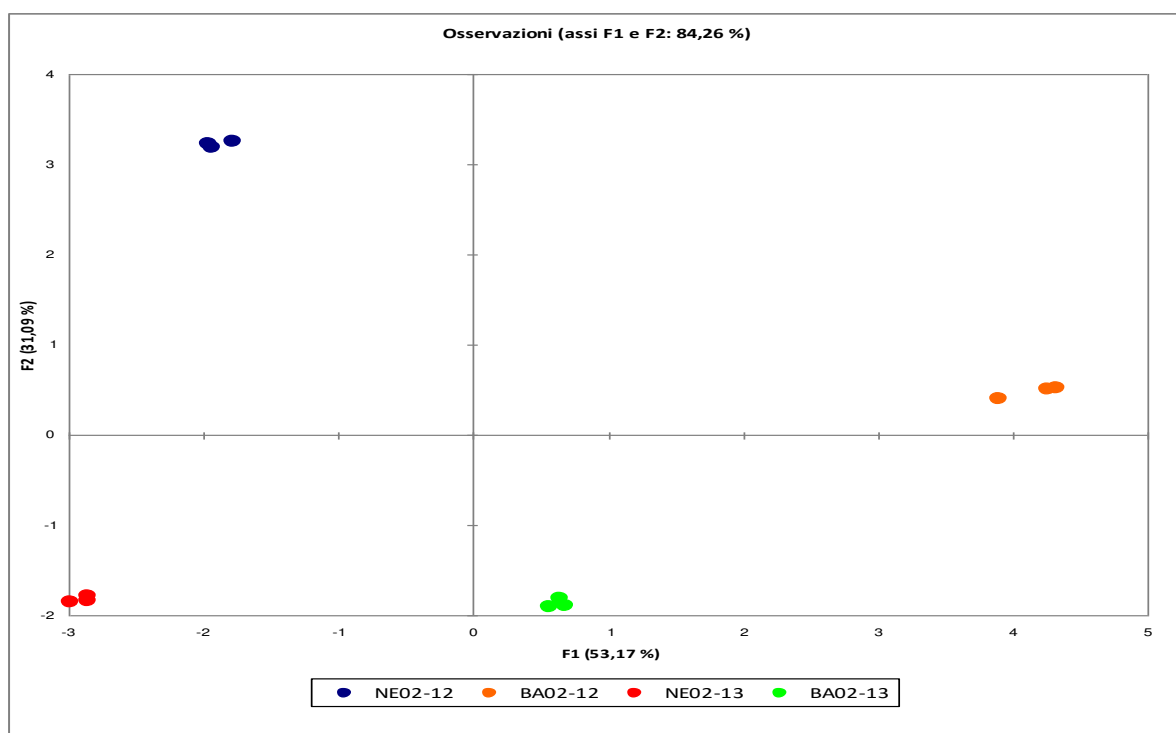


Figura 4.102 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

Dal confronto con il loading-plot (Figura 4.103), possiamo mettere in luce i fattori maggiormente influenti sulla separazione dei campioni. I dati relativi al colore ed ai flavonoidi totali si differenziano nettamente tra le due tipologie (PC1), mentre l'acidità e i valori isotopici del $(D/H)_I$ e $^{18}O/^{16}O$ sono le variabili maggiormente influenzate dall'annata (PC 2).

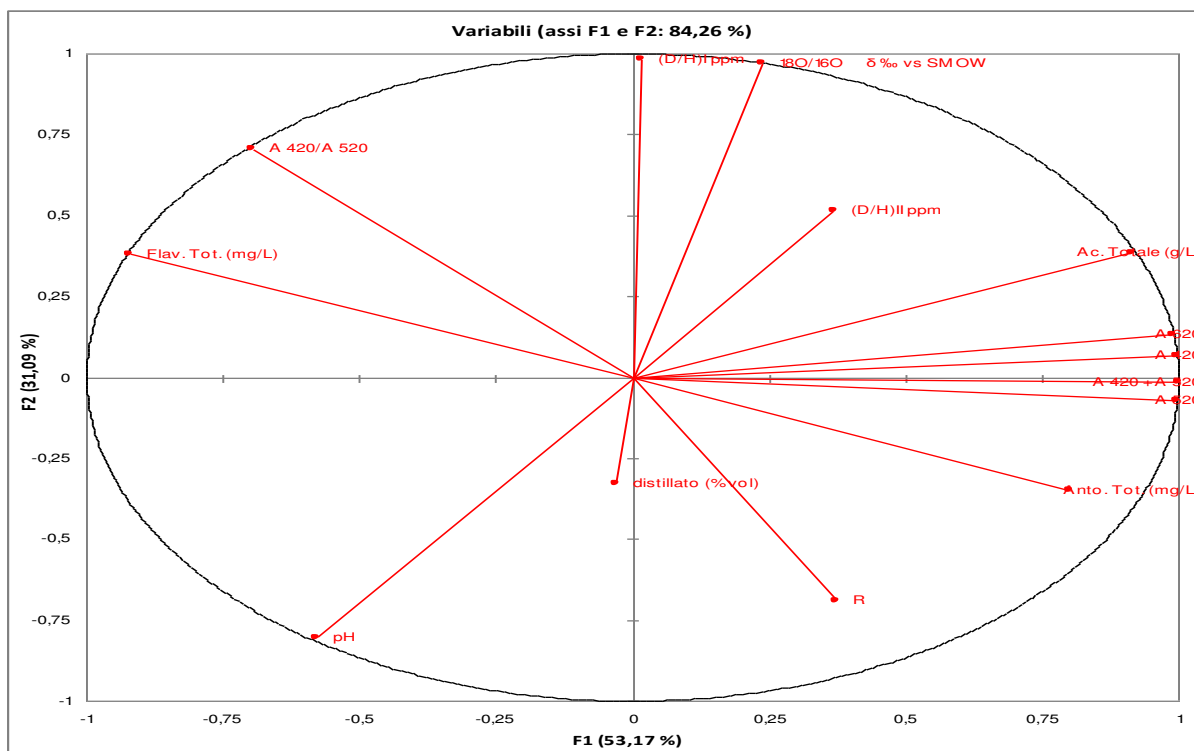


Figura 4.103 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

4.5.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti del vitigno e dell'annata di produzione.

Dalla figura 4.104 si può vedere come le prime due componenti principali, che spiegano il 76.36% della varianza totale, siano in grado di raggruppare i campioni in base al vitigno e all'annata di provenienza. Il Barbera si trova con valore negativo su PC 1 mentre il Nebbiolo si trova tendenzialmente con valore positivo. Si osserva inoltre, una netta separazione dei campioni di Nebbiolo su PC 1 per quanto riguarda l'annata di produzione. La PC 2 separa, invece, i campioni di Barbera rispetto all'annata.

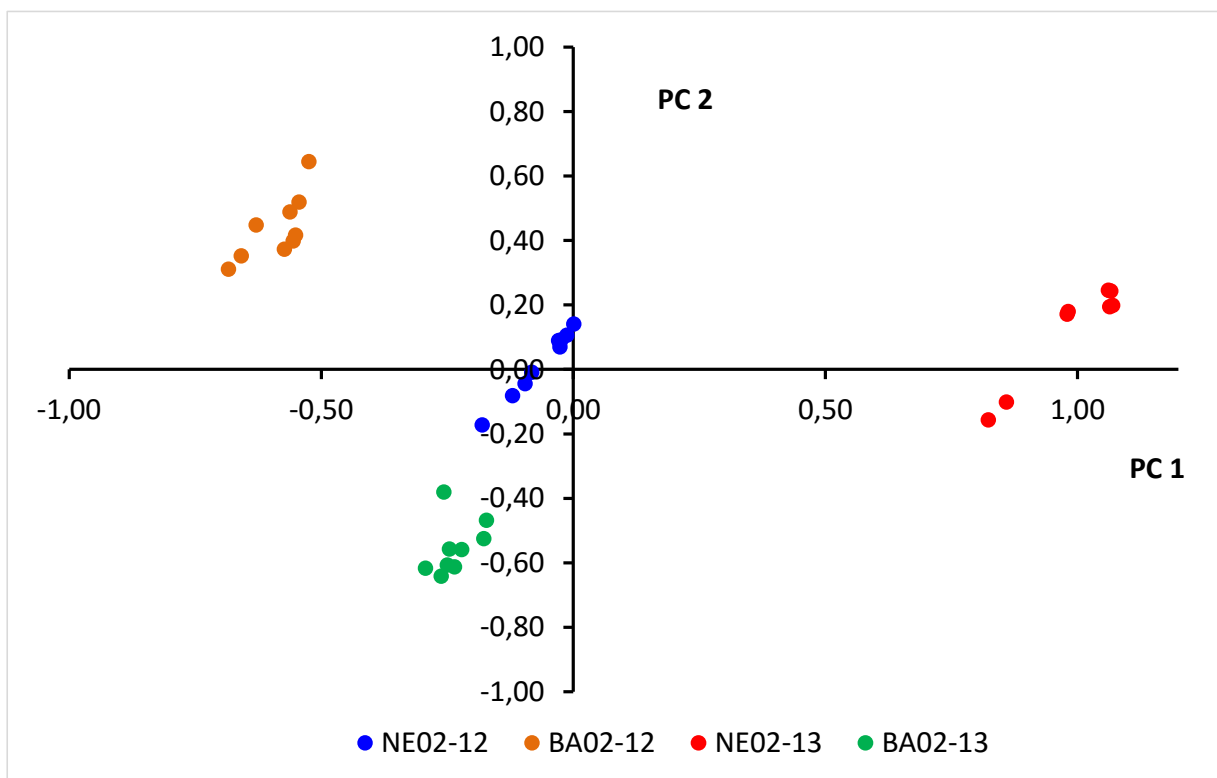


Figura 4.104 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0.5 a 10 ppm.

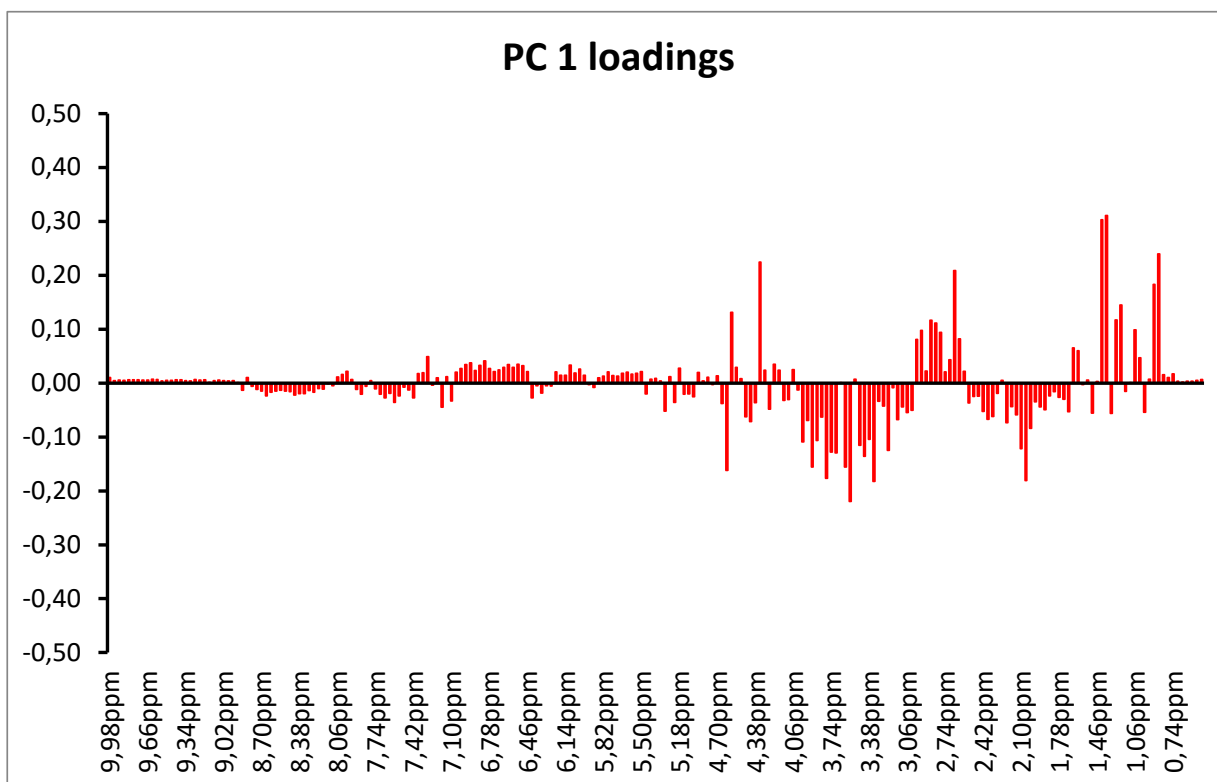


Figura 4.105 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro intero

La figura 4.105 riporta il grafico dei pesi per la PC 1, da cui si possono evidenziare quali siano le zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC. Conoscendo le zone spettrali in cui cadono i segnali NMR dei diversi metaboliti del vino, si può risalire a quali siano quelli maggiormente implicati nella separazione dei vini osservata.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 1 con peso positivo: l'etanolo (1.04, 1.29, 3.50, 3.78 ppm), l'acido succinico (2.66 ppm), l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'acido lattico (1.38, 1.42, 4.34 ppm), l'acido taratarico (4.60 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.13, 6.84, 6.93, 6.99, 7.02 ppm) e il 2-feniletanolo (2.85, 3.82, 7.30, 7.37 ppm).

Al contrario contribuiscono a PC 1 con peso negativo: l'acido acetico (2.06 ppm), la prolina (1.98, 2.06, 2.34, 3.58, 4.14 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (3.90, 6.41, 7.18, 7.66 ppm) e l'arabinosio (3.83-4, 4.49, 5.21, 5.28 ppm).

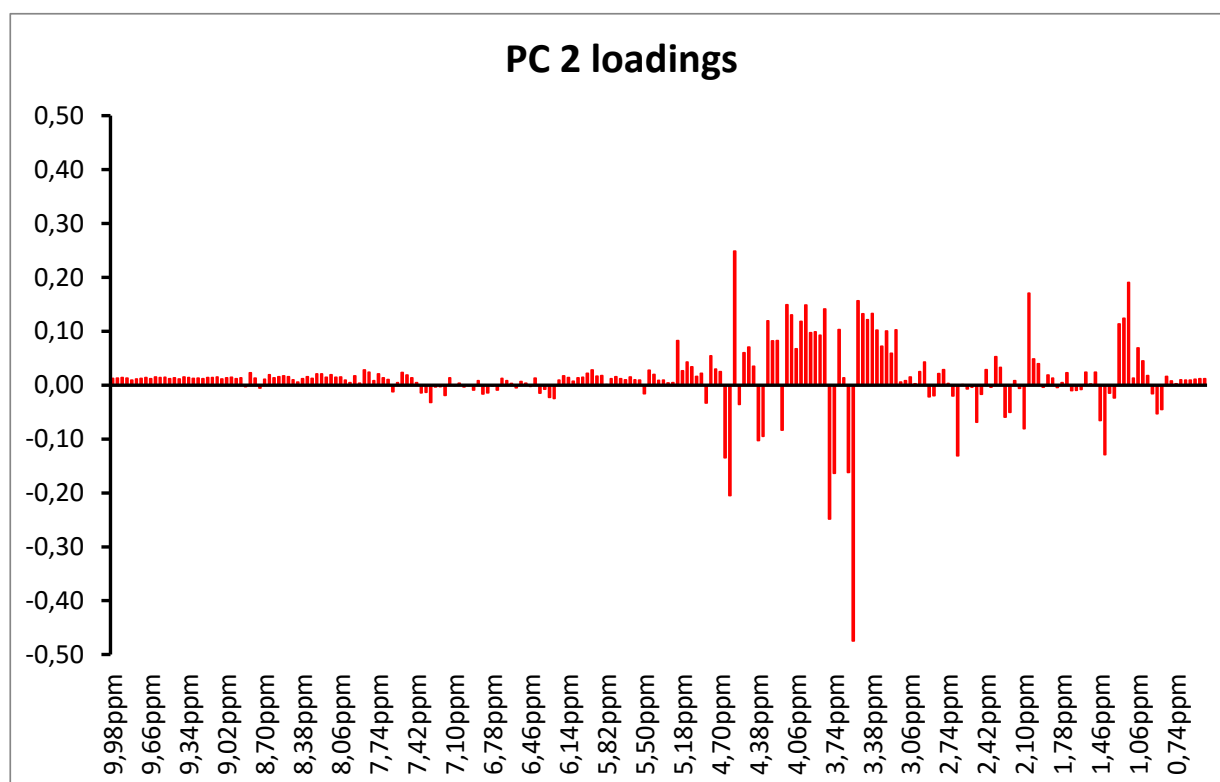


Figura 4.106 Grafico dei pesi per PC 2 considerando l'intero spettro.

La figura 4.106 riporta il grafico dei pesi per la PC 2, in relazione alle zone dello spettro NMR che influiscono maggiormente su questa PC.

In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 2 con peso positivo: l'acido acetico (2.06 ppm), la treonina (1.32, 4.30 ppm), l'etilacetato (1.24, 2.07, 4.17 ppm), il D-(-)-ribosio (3.82, 4.08, 4.19, 4.92, 5.22 ppm), l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm).

Contribuiscono, invece, a PC 2 con peso negativo: l'acido lattico (1.42, 4.34 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.55, 3.78 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm).

In seguito si è ripetuta l'analisi statistica dei dati considerando l'intervallo spettrale da 5 a 10 ppm. I metaboliti che hanno segnali NMR in questa zona appartengono alla famiglia dei metaboliti secondari della vite tra cui flavoni, antociani, tannini e polifenoli. L'intera classe di metaboliti secondari è importante per la separazione dei vini osservata.

In figura 4.107 si può vedere come le prime due componenti principali, che spiegano il 78.84% della varianza totale, siano in grado di raggruppare i campioni in base al vitigno e all'annata di provenienza. Per quanto riguarda il vitigno, la Barbera si trova con valore positivo su PC 1 mentre il Nebbiolo si trova con valore negativo. Si può anche osservare, una parziale separazione dei campioni di Barbera su PC 1 in funzione dell'annata di produzione. La PC 2 separa, invece, i campioni rispetto all'annata di produzione per questa parte dello spettro.

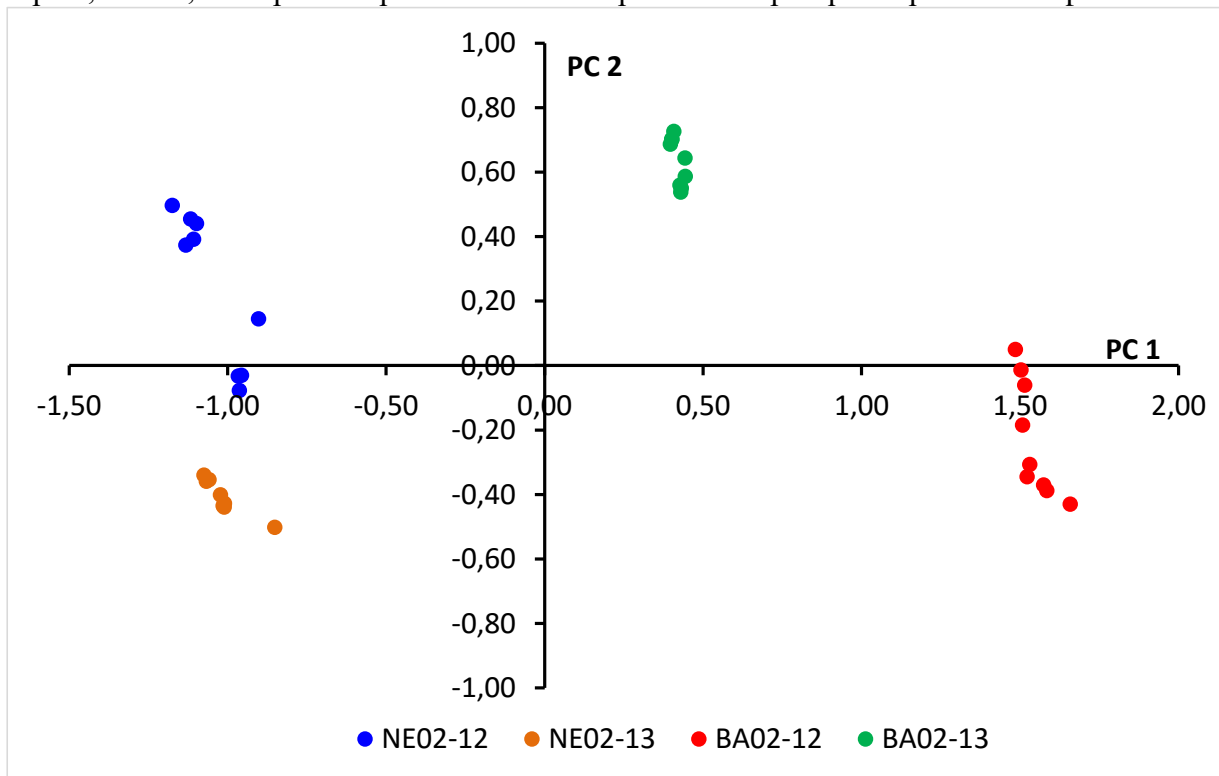


Figura 4.107 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

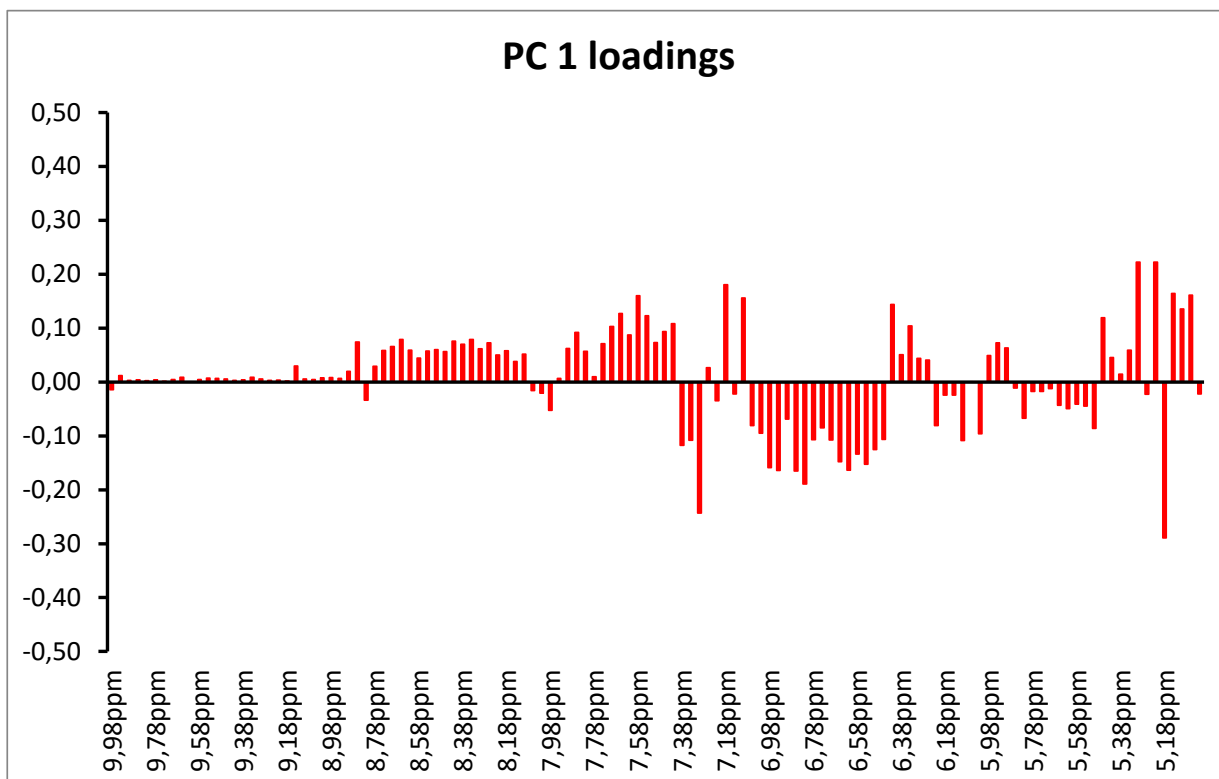


Figura 4.108 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro da 5 a 10 ppm.

In questa parte dello spettro (Figura 4.108) danno maggior peso positivo i seguenti metaboliti: l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm), mentre con peso negativo sono: la (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), il D- mannosio (5.16 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm).

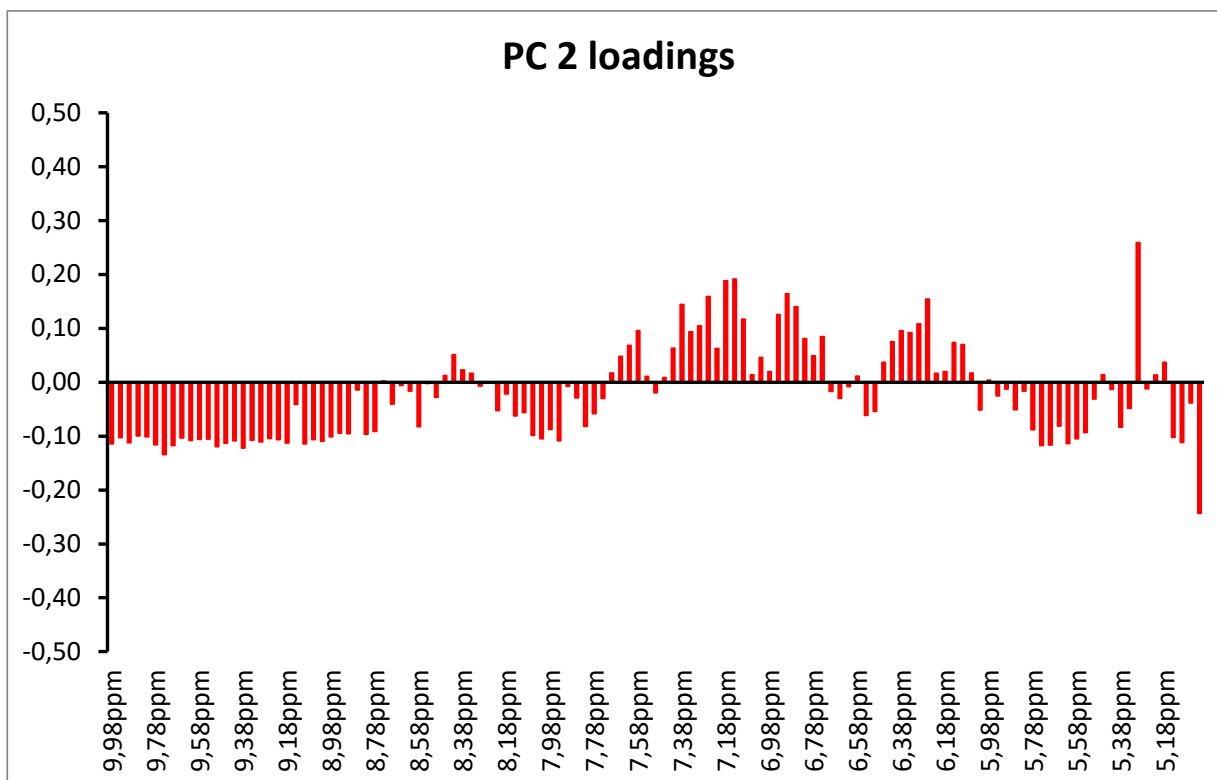


Figura 4.109 Grafico dei pesi per PC 2 considerando lo spettro da 5 a 10 ppm.

La figura 4.109 riporta il grafico dei pesi per la PC 2. In figura sono evidenziate le zone dello spettro NMR che hanno peso maggiore su questa PC che permettono di risalire ai metaboliti più importanti per la separazione dei campioni. In particolare si può notare che contribuiscono alla definizione di PC 2 con peso positivo: l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), la (+)-catechina idrato (6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.84, 6.93, 6.99 ppm). Con peso negativo: la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm), il saccarosio (5.39 ppm). Si trovano, inoltre, anche una serie di segnali da 8.1 a 8.9 ppm che originano dalle forme oligomere dei metaboliti secondari.

4.5.4 Analisi ¹HNMR per la valutazione degli effetti dovuti all'invecchiamento.

Vino Nebbiolo

Il grafico delle proiezioni (Figura 4.110) mostra come la PC 1, che spiega il 71.72 % della varianza, sia in grado di separare i campioni di Nebbiolo delle due annate di analisi. La PC 1 separa molto bene i campioni analizzati nel 2013, a valori negativi, da quelli delle analisi effettuate un anno dopo in condizioni di conservazione standard a valori positivi. Non si osservano separazioni per la seconda componente principale.

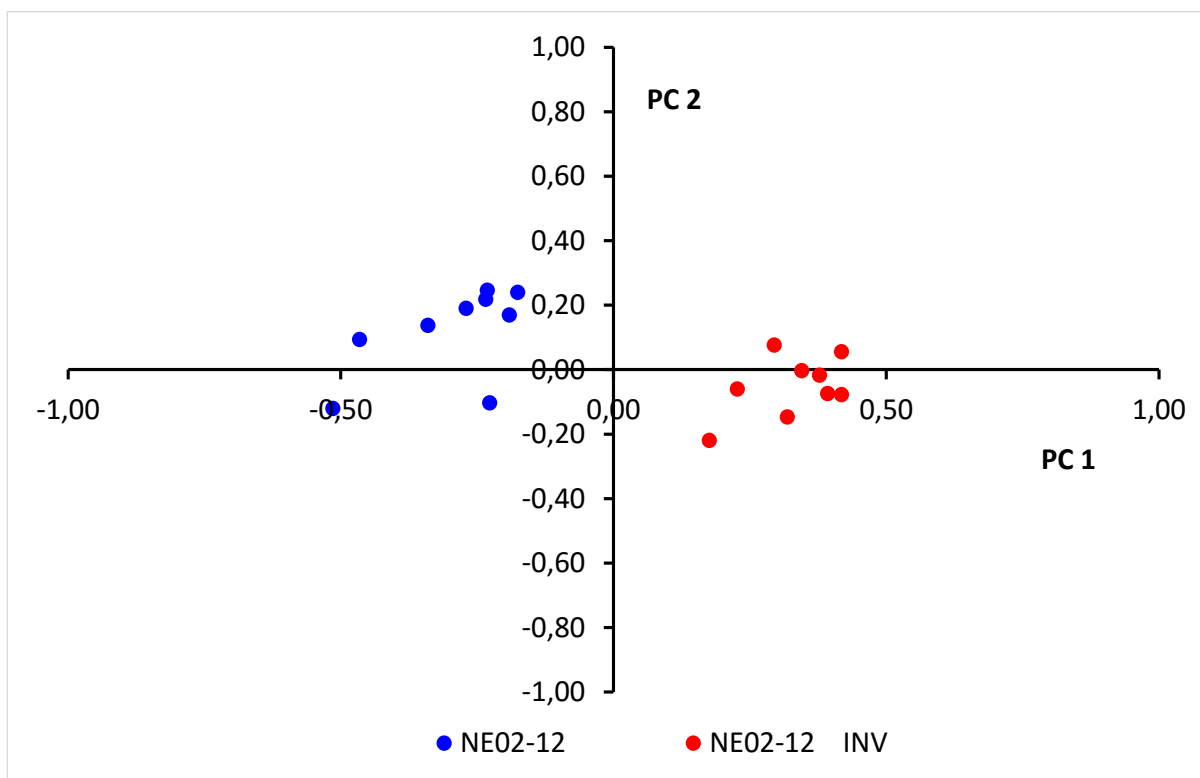


Figura 4.110 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0.5 a 10 ppm.

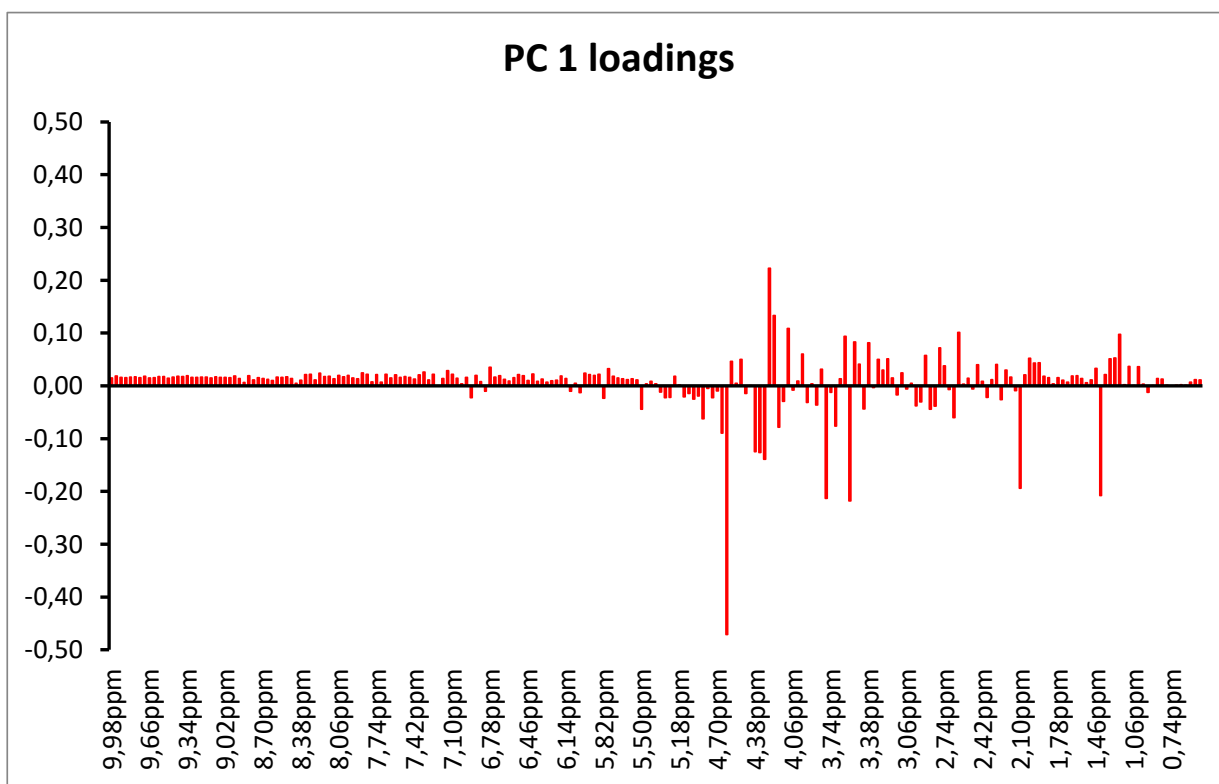


Figura 4.111 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro intero

In figura. 4.111 è riportato il grafico dei pesi per PC 1. Da questo grafico si può vedere che i metaboliti con maggior peso positivo su PC 1 sono: l'etilacetato (1.24, 2.07, 4.17 ppm), l'acido

malico (1.24, 2.06, 4.10 ppm), la treonina (1.34, 4.26 ppm). Invece tra i maggiori metaboliti con peso negativo si possono osservare l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.55, 3.78 ppm), l'acido tartarico (4.60), l'acido lattico (1.42, 4.34 ppm), il saccarosio (4.10, 4.18, 5.38 ppm), l'acido lattico (1.42, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm).

Si è ripetuta l'analisi dei dati nella porzione spettrale da 5 a 10 ppm, per i campioni di vino analizzati dopo l'imbottigliamento e dopo un anno di conservazione per verificare il comportamento dei campioni in questa parte dello spettro.

Esiste una separazione evidente lungo la PC 1 (Figura 4.112) tra le analisi effettuate nei due anni. In questo caso le prime due componenti principali spiegano il 76.13% di varianza totale. I due gruppi di campioni si differenziano in base alla prima ed alla seconda componente principale. I campioni di vino Nebbiolo del primo anno si posizionano a valori negativi di PC1 e tendenzialmente positivi su PC 2 mentre quelli analizzati dopo un anno si trovano a valori positivi di PC1 e negativi di PC 2.

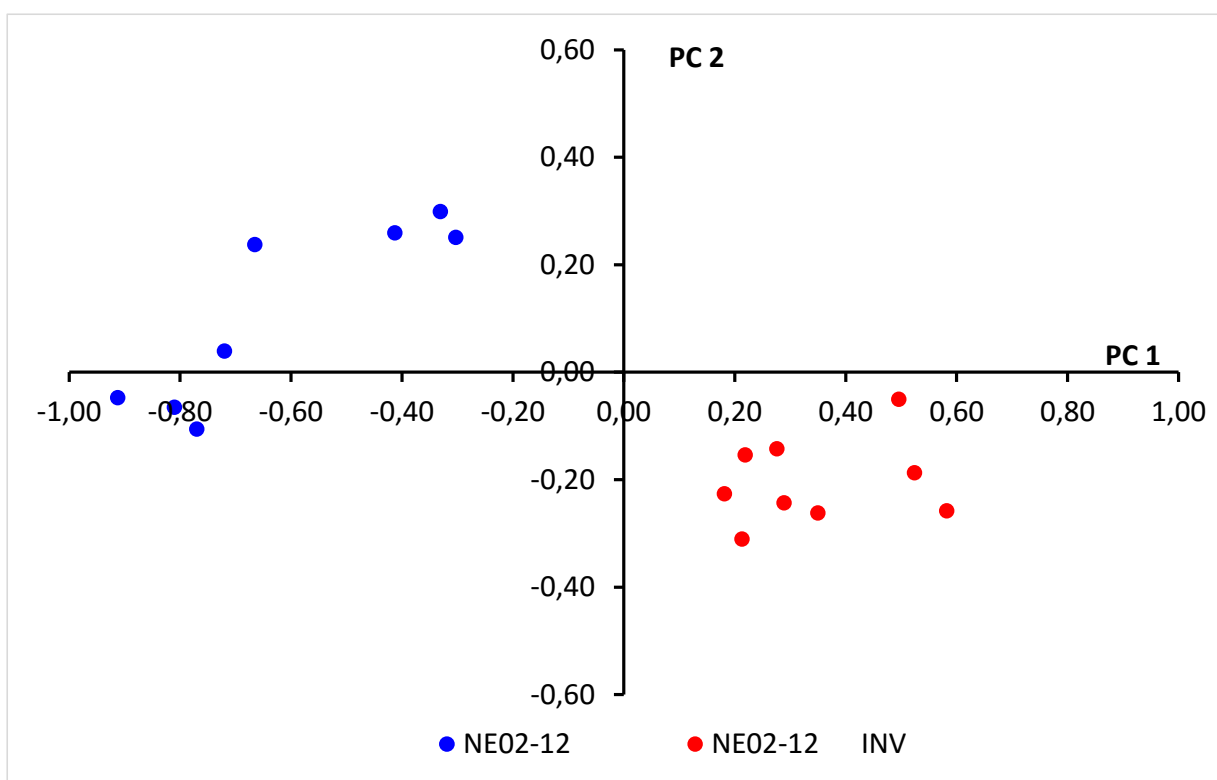


Figura 4.112 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

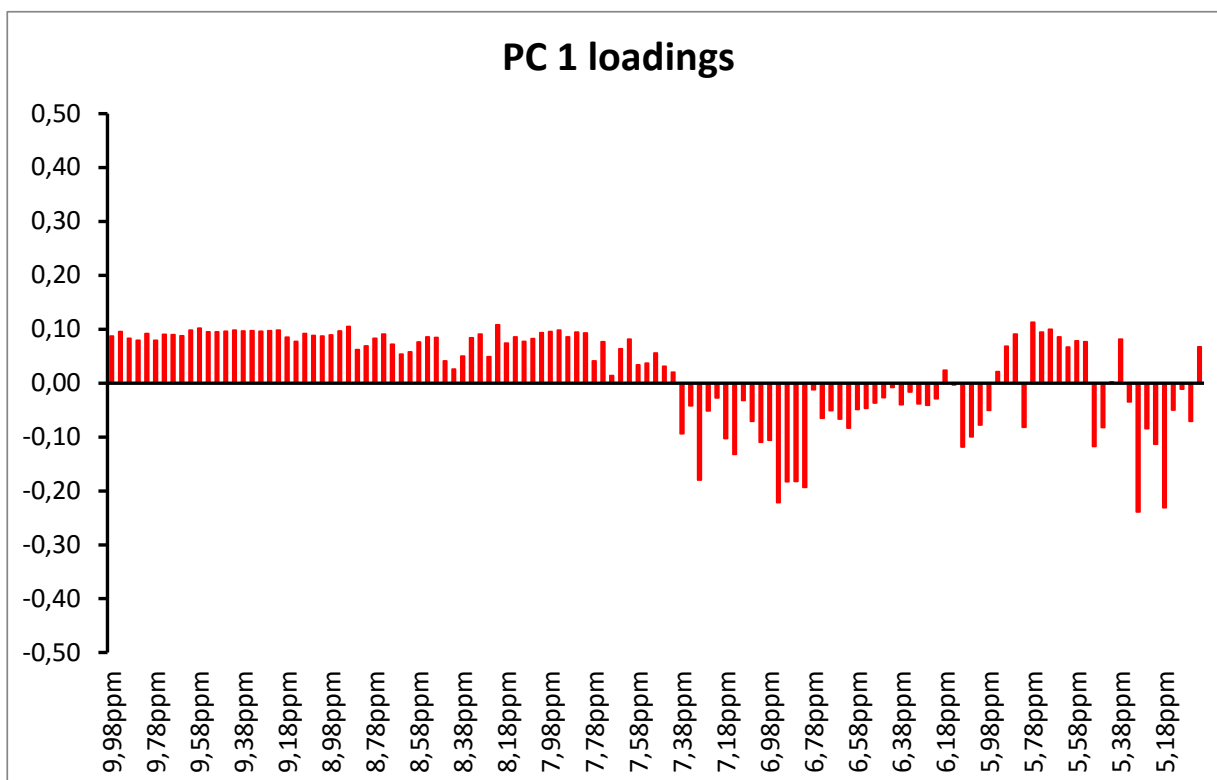


Figura 4.113 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro da 5 a 10 ppm.

Per la prima componente principale dal grafico dei pesi, (Figura 4.113) si evidenzia il contributo con peso positivo di: il saccarosio (5.39 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm). Invece con peso negativo abbiamo: l'arginina (6.70, 7.26 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acido siringico (7.38 ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm).

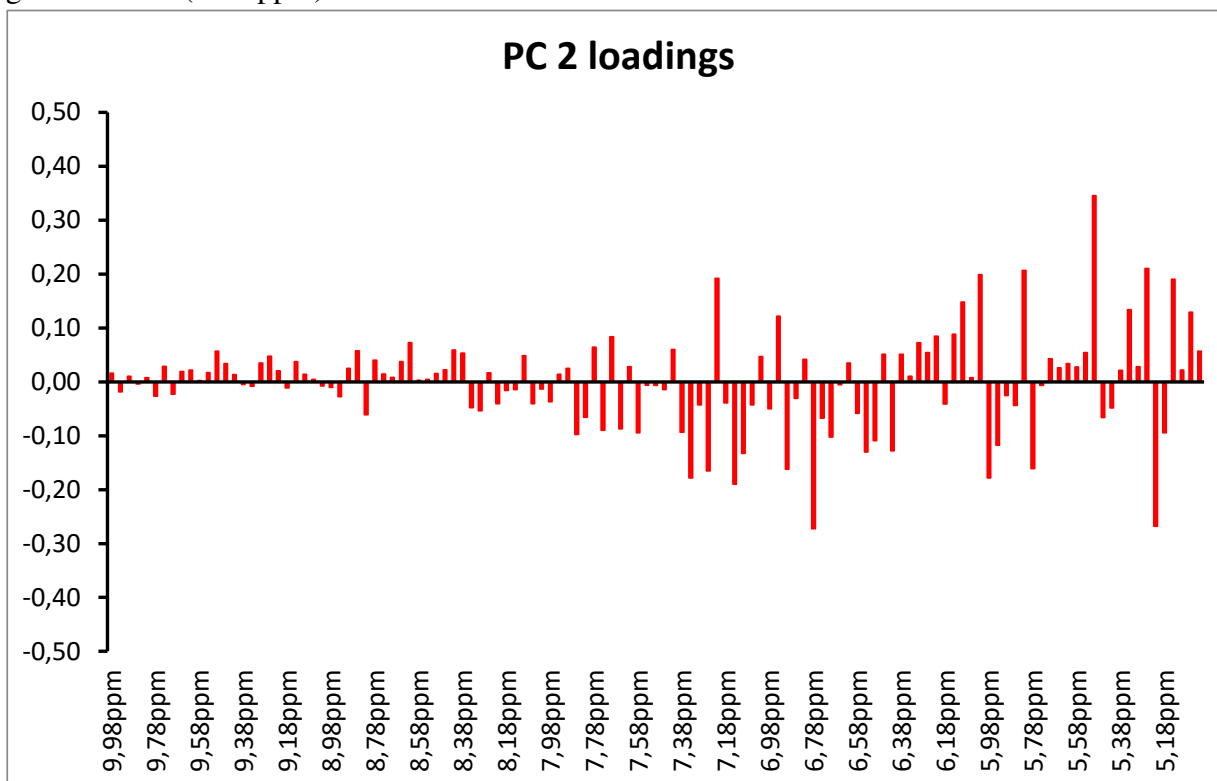


Figura 4.114 Grafico dei pesi per PC 2 considerando lo spettro da 5 a 10 ppm.

Per la seconda componente principale (Figura 4.114) i metaboliti con il maggior peso positivo sono: l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm). Con peso negativo: l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), la tirosina (6.87, 7.18), l'acido gallico (7.15 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm).

Vino Barbera

In questo grafico (Figura 4.115) delle proiezioni si mette in luce come la PC 1, che spiega il 45 % della varianza, sia in grado di separare i campioni di Barbera delle due annate di analisi. I campioni analizzati nel 2013 si trovano a valori negativi, mentre quelli delle analisi effettuate un anno dopo in condizioni di conservazione standard a valori positivi.

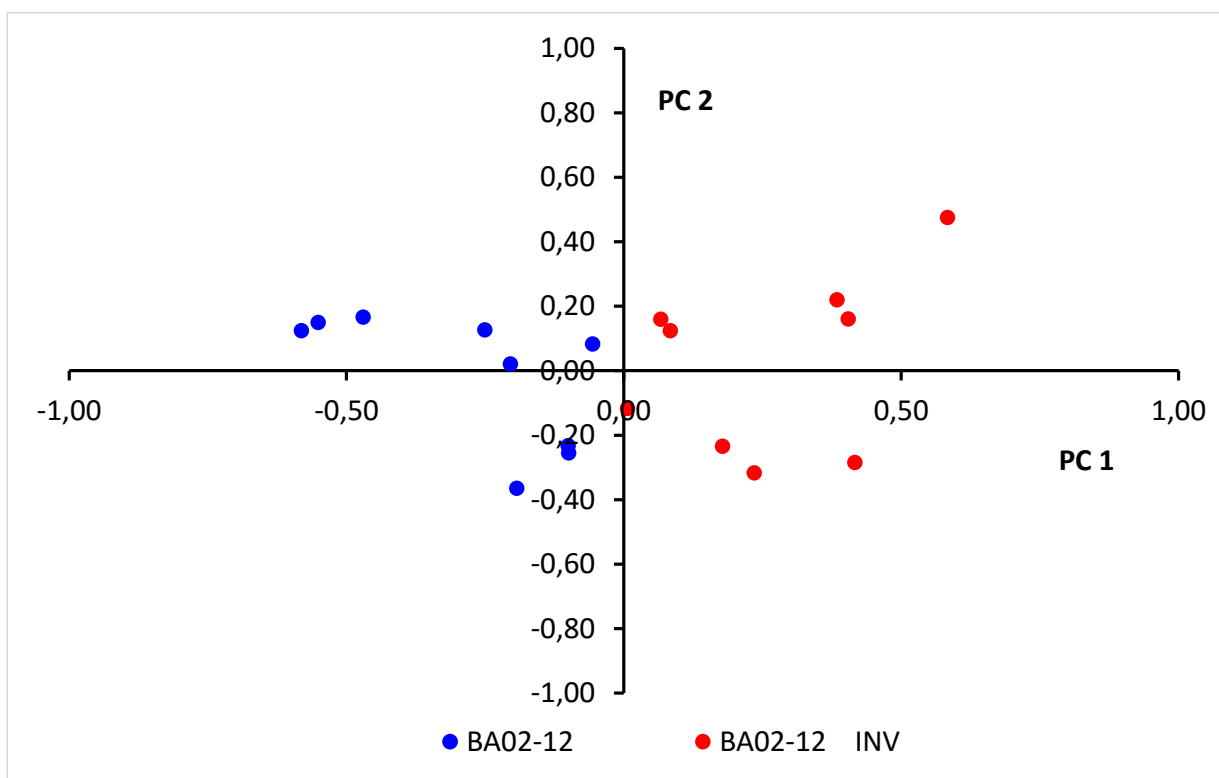


Figura 4.115 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0.5 a 10 ppm.

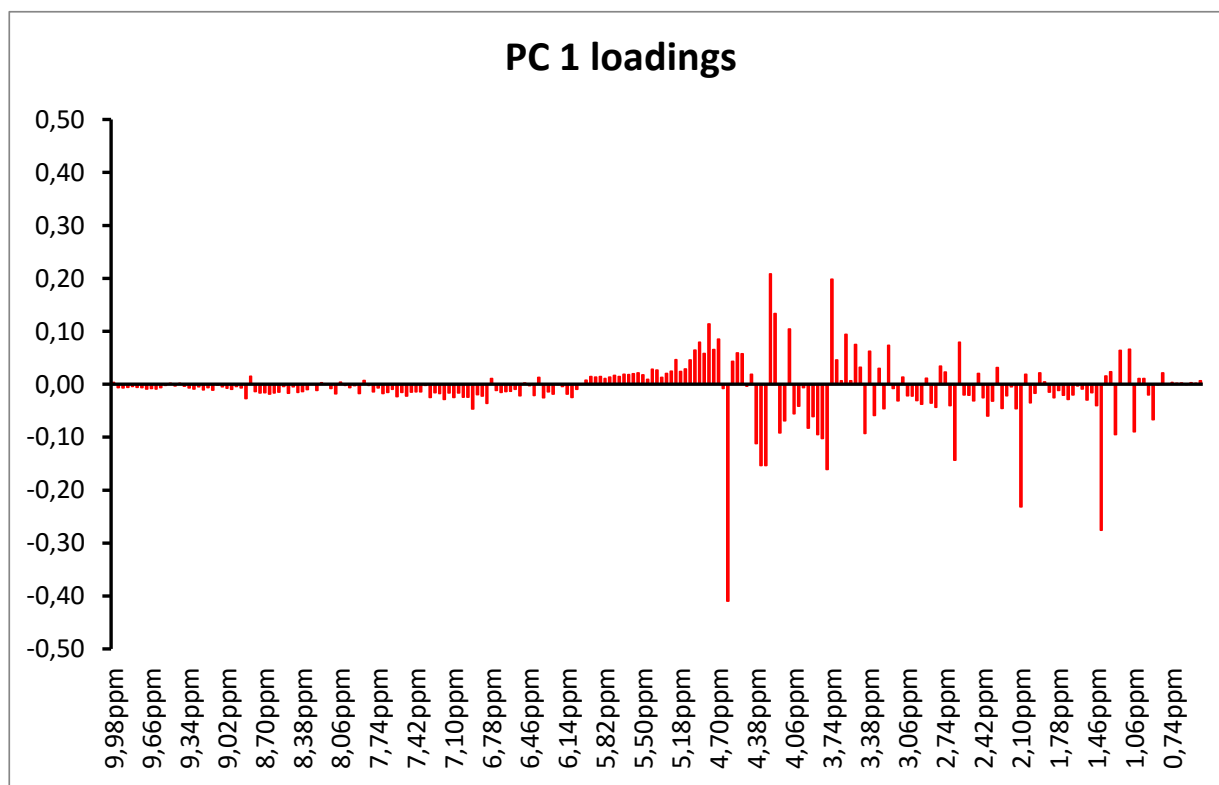


Figura 4.116 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro intero

Da questa figura (Figura 4.116) si evidenziano i metaboliti che influenzano con peso positivo su PC 1 e sono: l'etilacetato (1.24, 2.07, 4.17 ppm), la treonina (1.32, 4.26 ppm), e con peso negativo: l'acido succinico(2.65ppm), l'acido piruvico (2.36 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm), l'acido lattico (1.42, 4.34 ppm), l'etanolo (1.04, 1.30, 3.50, 3.78 ppm).

L'analisi statistica dei dati è stata ripetuta considerando solo la zona dello spettro NMR da 5 a 10 ppm.

Di seguito (Figura 4.117) si riporta la separazione dei campioni tra le analisi effettuate nei due anni per il vino Barbera. Le prime due componenti principali spiegano il 59.88% di varianza totale. I due gruppi di campioni si differenziano in base ad entrambe le componenti principali. Considerando la PC 1 i due set di campioni non sono molto separati; i campioni invecchiati si trovano a valori più positivi. Rispetto alla PC 2, invece, i campioni di vino Barbera del primo anno si posizionano a valori positivi mentre quelli analizzati dopo un anno di conservazione si trovano a valori negativi.

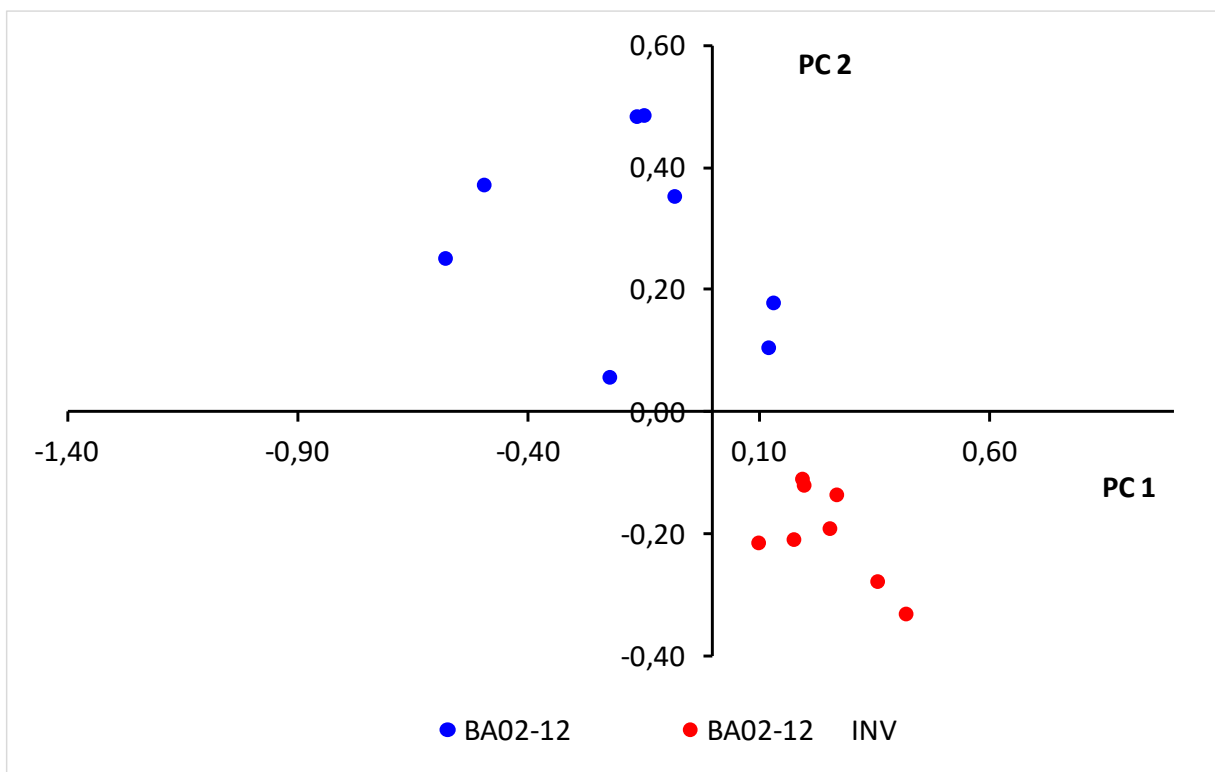


Figura 4.117 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

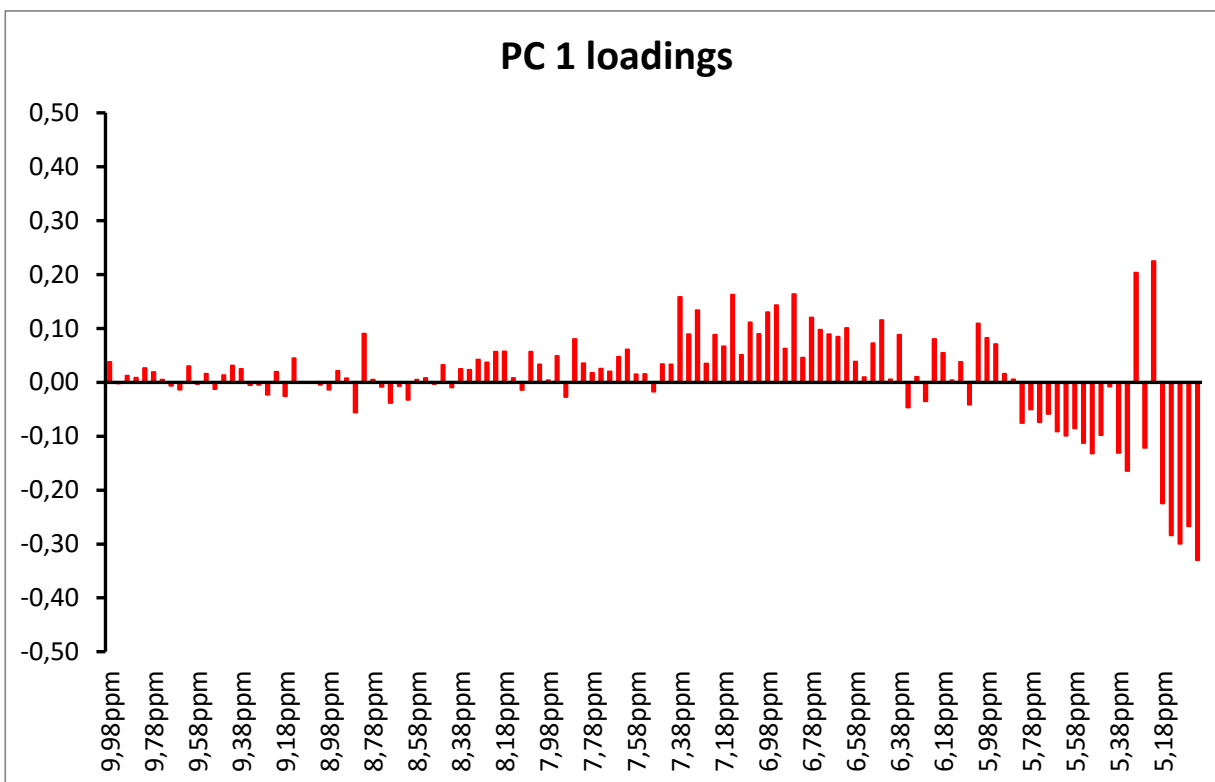


Figura 4.118 Grafico dei pesi per PC 1 considerando lo spettro da 5 a 10 ppm.

I metaboliti (Figura 4.118) con peso positivo su PC 1 sono: l'acido galatturonico (5.30 ppm), il D-ribosio (5.22 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm), il trans-resveratrolo (6.31, 6.91, 6.96, 7.14, 7.50 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.13, 6.84, 6.93, 6.99, 7.02 ppm), l'acido benzoico (7.54, 7.68, 8.02 ppm), la quercetina (6.30, 6.52, 7.00, 7.65, 7.74 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm). Mentre tra quelli con peso negativo riconosciamo solamente lo D-(+)-xilosio (5.17 ppm), e il saccarosio (5.39 ppm).

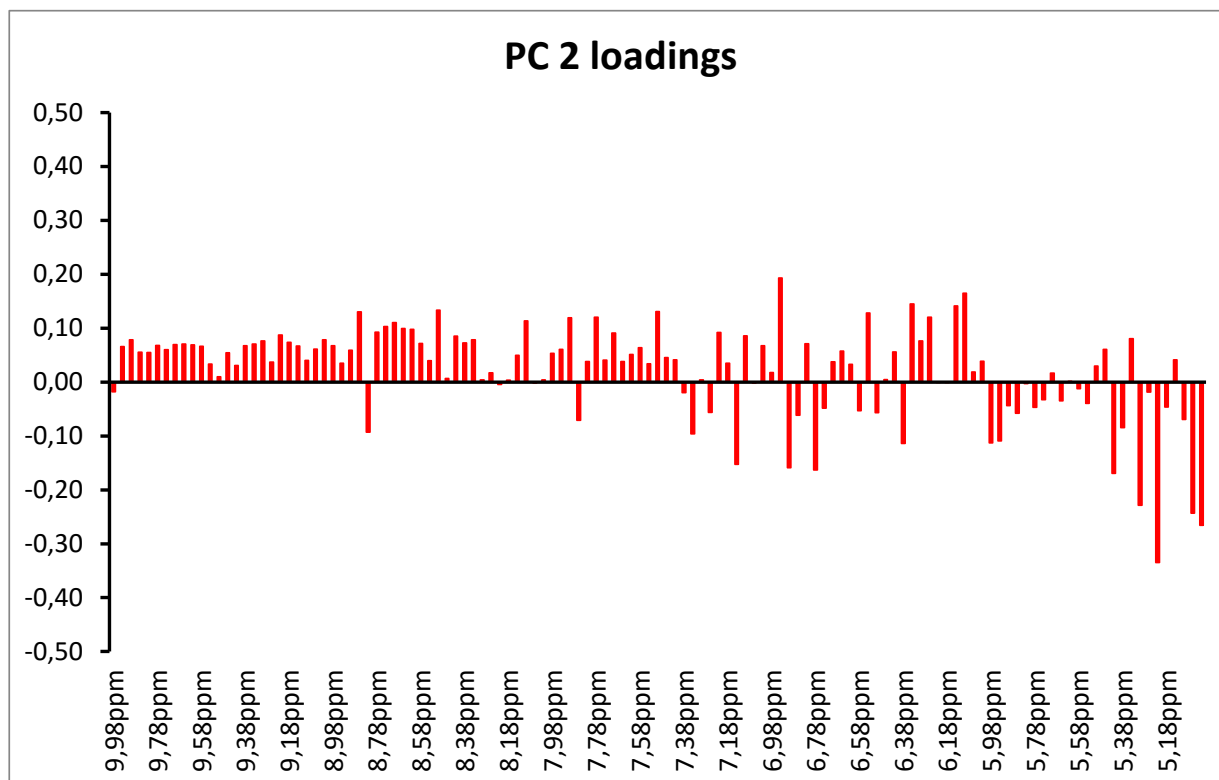


Figura 4.119 Grafico dei pesi per PC2 considerando lo spettro da 5 a 10 ppm.

In figura 4.119 si mostrano i pesi dei principali metaboliti per la PC 2. I metaboliti implicati nella separazione dei campioni con peso positivo sono: l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm), l'epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm), la quercetina (7.02, 7.66, 7.74 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.13, 6.84, 6.93, 6.99, 7.02 ppm). Con peso negativo troviamo invece: l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'acido fumarico (6.76 6.74 ppm), il saccarosio (5.38 ppm), lo D-(+)-xilosio (5.17 ppm).

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

Effetto zona di produzione

5.1 Confronto zone di produzione (Est Piemonte – Ovest Piemonte) su vino Dolcetto

Di seguito, si è voluto analizzare l'effetto della zona di provenienza dei vini, prendendo in considerazione il vitigno Dolcetto di due zone della regione Piemonte, una nella provincia di Torino (DO02-13) e l'altra nella provincia di Alessandria (DO01-13), distanti circa cento chilometri tra loro e orientate rispettivamente ad Ovest ed a Est.

5.1.1 Analisi chimiche ed isotopiche

Le tabelle 5.1 e 5.2 riportano i dati delle analisi chimiche ed isotopiche dei vini (appartenenti alla stessa annata di produzione 2013), ma prodotti nelle due diverse zone.

Per quanto riguarda le analisi di routine, possiamo evidenziare come il pH e l'alcol siano maggiori nell'azienda situata ad Est (DO01-13), rispetto a quella situata ad Ovest. Analoghe considerazioni si possono fare per gli antociani ed i flavonoidi totali delle due zone. Con andamento contrario risultano le misure per il colore per le rispettive zone. Queste ultime differenze riscontrate tra i due vini sono da attribuire al diverso grado di maturazione dell'uva. Il Dolcetto DO02-13, malgrado abbia un tenore inferiore in antociani e flavonoidi totali, è caratterizzato da un colore più intenso e ciò è sicuramente dovuto al pH inferiore che sposta l'equilibrio degli antociani verso la forma più intensamente colorata (rosso). I valori isotopici dei vini rientrano nelle media dei valori individuati nelle banche dati per le zone in esame.

Tabella 5.1 Analisi chimiche e spettrofotometriche

VINI	pH	Ac. Totale (g/L)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
DO01-13	3,64	3,87	389	2451	0,275	0,376	0,085	0,733	0,651
DO02-13	3,36	4,04	207	1355	0,306	0,481	0,091	0,636	0,788

Tabella 5.2 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	R	¹⁸ O/ ¹⁶ O ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
DO01-13	14,29	98,82	132,92	2,690	3,667
DO02-13	12,56	98,56	128,83	2,614	1,896

5.1.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici

La proiezione dello score plot ottenuto attraverso l'analisi delle componenti principali, mostra come i due vini si separino nettamente sulla PC1. Il Dolcetto1 si trova a valori negativi e si contrappone a quello della zona due a valori positivi. La variabilità spiegata dalla sola PC 1 è del 96.8%.

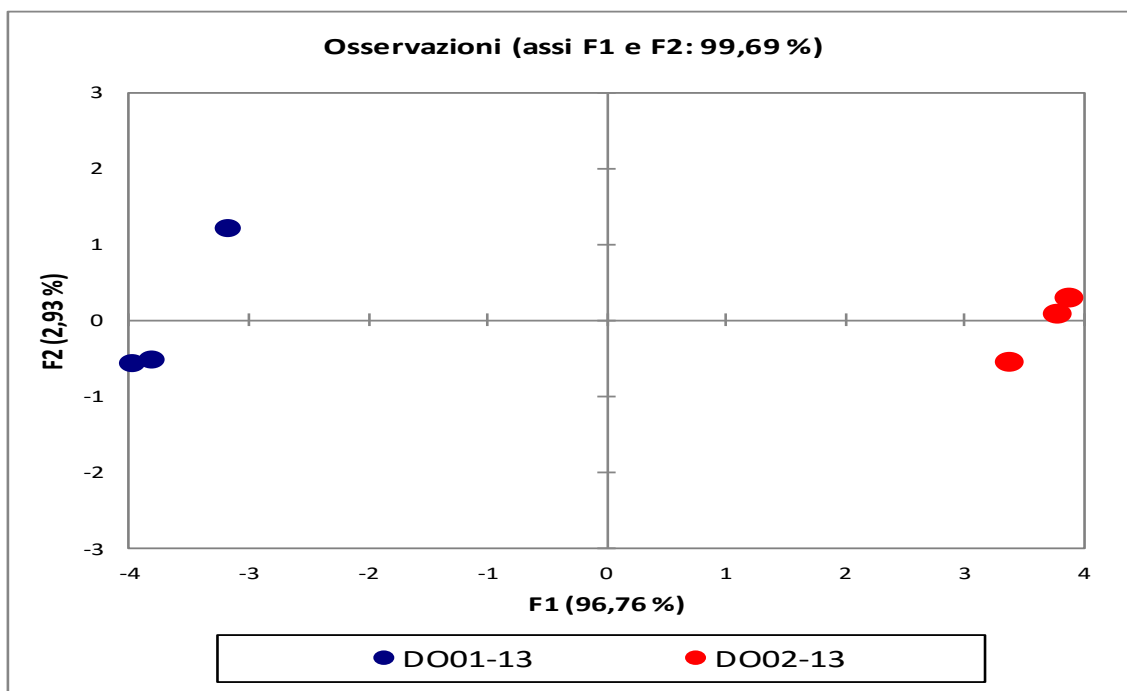


Figura 5.1 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

I dati del loadings-plot indicano i fattori maggiormente influenti sulla separazione dei due gruppi di campioni. Hanno peso negativo su PC 1 gli antociani, i flavonoidi totali ed i valori isotopici del (DH)₁ e ¹⁸O/¹⁶O. A valori positivi sulla PC1 troviamo l'acidità ed il colore.

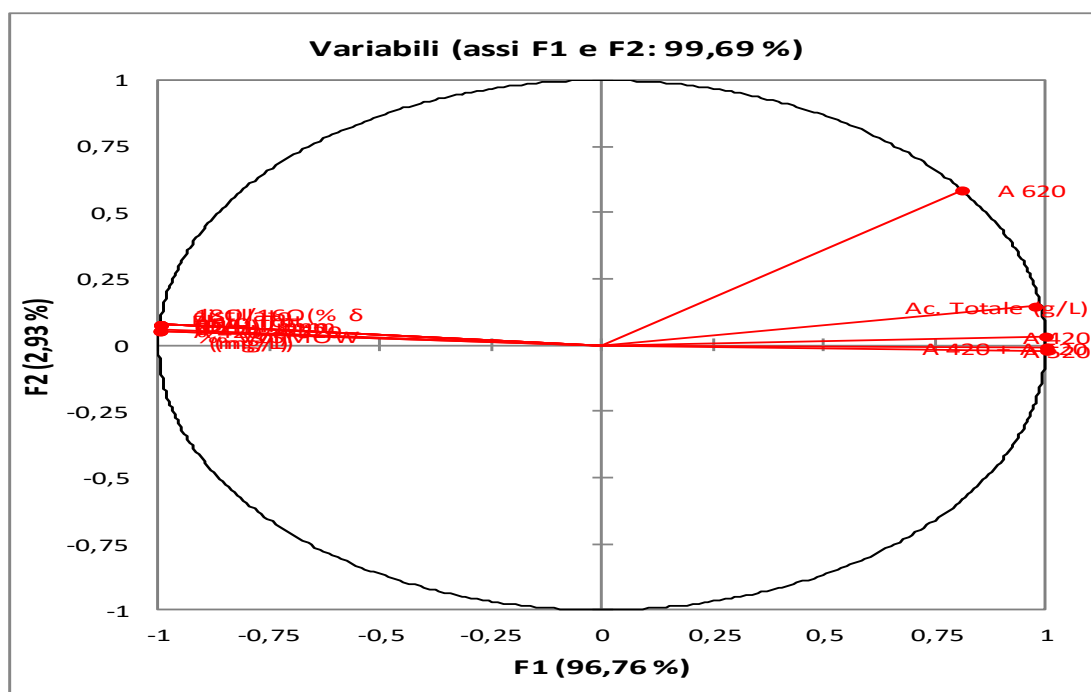


Figura 5.2 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

5.1.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione.

Nella figura 5.3 si può vedere la distribuzione dei campioni lungo le prime due componenti principali (PC 1 e PC 2). La sola PC 1 spiega l'87.91% della varianza totale ed è in grado di

differenziare le due zone di provenienza. Sulla PC 1, infatti, il Dolcetto1 si trova a valori negativi mentre il Dolcetto2 si posiziona a valori positivi.

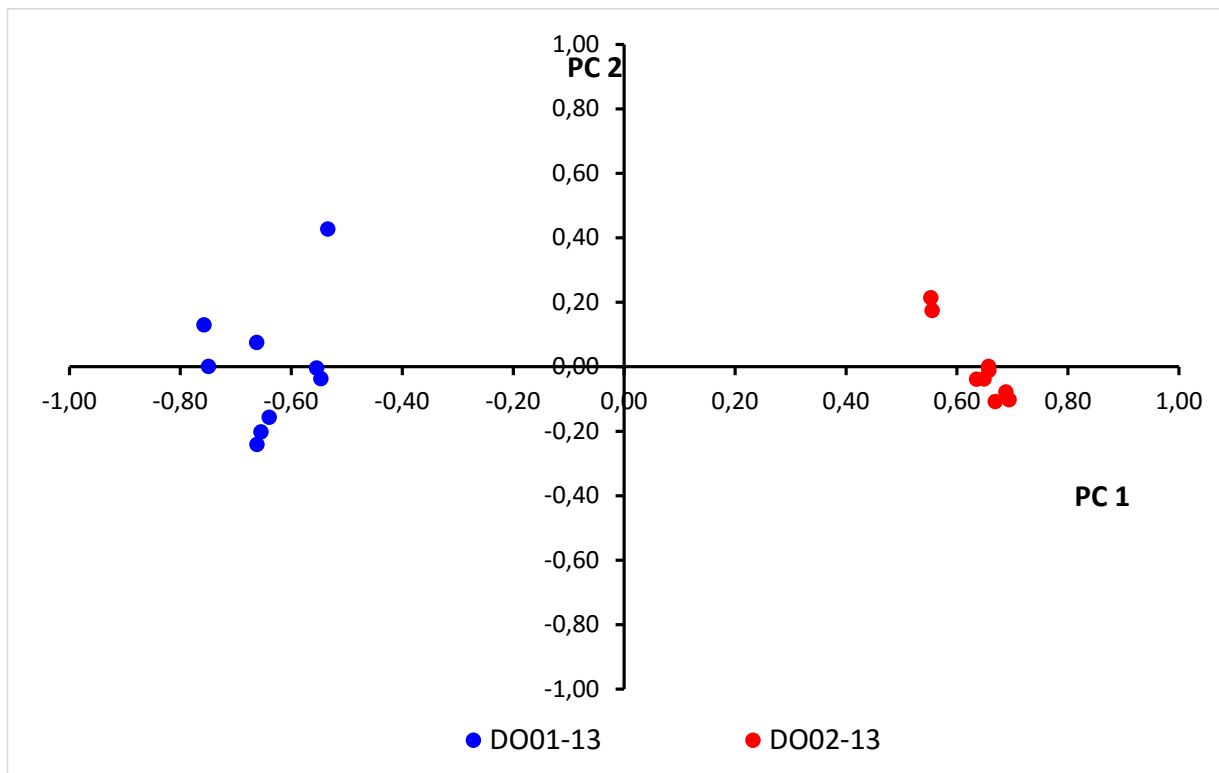


Figura 5.3 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro intero.

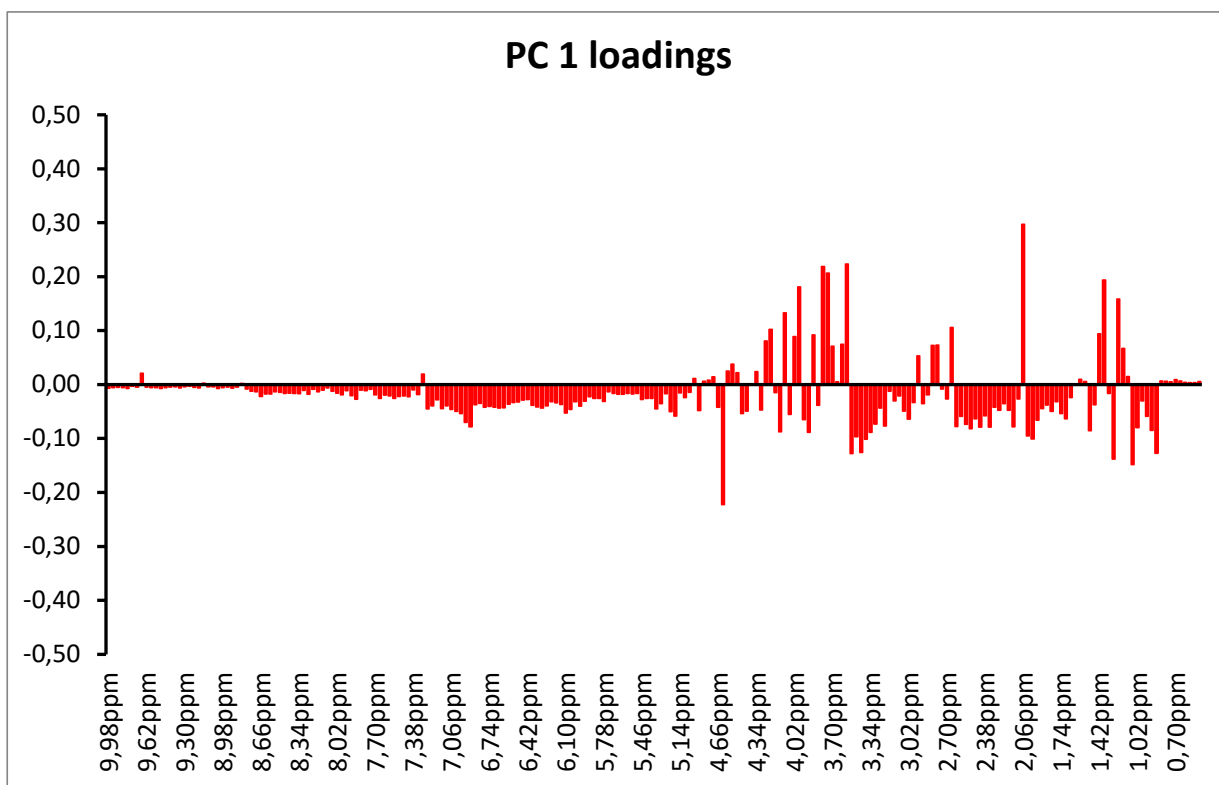


Figura 5.4 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

Dalla figura 5.4 si evidenzia che i metaboliti che influenzano con peso positivo la PC 1 e sono: l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm), e con peso negativo: l'isobutanolo (0.87, 1.73 ppm), il GABA (1.94, 2.49, 3.04 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), l'etanolo (1.04, 1.30, 3.50, 3.78).

L'analisi statistica dei dati spettroscopici è stata ripetuta nella zona spettrale da 5 a 10 ppm.

Anche in questa zona dello spettro, come si nota dalla figura 5.5, la PC 1, che spiega il 91.05% della varianza totale è in grado da sola di separare i vini in base alle due zone di provenienza. Sulla PC 1, infatti, il Dolcetto1 si trova a valori negativi mentre il Dolcetto2 si posiziona a valori positivi come già osservato per l'intero intervallo spettrale.

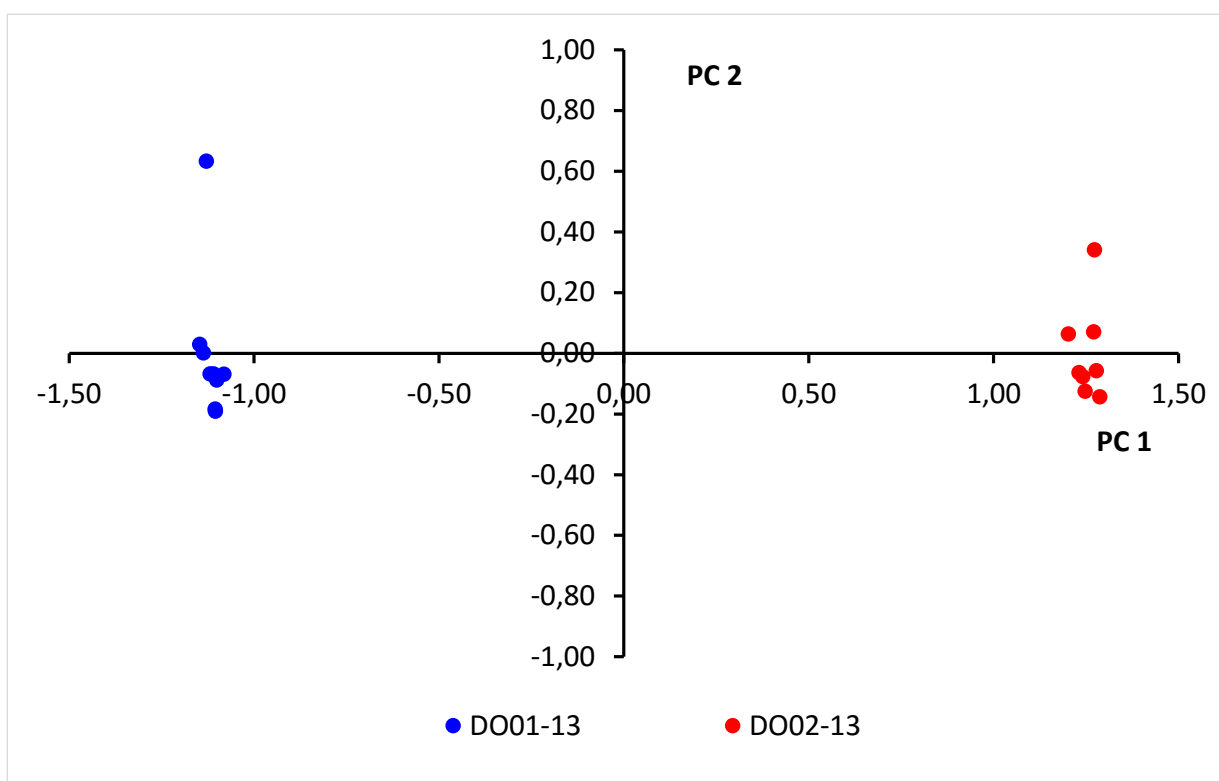


Figura 5.5 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm..

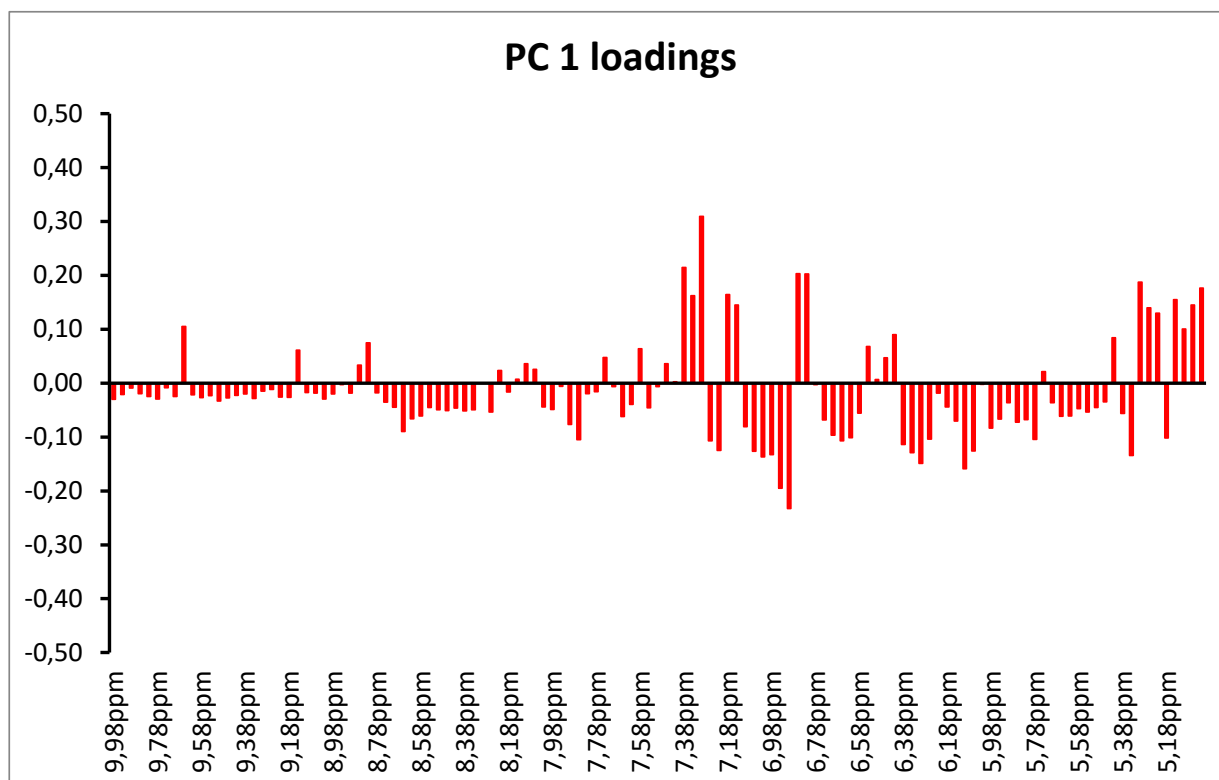


Figura 5.6 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 5.6 riporta il grafico dei pesi da cui si possono individuare i principali metaboliti per la PC 1. Quelli con peso positivo sono: l'acido gallico (7.15 ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm). Con peso negativo abbiamo: l'epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), l'HMF (6.66, 7.53, 9.45 ppm).

5.2 Confronto zone di produzione (Nord Piemonte –Sud Piemonte) su vino Barbera.

In questa area del Piemonte, si è voluto analizzare l'effetto della zona di provenienza, prendendo in considerazione il vitigno Barbera di tre zone diverse, una nella provincia di Torino (Piverone- Ivrea) e le altre due nella provincia di Alessandria (Carpeneto e Rosignano rispettivamente situate a Sud e a Nord della provincia). Quella situata a Sud della provincia di Alessandria dista circa cento chilometri da quella situata più a Nord (Piverone- Ivrea) e tra loro sono orientate rispettivamente a Nord, Nord-ovest e Sud, Est-est.

5.2.1 Analisi chimiche ed isotopiche

Le tabelle 5.3 e 5.4 riportano i dati delle analisi chimiche ed isotopiche dei vini (appartenenti ad una stessa annata quella del 2013), ma prodotti da tre aziende di zone diverse.

Per quanto riguarda le analisi di routine, mostrano come solo il pH della Barbera03 risulta più elevato rispetto agli altri due. La Barbera01 presenta l'acidità totale gli antociani totali ed i flavonoidi totali più elevati rispetto agli altri due vini. Il grado alcolico e il colore non mostrano apprezzabili differenze tranne che per la Barbera03 di poco inferiore. I valori isotopici dei vini rientrano nelle media dei valori individuati nelle banche dati per la zona in esame.

Tabella 5.3 Analisi chimiche e spettrofotometriche

VINI	pH	Ac. Totale (g/L)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
BA01-13	3,21	5,21	262,00	981,00	0,21	0,30	0,05	0,69	0,51
BA03-13	3,86	3,94	141,00	1191,00	0,22	0,31	0,07	0,70	0,53
BA07-13	3,57	3,83	130,33	1157,67	0,19	0,23	0,05	0,83	0,43

Tabella 5.4 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) I ppm	(D/H) II ppm	R	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$? ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
BA01-13	12,70	101,12	131,06	2,592	1,695
BA03-13	12,26	99,78	131,71	2,640	1,380
BA07-13	12,13	100,72	127,92	2,540	-0,272

5.2.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici

Nello score plot ottenuto (Figura 5.7) attraverso l'analisi delle componenti principali, si evidenziano come il vino Barbera07 (zona a Nord) si separa nettamente sulla PC1 a valori negativi rispetto agli altri due che sono situati a valori positivi. Per quanto riguarda il secondo componente principale si nota una netta separazione dei campioni di Barbera01 e Barbera03. La variabilità spiegata dalle prime due componenti principali è di 97.13%.

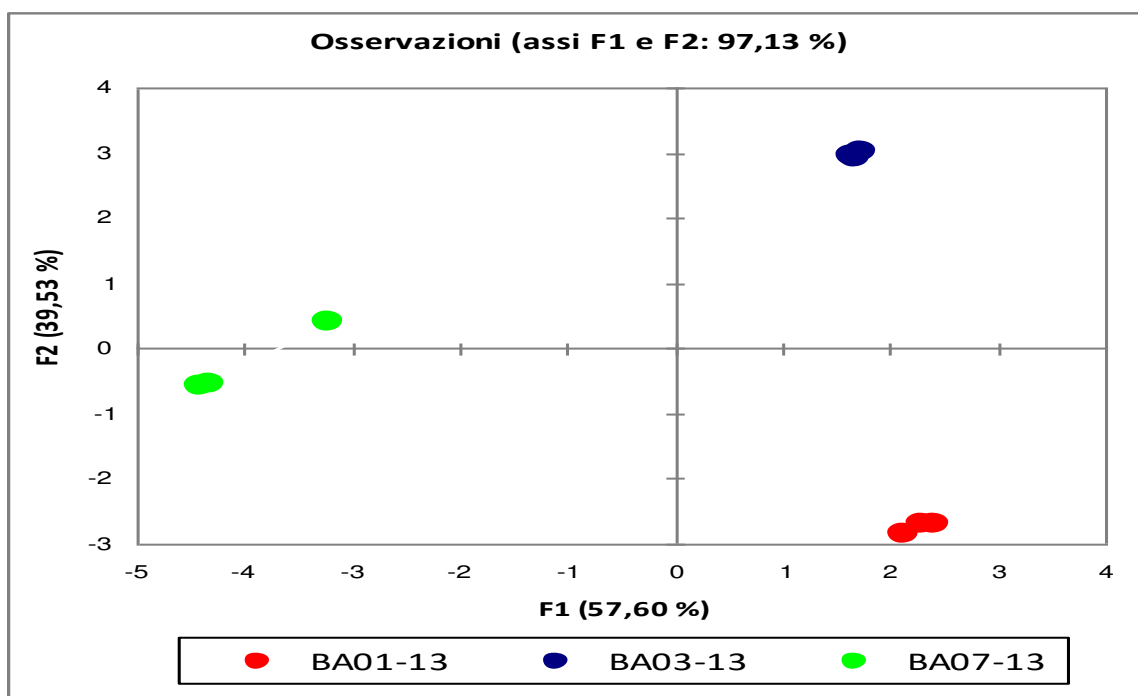


Figura 5.7 Score plot PC 1 vs. PC 2. Dati chimici ed isotopici.

Dal confronto tra lo score plot e il loadings-plot (Figura 5.8), si evince come i fattori maggiormente influenti sulla separazione dei campioni siano quelli relativi ai parametri del

colore, $(D/H)_{II}$ e $^{18}O/^{16}O$ per la PC 1, mentre la PC 2 differenzia i campioni per il pH, flavonoidi totali e $(D/H)_I$.

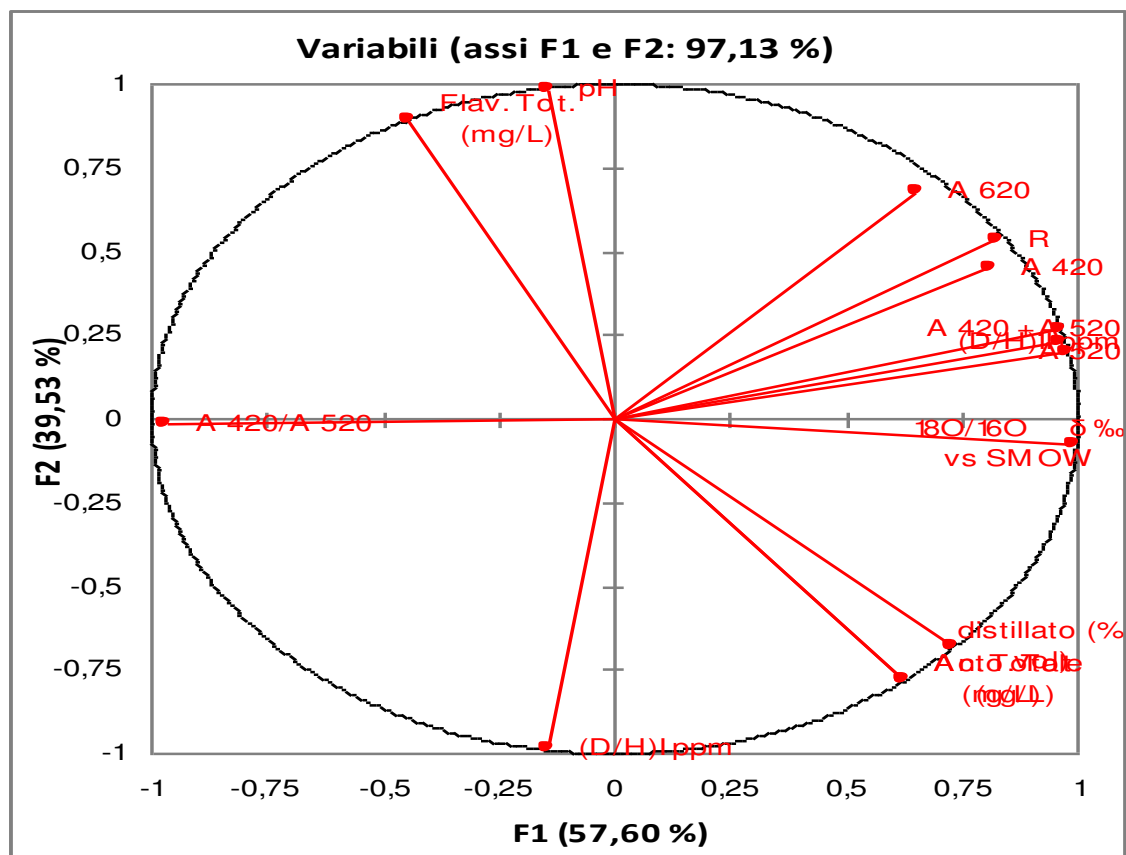


Figura 5.8 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

5.2.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione.

Lo score plot della figura 5.9 evidenzia come le prime due componenti principali (PC 1 e PC 2), che spiegano l'88.81% della varianza totale siano in grado di separare le tre zone diverse di provenienza. Rispetto allo score plot ottenuto considerando i dati chimici ed isotopici, in questo caso la separazione è ancora più evidente anche perché il solo primo componente principale spiega il 67.81% della varianza totale. Lungo il primo componente principale vengono separate la Barbera01 e la Barbera03. La seconda componente principale separa la Barbera07 dalle altre due.

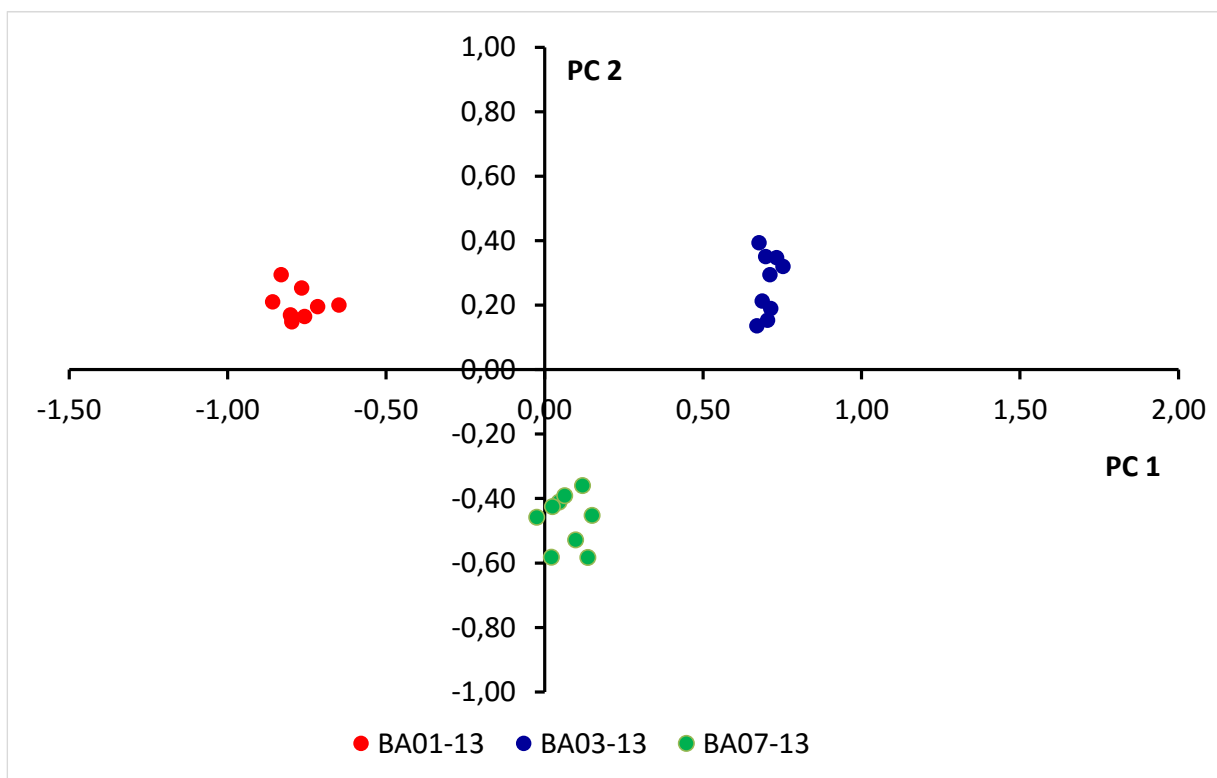


Figura 5.9 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro intero.

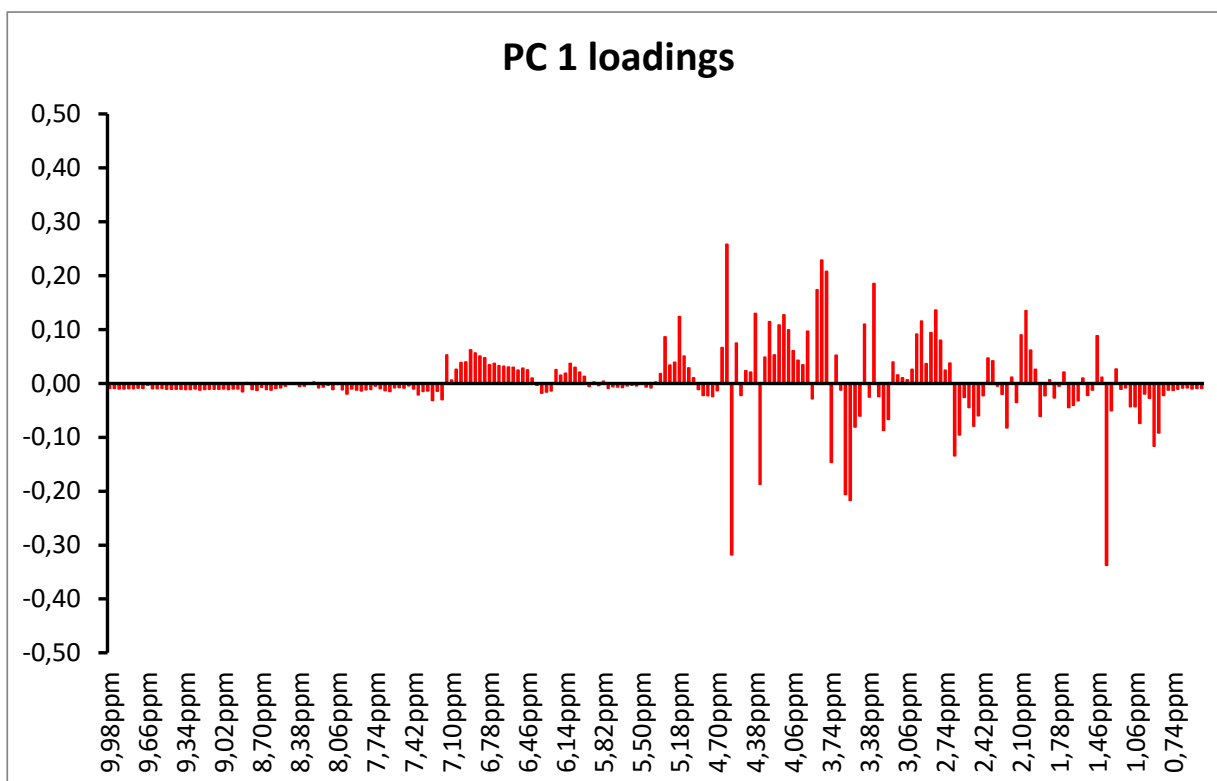


Figura 5.10 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 5.10 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1, nella zona spettrale tra 0,5 a 10 ppm. Da tale grafico è possibile osservare quali siano i metaboliti principali con peso positivo, tra questi: l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido tartarico (4.60 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89

ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), l'acido D-galatturonico (3.70, 3.92, 4.30, 5.30 ppm), l'acido citrico (2.81, 2.96 ppm), e con peso negativo: l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm).

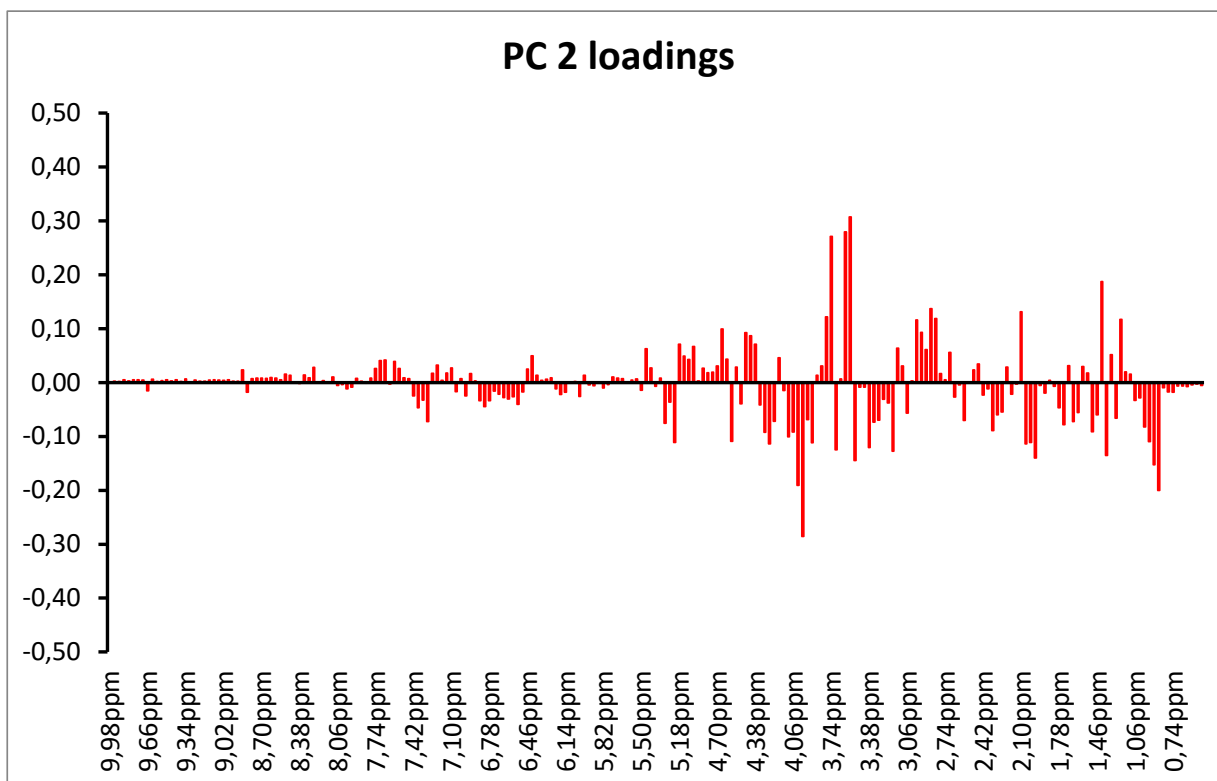


Figura 5.11 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 5.11 riporta il grafico dei pesi per PC 2. Osservando il grafico si possono ricavare i metaboliti con maggior peso su questa PC. Con peso positivo troviamo: il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), l'acido malico (2.79, 2.89 ppm). Con peso negativo abbiamo: l'acido acetico (2.06 ppm), l'isobutanolo (0.87, 1.73 ppm), la leucina (0.95, 1.72 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido galatturonico (3.70, 3.92, 4.30, 5.30 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm).

L'analisi statistica dei dati spettroscopici è stata ripetuta nella zona spettrale da 5 a 10 ppm.

Considerazioni della stessa natura si possono fare anche per la zona spettrale tra 5 a 10 ppm (Figura 5.12). In questo caso le prime due componenti principali spiegano il 95.73% della varianza totale. Lungo il primo componente principale vengono separate la Barbera01 rispetto alla Barbera03 e Barbera07 mentre lungo il secondo componente principale si separano la Barbera03 e la Barbera07.

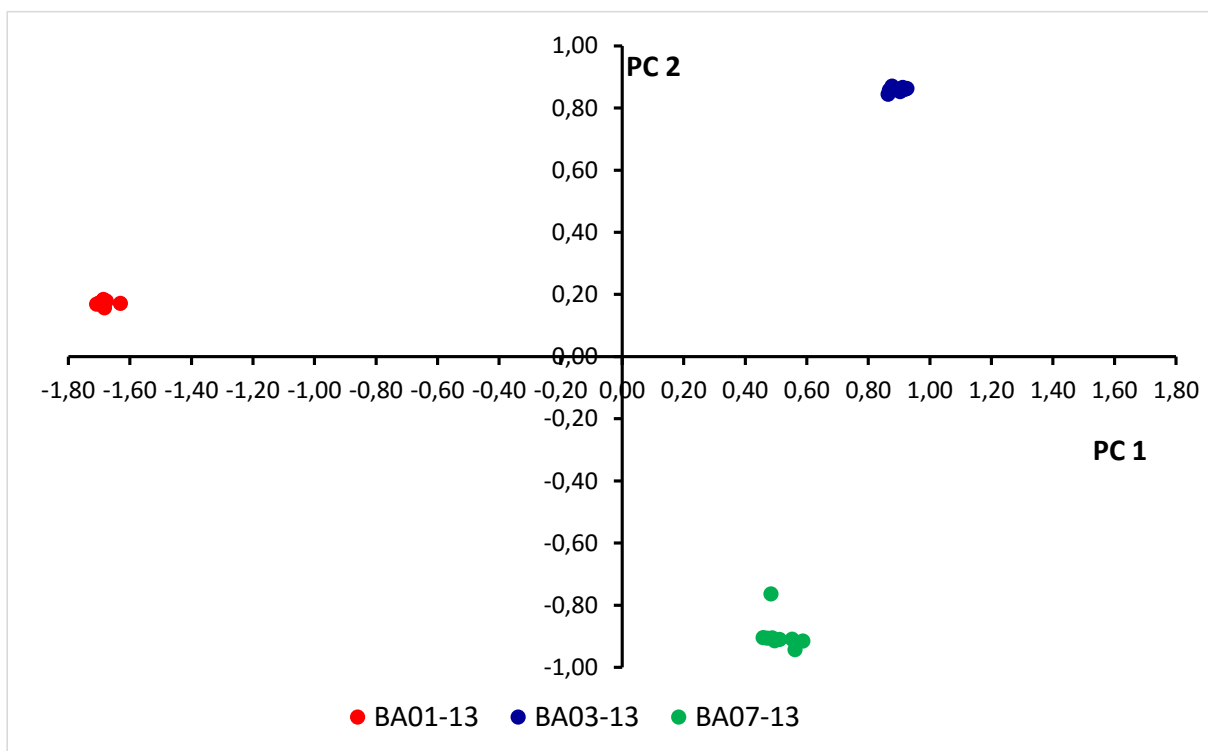


Figura 5.12 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

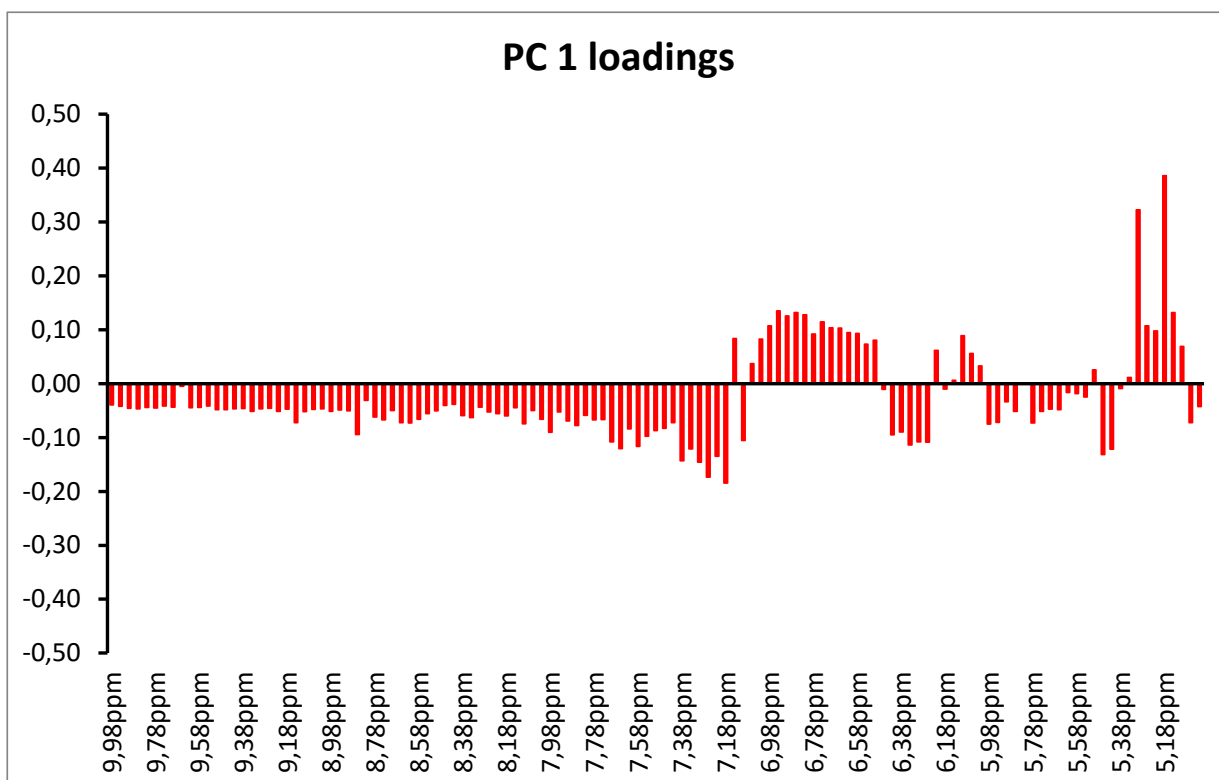


Figura 5.13 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm

Nella figura 5.13 si riporta il grafico dei pesi per PC 1 nella porzione dello spettro da 5 a 10 ppm. Tra i metaboliti utili alla definizione di PC 1 possiamo riscontrare, con peso positivo:

l'acido galatturonico (5.19, 5.24, 5.30 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.13, 6.84, 6.93, 6.99, 7.02 ppm), l'epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), e con peso negativo: il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm).

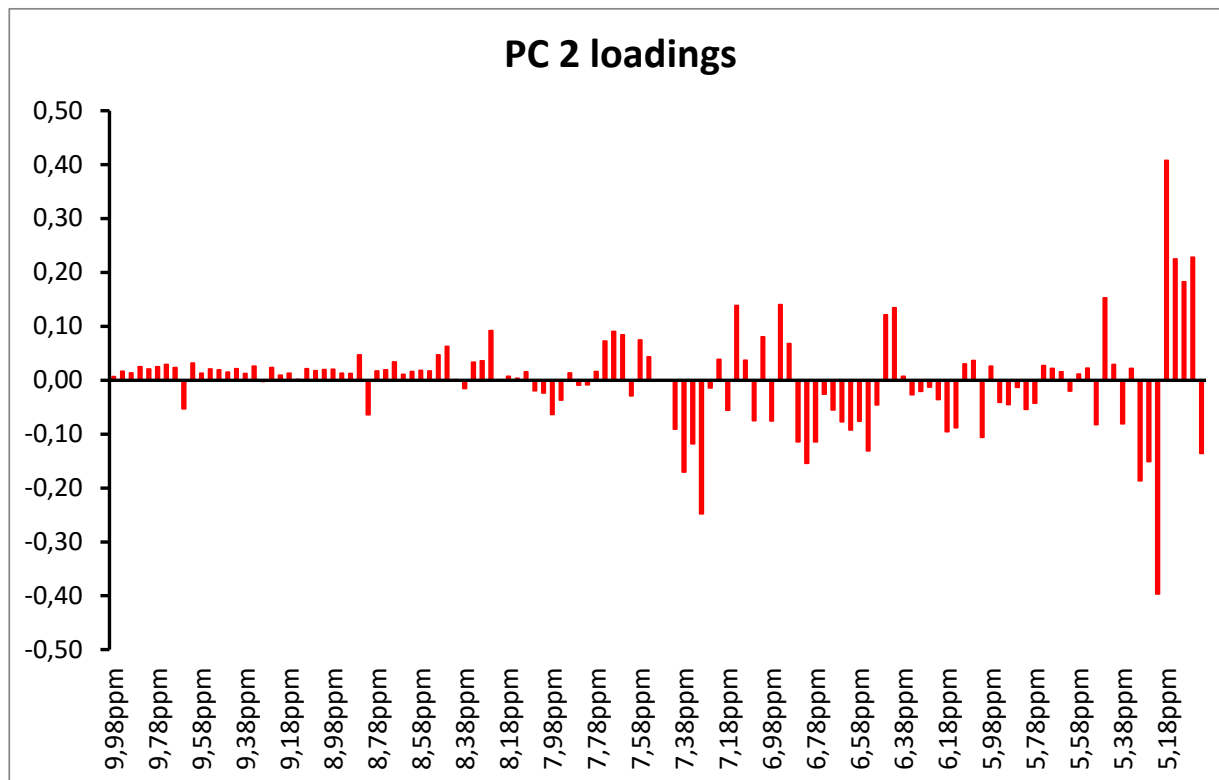


Figura 5.14 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

Dalla figura 5.14 si possono identificare i metaboliti con il maggior peso sulla PC 2. Si distinguono con peso positivo: il D- mannosio (5.16 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 7.58, 7.68 ppm), la (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm). Invece con peso negativo: l'acido galatturonico (5.19, 5.24, 5.30 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), il saccarosio (5.39 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), l'acido siringico (7.8 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm).

5.3 Confronto zone di produzione (Est Piemonte –Ovest Piemonte) su vino Barbera.

Di seguito, sono stati analizzati gli effetti della zona di provenienza, prendendo in considerazione il vitigno Barbera di due zone della regione Piemonte (Cisterna d'Asti-Asti, e Rosignano Monferrato-Alessandria) e una della regione Lombardia (Montù Beccaria- Pavia). Esse hanno un orientamento da Est verso Ovest e le due zone più lontane tra loro distano circa cento chilometri.

5.3.1 Analisi chimiche ed isotopiche

Le tabelle 5.5 e 5.6 riportano i dati delle analisi chimiche ed isotopiche dei vini (appartenenti ad una stessa annata, quella del 2013), ma prodotti da tre aziende di zone diverse.

Per quanto riguarda le analisi di routine, esse mostrano come per la Barbera02 il pH insieme agli antociani totali, i flavonoidi totali, l'alcol ed il colore siano più elevati rispetto agli altri due vini. Per quanto riguarda la Barbera06 e la Barbera08 i parametri considerati non mostrano apprezzabili differenze. I valori isotopici dei vini rientrano nelle medie dei valori individuati nelle banche dati per la zona in esame

Tabella 5.5 Analisi chimiche e spettrofotometriche

VINI	pH	Ac. Totale (g/L)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
BA02-13	3,70	3,79	272	1539	0,23	0,28	0,06	0,810	0,512
BA06-13	3,38	4,87	157	1219	0,19	0,26	0,05	0,743	0,452
BA08-13	3,47	5,203	151	1372	0,1839	0,225	0,043	0,818	0,409

Tabella 5.6 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	R	¹⁸ O/ ¹⁶ O δ ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
BA02-13	13,13	99,38	127,81	2,572	-0,513
BA06-13	11,52	100,26	126,63	2,526	0,090
BA08-13	11,75	100,7	129,33	2,570	-0,338

5.3.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici

Dallo score plot (Figura 5.15) ottenuto attraverso l'analisi delle componenti principali, possiamo notare come la zona della Barbera02 (a valori positivi) si separa nettamente sulla PC1 dalle altre due. Questo vino mostrerà valori maggiori di tutti quei parametri che hanno peso positivo sulla PC 1. La PC 2 mostra una buona separazione tra i campioni di Barbera06 e Barbera08.

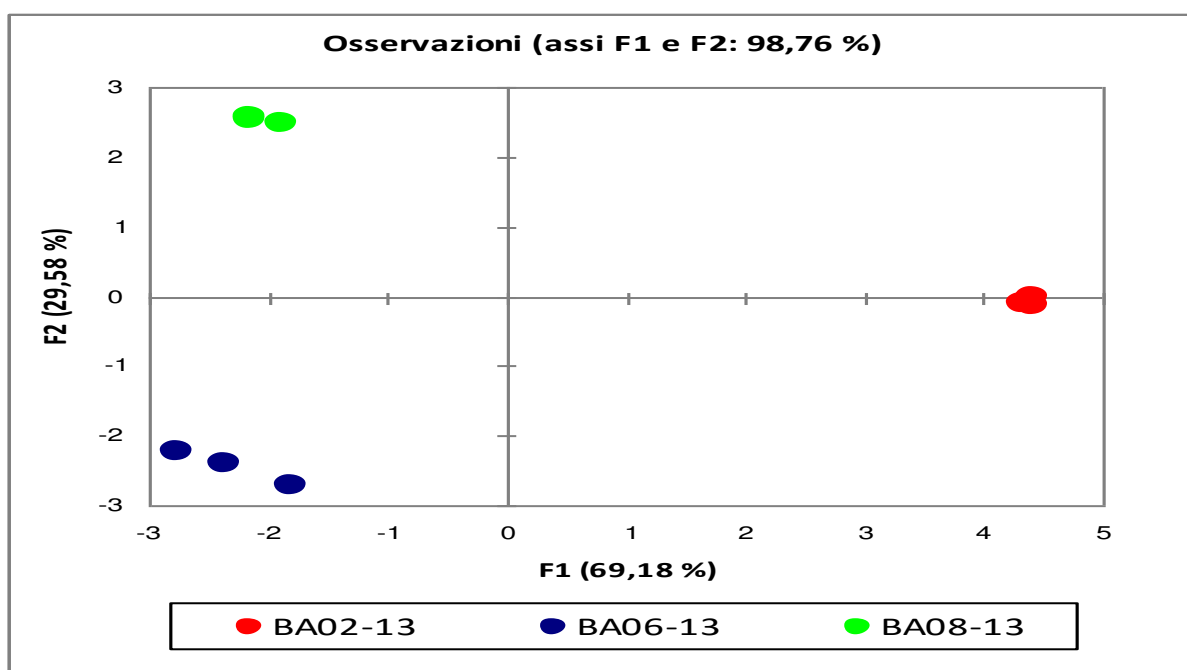


Figura 5.15 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

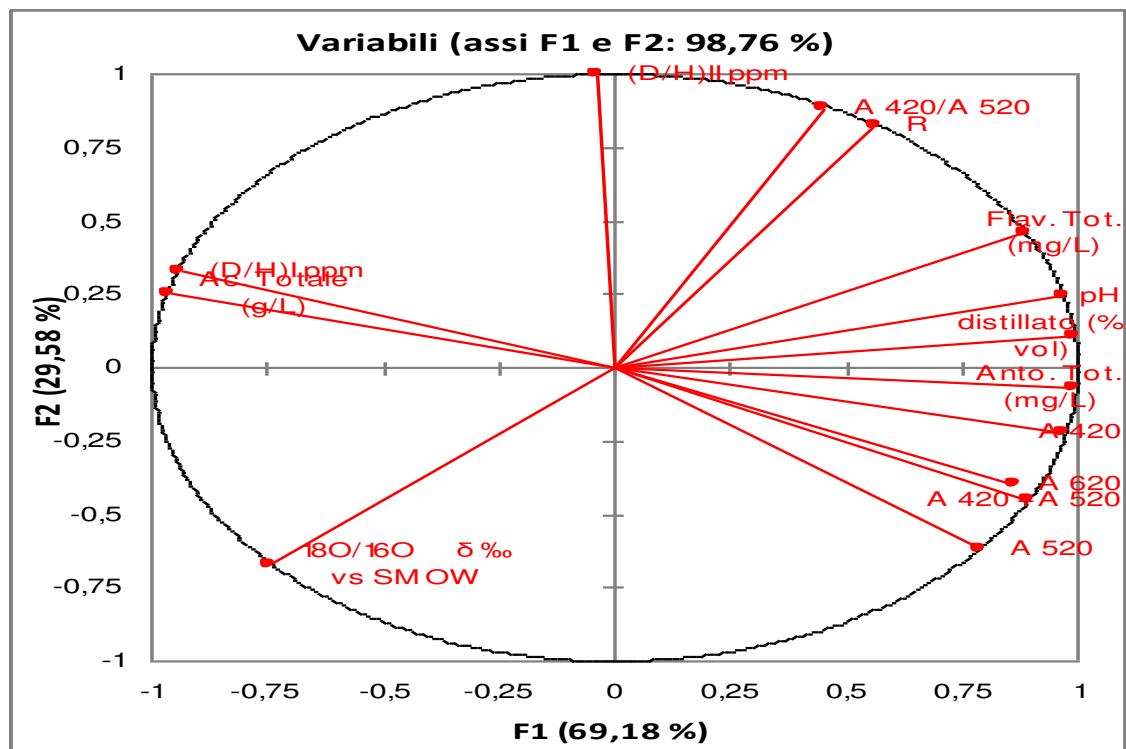


Figura 5.16 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

Osservando il loadings-plot (Figura 5.16), possiamo evidenziare quali siano i fattori maggiormente influenti sulla separazione dei campioni: i dati relativi al pH, al colore, agli antociani totali, ai flavonoidi totali e l'alcol, hanno valori positivi sulla PC1. Mentre l'acidità e i valori isotopici del $(DH)_I$ e $^{18}O/^{16}O$ sono le variabili con pesi negativi sulla stessa PC. I parametri maggiormente influenti su PC 2 sono il $(DH)_{II}$, con peso positivo, e $^{18}O/^{16}O$ con peso negativo.

5.3.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione.

In figura 5.17 lo score plot mette in luce come le prime due componenti principali (PC 1 e PC 2), che spiegano l'86.85% della varianza totale siano in grado di separare le tre zone diverse di provenienza. Lungo il primo componente principale vengono separati i campioni delle tre zone di produzione mentre la PC 2 separa la Barbera06 dalle altre due.

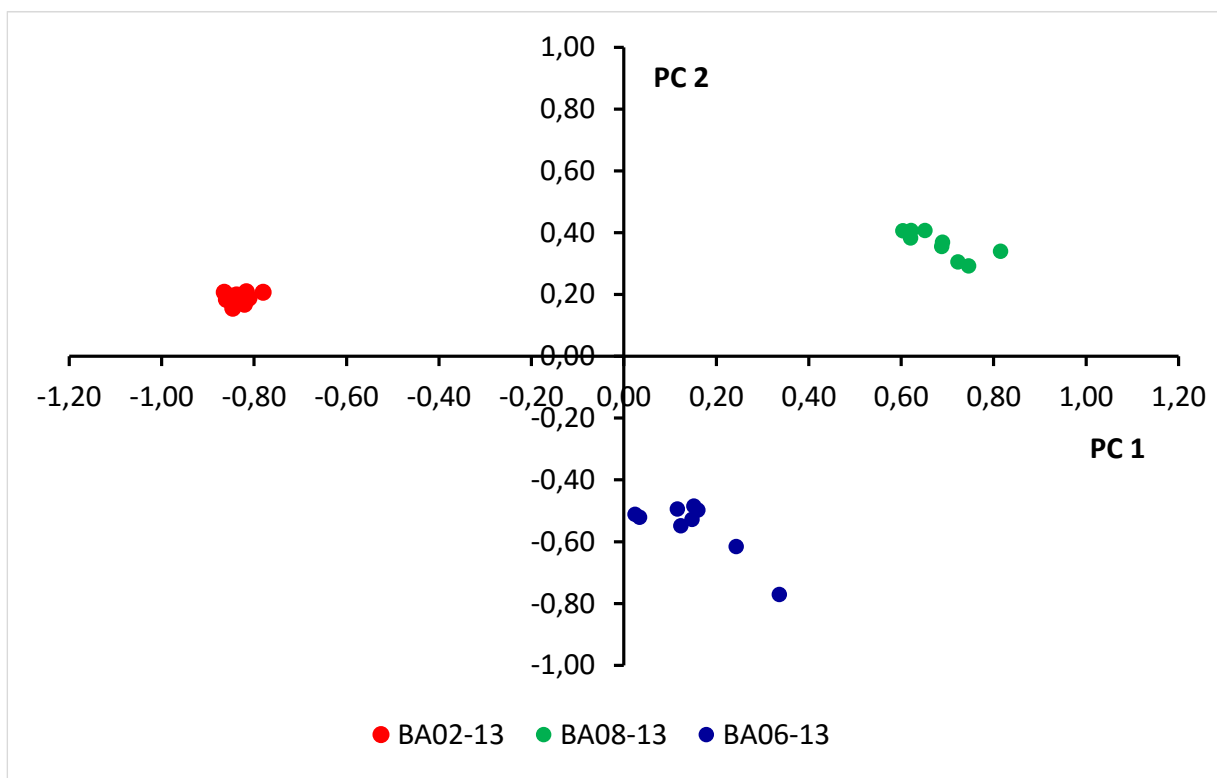


Figura 5.17 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0.5 a 10 ppm.

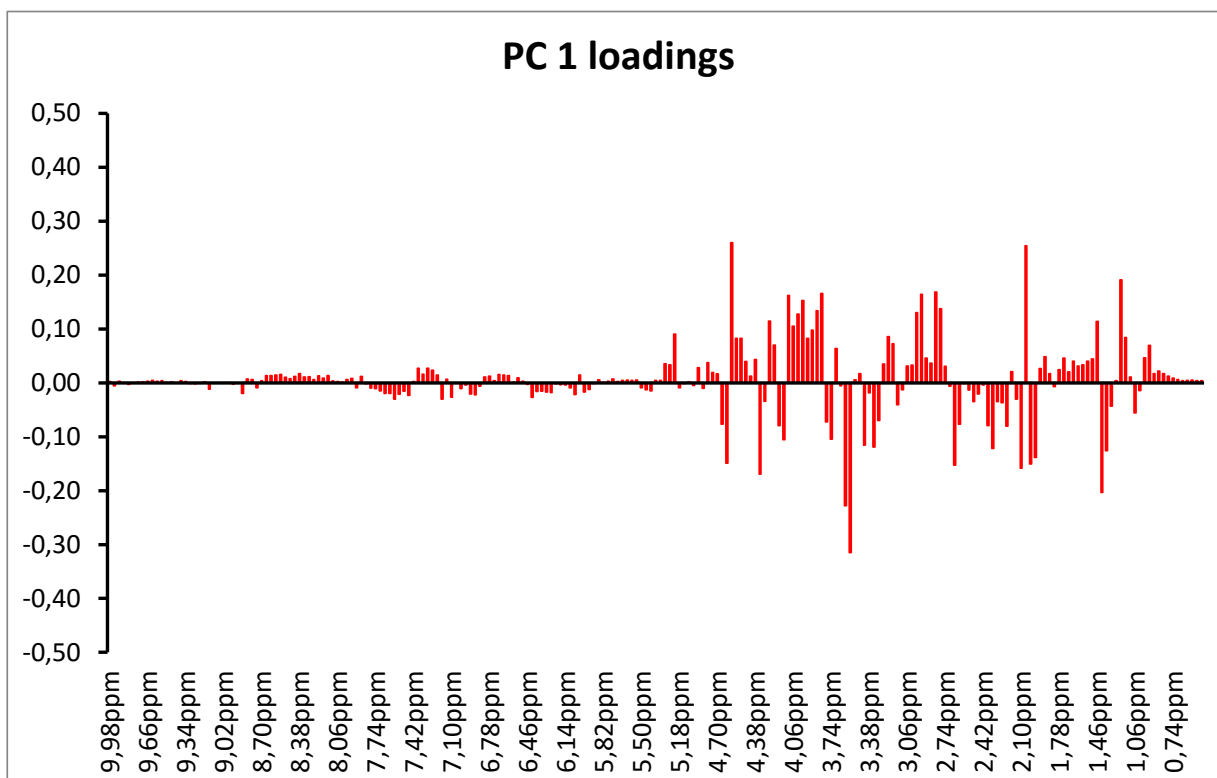


Figura 5.18 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 5.18 riporta il grafico dei pesi per PC 1, prendendo in considerazione l'intera zona spettrale (0,5 – 10 ppm). Dall'immagine è possibile ricavare quali siano i metaboliti con peso positivo che contribuiscono maggiormente alla separazione dei campioni, tra questi è possibile distinguere: l'acido acetico (2.06 ppm), la treonina (1.32, 4.27 ppm), l'acido tartarico (4.60

ppm), l'isoleucina (0.94, 1.00, 1.46 ppm), l'arginina (1.70, 3.26, 7.26 ppm), l'acido aspartico (2.94, 3.00, 4.05 ppm), l'alanina (1.49, 3.85 ppm), il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm), l'arabinosio (3.78, 4.49, 5.28 ppm) e con peso negativo: l'acido succinico (2.65 ppm), il glicerolo (3.54, 3.77 ppm), l'etilattato (1.38, 4.18, 4.34 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm).

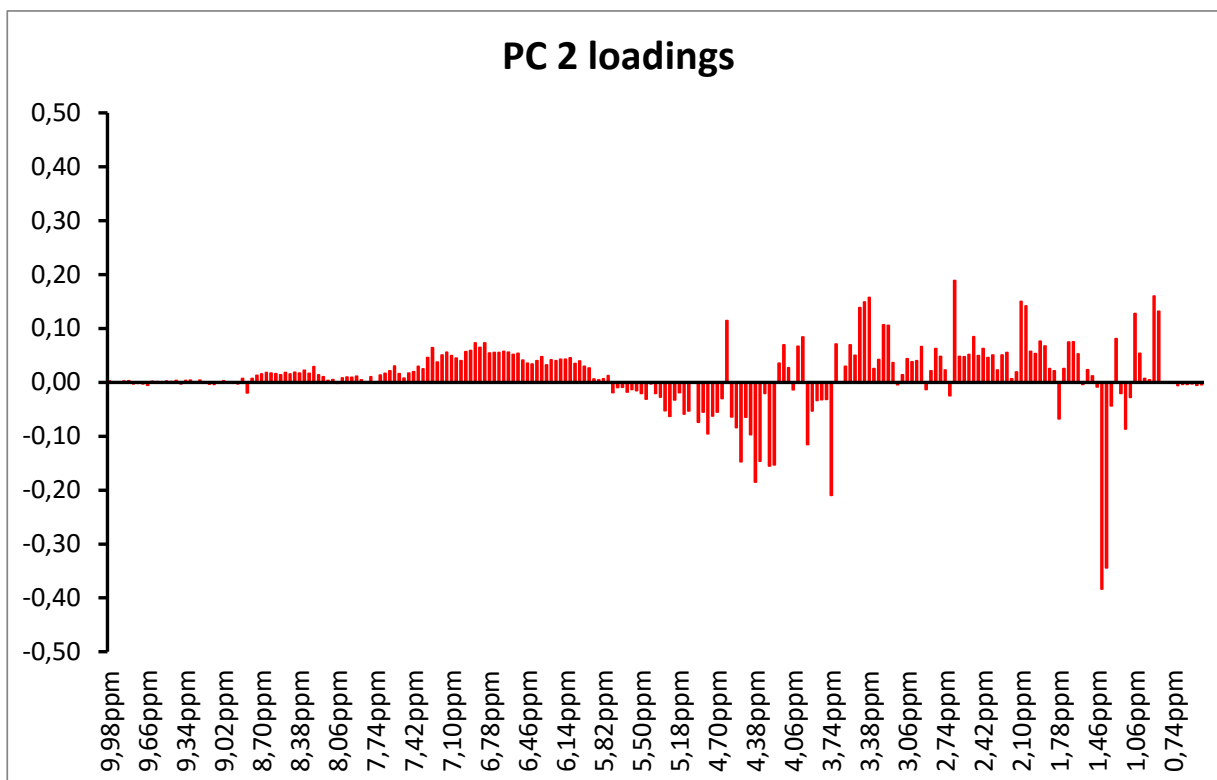


Figura 5.19 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

Dalla figura 5.19, che mostra il grafico dei pesi per PC 2 ottenuto considerando l'intera zona spettrale (0,5 – 10 ppm), è possibile risalire a quali siano i metaboliti con peso positivo che contribuiscono maggiormente alla separazione dei campioni, tra questi si evidenziano: l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), l'arginina (1.70, 3.26, 7.26 ppm), l'acido aspartico (2.94, 3.00, 4.05 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido tartarico (4.60), la cisteina (3.02, 3.10, 4.00 ppm), l'istidina 3.34, 4.04, 7.38, 8.65 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm) e con peso negativo: l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'alanina (1.49, 3.85 ppm), l'arabinosio (3.78, 4.49, 5.28 ppm), l'acido galatturonico (3.92, 4.24, 4.30, 4.64, 5.19, 5.24, 5.30 ppm), l'acido malico (2.70, 2.88, 4.53 ppm).

L'analisi statistica dei dati spettroscopici è stata ripetuta nella zona spettrale da 5 a 10 ppm.

Nella figura 5.20 lo score plot mostrato è stato ottenuto prendendo in considerazione la seconda parte dello spettro quella maggiormente interessata dai metaboliti secondari. La figura mette in evidenza come le prime due componenti principali (PC 1 e PC 2), che spiegano l'92.96% della varianza totale sono in grado di separare le tre zone diverse di provenienza dei campioni. Lungo il primo componente principale vengono separati i campioni delle tre zone mentre la PC 2 separa la Barbera08 dalle altre due.

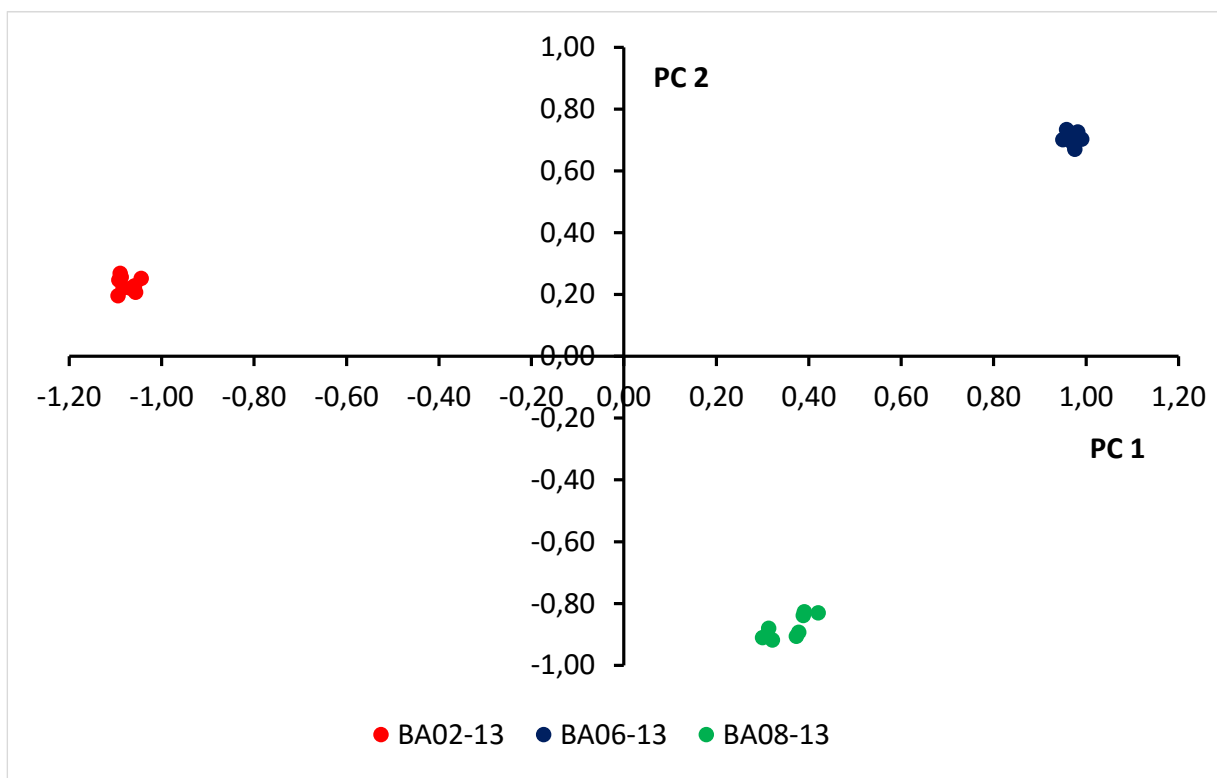


Figura 5.20 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

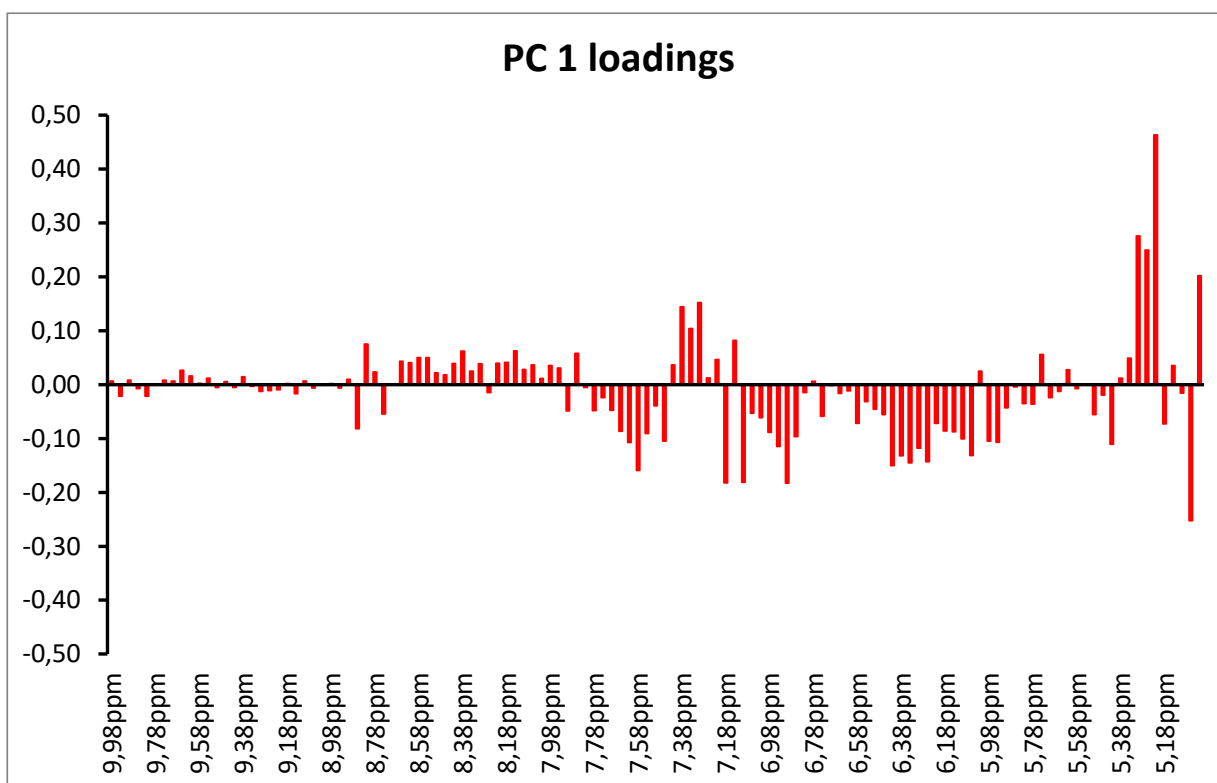


Figura 5.21 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 5 a 10 ppm.

Il grafico 5.21 riporta i pesi per PC 1. Dalla figura possiamo dedurre i principali metaboliti che contribuiscono a questa PC nella zona spettrale compresa tra 5 e 10 ppm. Con peso positivo si evidenziano i seguenti metaboliti: l'acido galatturonico (5.30 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm), l'acido sirringico (7.38 ppm), il D-

ribosio (5.22 ppm). Con peso negativo possiamo identificare soprattutto metaboliti di natura secondaria, come: l'epicatechina gallato (6.10, 6.84, 6.93, 6.99 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm).

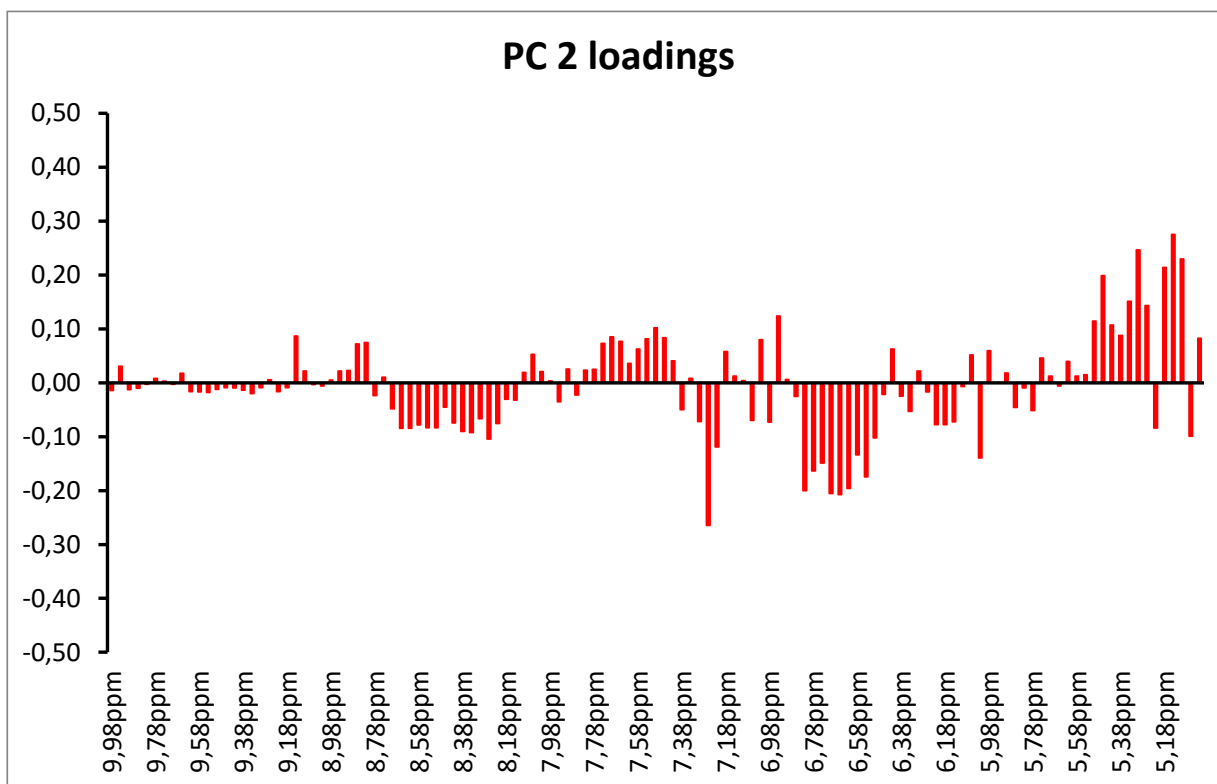


Figura 5.22 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 5 a 10 ppm.

La figura 5.22, che riporta il grafico dei pesi per la PC 2. I metaboliti identificati con peso positivo sono: il D- mannosio (5.16 ppm), l'acido galatturonico (5.30 ppm), la trigonellina HCl (8.08, 8.84, 9.14 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 7.18, 7.66 ppm), mentre tra i metaboliti con peso negativo troviamo: l'acetaldeide (9.66 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm).

5.4 Confronto tra microzone di produzione con vino Barbera

Anche in questa area del Piemonte si è voluto analizzare l'effetto della zona di provenienza, considerando il vitigno Barbera di tre zone diverse, due nella provincia di Asti (Costigliole d'Asti e Asti) e la terza nella provincia di Cuneo (Govone). Sebbene amministrativamente dislocati in due provincie diverse, in realtà, i comuni considerati sono molto vicini e si trovano nell'arco di venticinque chilometri l'uno dall'altro. Lo scopo di questo confronto è quello di valutare se si riescano comunque a separare i campioni anche riducendo molto le distanze tra le zone di origine.

5.4.1 *Analisi chimiche ed isotopiche*

Le tabelle 5.7 e 5.8 riportano i dati delle analisi chimiche ed isotopiche. Le analisi di routine, mostrano come il pH della Barbera05 risulti più basso rispetto agli altri due mentre l'acidità totale, l'alcol, gli antociani totali i flavonoidi totali ed il colore risultino più elevati. Non si evidenziano marcate differenze tra la Barbera04 e Barbera11. I valori isotopici dei vini rientrano nelle media dei valori individuati nelle banche dati per la zona in esame.

Tabella 5.7 Analisi chimiche e spettrofotometriche

VINI	pH	Ac. Totale (g/L)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
BA04-13	3,72	4,89	176	1266	0,18	0,21	0,04	0,842	0,393
BA05-13	3,40	5,66	207	1588	0,33	0,53	0,09	0,630	0,865
BA11-13	3,60	4,44	163	1264	0,19	0,2203	0,05	0,841	0,406

Tabella 5.8 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	R	¹⁸ O/ ¹⁶ O δ ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
BA04-13	12,78	100,06	129,20	2,582	0,290
BA05-13	13,21	98,81	128,52	2,601	-1,010
BA11-13	11,87	98,28	127,79	2,601	-0,446

5.4.2 *Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici*

In questo score plot (Figura 5.23) si nota come dall'analisi delle componenti principali, la zona della Barbera05 (a valori positivi) si separi nettamente sulla PC1 dalle altre due. Inoltre, la PC 2 permette una buona separazione tra la Barbera04 e la Barbera11. I campioni della Barbera05 avranno sia valori maggiori di quei parametri che hanno peso positivo sulla PC 1 sia valori minori di quelli con peso negativo sulla PC 1.

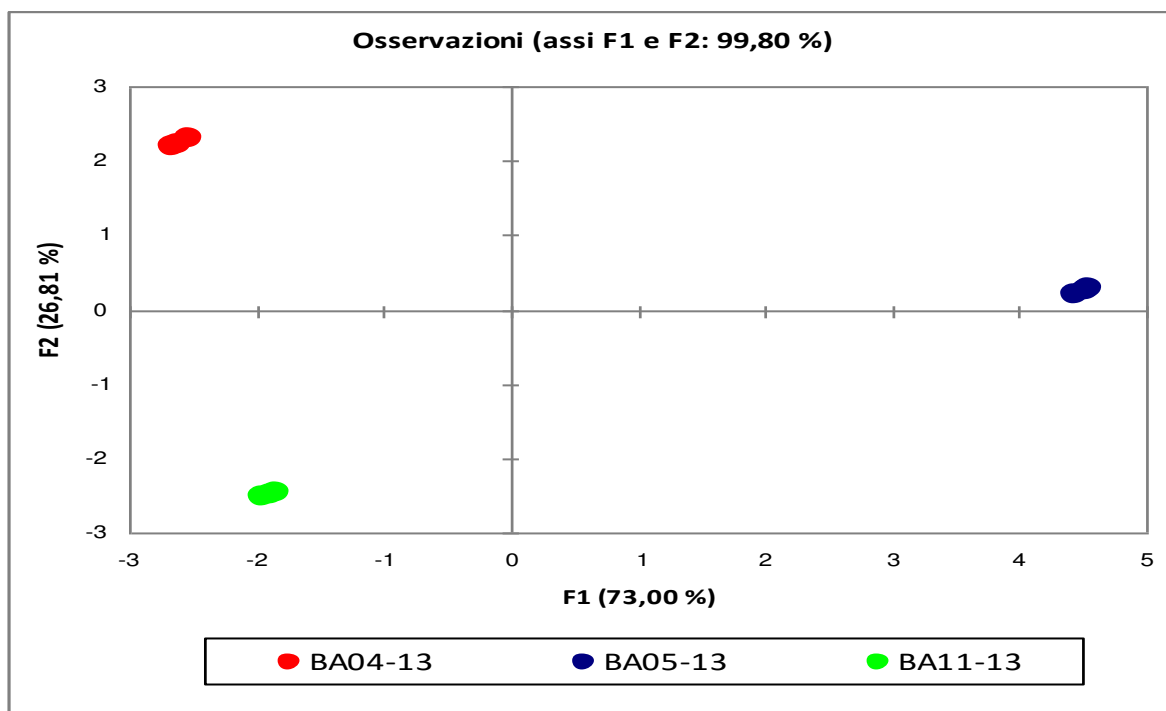


Figura 5.23 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

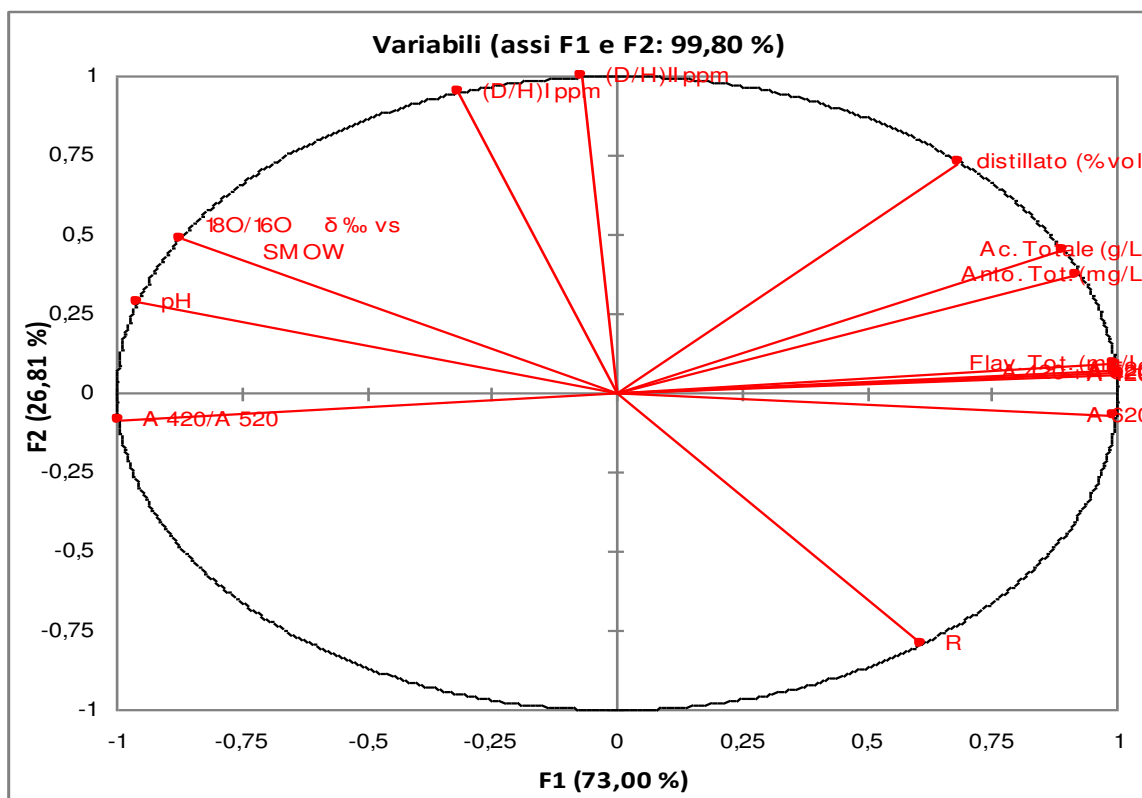


Figura 5.24 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

Dall'analisi del loadings-plot (Figura 5.24), si può evidenziare come i fattori maggiormente influenti sulla separazione dei vini siano quelli relativi al colore, all'acidità totale, agli antociani totali, ai flavonoidi totali e all'alcol, a valori positivi sulla PC1. L'acidità e il rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ sono le variabili con peso negativo su questa PC. $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ e $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ sono le variabili più importanti per la definizione di PC 2.

5.4.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione

Dalla figura 5.25 si può vedere come le prime due componenti principali, che spiegano il 95,54% della varianza totale, siano in grado di raggruppare i campioni in base alla zona di provenienza. Il vitigno Barbera05 si trova con valore positivo su PC 1 mentre il Barbera04 e Barbera11 si trovano con valore negativo. Si osserva inoltre, una netta separazione lungo la PC 2 dei campioni di Barbera11 dai rimanenti.

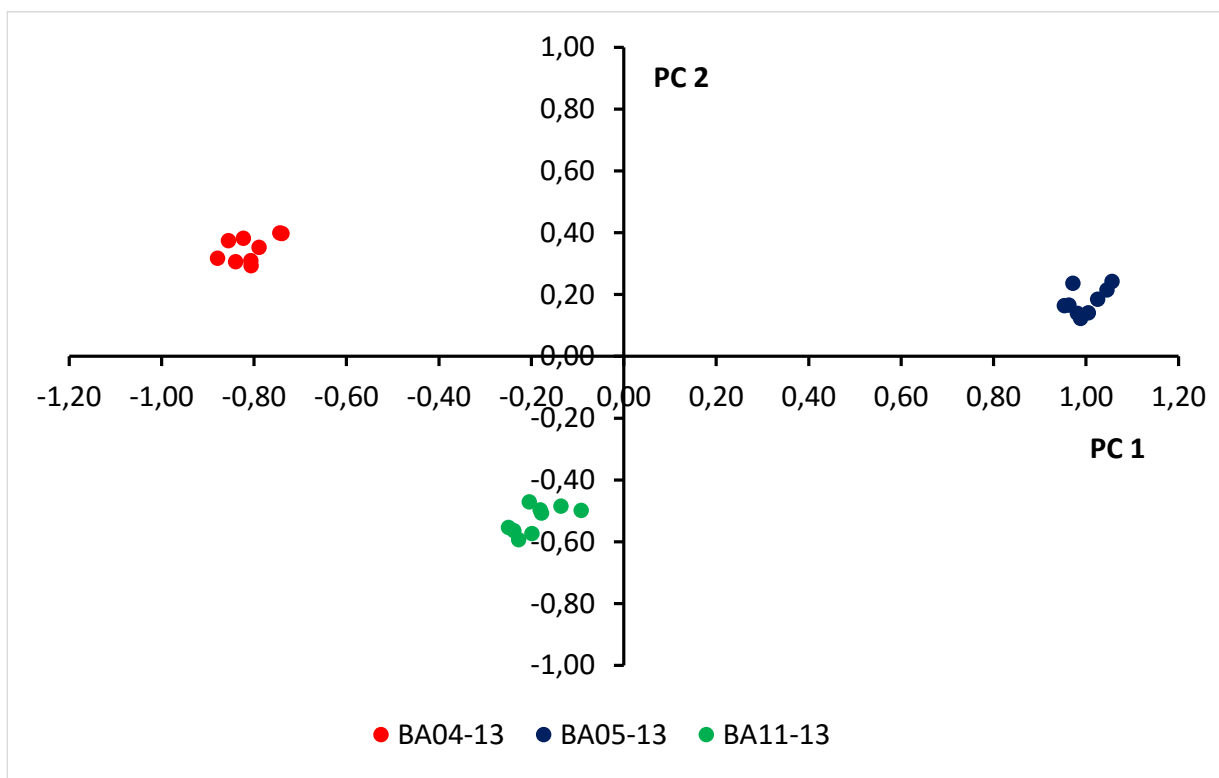


Figura 5.25 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0,5 a 10 ppm.

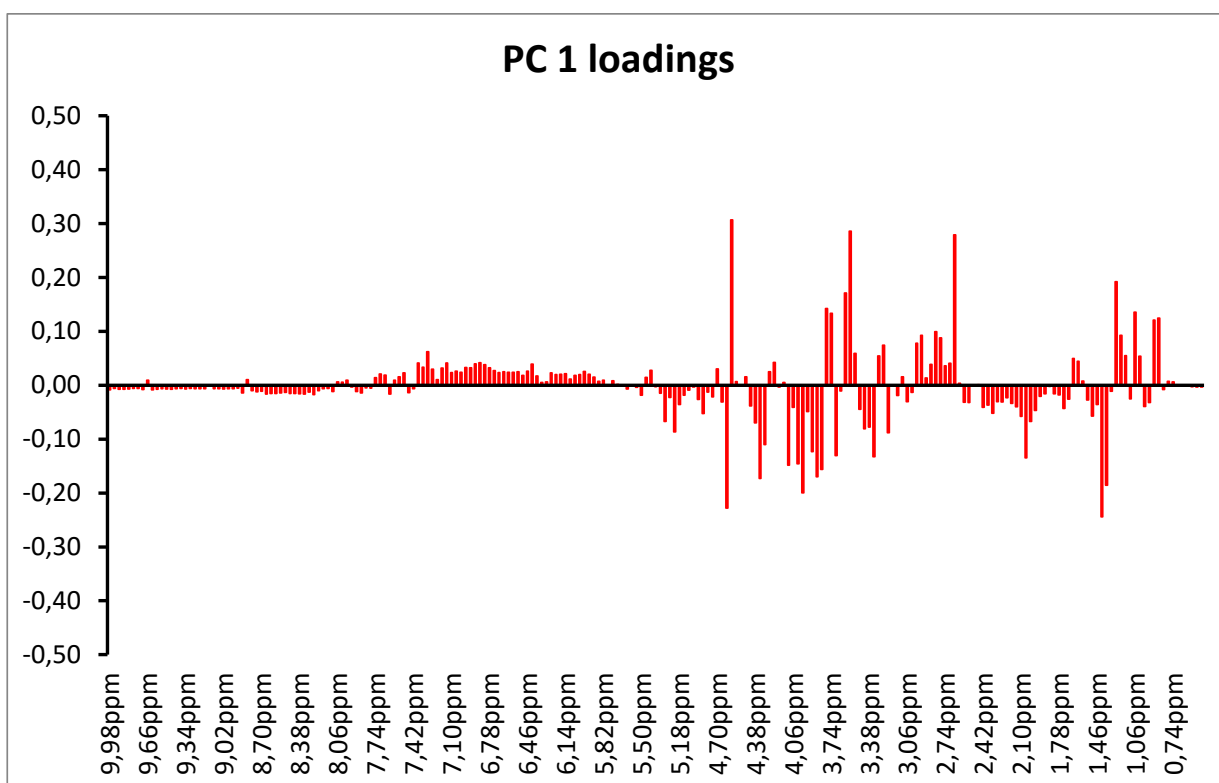


Figura 5.26 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

Il grafico 5.26 riporta i pesi dei principali metaboliti su PC 1, nell'intera zona spettrale. Tra questi possiamo riscontrare con valore positivo: la treonina (1.32, 4.27 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido tartarico (4.60), l'acido gallico (7.15 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37

ppm), il glicerolo (3.54, 3.55, 3.78 ppm), l'acido malico (2.70, 2.88, 4.53 ppm), la quercetina (6.30, 6.52, 7.00, 7.65, 7.74 ppm), e con peso negativo: l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34ppm), l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), il metanolo (3.34ppm), il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm), l'acetoino (1.36, 2.21, 4.40 ppm), l'1,3 propadiolo (1.78 ppm), l'etillattato (1.39, 4.18, 4.34 ppm), l'acetaldeide (2.23, 9.66 ppm).

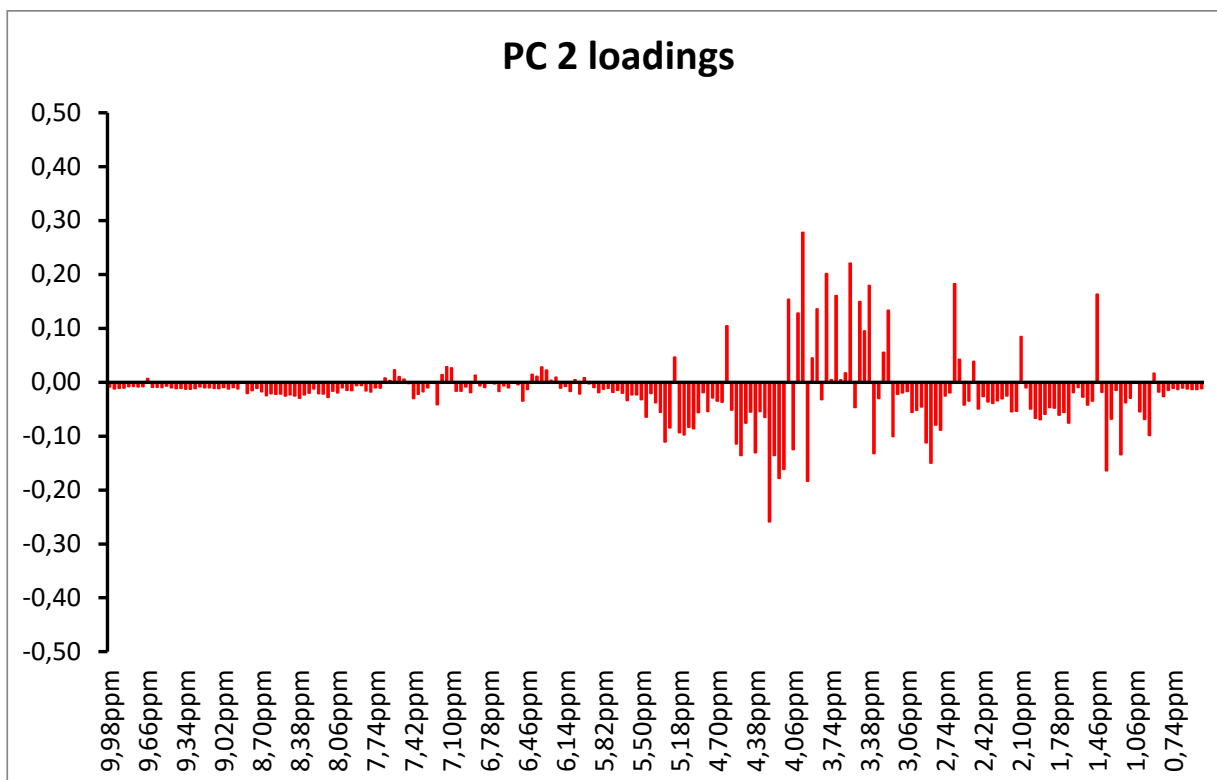


Figura 5.27 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

Nella figura 5.27 vengono riportati i pesi dei principali metaboliti su PC 2, nella zona spettrale tra 0,5 a 10 ppm e sono con peso positivo sono: l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'acido tartarico (4.60), l'acido gallico (7.15 ppm), il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm), il glicerolo (3.54, 3.55, 3.78 ppm), mentre hanno peso negativo: la treonina (1.32, 4.27 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34ppm), l'isobutanolo (0.86, 1.74, 3.34 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), (+)-l'epicatechina (2.75, 2.92, 4.32, 4.98, 6.07, 6.10, 6.93, 7.04 ppm), il metanolo (3.34ppm), l'acido aspartico (2.94, 3.00, 4.05 ppm), l'acido galatturonico (3.92, 4.24, 4.30, 4.64, 5.19, 5.24, 5.30 ppm), l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), l'etillattato (1.39, 4.18, 4.34 ppm), l'acetoino (1.36, 2.21, 4.40 ppm).

L'analisi PCA è stata ripetuta considerando la porzione di spettro NMR tra 5 e 10 ppm.

In questa seconda parte dello spettro la figura 5.28 mette in luce come le prime due componenti principali, che spiegano il 96.89% della varianza totale, siano in grado di raggruppare i campioni in base alla zona di provenienza. Il vitigno Barbera05 si trova con valore positivo su PC 1 mentre il Barbera04 e Barbera11 si trovano con valore negativo come già osservato sullo

studio condotto sullo spettro intero. Si osserva inoltre, una netta separazione dei campioni anche lungo la PC 2 per questa parte dello spettro.

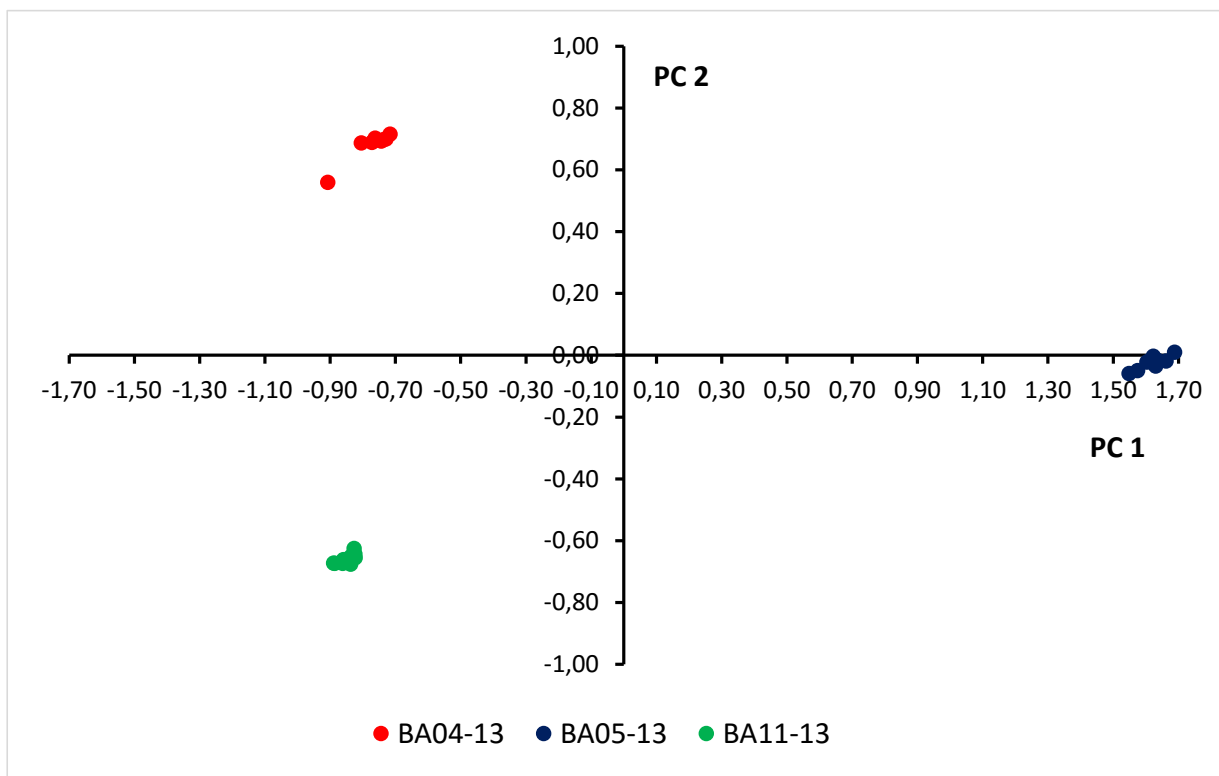


Figura 5.28 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm.

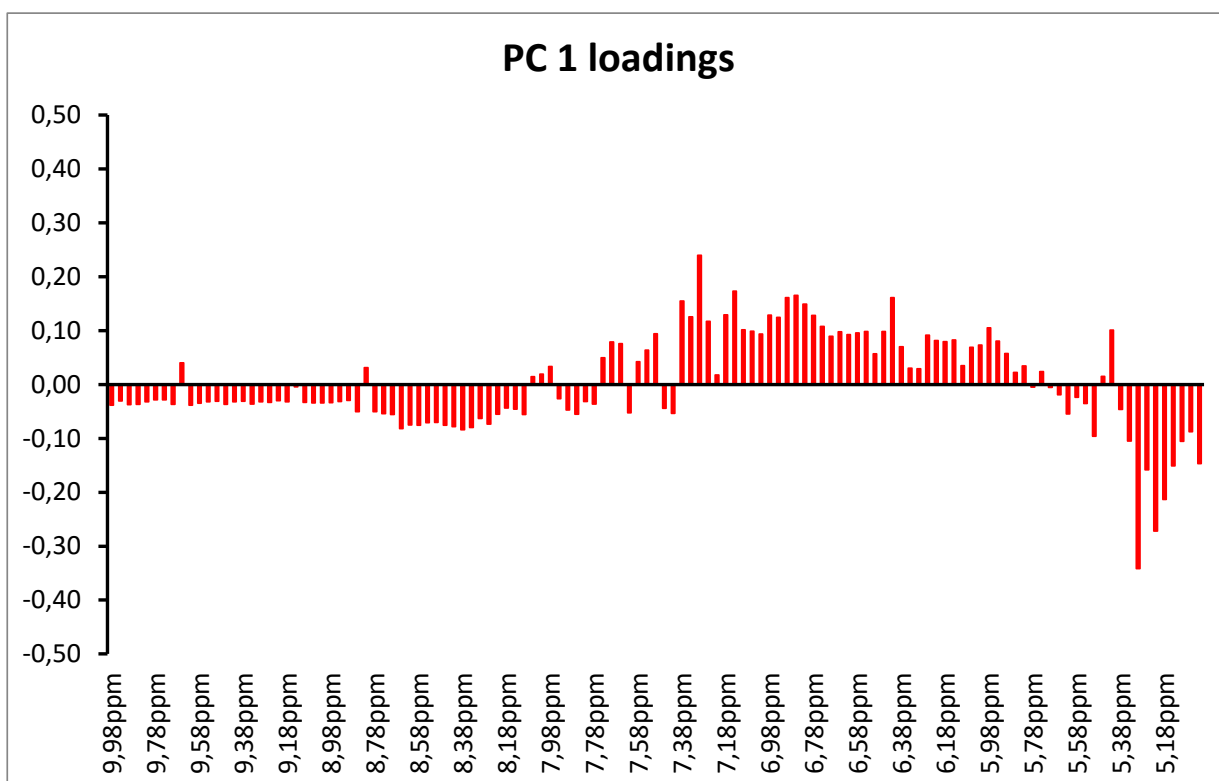
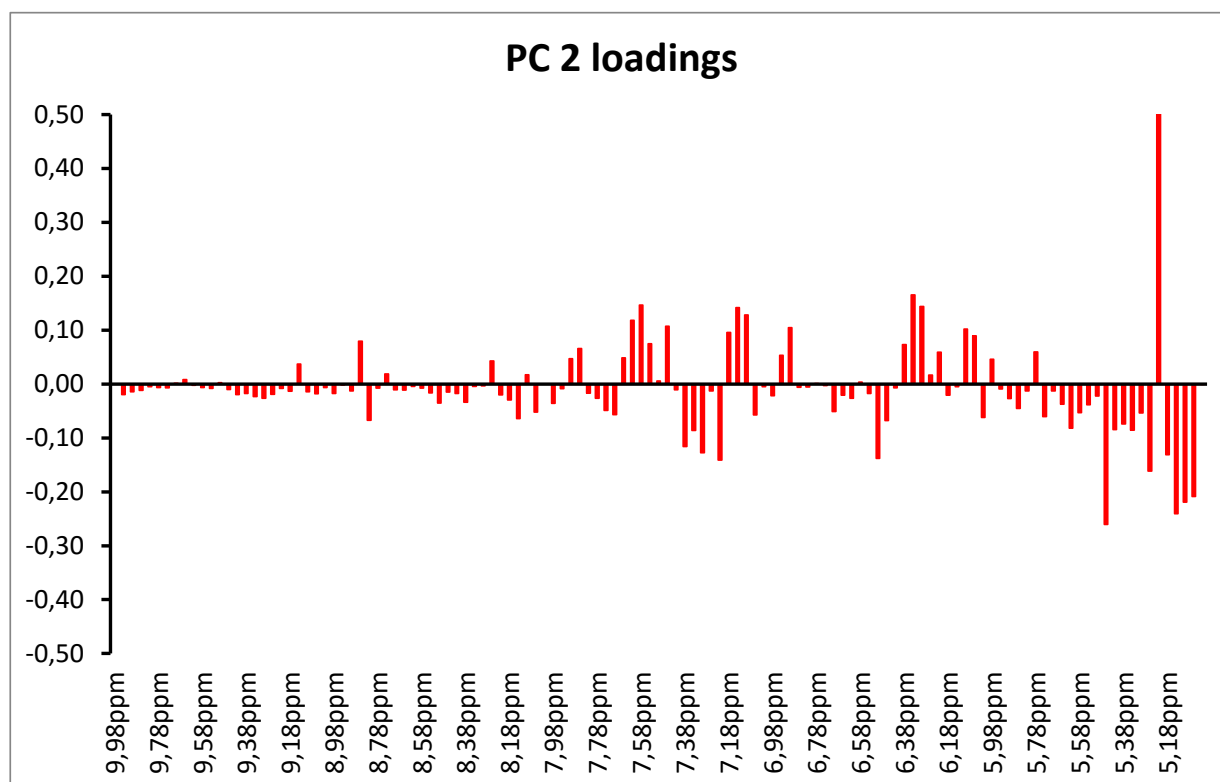


Figura 5.29 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 5 a 10 ppm.

In questa seconda parte dello spettro, figura 5.29, possiamo riscontrare che la maggior parte dei metaboliti siano di natura secondaria. Con peso positivo si identificano l'acetaldeide (9.66 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acido sirringico (7.38 ppm), la quercetina (6.30, 6.52, 7.00, 7.65, 7.74 ppm), la (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 6.93, 7.58, 7.70 ppm), il *trans*-resveratrolo (6.31, 6.64, 6.91, 6.96, 7.14, 7.50 ppm), l'acido benzoico (7.54, 7.68, 8.02 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.13, 6.84, 6.93, 6.99, 7.02 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 6.94, 7.18, 7.30, 7.66 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm), e con peso negativo: l'acido galatturonico (5.30 ppm), il D-mannosio (5.16 ppm), il saccarosio (5.39 ppm), il d-ribosio (5.22 ppm).

*Figura 5.30 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 5 a 10 ppm.*

Dall'analisi del loadings-plot in figura 5.30 si sono riscontrati i seguenti metaboliti con peso positivo: il d-ribosio (5.22 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm). Con peso negativo si sono osservati i seguenti metaboliti: l'acido galatturonico (5.30 ppm), il D-mannosio (5.16 ppm), il saccarosio (5.39 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm).

5.5 Ampliamento del confronto tra microzone di produzione con vino Barbera

In quest'ultima parte del lavoro sulle microzone di produzione, si è voluto estendere quanto visto nel paragrafo 5.4 aggiungendo ai vini analizzati in quel contesto altri tre vini della provincia di Alessandria. In particolare si sono aggiunti due vini (Barbera03 e Barbera06) provenienti da due produttori dello stesso paese, Rosignano Monferrato, ed un vino (Barbera09) proveniente dal comune di Vignale Monferrato. Il comune di Vignale Monferrato, pur essendo nella provincia di Alessandria, è molto vicino anche alla provincia di Asti. Tutti i comuni considerati si trovano nell'arco di cinquanta chilometri l'uno dall'altro.

5.5.1 Analisi chimiche ed isotopiche

Le tabelle 5.9 e 5.10 riportano i dati delle analisi chimiche ed isotopiche. Le analisi di routine, mostrano come il pH della Barbera03, Barbera04 e Barbera11 risultano più alti rispetto agli altri tre. L'acidità totale, tranne che per la Barbera05, non mostra apprezzabili differenze. L'alcol, gli antociani totali e i flavonoidi totali risultano più elevati nella Barbera09 rispetto agli altri vini. Per quanto riguarda il colore, i valori di intensità colorante risultano più alti nella Barbera05 e Barbera09. I valori isotopici dei vini rientrano nelle media dei valori individuati nelle banche dati per le zone in esame.

Tabella 5.9 Analisi chimiche e spettrofotometriche

VINI	pH	Ac. Totale (g/L)	Anto. Tot. (mg/L)	Flav. Tot. (mg/L)	A 420	A 520	A 620	A 420/A 520	A 420 + A 520
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
BA04-13	3,72	4,89	176	1266	0,18	0,21	0,04	0,842	0,393
BA05-13	3,40	5,66	207	1588	0,33	0,53	0,09	0,630	0,865
BA11-13	3,60	4,44	163	1264	0,19	0,22	0,05	0,841	0,406
BA03-13	3,86	3,94	141	1191	0,22	0,31	0,07	0,697	0,529
BA06-13	3,38	4,87	157	1219	0,19	0,26	0,05	0,743	0,452
BA09-13	3,45	4,53	313	1734	0,34	0,48	0,10	0,706	0,822

Tabella 5.10 Analisi isotopiche

VINI	distillato (% vol)	(D/H) _I ppm	(D/H) _{II} ppm	R	¹⁸ O/ ¹⁶ O δ ‰ vs SMOW
	Media	Media	Media	Media	Media
BA04-13	12,78	100,06	129,20	2,582	0,290
BA05-13	13,21	98,81	128,52	2,601	-1,010
BA11-13	11,87	98,28	127,79	2,601	-0,446
BA03-13	12,26	99,78	131,71	2,640	1,380
BA06-13	11,52	100,26	126,63	2,526	0,090
BA09-13	14,37	98,25	128,86	2,623	-0,312

5.5.2 Analisi statistica dei dati chimici ed isotopici

In figura 5.31 lungo la PC 1 si osservano i vini di Barbera05 e Barbera09 a valori positivi, mentre a valori negativi si posizionano i vini di Barbera04, Barbera03, Barbera06, Barbera11. Le prime due componenti principali, spiegano il 81,33% della varianza totale. Lungo il secondo componente principale si distinguono tre gruppi: a valori negativi la Barbera06, a valori intermedi la Barbera04, Barbera05, la Barbera09 e la Barbera11, e a valori positivi la Barbera03. I due vini Barbera provenienti dallo stesso comune hanno la stessa proiezione su PC 1, ma sono a valori opposti su PC 2. La PC 2 sembra quindi indicare differenze dovute ai produttori piuttosto che alle zone di origine.

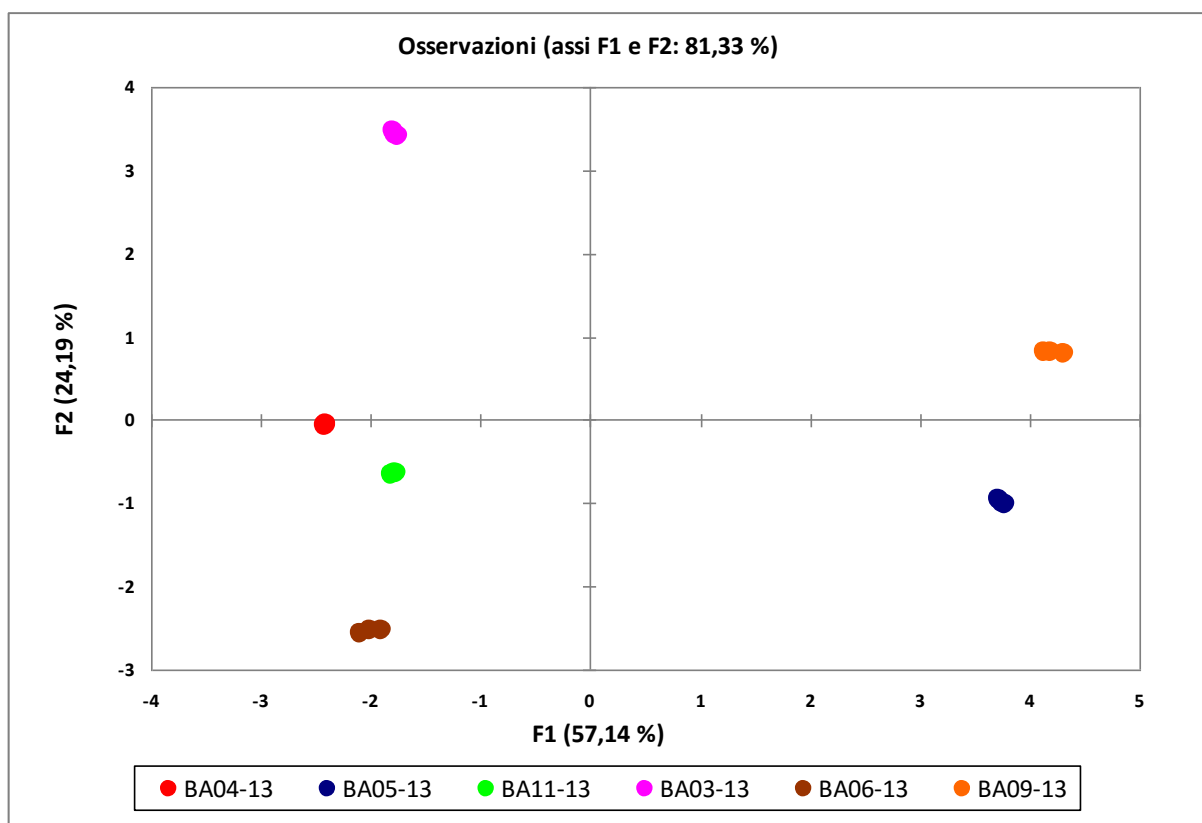


Figura 5.31 Score plot PC 1 vs. PC 2 dati chimici ed isotopici.

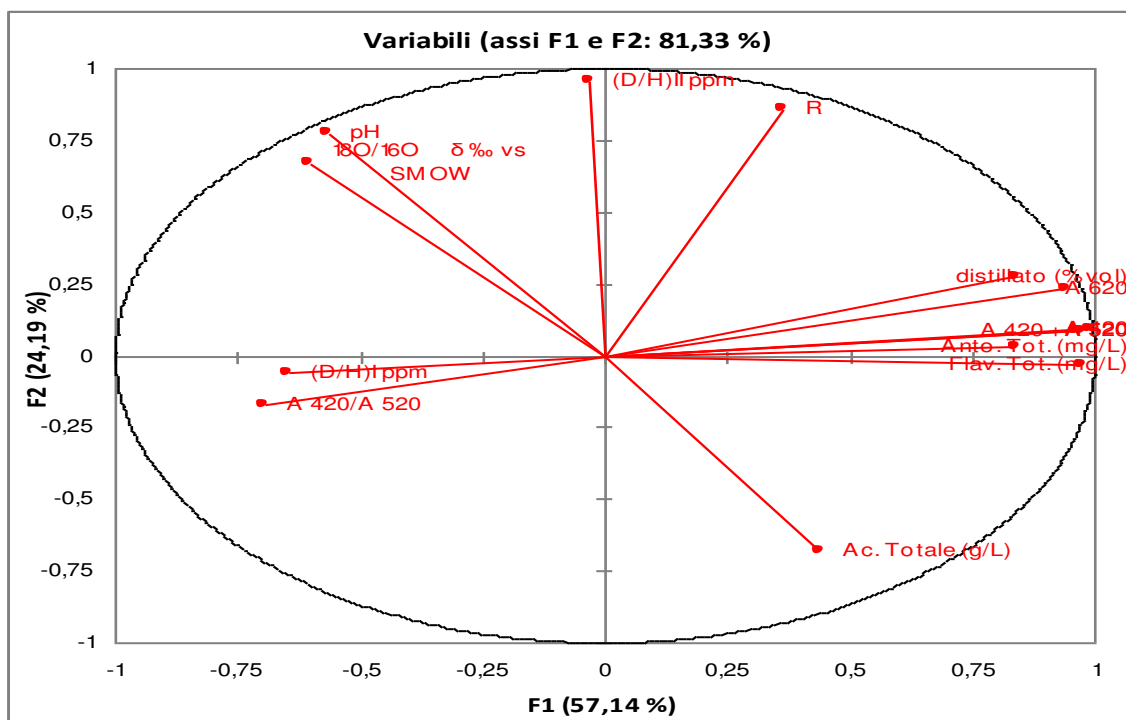


Figura 5.32 Loadings plot per PC 1 e PC 2 dati chimici ed isotopici.

Dal loadings-plot riportato in figura 5.32, si possono evidenziare come i parametri che influiscono maggiormente sulla separazione dei campioni sono quelli relativi all'acidità totale, agli antociani totali, ai flavonoidi totali ed all'alcol, il (D/H)_{II} a valori positivi sulla (PC1). Mentre i valori isotopici del (DH)_I, ¹⁸O/¹⁶O e pH hanno peso negativo. Variabili importanti per la PC 2 sono: (DH)_{II}, grado alcolico, pH e acidità totale.

5.5.3 Analisi 1HNMR per la valutazione degli effetti della zona di produzione

Dalla figura 5.33 si può vedere come le prime due componenti principali, che spiegano il 68.71% della varianza totale, siano in grado di raggruppare i campioni in due gruppi di appartenenza lungo il primo componente principale. Da un lato a valori positivi la Barbera05, e la Barbera09 mentre a valori negativi si posizionano la Barbera03, la Barbera04, la Barbera06, e la Barbera11. Invece lungo il secondo componente principale vengono differenziati altri due gruppi, il primo: la Barbera03, la Barbera06, e la Barbera11, a valori negativi ed il secondo gruppo: la Barbera04, la Barbera05, e la Barbera09 a valori positivi. In questo caso, i due campioni provenienti dallo stesso comune si trovano molto vicini sia su PC 1 che su PC 2. Il raggruppamento osservato tra i campioni, quindi, è realmente dovuto alla zona di origine dei campioni.

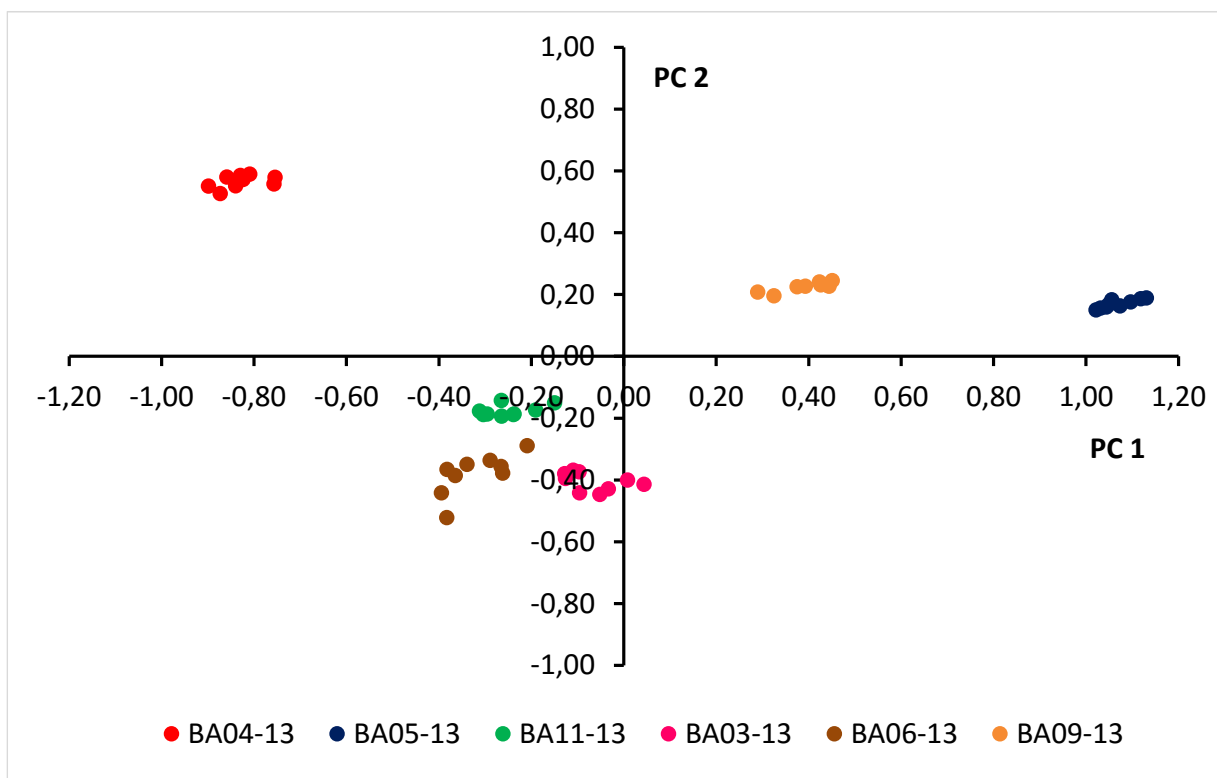


Figura 5.33 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 0,5 a 10 ppm.

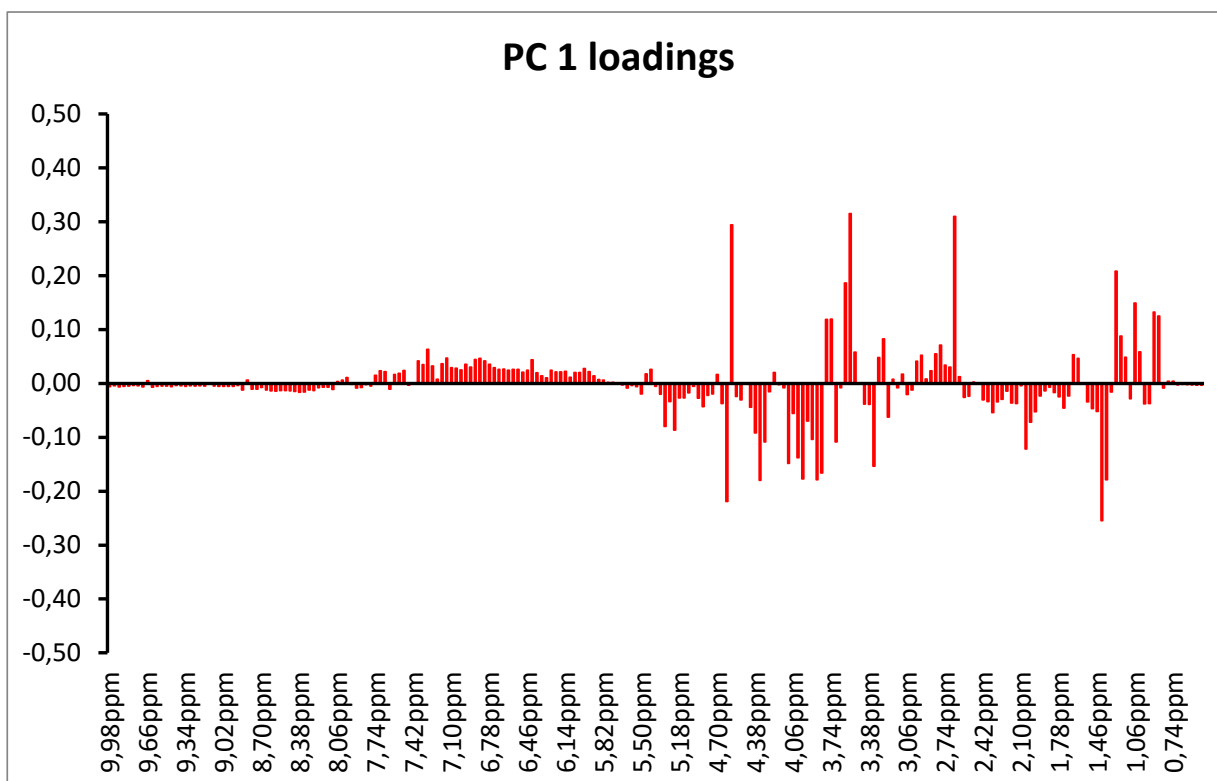


Figura 5.34 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

La figura 5.34 riporta il grafico dei pesi per la PC 1 da cui è possibile risalire ai principali metaboliti coinvolti nella definizione di questa PC. Con peso positivo abbiamo: l'etanolo (1,04, 1,30, 3,50, 7,38 ppm) l'acido tartarico (4,60), l'acido gallico (7,15 ppm), l'acido succinico

(2.65 ppm), l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'epicatechina gallato (6.10, 6.13, 6.84, 6.93, 6.99, 7.02 ppm), il glicerolo (3.54, 3.55, 3.77 ppm).

Al contrario con peso negativo troviamo: il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm), l'acido galatturonico (3.92, 4.24, 4.30, 4.31, 4.64, 5.19, 5.24, 5.30 ppm), il D- mannosio (3.35, 3.56, 3.82, 5.16 ppm), il saccarosio (4.03, 4.19, 5.39 ppm), l'etilattato (1.39, 4.18, 4.34 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm), l'alanina (1.49, 3.85 ppm), l'acetoino (1.36, 2.21, 4.40 ppm), il metanolo (3.34 ppm).

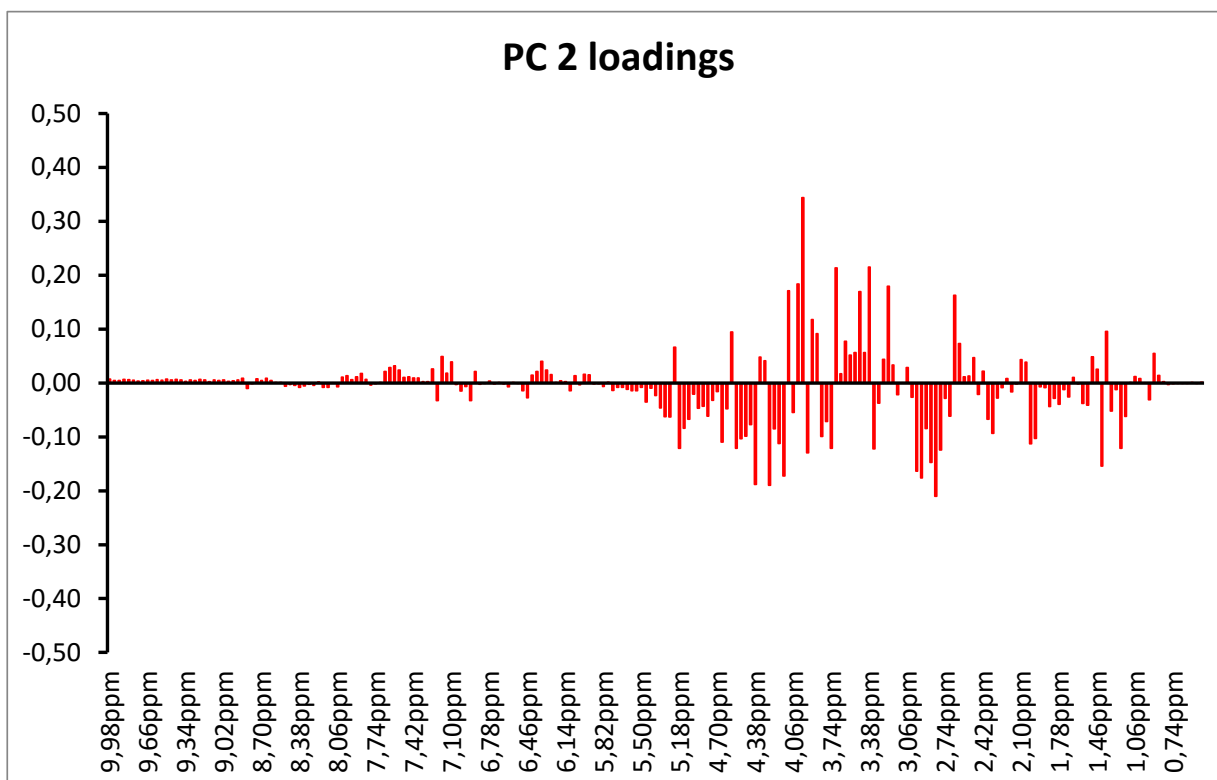


Figura 5.35 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 0,5 a 10 ppm.

Nella figura 5.35 si riportano i pesi per la PC 2. Da questi è possibile individuare i metaboliti importanti per questa PC. Con peso positivo si distinguono: il fruttosio (3.87, 3.97, 4.00, 4.09 ppm), l'acido succinico (2.65 ppm), l'acido tartarico (4.60), l'acido gallico (7.15 ppm), il glicerolo (3.54, 3.55, 3.77 ppm), l'acido lattico (1.40, 4.34 ppm), l'alanina (1.49, 3.85 ppm), l'acido acetico (2.06 ppm). Mentre con peso negativo si trovano: l'acido citrico (2.80, 2.96 ppm), l'acido malico (2.70, 2.88, 4.53 ppm), il metanolo (3.34 ppm), l'acido aspartico (2.94, 3.00, 4.05 ppm), la treonina (1.32, 4.27 ppm), l'etilattato (1.39, 4.18, 4.34 ppm).

Per valutare se i soli metaboliti secondari fossero in grado di separare i campioni, l'analisi PCA è stata ripetuta considerando la zona dello spettro da 5 a 10 ppm.

In questa seconda parte dello spettro, come si può vedere dalla figura 5.36 le prime due componenti principali, che spiegano il 74.25% della varianza totale, sono in grado di raggruppare i campioni in tre gruppi di appartenenza lungo il primo componente principale. A valori positivi la Barbera05, e la Barbera09 mentre a valori negativi si posizionano la Barbera03, la Barbera04, la Barbera06, e la Barbera11. Lungo il secondo componente principale vengono differenziati invece due gruppi, il primo: la Barbera03, a valori negativi ed il secondo gruppo: la Barbera04, la Barbera05, e la Barbera09, e la Barbera11 a valori positivi.

I campioni di vino provenienti dallo stesso comune hanno la stessa proiezione lungo la PC 1 ma risultano separati dalla PC 2. La PC 2, quindi, indica una separazione dei campioni non dovuta alla zona di provenienza.

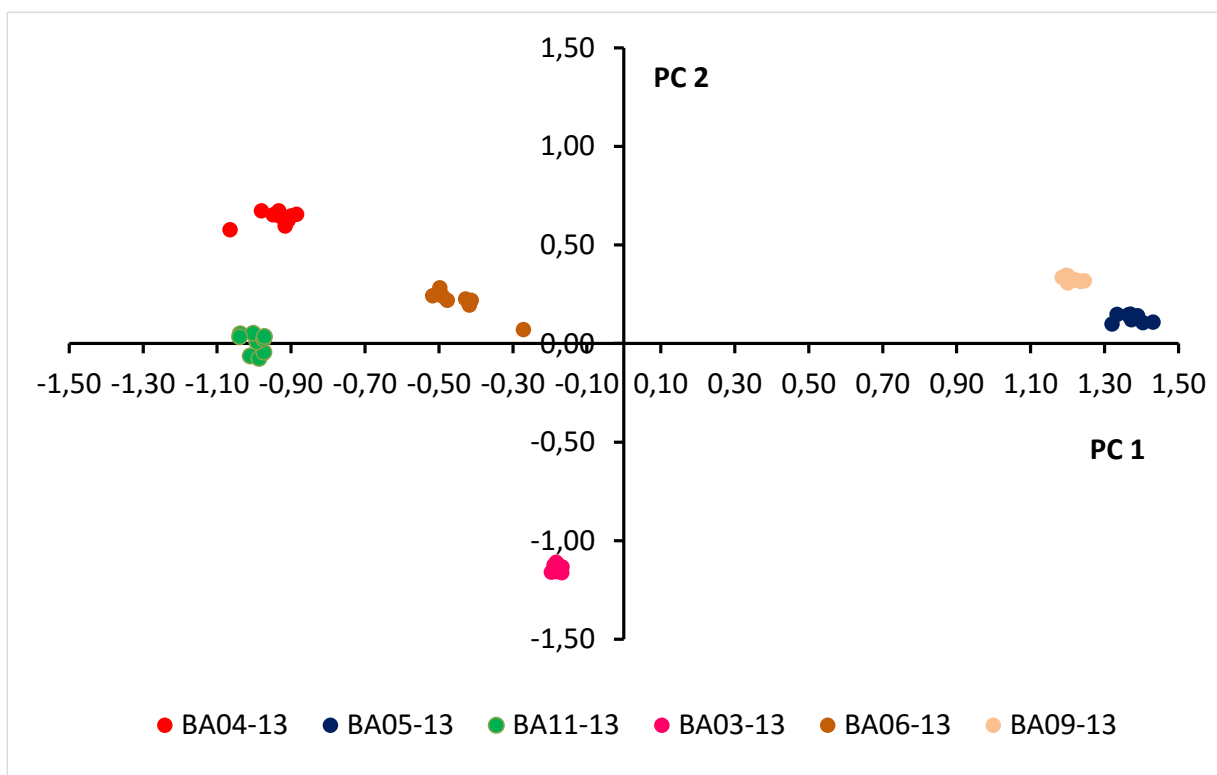


Figura 5.36 Grafico delle proiezioni PC 1 e PC 2, spettro da 5 a 10 ppm

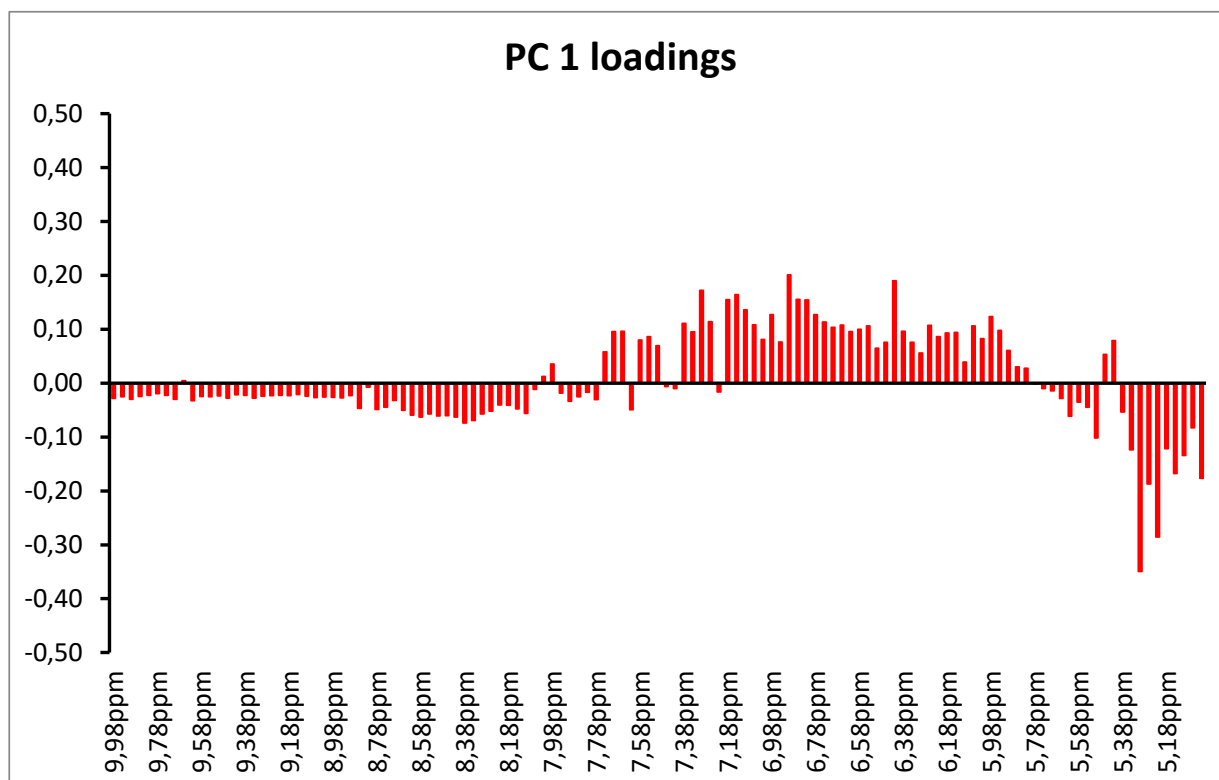


Figura 5.37 Grafico dei pesi per PC 1, spettro intero da 5 a 10 ppm.

La figura 5.37 riporta il grafico dei pesi per la PC 1 da cui è possibile ricavare i principali metaboliti coinvolti nella definizione di questa PC. Con peso positivo abbiamo: la quercetina (6.30, 6.52, 7.00, 7.65, 7.74 ppm), l'acido sirigico (7.38 ppm), l'acido *p*-cumarico (6.38, 6.93, 7.58, 7.70 ppm), il *trans*-resveratrolo (6.31, 6.64, 6.91, 6.96, 7.14, 7.50 ppm), l'acido *trans*-ferrulico (6.41, 6.94, 7.18, 7.30, 7.66 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), la tirosina (6.87, 7.18 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91, 6.93 ppm), la (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm). Con peso negativo troviamo: l'acido galatturonico (5.30 ppm), il D- mannosio (5.16 ppm), il saccarosio (5.39 ppm) ed il d-ribosio (5.22 ppm).

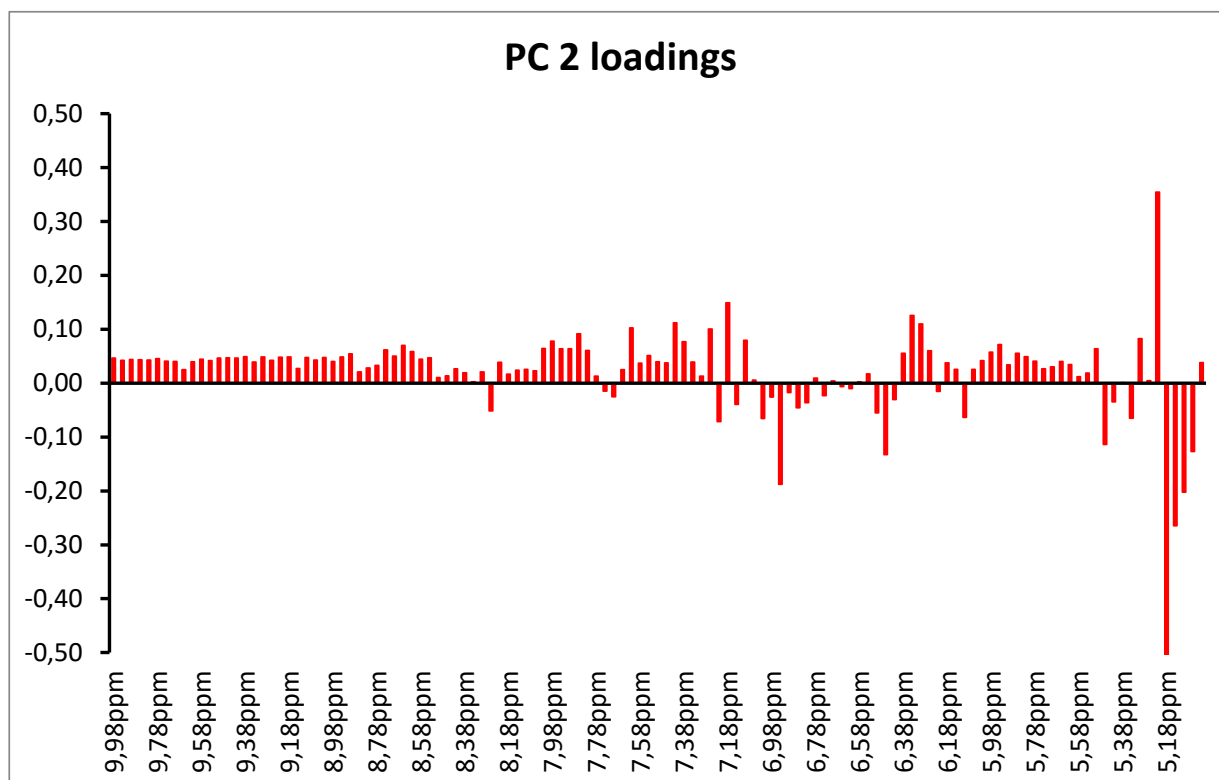


Figura 5.38 Grafico dei pesi per PC 2, spettro intero da 5 a 10 ppm.

Nella figura 5.38 si riportano i pesi per la PC 2. Da questi è possibile individuare i metaboliti importanti per questa PC. Hanno peso positivo l'acido galatturonico (5.30 ppm), il d-ribosio (5.22 ppm), il 2-feniletanolo (7.30, 7.37 ppm), l'acetaldeide (9.66 ppm), l'acido benzoico (7.54, 7.68, 8.02 ppm), l'arginina (6.70, 7.26 ppm), l'istidina (7.38, 8.65 ppm), l'acido siringico (7.38 ppm). Mentre con peso negativo si trovano: il D- mannosio (5.16 ppm), la (+)-catechina idrato (6.00, 6.10, 6.85, 6.91 6.93 ppm), la (+)-epicatechina (6.09, 6.93, 7.04 ppm), l'acido gallico (7.15 ppm).

5.6 Analisi dei risultati ottenuti

La spettroscopia ^1H NMR unita all'analisi PCA ha permesso di separare i campioni di vino in base alla loro zona di provenienza in modo analogo, ed in alcuni casi migliore, rispetto alle altre tecniche di analisi chimiche ed isotopiche. L'analisi dei grafici dei pesi ha permesso di individuare quali fossero i principali metaboliti responsabili della separazione dei campioni per ogni singolo caso considerato.

Le analisi statistiche condotte considerando solo la zona spettrale da 5 a 10 ppm hanno mostrato una migliore separazione dei campioni ed una maggiore percentuale di varianza spiegata da PC 1 e PC 2 rispetto a quelle eseguite su spettro intero. Questa evidenza conferma quanto già osservato nel capitolo 4: la zona dello spettro NMR che contiene i segnali dei metaboliti secondari è quella più importante per la differenziazione dei vini rossi.

Quando lo studio delle zone di produzione si è spinto a confrontare campioni di vino provenienti da zone molto vicine, si sono evidenziati alcuni limiti del metodo. Alcune volte, infatti, differenze tra i campioni dovute alle diverse pratiche di cantina dei produttori si sono dimostrate preponderanti sulle differenze da zona di produzione. Questa osservazione vuole sottolineare non tanto una debolezza del metodo ^1H NMR per l'analisi dei vini, ma, piuttosto,

Christos Tsolakis

Studio dei metaboliti del vino da vitigni coltivati in Piemonte attraverso l'uso della spettroscopia NMR

l'importanza di avere la possibilità di accedere a campioni di vino certificati prodotti secondo procedure standardizzate e controllate.

CONCLUSIONI

La spettroscopia ^1H NMR si rivela una tecnica all'avanguardia per il settore enologico e le sue future applicazioni dimostrandosi come un nuovo modo di osservare le dinamiche nel vino.

Il metodo di analisi è innovativo non distruttivo e richiede minime quantità di campione. La preparazione del campione è facile e veloce e permette di lavorare sul vino tal quale. Il tempo richiesto per la misura non va oltre i trenta minuti ed i risultati ottenuti su campioni replicati sono altamente riproducibili.

Con la preparazione di una libreria di spettri registrati sui metaboliti puri in matrice idroalcolica, la tecnica NMR si è dimostrata uno strumento analitico per la determinazione anche quantitativa dei componenti del vino.

Il metodo ^1H -NMR si è dimostrato complementare ai metodi (ormai assodati) isotopici NMR (D/H) ed IRMS ed ha permesso di ottenere un migliore quadro analitico ed una maggiore sicurezza sul contenuto in metaboliti nei vini.

La spettroscopia ^1H NMR, unita all'analisi statistica delle componenti principali, è stata in grado di separare tra loro i campioni sia di vino rosso che di vino bianco in tutti i casi considerati. In particolare si è stati in grado di evidenziare differenze tra vini provenienti da vitigni diversi e loro miscele, vini provenienti da diverse annate di produzione e vini con diversi periodi di invecchiamento. Si sono inoltre separati i vini in base alle diverse zone di produzione. Per ogni singola fase del lavoro, l'analisi dei dati ha permesso di identificare i principali metaboliti che determinano la separazione dei campioni.

Per i vini rossi si è potuta riscontrare la maggior varianza spiegata dalle prime due PC quando l'analisi delle PCA è stata condotta sulla regione dello spettro tra 5 e 10 ppm. Al contrario per i vini bianchi la maggior quantità di informazione spiegata da PC 1 e PC 2 si è potuta osservare considerando la zona dello spettro NMR da 0.5 a 5 ppm. Per i vini rossi, la parte dello spettro più significativa è quella in cui cadono i segnali dei metaboliti secondari di cui questi vini sono molto ricchi. Per i vini bianchi, invece, le maggiori informazioni si ricavano dalla zona dello spettro NMR dove cadono i segnali degli acidi organici, degli zuccheri e dei principali amminoacidi essendo questi vini poveri di metaboliti secondari.

L'elevata percentuale di varianza spiegata dalla PC 1 nello studio dei vini provenienti da vitigni diversi e delle loro miscele, unita alla separazione dei campioni che questa PC è in grado di fornire, indica come lo spettro NMR sia molto informativo per la separazione dei vini in base a questo criterio.

Durante lo studio sui vini rossi e bianchi di diversa annata di produzione si è potuto notare che la spettroscopia NMR, unita all'analisi statistica, è stata in grado di separare bene i vini delle diverse vendemmie. Le differenze riscontrate nei vini di diverse annate di produzione possono derivare dalle differenti condizioni climatiche di queste ultime. La radiazione solare, la temperatura media annua, il vento, la piovosità, l'umidità dell'aria e l'evaporazione sono fattori importanti per l'evoluzione delle caratteristiche della vite e dell'uva da essa prodotta. Queste caratteristiche si ripercuotono sul processo di vinificazione e sul prodotto finale.

L'analisi dei dati NMR ottenuti sui vini rossi e bianchi con diverso periodo di conservazione ha dimostrato che, sebbene con difficoltà, sia possibile rilevare differenze tra i campioni. I risultati non sempre pienamente soddisfacenti ottenuti in questa fase del lavoro sono in parte riconducibili alle condizioni di stoccaggio dei campioni durante il periodo di conservazione (12°C, al riparo dalla luce). In queste condizioni l'invecchiamento dei vini è molto rallentato. Per cui, anche dopo 24 mesi, le differenze tra i campioni sono molto piccole.

La spettroscopia ^1H NMR unita all'analisi PCA ha permesso di separare i campioni di vino in base alla loro zona di provenienza in modo analogo, ed in alcuni casi migliore, rispetto alle altre tecniche di analisi chimiche ed isotopiche. Quando lo studio delle zone di produzione si è spinto a confrontare campioni di vino provenienti da zone molto vicine, si sono evidenziati alcuni limiti del metodo. Alcune volte, infatti, differenze tra i campioni dovute alle diverse pratiche di cantina dei produttori si sono dimostrate preponderanti sulle differenze da zona di produzione. Questa osservazione vuole sottolineare non tanto una debolezza del metodo ^1H NMR per l'analisi dei vini, ma, piuttosto, l'importanza di avere la possibilità di accedere a campioni di vino di sicura provenienza, prodotti secondo procedure standardizzate e controllate.

BIBLIOGRAFIA

- C. Aghemo, A. Albertino, R. Gobetto, F. Spanna. Correlation between isotopic and meteorological parameters in Italian wines: a local-scale approach. *J. Sci. Food Agric.*, 2011, 91, 2088–2094.
- K. Ali, F. Maltese, R. Toepfer, Y. Hae Choi, R. Verpoorte. Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *J. Biomol. NMR*, 2011, 49, 255–266.
- J. K. Amrani, Y. Glories, M. Mercier. Localisation des tannins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, 1994, 33, 133-138.
- M. Anastasiadi, A. Zira, P. Magiatis, S. A. Haroutounian, A. L. Skaltsounis, E. Mikros. ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 11067–11074.
- A. Baiano, C. Terracone, F. Longobardi, A. Ventrella, A. Agostiano, M. A. Del Nobile. Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics of Sauvignon blanc wines. *Food Chem.*, 2012, 135, 2694–2701.
- H. Bartlett, F. Eperjesi. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol. Opt.*, 2003, 23 (5), 383-399.
- M.A. Brescia, V. Caldarola, A. De Giglio, D. Benedetti, F.P. Fanizzi, A. Sacco. Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 458, 177–186.
- A. Calo, D. Tomasi, M.C. Cravero, R. Di Stefano. Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp.), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoiltartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti* 1984, 25 (1054), 47-61.
- A. Calokerinos. NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits. *Food Chem.*, 2013, 138, 1837–1846.
- I.D. Campbell, R.A. Dwek.. *Biological Spetroscopy*, 1995, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park.
- M. Castino,. Caratteristiche sensoriali dei polifenoli flavanici dei vini. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 1991, 22 (Parte I), 243-251.
- V. Cheynier, C. Osse, J. Rigaud. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.*, 1988, 53, 1729-1732.
- V. Cheynier,; M. Duenas-Paton, E. Salas, C. Maury, J. M. Souquet, P. Sarni-Manchado, H. Fulcrand,. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Viticult.*, 2006, 57 (3), 298-305.
- Commission Regulation (EEC) No 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines (1990) *Official Journal of the European Communities*, L 272, Volume 33, 1-192.

- MC. Cravero, R. Di Stefano. Composizione fenolica di alcune varietà di vite coltivate in Piemonte. *Vignevini*, Bologna, 1992, 19 (5), 47-54.
- M. C. Cravero, S. Guidoni, A. Schneider, R. Di Stefano. Caractérisation variétale de cépages musqués à raisin coloré au moyen de paramètres ampélographiques descriptifs et biochimiques. *Vitis*, 1994, 33 (2), 75-80.
- MC. Cravero, V. Dell'Oro. Il resveratrolo: un composto polifenolico dell'uva e del vino di interesse terapeutico. *Enotecnico*, 1995, 4, 67-72.
- R. Di Stefano, MC. Cravero, N. Gentilini. Methods for polyphenol determination in wine. *Enotecnico*, 1989, 25 (5), 83-89.
- R. Di Stefano, MC. Cravero. Red wine colour and phenolic compounds. *Enotecnico*, 1989, 25 (10), 81-87.
- R. Di Stefano, MC. Cravero. I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. *Riv. Vitic. Enol.*, 1990, 1, 34-44.
- R. Di Stefano, D. Borsa, N. Gentilini. Estrazione degli antociani dalle bucce dell'uva durante la fermentazione. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 1994, 25 (1), 31-46.
- R. Di Stefano, D. Borsa, G. Maggiorotto, L. Corino. Terpeni e polifenoli dei 'Brachetti' e delle 'Malvasie'. *L'Enotecnico*, 1995, 45, 67-75.
- R. Di Stefano, I. Ummarino, N. Gentilini. Alcuni aspetti del controllo di qualità nel campo enologico. Lo stato di combinazione degli antociani. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 1996a, 27, 105-121.
- R. Di Stefano. Composti fenolici e volatili del Barolo. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 1996b, 27, 91-103.
- Y.-Y. Du, G.-Y. Bai, X. Zhang, M.-L. Liu. Classification of Wines Based on Combination of ^1H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Chin. J. Chem.*, 2007, 25 (7), 930-936.
- H. Forstel, G.J. Martin, D. Olschimke, R. Wittkowski. Détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des vins. 1996, Office International de la Vigne et du Vin FV N° 1035 2366/190396.
- C. Fotakis, K. Kokkotou, P. Zoumpoulakis, M. Zervou. NMR metabolite fingerprinting in grape derived products. An overview. *Food Res. Int.*, 2013, 54, 1184-1194.
- C. Fotakis, D. Christodouleas, K. Kokkotou, M. Zervou, P. Zoumpoulakis, P. Moulos, M. Liouni, A. P. Minoja, C. Napoli. NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. *Food Res. Int.*, 2014, 63, 126-131.
- H. Fulcrand, M. Duenas, E. Salas, V. Cheynier. Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Viticult.*, 2006, 57 (3), 289-297.
- P. Giannessi, M. Matta, 1987 - Trattato di scienza e di Enologia, vol I, p 122-137 OIV 1995. Cahier scientifique et technique: le plomb. Bulletin OIV.

- A. Genovese, A. Gambuti, P. Piombino, L. Moio. Sensory Properties and Aroma Compounds of Sweet Fiano Wine. *Food Chem.*, 2007, 103 (3), 1228-1236.
- Y. Glories, 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse -Université de Bordeaux 11.
- R. Godelmann, F. Fang, E. Humpfer, B. Schütz, M. Bansbach, H. Schäfer, M. Spraul. Targeted and Nontargeted Wine Analysis by ^1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 5610–5619.
- S. Guidoni, R. Di Stefano, A. Schneider, M.C. Cravero. Caractérisation ampélographique et aromatique de cépages musqués à raisin coloré. *Atti del Simposio Internazionale "Connaissance Aromatique des cépages et qualité des vins"*, 1993, 142-151.
- E. Haslam, 1975. Natural proanthocyanidines. In «The flavonoids» J.B. Harborne, T.J. Mabry et H. Mabry ed., pp 505-559.
- Y.S. Hong. NMR-based metabolomics in wine science. *Magn. Reson. Chem.*, 2011, 49, S13–S21.
- E. Jamin, F. Martin., G.G. Martin. Determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of Ethanol derived from fruit juices and maple syrup by Isotopic Ratio Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.*, 2004, 87 (3): 621-630.
- I. J. Košir, J. Kidric. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 458, 77–84.
- L. Laghi, A. Versari, E. Marcolini, G. P. Parpinello. Metabonomic Investigation by ^1H -NMR to Discriminate between Red Wines from Organic and Biodynamic Grapes. *Food Nutr. Sci.*, 2014, 5, 52-59.
- F. H. Larsen, F. Van Den Berg, S. B. Engelsen. An exploratory chemometric study of ^1H NMR spectra of table wines. *J. Chemometrics*, 2006, 20, 198–208.
- J.E. Lee, G. S. Hwang, F. Van Den Berg, C. H. Lee, Y.S. Hong. Evidence of vintage effects on grape wines using ^1H NMR-based metabolomic study. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 648, 71–76.
- E. López-Rituerto, F. Savorani, A. Avenozza, J. H. Busto, J. M. Peregrina, S. B. Engelsen. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ^1H NMR Metabolomics. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 3452–3461.
- F. Mannini, N. Argamante, R. Credi. Improvements in the quality of grapevine Nebbiolo clones obtained by sanitation. *Acta Horticulturae*, 1995, 427, 319-324.
- G.J. Martin, C. Guillou, N. Naulet, S. Brun, Y. Tep, J.C. Cabanis, P. Sudraud. Control of origin and enrichment of wine by Specific Isotope Analyses. *Sciences des Aliments*, 1986, 6, 385-405.
- F. Mattivi, G. Versini. Influenza delle tecnologie di vinificazione sul patrimonio fenolico di vini Teroldego Rotaliano. *Atti del Convegno "Il Teroldego Rotaliano"*, 1989, Suppl. Boll., ISMA, 3, 83-91.

Y. B. Monakhova, H. Schäfer, E. Humpfer, M. Spraul, T. Kuballa, D.W. Lachenmeier. Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR to provide sensitivity for analysing alcoholic beverages. *Magn. Reson. Chem.*, 2011, 49, 734–739.

Y. B. Monakhova, T. Kuballa, D. W. Lachenmeier. Chemometric Methods in NMR Spectroscopic Analysis of Food Products. *J. Anal. Chem.*, 2013, 68 (9), 755–766.

Y. B. Monakhova, R. Godelmann, A. Hermann, T. Kuballa, C. Cannet, H. Schäfer, M. Spraul, D. N. Rutledge. Synergistic effect of the simultaneous chemometric analysis of ^1H NMR spectroscopic and stable isotope (SNIF-NMR, ^{18}O , ^{13}C) data: Application to wine analysis. *Anal. Chim. Acta*, 2014, 833, 29–39.

CW. Nagel, LW. Wulf. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Amer. J. Enol. Viticult.* 1979, 30, 111-116.

G. Nicolini, R. Larcher, P. Pangrazzi, L. Bontempo. Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*, 2004, 43 (1), 41-45.

M. Nilsson, I. F. Duarte, C. Almeida, I. Delgadillo, B. J. Goodfellow, A. M. Gil, G. A. Morris. High-Resolution NMR and Diffusion-Ordered Spectroscopy of Port Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 3736-3743.

G. E. Pereira, J.P. Gaudillère, C. Van Leeuwen, G. Hilbert, M. Maucourt, C. Deborde, A. Moing, D. Rolin. ^1H -NMR Metabolic Profiling of Wines from Three Cultivars, Three Soil Types and Two Contrasting Vintages. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 2007, 41(2), 103-109.

Registro nazionale delle varietà di viti, Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca per la viticoltura, <http://catalogoviti.politicheagricole.it/home.php>.

J. Ribéreau-Gayon, E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, P. Sudraud, 1976. *Traité d'Oenologie-Sciences et Techniques du vin*. Dunod, Paris, 3: 198-225.

P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, *Trattato di Enologia 2*, vol. 2: *Chimica del Vino Stabilizzazione Trattamenti - 3A EDIZIONE*, (2010), Edagricole – Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE, Milano.

C. Riponi, M. Bourzeix, N. Heredia, P. Benard, M. Moutounet, J.L. Escudie, M. Caillet. Analysis of pigment composition. Influence of vinification at different temperatures. *Progres Agricole et Viticole*, 1985, 102 (13-14), 331-335.

P. Sarni, H. Fulcrand, V. Souillol, JM. Souquet, V. Cheynier. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 1995, 69 (3), 385-391.

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

VL. Singleton, M. Salgues, J. Zaya, E. Trousdale. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1985, 36, 50-56.

H.S. Son, G. S. Hwang, K. M. Kim, H.J. Ahn, W.M. Park, F. Van Den Berg, Y.S. Hong, C.H. Lee. Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using ^1H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 1481–1490.

CF. Timberlake, P. Bridle. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1976, 27, 97-105.

F. Thomas, E. Jamin. ^2H NMR and ^{13}C -IRMS Analyses of acetic acid from vinegar, ^{18}O -IRMS analysis of water in vinegar (International Collaborative Report). *Anal. Chim. Acta*, 2009, 649, 98-105.

J.H. Thorngate, V.L. Singleton. Localization of procyanidins in grape seeds. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1994, 45, 259–262.

R. Todeschini. *Introduzione alla Chemiometria*, (2003), Edises, Napoli.

I. Ummarino, R. Di Stefano. Influenza del numero di semi per acino sulla composizione dell'uva. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, Conegliano, 1996, 49 (4), 29-37.

L. Viggiani, M. A. Castiglione Morelli. Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance: A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 8273–8279.

Relazione dell'attività svolta durante il dottorato di ricerca

Attività didattica svolta durante il periodo del Dottorato di Ricerca:

- IV Congresso Internazionale CERVIM (Lyon) dal 07/11/2012 al 09/11/2012
- Alimentazione Agricoltura e Sostenibilità: tre sfide per il futuro dell'umanità. Polo universitario Asti studi superiori il 21/11/2012
- Valor Vitis – Valorizzazione dei sottoprodotti della filiera vitivinicola per la produzione di composti ad alto valore aggiunto. Laboratorio Chimico della Camera di commercio di Torino il 01/03/2013.
- Seminario della Agilent Technologies a Torino il 09/04/2013
- CISETA – XI° Congresso Italiano di Scienza e Tecnologia degli Alimenti. RHO – MILANO il 21/05/2013 e il 22/05/2013
- Seminario Perkin Elmer “Controllo, caratterizzazione quali – quantitativa e problematiche analitiche emergenti nell'ambito dei prodotti viti-vinicoli”. Asti 30/05/2013
- BIOSTAT. Scuola estiva di alta formazione. Inferenza statistica in Biologia e Scienze Umane. Asti dal 24/06/2013 al 28/06/2013.
- VII Giornata del Dottorato di Ricerca. Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”. Alessandria il 27/09/2013.
- NMR Bruker Users' Meeting tenuto a Milano il 26 novembre 2013.
- PER.FORM– Unione Industriale della Provincia di Asti Conferimento di incarico di progettazione e docenza relativamente al corso: Titolo del corso: “CANTINIERE” Cod. Avviso 2/2010 progetto AVM/127/10 – ASTI UNA RIQUALIFICA PER IL FUTURO.
- Giornata del Dottorato di ricerca Alessandria, Palazzo del Monferrato, 26 settembre 2014.
- Il Centro di Ricerca per l'Enologia La Fondazione Cassa di Risparmio di Asti Il Polo Universitario Asti Studi Superiori Presentano il Convegno il progetto SALUVA. I polifenoli dell'uva, una risorsa da conoscere e valorizzare Asti -Venerdì 13 Febbraio 2015 - ore 9.00
- Le soluzioni tecnologiche per la CARTA DI MILANO. Lotta alle contraffazioni, diagnostica per controllo qualità delle produzioni alimentari. EXPO Milano Workshop del 17 Settembre 2015
- Seminario *Risonanza Magnetica Nucleare e chimica forense*. Milano, 15 Ottobre 2015 Viale Vincenzo Lancetti 43. Bruker Italia
- Giornata del Dottorato di ricerca Alessandria, Palazzo Borsalino, 25 settembre 2015.

Elenco delle pubblicazioni durante il periodo del Dottorato di Ricerca

- Sansone L., Tassinari R., Belfiore N., Dell'Oro V., Ciambotti A., Tsolakis C., Cravero M.C., Bonello F., Ferioli D., Vaccaro C., Sparacio A., Determinazione delle concentrazioni di metalli e di rapporti isotopici (D / H), $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ per la tracciabilità geografica dei vini di alcune tipiche varietà italiane. Proceedings of the 35th World Congress of Vine and Wine (OIV). 18-22 June 2012, Izmir, Turkey.
- Garcia-Moruno E., Cravero M.C., Costantini A., Doria F., Tsolakis C., Fermentazione malolattica sicura per la valorizzazione della tipicità dei vini. Vitenda 2013, 278-279. Edizioni Vit En, **ISBN 978-88-86055-26-0**.
- Cravero M.C., Bonello F., Tsolakis C., Piano F., Borsa D., Comparison between Nero d'Avola wines produced with grapes grown in Sicily and Tuscany. It. J. Food Sci., 2012, 24, 384-387. **ISSN 1120-1770**.
- Cravero M.C., Bonello F., Tsolakis C., Moriondo G., Sensory profile of red wines made with different blend of local Aosta Valley varieties. Atti del 4° CONGRES INTERNATIONAL SUR LA VITICULTURE DE MONTAGNE, 7 – 9 NOVEMBRE 2012 LYON, RHONE - ALPES FRANCE. **ISBN 97888902330-8-1**.
- Dell'Oro V., Ciambotti A., Tsolakis C., Carbon Isotopic ratio variations related to water stress in some Tuscan and Sicilian wines. Progrès Agricole et Viticole, 2012, 129 (17), 400-403. **ISSN 0369-8173**.
- Dell'Oro V., Ciambotti A., Tsolakis C., Controllo qualità dei vini passiti. Laboratorio 2000, maggio 2012, 26-29.
- Dell'Oro V., Ciambotti A., Tsolakis C., Quality and safety of Italian wine vinegar. Ital. J. Food Sci., 2012, 24 (2), 182-187.
- Costantini A.C. E., Angelli A., Bucelli P., Ciambotti A., Dell'Oro V., Natarelli L., Pellegrini S., Perria R., Priori S., Storchi P., Tsolakis C., Vignozzi N., Unexpected relationships between $\delta^{13}\text{C}$, water deficit, and wine grape performance. IX^o International Congress of Vitivinicultural Terroirs. June 25th- 29th, 2012, Dijon (Burgundy) and Reims (Champagne).

- Bonello F., Tsolakis C., Cravero M.C., Ciambotti A., Dell'Oro V., Sansone L., Rapporti isotopici e profili sensoriali per la tracciabilità dei vini. Proceedings of the 35th World Congress of Vine and Wine (OIV). 18-22 June 2012, Izmir, Turkey.
- Borsa D., Cravero M.C., Bonello F., Tsolakis C., Effetti dell'insilamento delle vinacce sulla composizione della Grappa di Moscato. Atti – X Convegno CISETA – Milano, 11 – 12 maggio 2011, 19 – 23. **ISBN 978-88-96027-11-0.**
- Tsolakis C., Chiusano L., Cravero M. C., La qualità del vino? Prevederla assaggiando l'uva. Il corriere vinicolo, Settembre 2013, 86, 33-34.
- Dell'Oro V., Tsolakis C., Ciambotti A., Grappa italiana in commercio. Laboratorio 2000, maggio 2013, 26(4), 46-49.
- Dell'Oro V., Ciambotti A., Tsolakis C., Vini e cocktail aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino. Laboratorio 2000, maggio 2013, 27(4), 50-53.
- Cravero M.C., Bonello F., Tsolakis C., Piano F., Borsa D., Comparison between Nero d'Avola wines produced with grapes grown in Sicily and Tuscany. Italian Food & Beverage Technology, 2013, 72, 14-18. **ISSN 1590-6515.**
- Costantini, E.A.C., Agnelli, A.E., Bucelli, P., Ciambotti, A., Dell'Oro, V., Natarelli, L., Pellegrini, S., Perria, R., Priori, S., Storchi, P., Tsolakis, C., Vignozzi, N., Unexpected relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and wine grape performance in organic farming. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2013, 47, 269 – 285.
- Borsa D., Cravero M.C., Bonello F., Tsolakis C., Effetti dell'insilamento delle vinacce sulla composizione della Grappa di Moscato. Industrie delle Bevande, 2013, 42, 11-14. **ISSN 0390-0541.**
- Borsa D., Asproudi A., Chiusano L., Tsolakis C., Cravero M.C., Valutazione preliminare della qualità di vini Moscato d'Asti senza solforosa. Atti OIV del 36 Congresso Mondiale della Vigna e del Vino. Bucarest, 2-7 giugno 2013.
- Dell'Oro, V., Ciambotti, A., Tsolakis, C., Panoramica sui vini DOP italiani. Laboratorio 2000, 2014, 28 (6), 24-27.
- Dell'Oro V., Tsolakis C., Ciambotti A., Birra: aspetti tecnici e legali. Laboratorio 2000, 2014, 28 (4), 26-29.
- Dell'Oro V., Tsolakis C., Ciambotti A., Vini spumanti: aggiornamento normativo. Laboratorio 2000, 2014, 28 (2), 30-33.

- Dell'Oro, V.; Ciambotti, A., Tsolakis, C., Panoramica dei distillati italiani in commercio. *Laboratorio* 2000, 2014 28 (7), 32-35.
- Dell'Oro, V., Ciambotti, A., Tsolakis, C., Aceto di vino: qualità e sicurezza. *Laboratorio* 2000, 2014, 28 (7), 28-31.
- Bosso, A., Tsolakis, C., Panero, L., Guaita, M., Borsa, D., Petrozziello, M., Nuove Tecniche di Vinificazione per il Gaglioppo. Del terroir e delle uve del Cirò. *Ricerca e Valorizzazione*, 2014, 87-108.
- Borsa, D.; Tsolakis, C.; Cravero, M.C., Vini passiti. Tecniche di appassimento e caratteristiche varietali. *Il Corriere Vinicolo*, 2014, 87 (40), 19-20.
- Dell'Oro, V.; Ciambotti, A., Tsolakis, C., Contenuto e limiti dei principali metalli nei vini commerciali. *Atti del XI Congresso Italiano di Scienza e Tecnologia degli Alimenti CISETA. Fiera Milano-Rho*, 2013, 11, 282-286.
- Dell'Oro, V.; Tsolakis, C.; Ciambotti, A., Verifying the authenticity of Barolo wine and absence of fraud by means of stable isotopes analysis. *Progrès Agricoles et Viticoles Publications et Actualités Vitivinicoles*, 2015, 132 (9), 22-30.
- Dell'Oro, V.; Tsolakis, C.; Ciambotti, A., Caratterizzazione isotopica del vino barbaresco. *Laboratorio* 2000, 2015, 29 (2), 34-37.
- Dell'Oro, V., Ciambotti, A., Tsolakis, C., Controllo della qualità del vino moscato d'Asti, *Laboratorio* 2000, 2015, 29 (6), 26-29.
- Cravero, M.C., Bonello, F., del Pazo Alvarez, M., Tsolakis, C., Borsa, D., The sensory evaluation of 2,4,6-trichloroanisole in wines. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121 (3), 411-417.
- Chiusano L., Cravero M.C., Borsa D., Tsolakis C., Zeppa G., and Gerbi V., Effect of the addition of fruit juices on grape must for natural beverage production. *Ital. J. Food Sci.*, 2015, 27 (3), 375-384.
- Dell'Oro V., Ciambotti A., Tsolakis C., Normativa e tecniche di produzione delle bevande spiritose, dell'aceto di vino e dei vini aromatizzati che utilizzano l'indicazione geografica. In *PROGETTO "SUPPORTO ALL'ATTIVITÀ SANZIONATORIA E FORMATIVA AL FINE DI UNA PIÙ EFFICACE TUTELA DEI PRODOTTI DOP E IGP"*, 2015, 139-157. **ISBN: 9788868124397.**

APPENDICE

Si riporta, di seguito, copia degli articoli pubblicati su riviste con Impact Factor

COMPARISON BETWEEN NERO D'AVOLA WINES PRODUCED WITH GRAPES GROWN IN SICILY AND TUSCANY

M.C. CRAVERO*, F. BONELLO, C. TSOLAKIS, F. PIANO and D. BORSA
CRA - Centro di Ricerca per l'Enologia, Via Pietro Micca 35, 14100 Asti, Italy

*Corresponding author: Tel. +39 014 1433814 - Fax +39 014 1436829
email: mariacarla.cravero@entecra.it

ABSTRACT

Nero d'Avola is a red autochthonous cultivar from Sicily, a region of southern Italy. The aim of this study is to compare the quality of Nero d'Avola wines produced from vines grown in Sicily and Tuscany (central Italy) between 2003 and 2005. Chemical-physical parameters and polyphenol content were evaluated in the grapes and wines and sensory profiles for the wines were obtained. These results highlighted the strong performance of the Nero d'Avola cultivar outside its main production area, characterised by different climate conditions.

- Keywords: autochthonous vine, Nero d'Avola, phenolics, wine sensory profile -

INTRODUCTION

Nero d'Avola is a red autochthonous cultivar from Sicily, a region of southern Italy that is well known for producing the world-famous IGT (Typical Geographical Indication) Sicily wine. Nero d'Avola is used, together with other Sicilian or international cultivars, to produce high-quality red wines. The Nero d'Avola grape is an early ripening cultivar with considerable vegetative vigour. In recent years, studies into the influence of yeast on the composition of Nero d'Avola wines (CORONA, 2007) and the phenolic content of grapes and wines (CORONA *et al.*, 2004; CORONA and FINOLI, 2004; LOVINO *et al.*, 2006) have been undertaken. A study into the anthocyanin patterns of Sicilian wines (CASAVECCHIA *et al.*, 2007) showed that Nero d'Avola was distinct from other allochthonous varieties (Syrah, Merlot and Cabernet Sauvignon). Nero d'Avola grape quality depends on the irrigation strategy and canopy management practices, such as leaf removal (BARBAGALLO *et al.*, 2007).

Nero d'Avola has been studied in experimental vineyards to evaluate its adaptability to the different regions of Italy (CALÒ *et al.*, 2002; BUCCELLI and STORCHI, 2007) and an earlier study, undertaken in Piedmont (northern Italy), reported that the Nero d'Avola cultivar was late ripening and produced a wine with a high degree of acidity (BONIFACINO *et al.*, 2004).

The aim of this study was to compare the quality of Nero d'Avola wines produced from grapes grown in Tuscany (Central Italy) and from their native area, Sicily.

MATERIALS AND METHODS

The grapes were grown in experimental vineyards in Tuscany (Montescudaio, Pisa) and Sicily (Biesina, Trapani). These vineyards belonged to a group of 24 vineyards located in 17 Italian regions and planted with local varieties as well as 20 varieties that were common to all 24 vineyards as described in CALÒ *et al.* (2002). The aim of that project was to assess the potential of introducing some allochthonous and autochthonous Italian varieties into regions other than their native areas and containing different "terroir".

The two vineyards chosen for this study were similar in age (1993), had the same training system (vertical trellis) and were at a similar altitude (80 m a.s.l.). The planting material had the same origin and rootstock (SO4) and the planting system was similar. The wines were produced in duplicate under the same conditions in 2003, 2004 and 2005 in both areas. Grape samples (120 kg) were crushed and destemmed. SO₂ (60 mg kg⁻¹) was added and the mixture inoculated with a "pied de cuve" (starter Fermicru

VR5, 0.25 g L⁻¹). Maceration lasted 8-10 days and, during this period, the cap was punched down twice a day. The free-run wine was inoculated with *Oenococcus oeni* (*Uvaferm alpha*) to induce malolactic fermentation. The wines were then decanted three or four times and another 30 mg L⁻¹ of SO₂ was added. Following this, the wine was kept at -5°C for 10 days to allow tartaric stabilization. The level of SO₂ was then checked and the wine was filtered, using a cartridge line with decreasing porosity, and finally bottled in the spring of the year following the vintage (April - May). The chemical-physical and sensory analyses of the wines were undertaken during the summer following the vintage year. The chemical-physical analyses, consisting of alcohol, dry extract, total acidity (g L⁻¹ tartaric acid), volatile acidity (g L⁻¹ acetic acid) and pH analysis, were performed according to standard methods (G.U. C.E. n. 272 3/10/1990). Polyphenol indices (DI STEFANO *et al.*, 1989), colour intensity and hue were also measured. Tasting sessions took place in duplicate in an ISO tasting room (8589-2007) with ISO approved glasses (3591-1977). The wine sensory profiles were constructed by a trained panel from the CRA-ENO (14 tasters), following a procedure derived from the ISO standards (11035-1994). The wines were described using a predefined odour list (GUINARD and NOBLE, 1986) and included visual and gustative descriptions. The attributes were chosen if their identification frequency was greater than:

$$(n^{\circ} \text{ assessors} \times n^{\circ} \text{ wines}) / 2.$$

The third level olfactory descriptors (violet, raspberry, cherry, prunes, jam, just-cut grass, hay) were chosen if their identification frequency was higher than:

$$(n^{\circ} \text{ assessors} \times n^{\circ} \text{ wines}) / 4.$$

A tasting sheet was created in order to measure the intensity of each chosen descriptor using an unstructured intensity scale presented on a wheel.

A fixed model ANOVA (three-way) was performed on the raw data from each of the sensory descriptors evaluated by the panel in order to analyze: assessor, effects of vinification, replications of the tasting session, assessor × effects of vinification, assessor × replication and effects of vinification × replication. This was conducted in order to obtain information on panel performance, in terms of individual differences among assessors. Three-way ANOVA was performed on the entire data set according to the following model: region, effects of vinification, vintage and the interactions among the main factors. Chemical data were also submitted to three-way ANOVA (effects of vinification, region, vintage and their interactions).

Table 1 - Chemical-physical properties of Nero d'Avola wines obtained from grapes grown in the two regions. (Means in the same row followed by a different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ using Duncan's test).

	Tuscany		Sicily	
	average	s.d.	average	s.d.
Alcohol (% vol.)	13.60	0.88	13.63	0.58
pH	3.46	0.07	3.40	0.23
Total acidity (g L ⁻¹)	5.68	0.70	6.58	1.26
Colour intensity (E ₄₂₀ + E ₅₂₀)	0.654 b	0.154	0.576 a	0.084
Colour hue (E ₄₂₀ /E ₅₂₀)	0.677	0.012	0.674	0.108
Total anthocyanins (mg L ⁻¹)	171	16	205	35
Total flavonoids (mg L ⁻¹)	1505	44	2240	70
Total phenols (mg L ⁻¹)	1642 a	29	2173 b	46
Proanthocyanidins (mg L ⁻¹)	2392 a	49	3433 b	104
Flavans reactive to vanilline (mg L ⁻¹)	829	15	1089	20

Table 2 - Chemical - physical properties of Nero d'Avola wines recorded over the three years for both regions. (Means in the same row followed by a different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ using Duncan's test).

	2003		2004		2005	
	average	s.d.	average	s.d.	average	s.d.
Alcohol (% vol.)	13.79	1.16	13.49	0.55	13.56	0.68
pH	3.34	0.28	3.48	0.49	3.48	0.10
Total acidity (g L ⁻¹)	6.63	0.94	5.73	0.60	6.04	0.64
Colour intensity (E ₄₂₀ + E ₅₂₀)	0.517 a	0.030	0.591 b	0.010	0.738 c	0.092
Colour hue (E ₄₂₀ /E ₅₂₀)	0.617 a	0.017	0.736 b	0.077	0.673 ab	0.081
Total anthocyanins (mg L ⁻¹)	178	23	160	3	227	21
Total flavonoids (mg L ⁻¹)	2444 b	59	1322 a	109	1851 ab	117
Total phenols (mg L ⁻¹)	2304 c	39	1561 a	77	1858 b	31
Proanthocyanidins (mg L ⁻¹)	3468 b	65	2033 a	1121	3237 b	115
Flavans reactive to vanilline (mg L ⁻¹)	1165	20	847	39	866	2

RESULTS AND DISCUSSION

No effects of the vinification and replications of the tasting session were found. Many physical-chemical parameters (alcohol, pH, total acidity, colour hue) were similar in Sicilian and Tuscan wines (Table 1). Colour intensity was significantly higher in the Tuscan products, whereas total phenols and proanthocyanidins were significantly higher in the Sicilian wines. Generally all the phenolic parameters were higher in the Sicilian wines, although for most of them (total anthocyanins, total flavonoids and flavans reactive to vanilline) the difference was not statistically significant.

There was a significant effect of vintage (Table 2) on colour intensity and hue; the lowest values were recorded in 2003, a year characterized by extreme summer temperatures. The only statistically significant interactions were "region × vintage" for the colour intensity and for the total anthocyanins content, which were significantly lower in the Sicilian wines in 2003. This could be explained by changes in the biosynthetic pathway leading to the synthesis of anthocyanins (DI STEFANO *et al.*, 2008; CHORTI *et al.*, 2010): excessive temperature levels or hydric stress in southern Italy may have caused the low anthocyanins content in the grapes.

The recorded phenolic content (Table 2) was lowest in 2004. However, specifically, only total

flavonoids, total phenols and proanthocyanidins were significantly lower than in 2003 and 2005. This could be due to the unfavorable climatic conditions. In both vineyards, the highest rainfall and the lowest average temperatures, in the period after veraison, were recorded in 2004 (data not shown).

The sensory analysis confirmed the results of the chemical analysis. The wine sensory profiles (Fig. 1) were also similar. The Sicilian wines were statistically different only at the highest intensity of "raspberry" odour. A statistical difference in colour intensity (Table 1) was not perceived at a sensory level, possibly because the wines both had an intense ruby red colour (Fig. 1).

Vintage (Fig. 2) significantly influenced the sensory profiles, with the exception of "hay" odour and astringency. Generally, the 2003 wines showed significantly lower intensities for all the descriptors. The 2003 vintage was characterized by anomalous thermal events, which could explain the low intensity of the wine odour characteristics (TOMASI *et al.*, 2007).

In the 2004 wines, the sensory perception of acidity and astringency were lower (Fig. 2) according to the chemical data for total acidity and tannin parameters (proanthocyanidins and flavans reactive to vanilline) – reported in Tab. 2. However, only the acidity perception was statistically significantly different (Fig. 2).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Italian Ministry of Agriculture (MI-PAF) for financial support (Progetto PRO.VIT.) and the members of the CRA-ENO panel for their availability.

REFERENCES

- Barbagallo M.G., Vesco G., Pisciotta A., Crosta L. and Di Lorenzo R. 2007. Effetti del regime colturale e della sfogliatura sull'attività vegetativa e produttiva della cultivar Nero d'Avola. *Quad. Vitic. Enol.*, Univ. Torino, 29, 141-154.
- Bonifacino G., Rabino M., Tragni R., Cravero M.C., Ubigli M., Serpentino M.L. and Schneider A. 2004. Studio sull'adattabilità di nuovi vitigni in Piemonte. Supplemento al n. 41 di "Quaderni della Regione Piemonte - Agricoltura".
- Borsa D., Tsolakis C., Pisano G., Sotgiu L. and Ciambotti A. 2007. Influence of tilling area on the composition of Nero d'Avola grapes and wines. "Oeno 2007" 8th Symposium International d'Oenologie de Bordeaux. Tome 1, 38-41.
- Bucelli P. and Storchi P. 2007. Valutazione viticola ed enologica di alcuni vitigni autoctoni e innovativi per la Toscana. *Riv. Vitic. Enol.*, 60, (2), 3-21.
- Calò A., Costacurta A., Giorgessi F. and Ubigli M. 2002. Importance de l'humidité du sol sur les équilibres végétatifs et productifs des vignes set sur la qualité des vins. *Riv. Vitic. Enol.*, 55, (1), 25-38.
- Casavecchia C., Magnisi R., La Pera L., Maisano R. and Dugo G. 2007. Classification of Sicilian red wines from autochthonous and allochthonous cultivars according to anthocyanin pattern. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58, (2), 286-290.
- Chorti E., Guidoni S., Ferrandino A. and Novello V. 2010. Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanins accumulation in Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, (1), 23-30.
- Corona O. 2007. Influenza del lievito sulla composizione di vini Nero d'Avola. *Riv. Vitic. Enol.*, 60, (1), 49-63.
- Corona O., Arcoleo G., Terrasi G. and Gattuso A.M. 2004. Nero d'Avola. Nota II - Evoluzione dei processi biochimici nel corso dello sviluppo e della maturazione dell'uva. *Vignevini*, 31, (6), 93-98.
- Corona O. and Finoli C. 2004. Caratterizzazione del profilo polifenolico dei vini Nero d'Avola. Influenza delle pratiche colturali sul profilo polifenolico. *Riv. Vitic. Enol.*, 57, (1-2), 59-58.
- Di Stefano R., Cravero M.C. and Gentilini N. 1989. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico*, XXV, (5), 83-89.
- Di Stefano R., Mattivi F., Caburazzi M., Giustini E. and Bonifazi L. 2008. Evoluzione della composizione fenolica dell'uva Sagrantino durante la maturazione. *Riv. Vitic. Enol.*, 61, (1), 39-61.
- Guinard J.X. and Noble A.C. 1986. Proposition d'une terminologie pour une description analytique de l'arôme des vins. *Sci. Alim.*, 6, 657-662.
- ISO 11035:1994 Sensory analysis - Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach.
- Lovino R., Baiano A., Pati S., Faccia M. and Gambacorta G. 2006. Phenolic composition of red grapes grown in southern Italy. *It. J. Food Sci.*, 18, (2), 177-186.
- Tomasi D., Calò A., Pascarella G., Pitacco A., Borsa D. and Gaiotti F. 2007. Effetti dell'incremento termico sulla qualità dell'uva: il caso della Garganega e delle sue forme di allevamento. Proceedings XXX OIV World Congress, Budapest, 11-16, Giugno 2007, Sez.1.1.A.

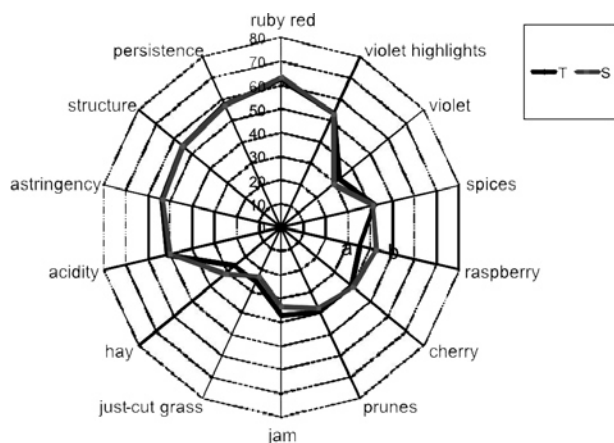


Fig. 1 - Nero d'Avola sensory profiles - Region Effect. Three year average of the sensory profiles for the Tuscan and Sicilian wines. (Descriptors followed by a different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ using Duncan's test).

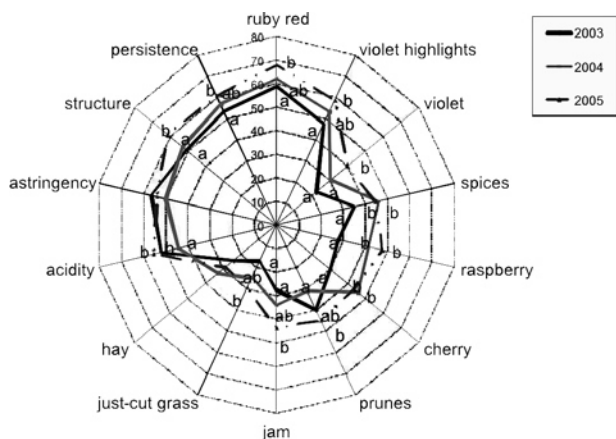


Fig. 2 - Nero d'Avola sensory profiles - Vintage Effect. Average of the sensory profiles for the Tuscan and Sicilian wines in the three vintages. (Descriptors followed by a different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ using Duncan's test).

CONCLUSIONS

This 3-year survey showed the effects of various environmental conditions on the composition of Nero d'Avola wines. The analyses showed that the alcohol content and the polyphenolic compounds in the wines produced in central and southern Italy were similar. The Tuscan wine results confirmed previous results by BUCELLI and STORCHI (2007) and BORSA *et al.* (2007). However, although the environmental conditions were different in the two regions, the visual and olfactory descriptors were still the same for both the Sicilian and the Tuscan wines. These results suggest that Nero d'Avola could be a promising variety to grow outside Sicily.

QUALITY AND SAFETY OF ITALIAN WINE VINEGAR

V. DELL'ORO*, A. CIAMBOTTI and C. TSOLAKIS

CRA-ENO Centro di Ricerca per l'Enologia, Via Micca 35, 14100 Asti, Italy

*Corresponding author: Tel. +39 0141 433820, Fax +39 0141 434829,
email: valentina.delloro@isenologia.it

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the most common frauds in the production of wine vinegar in Italy. By means of isotopic analyses (SNIF-NMR and IRMS techniques), 100 samples of commercial wine vinegars and 100 samples of red and white wines used for vinegar production were analysed to detect any illegal practices such as watering, sugaring, addition of synthetic acetic acid or table grapes. For further investigations, samples were also submitted to chemical, physical, microbiological and sensorial analyses. The results show that the addition of synthetic acetic acid is still a very common fraud.

- Keywords: frauds, isotopic, quality, safety, vinegar, wine -

INTRODUCTION

Vinegar is an acidic liquid derived from the oxidation of ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), which has previously been fermented from sugar. The result is the production of acetic acid (CH_3COOH), the main component of vinegar. This process was first explained by PASTEUR. In 1864, he made an important contribution to the scientific study of this substance, by demonstrating that the oxidation of ethanol by means of acetic acid bacteria led to the formation of acetic acid.

Vinegar has long been known and appreciated. It was employed as a culinary ingredient and preservative as well as a medicament and disinfectant in ancient Greece, Roman times and the Middle Ages. The Italian term "aceto" derives from the Latin *acetum* (acid and sour liquid obtained from wine) whereas the English term "vinegar" comes from the Old French *vin aigre* meaning "sour wine". Both words link vinegar with sourness and wine, but this important by-product can be made also from malt, apple cider, fruit, rice, coconut, cane, beer, honey, etc. However, the most common type is wine vinegar. The aim of this study was to investigate the most common frauds relating to Italian wine vinegars, pointing out the infringements of legal limits and quality standards or the risks to human health. These are very important of food quality and safety issues, as vinegar is still widely used in cooking and food preservation.

In Italy, the 20 February 2006 No. 82 Law incorporated the EU Directive for the Common Market Organization (CMO) that regulates wine and also vinegar production. As for commercial wine vinegars, it fixes legal limits for the following parameters: total acidity, alcoholic degree, ashes, sulfur dioxide, zinc, copper, lead, boric acid, bromine and sorbitol. According to Italian legislation, wines used to produce wine vinegars can only be affected by sourness. The Italian Ministry of Agriculture controls food products in order to detect frauds or non-conformities to the law. The term "fraud" generally indicates an intentional deception made to secure unfair advantage or unlawful gain. Our laboratory is involved in this prevention effort, the aim of which is to secure quality and safety for consumers. We carry out analyses on irregular samples of wines, musts, spirits and wine vinegars, already examined by other agencies, in order to confirm or refute the previous results (Review Analysis).

In this work, 100 samples of commercial wine vinegars and 100 samples of red and white wines used in vinegar production were analysed. The results were compared with standards set out in current legislation in order to evaluate the incidence of the most common frauds.

With regard to vinegars, we first need to investigate the addition of synthetic acid, a very common illegal practice. Until the introduction of radiocarbon analytical method, this addition was very dif-

ficult to detect (RESMINI and VOLONTERIO, 1974; MATTA and GIANNESI, 1987). Vinegar containing synthetic acetic acid can be assessed by the content of ^{14}C . The amounts of ^{14}C in natural wine vinegars are determined by the year of production. Other adulterations such as watering and sugaring are today easily detectable by means of isotopic analyses (SNIF-NMR and IRMS techniques).

Isotopic techniques were first introduced in France in the 1980s and soon became widely applied in oenology (MARTIN *et al.*, 1986; FORSTEL *et al.*, 1996; JAMIN *et al.*, 2004; THOMAS and JAMIN, 2009). They are based on the fact that a particular molecule may have different isotope contents, depending on the biochemical processes involved in its synthesis. These analyses also made it possible to control mislabelling, a practice concerning both wines and primary products like grapes. As for wines used for vinegar production, it is now easily to verify much of the data or statements reported on their labels. By means of isotopic analyses, we detected the use of table grapes, such as *Pergolone*, instead of wine grapes. Table grapes and wine grapes have similar isotopic parameters but a different potential alcohol degree. Unscrupulous producers take advantage of the availability of table grapes which cost less, and due to their use on a massive production scale they can make greater profits. As the potential amount of alcohol is lower in table grapes than in wine grapes, a solution of water and sugar is usually added to increase it.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Red and white wine vinegars

In this work, 100 commercial samples of white and red wine vinegars originating from the most important Italian production areas were analysed anonymously and indicated by progressive numbers. The samples were collected in the following regions: Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Campania, Sicilia.

Red and white wines used in vinegar production

Other 100 red and white wines employed in vinegar production were also analysed anonymously and indicated by progressive numbers. The samples were collected in the following regions: Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli, Emilia Romagna, Lazio, Puglia, Sicilia, Campania.

Methods

Red and white wine vinegars

The chemical and physical analyses covered

the following legal parameters: total acidity, ethanol, copper, zinc and lead content, presence of synthetic acetic acid. They were carried out according to the standards established by the resolution of the International Organisation of Vine and Wine (OIV): "Oenology 2000 – Methods of analysis of vinegars".

- **Total acidity** was determined by titration with sodium hydroxide 0.1 N. (phenolphthalein indicator).

- **Ethanol** was determined after distillation by titration with the addition of an excess of potassium dichromate and then back titrated with a solution of ferrous sulfate and ammonium.

- **Heavy metals** were determined in vinegars using a Zeeman 5100 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer). Copper was determined by flame ionization spectroscopy. In the case of very low concentrations, we used the method of a standard addition. Zinc was also determined by flame ionization spectroscopy. Lead was determined by ashing.

- **Synthetic acetic acid** was quantified by the amount of ^{14}C detected. Natural wine vinegars have amounts of ^{14}C which relate to their year of production. The addition of synthetic acid causes a noticeable reduction in ^{14}C values. Measurements were carried out by means of a ^{14}C liquid scintillation spectrometer. As a reference, we used our data-base of radioactivity values for natural vinegar.

Red and white wines used for vinegar production

All the samples of wines were submitted to chemical, physical and isotopic analyses, according to the resolutions established by the OIV methods. The chemical and physical anal-

yses covered the following legal parameters: total sulfur dioxide, copper, zinc, lead, methanol, isotopic parameters. Organoleptic faults were ascertained through a series of sensory analyses. Italian laws states that all the values detected in wines used for vinegar production must be within the legal ranges. Only the volatile acidity can be over the legal limit.

- **Total sulfur dioxide.** It was oxidized by sulfuric acid with oxygenated water and measured by titration with 0.1 N sodium hydroxide using the mixed indicator Methyl Red-Methylene Blue – alcoholic solution.

- **Heavy metals.** These were directly determined in wines using a Zeeman 5100 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer). Lead was determined by furnace whereas copper was determined by flame ionization spectroscopy.

- **Methanol.** It was quantified according to the OIV gas chromatographic method and extracted from wine by distillation and then quantified using a Carlo Erba model 5300 gas chromatograph and an Innowax column equipped with a flame ionization detector, according to the OIV reference method.

- **Isotopic parameters.** These were determined by applying the following methods:

- **SNIF-NMR Isotopic Ratio (D/H)I** determinations were performed on a Bruker Avance 300 (Cryomagnet 300/52) NMR spectroscope. The analysis was carried out on distilled wine (Fig. 1).

- $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratios were determined by isotopic ratio mass spectrometry, using a Fisons, Optima model. The variation from a standard value attributed to a reference substance by the International Atomic Energy Agency of Vienna (IAEA) was measured. The analyses were carried out on distilled wine (Fig. 2).

- $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotopic ratio measurements were per-

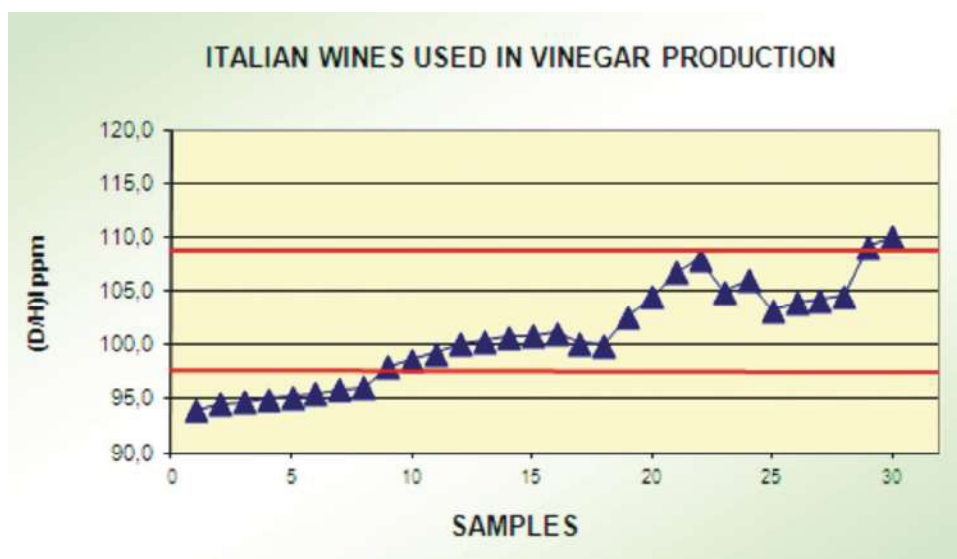


Fig. 1 - Isotopic parameter (D/H)I values compared with the reference values of the National Annual Data Bank on Authentic Wines.

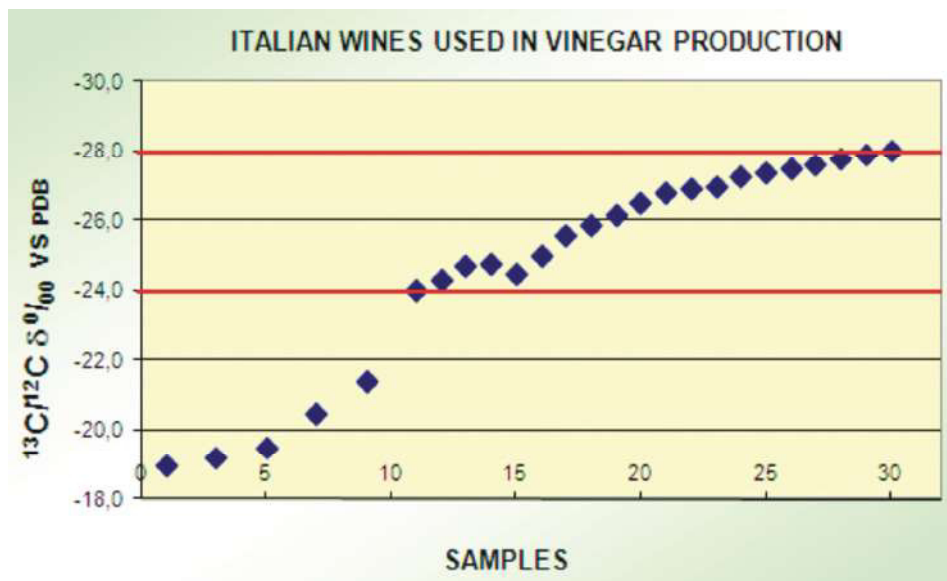


Fig. 2 - $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic parameter values compared with the reference values of the National Annual Data Bank on Authentic Wines.

formed on the same mass spectrometer. These values represent the % variation from the standard value attributed to ocean water, the Vienna Standard Mean Ocean Water (V-SMOW). The analyses were carried out directly on wine without any distillation.

- **Organoleptic faults.** These were detected through a series of sensorial analyses carried out by the CRA-ENO wine tasting panel, formed by five wine tasters trained to detect wine faults.

RESULTS

Red and white wine vinegar

For red and white wine vinegars, we detected the addition of synthetic acid and dried currants.

Addition of synthetic acetic acid radiocarbon

In the past, the addition of pyroligneous acid or "wood vinegar" to vinegars was a very common practice. This synthetic acid was very difficult to detect, because it has the same chemical structure as vinegar. In the determination of ^{14}C in our vinegar samples, we recorded a minimum value of 11.29 dpm/g C and a maximum value of 14 dpm/g C. The reference value of 14 dpm/g for authentic vinegars was determined in our laboratory. Values that are 5% or more under the reference value are considered to be irregular because of the addition of acetic acid. In our investigation, 20 samples were found to be irregular. Although the incidence of this fraud has diminished, it still remains one of the most widespread.

Addition of dried currants

The use of dried currants in vinification is another common practice. Their presence in wine is exposed by the variation in isotopic parameters. In vinegars, this addition is very difficult to detect, if water is added to dilute the wines used for vinegar production. This is a legal oenological practice but it changes the isotopic parameters of the wines. We found 3 irregular samples.

Red and white wines used for vinegar production

For the red and white wines used for vinegar production, we detected the following isotopic parameters.

The determination of the isotopic parameter (D/H)I produced values ranging from a minimum of 94 ppm to a maximum of 108 ppm. Reference values were obtained from the National Annual Data Bank on Authentic Wines: the range established was from 98 to 108 ppm. We found 10 irregular samples because of sugaring. Values from 94 to 98 ppm are due to the addition of sugar beet to wine, whereas values over 110 ppm are due to the addition of sugar cane.

The determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic parameter showed values ranging from a minimum of -19 ‰ to a maximum of -28 ‰. The range established from the National Data Bank is from -24 to -28 ‰. Values below -24 ‰ indicates the addition of exogenous sugars made from sugar cane or maize. We found 5 irregular samples.

The determination of the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotopic parameter $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ showed values ranging from a minimum of -5 ‰ (V-SMOW) to positive values

(Fig. 3). Reference values are determined yearly and were positive for the year concerning our samples. In general, negative values of this parameter indicate watering of the wine employed for vinegar production. This dilution increases the total volume of wines. We found 15 irregular samples.

We also found 5 samples for which all three isotopic parameters did not correspond to the reference values. This indicated the use of table grapes, e.g. *Pergolone*, instead of wine grapes (mislabelling). The two types of grapes have similar isotopic parameters but different potential alcohol degrees. When table grapes are illegally used in wine production, water and sugar are added to increase the alcohol content. This addition can be now identified by carrying out the isotopic analyses described.

Subsequently, we investigated the possible presence of heavy metals in our samples.

Copper

Copper sulfate pentahydrate is a fungicide. Mixed with calcium oxide it forms the so-called "Bordeaux Mixture" which is used to control fungus on grapes. In wines, this compound is usually below 1 mg/L, because it is partially eliminated during fermentation in the form of insoluble salts absorbed by lees. Thus the presence of copper in wines may be due to other causes: releases from the winery equipment or wine treatments with copper sulphate to eliminate bad odours. In the analysed samples, we found a minimum content of 0,3 mg/L and a maximum of 3 mg/L. Wine legislation establishes a limit for copper of 1 mg/L. We found 12 samples with a content over the legal limit.

Zinc

Although zinc is an essential requirement for our health, an excess of zinc can be harmful. Its

presence in wine may be due to its release from the storage containers. Zinc alloys have been used for thousands of years: brass is doubtless the most ancient. It was widely employed because of its resistance and the large availability of its component materials. The introduction of steel in wineries limited the use of zinc and its alloys. The content in zinc of our samples varied from a minimum of 2 mg/L and a maximum of 6 mg/L. The legal limit is 5 mg/L. We found 1 sample over the legal limit.

Lead

Lead is very dangerous to human health because it is highly toxic and may cause saturnism. The lead content in wines has been object of many studies carried out by OIV and E.U. experts. The legal limit of 0.2 µg/L is very low. The values determined for the analysed samples ranged from a minimum of 0.1 µg/mL to a maximum of 0.6 µg/mL. We found 2 irregular samples. A higher lead content may be due to traffic pollution near vineyards (fuel contains tetraethyl lead), vineyard treatments with copper salts contaminated by lead, releases by the storage container, winery machinery, or from the screw caps of wine bottles.

Methanol

This is a very noxious compound. Today its content in wines is generally low. Higher contents can be found in the so-called "hard-pressed wines" because of the natural degradation of pectins, during fermentation. This occurs when pomace is over-pressed in order to extract the juice that it still contains. The values determined in our samples varied from a minimum of 0.1 mL % of alcohol anhydride (a.a.) to a maximum of 0.45 mL % a.a. The legal limit for alcohol anhydride is 0.20 mL % mL a.a., for white wines, and 0.25 mL % a.a. for red wines. We found 5 irregular samples.

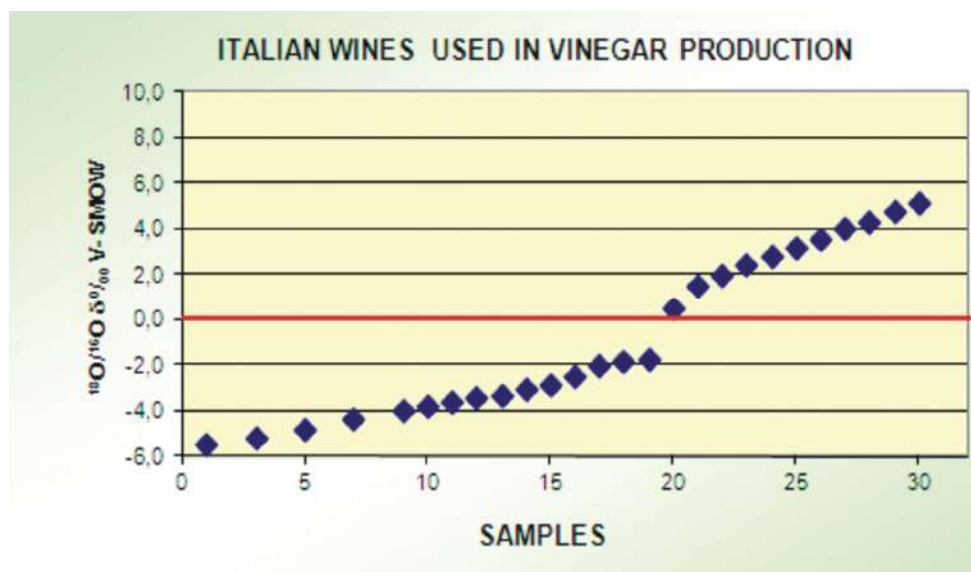


Fig. 3 - $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotopic parameter values compared with the reference values of the National Annual Data Bank on Authentic Wines.

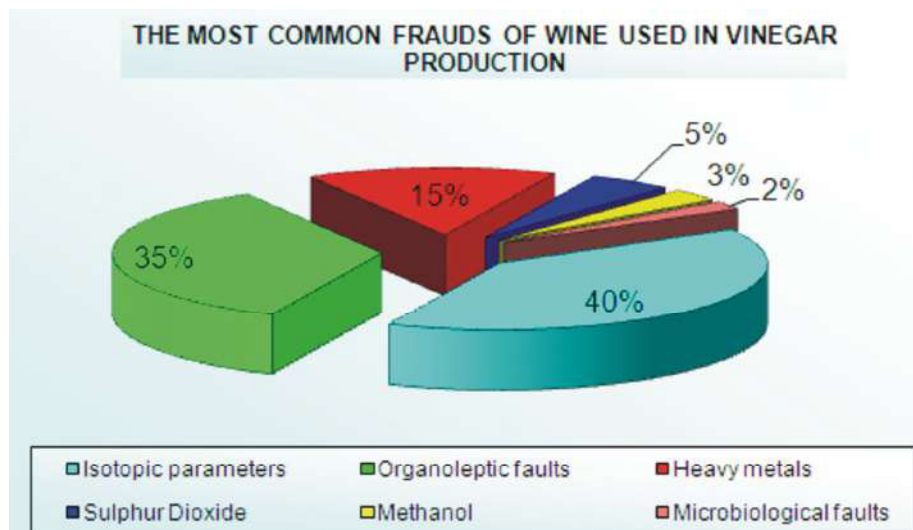


Fig 4 - The most common frauds and non-conformities to the law detected in red and white wines employed for vinegar production. The percentages were calculated on the total number of samples analysed.

Sulfur dioxide

High contents of sulfur dioxide are toxic. Nowadays wine quality is better than in the past, but current sulfur dioxide legal limits are still high, especially for sweet wines. The values determined in our samples varied from a minimum of 50 mg/L to a maximum of 360 mg/L. The legal limit established by E.U. laws is 200 mg/L for white wines and 150 mg/L for red wines. We found 3 irregular samples.

To complete our survey, we investigated the possible presence of organoleptic faults or microbiological contamination.

Organoleptic faults

Some organoleptic faults were detected in 35 samples. Well-known wine defects such as (oxidation, casse, flowers of wine or mould) were the most common ones. Organoleptic faults cannot be considered "frauds" in a strict sense and are generally related to wine storage problems.

Microbiological contamination

Lactic bacteria and re-fermentation were detected in 2 samples.

CONCLUSIONS

The quality of Italian wine vinegars has generally improved. Today, the availability of modern technologies and the use of good oenological products are more widespread. However, some infringements of the law are still committed (Fig. 4). To detect the slightest amount of an illegal or noxious compound, more reliable analytical

methods, such as isotopic analyses, are now applied. The introduction of a restrictive legislation and effective measures to prevent frauds has produced good results. Therefore, it is very important to continue to assess the number and variety of these infringements in order to further improve food quality and safety.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mr. Angelo Barrocu for collaborating on the analyses and Mrs. Annamaria Di Franco for her help with the English text.

REFERENCES

- Forstel H., Martin G.J. Olschimke D. and Wittkowski R. 1996. Détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des vins. Office International de la Vigne et du Vin FV N° 1035 2366/190396.
- Giannessi P. and Matta M. 1987. Trattato di scienza e di Enologia, Vol. I, p. 122-137.
- Jamin E., Martin F. and Martin G.G. 2004. Determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of Ethanol derived from fruit juices and maple syrup by Isotopic Ratio Mass Spectrometry. Journal of AOAC International, 87 (3): 621-630.
- Martin G.J., Guillou C., Naulet N., Brun S., Tep Y., Cabanis J.C. and Sudraud P. 1986. Control of origin and enrichment of wine by Specific Isotope Analyses. Sciences des Aliments, 6: 385-405.
- OIV 1995. Cahier scientifique et technique: le plomb. Bulletin OIV.
- Resmini P. and Volonterio G. 1974. Determinazione del livello naturale di ^{14}C nell'alcool etilico mediante scintillazione liquida: ottimizzazione delle condizioni di conteggio. Rivista di Viticoltura e di Enologia di Conegliano, 10: 420-430.
- Thomas F. and Jamin E. 2009. ^2H NMR and ^{13}C -IRMS Analyses of acetic acid from vinegar. ^{18}O -IRMS analysis of water in vinegar (International Collaborative Report), Analytica Chimica Acta, 649: 98-105.

UNEXPECTED RELATIONSHIPS BETWEEN $\delta^{13}\text{C}$ AND WINE GRAPE PERFORMANCE IN ORGANIC FARMING

Edoardo A.C. COSTANTINI^{*}, Alessandro AGNELLI¹, Pierluigi BUCELLI¹, Aldo CIAMBOTTI²,
Valentina DELL'ORO², Laura NATARELLI¹, Sergio PELLEGRINI¹, Rita PERRIA³, Simone PRIORI¹,
Paolo STORCHI³, Christos TSOLAKIS² and Nadia VIGNOZZI¹

1: Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, CRA-ABP,
Research Centre for Agrobiological and Pedology, Florence, Italy

2: CRA-ENO Research Centre for Oenology, Asti, Italy

3: CRA-VIC Research Unit for Viticulture, Arezzo, Italy

Abstract

Aim: To evaluate the relationship between carbon isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$) and wine grape viticultural and oenological performance in organic farming.

Methods and results: The study was carried out for four years in the Chianti Classico wine production district (Central Italy), on five non irrigated vineyards conducted in organic farming. The reference variety was Sangiovese. Eleven sites were chosen for vine monitoring and grape sampling. The performance parameters were alcohol and must sugar content, sugar accumulation rate, mean berry weight, and extractable polyphenols. $\delta^{13}\text{C}$, stem water potential, and soil water availability were also monitored. Finally, soil nitrogen as well as yeast available nitrogen in the must were measured. $\delta^{13}\text{C}$ was directly related to stem water potential and soil water deficit, and indicated a range of water stress conditions from none and moderate to strong. However, its relationship with viticultural and oenological results was contrary to expectation, that is, performance linearly increased along with soil moisture. On the other hand, the worst performance was obtained where both water and nitrogen were more limiting.

Conclusions: The unexpected relationship between $\delta^{13}\text{C}$ and Sangiovese performance was caused by low nitrogen availability. The studied sites all had low-fertility soils with poor or very poor nitrogen content. Therefore, in the plots where soil humidity was relatively higher, nitrogen plant uptake was favoured, and Sangiovese performance improved. Macronutrient being the main limiting factor, the performance was not lower in the plots where soil water availability was relatively larger. Therefore, the best viticultural result was obtained with no water stress conditions, at low rather than at intermediate $\delta^{13}\text{C}$ values.

Significance and impact of the study: Water nutrition is crucial for wine grape performance. $\delta^{13}\text{C}$ is a method used to assess vine water status during the growing season and to estimate vine performance. A good performance is expected at moderate stress and intermediate $\delta^{13}\text{C}$ values. A better knowledge of the interaction between water and nutrient scarcity is needed, as it can affect the use of $\delta^{13}\text{C}$ to predict vine performance.

Key words: carbon isotopes, water availability, nitrogen, red grape, performance index, Tuscany

Résumé

Méthodes et résultats: L'essai a été réalisé pendant quatre ans dans la région du Chianti Classico (Italie centrale), sur vignes non irriguées conduites en agriculture biologique. La variété de référence est le Sangiovese. Onze sites ont été choisis pour le suivi de la vigne et la maturation du raisin. Les variables mesurées pour évaluer la performance ont été l'alcool et la teneur en sucre dans le moût, le taux d'accumulation de sucre, le poids moyen des baies, et les polyphénols extractibles. Le $\delta^{13}\text{C}$, le potentiel hydrique de tige, et la disponibilité en eau du sol ont été suivis. L'azote du sol ainsi que l'azote assimilable dans le moût ont été mesurés. Le $\delta^{13}\text{C}$ était corrélé avec le potentiel hydrique de tige et le déficit en eau du sol, et a indiqué une gamme de stress hydrique entre absent et modéré à fort. Cependant, la relation avec les résultats viticoles et œnologiques était contraire à celle attendue. L'indice de performance a augmenté linéairement lorsque le stress hydrique a diminué. D'autre part, la moins bonne performance a été obtenue dans les situations où l'eau et l'azote ont été limitants.

Conclusions: La relation inattendue entre $\delta^{13}\text{C}$ et la performance du Sangiovese a été provoquée par la faible disponibilité en azote. Les sols étudiés ont tous été d'une faible fertilité et d'une teneur en azote faible à très faible. Par conséquent, dans les parcelles où l'humidité du sol était relativement plus élevée, l'absorption de l'azote par la plante a été favorisée, ce qui a amélioré la performance du Sangiovese. Dans des conditions où l'azote a été le principal facteur limitant, la performance n'a jamais été négativement affectée par la disponibilité en eau du sol. Par conséquent, le meilleur résultat a été obtenu dans des conditions sans contrainte hydrique, indiquées par des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ fortement négatives.

Signification et impact de l'étude: L'alimentation en eau est cruciale pour la performance de la vigne. $\delta^{13}\text{C}$ est une méthode utilisée pour évaluer le degré de contrainte hydrique subi au cours de la saison viticole et d'évaluer la performance de la vigne. Une bonne performance est attendue pour une contrainte hydrique modérée et des valeurs intermédiaires de $\delta^{13}\text{C}$. Peu de connaissances existent au sujet de l'interaction entre l'eau et la carence en nutriments. Ces relations peuvent affecter l'utilisation du $\delta^{13}\text{C}$ pour prédire le comportement de la vigne.

Mots clés: isotopes du carbone, disponibilité en eau, azote, raisin rouge, performance, Toscane

manuscript received 12th February 2013 - revised manuscript received 11th August 2013

INTRODUCTION

The best terroirs for red wine production are those in which some soil factors are limiting to vine vigour and berry size (van Leeuwen and Seguin, 2006), so that grapes ripen completely but slowly. These limiting factors may be chemical (limited nitrogen nutrition or ion antagonisms) or physical (insufficient water supply during certain phases of the growth cycle of the vine).

As a whole, nitrogen nutrition and water supply during certain phases of the growth cycle of the vine are considered essential factors of wine quality. Their role in determining the terroir effect has been experienced in many wine producing areas and with several varieties including, among others, France, with Cabernet-Sauvignon (Choné *et al.*, 2001), Merlot (Tregoat *et al.*, 2002) and Sauvignon Blanc (Peyrot des Gachons *et al.*, 2005), Australia with Sauvignon Blanc (White *et al.*, 2007), Hungary with Kékfrankos (Zsófi *et al.*, 2009), and USA with Cabernet-Sauvignon and Chardonnay (Chapman *et al.*, 2005; Deluc *et al.*, 2009).

Grapevine nitrogen nutrition, in particular, influences quality components in the grape and, ultimately, the wine. In addition, fermentation kinetics and formation of flavour-active metabolites are also affected by the nitrogen status of the must (Bell and Henschke, 2005). Plant uptake of soil nitrogen increases the concentration of major nitrogenous compounds such as total nitrogen, total amino acids, arginine, proline, ammonium and, consequently, yeast-assimilable nitrogen (YAN) in fruit. Intermediate must YAN offers the optimum balance between desirable and undesirable chemical and sensory wine attributes (Bell and Henschke, 2005). When the nitrogen concentration in must is low, there is a direct relationship between initial nitrogen concentration and the total concentration of higher alcohols in the wine (Äyräpää, 1971).

Water supply during specific phases of the growth cycle of the vine is also considered an essential factor of wine quality. A mild water deficit stress, in particular, is considered to enhance grape quality for the production of red wines (van Leeuwen *et al.*, 2009). More specifically, Tregoat *et al.* (2002) found that Merlot development and berry composition were more influenced by water uptake conditions than by vine nitrogen status in Bordeaux. Besides, at similar water uptake conditions, low vine nitrogen status increased berry potential. On the other hand, a moderate compared to a weak water stress increased YAN in grapes of Merlot, Syrah, Viognier, and

Chardonnay (Ojeda and Salmon, 2011). Such results, in addition to other more ecological motivations, enhanced the limitation of nitrogen fertilization in premium viticulture and the adoption of biological farming. Currently, organic viticulture covers about 80,000 ha in Europe and 44,000 in Italy, but not much is known on its effective feedback on wine grape performance.

Although knowledge of water and nitrogen nutrition in a vineyard is essential, its assessment is difficult, since soil water and nitrogen content have a strong temporal and 3D spatial variability, especially in rainfed cultivation and biological farming, where the use of synthetic nitrogen fertilizers is not allowed. Then, a common practice is the monitoring of viticultural and oenological indicators, like yield components, leaf and stem water potential (Ψ_{stem}), leaf analysis, oenological parameters, and sensory assessment.

Recently, in addition to traditional techniques, a new physiologic marker has been introduced for an integrative evaluation of the overall vine water uptake conditions during the ripening period, i. e., the ratio between the two stable carbon isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, called $\delta^{13}\text{C}$. Actually, stomata closure under water deficit restricts water and CO_2 flow; as ^{12}C is preferentially fixed during the photosynthesis process, when stomata are open, this results in a relative increase in the concentration of the heaviest isotope ^{13}C . The isotopic ratio can be measured either in the must sugars upon harvesting or in the alcohol of the wine produced (van Leeuwen *et al.*, 2001; Tregoat *et al.*, 2002; van Leeuwen *et al.*, 2003), though there is a shift of $\delta^{13}\text{C}$ between ethanol and sugars, due to the loss of ^{13}C -enriched carbon atoms of glucose as CO_2 during fermentation. Rossmann *et al.* (1996) found for 1,631 Italian samples a mean shift of 1.7‰.

Reported $\delta^{13}\text{C}$ values in the must sugars range from -21.0 to -28.0‰, with -25.5 or -26.0‰ considered threshold values between water deficit and non-limiting water nutrition (van Leeuwen *et al.*, 2003; Deschepper *et al.*, 2006). According to the same authors (van Leeuwen *et al.*, 2003; Tregoat *et al.*, 2002), values of about -23‰ in the must correspond to a minimum Ψ_{stem} close to -12 bar, a value that matched an optimal correlation with the berry sugar accumulation rate. Being correlated with important components of must quality (e.g., sugar content and titratable acidity), $\delta^{13}\text{C}$ can also be used to map terroirs at different scales (van Leeuwen *et al.*, 2001; Guix-Hébrard *et al.*, 2007; Zufferey and Murisier, 2007; Reynard *et al.*, 2011; Murisier *et al.*, 2012). A good quality performance is expected at moderate water stress and intermediate $\delta^{13}\text{C}$ values.

In the Chianti area (Central Italy) Costantini *et al.* (2010), using the $\delta^{13}\text{C}$ to evaluate land suitability for Sangiovese grapevine, could infer that the threshold between good and bad sensory evaluation of wine matched a $\delta^{13}\text{C}$ value of $-26.7 \pm 1.2\text{‰}$ in the alcohol, corresponding to a slight water deficit and a Ψ_{stem} of -9 bar. This value might be chosen as a first reference for the evaluation of Sangiovese performance.

Another method to evaluate the “performance” of the Sangiovese cultivar, that is, the vegetative and productive behaviour in a specific year and soil, was worked out by Bucelli *et al.* (2010). They used a set of selected viticultural parameters in a multivariate regression to estimate wine sensory evaluation (score) at the panel test. The results allowed to identify statistically different classes of wines and Sangiovese responses to year and environment variations.

Not much is known so far about the influence of the interactions between different forms of abiotic stress on $\delta^{13}\text{C}$, like those that might occur in rainfed and organic cultivation between water and nutrient scarcity. This research study was set up to test the relationship between $\delta^{13}\text{C}$ and Sangiovese viticultural and oenological performance in organic farming.

MATERIALS AND METHODS

1. Experimental setting, climate and soils

The study was carried out for four years, three years of monitoring (2007-2010) and one of validation (2011), in one of the largest and most important farm of the Chianti Classico wine production district (Tuscany, Central Italy), on 5 non irrigated vineyards, which covered about 40 ha. The fourth year of experimentation was conducted to confirm the unexpected results obtained in the three years of monitoring.

The reference variety was Sangiovese, which is the main variety for red wines in Central Italy (Fregoni, 2006; Costantini *et al.*, 2006). Plant density was 5,500-6,600 per ha and the rootstock was 420A (*Vitis berlandieri* × *Vitis riparia*), which is considered to be resistant to drought and active lime. Vineyards were planted in 2000, after slope reshaping by bulldozing and back hoe ploughing down to about 0.8-1.0 m. The vineyard was organically farmed and yields were low. Therefore, chemical fertilization was not implemented and only organic compounds (composted manure) were used. Nevertheless, no evident symptoms of nitrogen deficiency were observed. Training system, canopy management, and number of buds per plant were chosen in order to reduce production. Soil surface was periodically cultivated with mechanical

tillage to limit weed growth, interrupt capillarity and reduce evaporation, but only at alternate rows, to limit water runoff and soil erosion. During the years 2009 and 2010, composted manure was distributed at the rate of 1,000 kg ha⁻¹.

A weather station was placed near the selected vineyards. Eleven plots, covering about 100 m² each, were selected on the basis of a detailed survey, conducted with both traditional and multispectral image analysis and soil geoelectrical investigation (Andrenelli *et al.*, 2011; Martini *et al.*, 2013), to represent soil and plant spatial variability within vineyards. Thus, they should be considered representative of large parts of the farm.

In each plot, parallel soil and vine monitoring, as well as field measurements and grape sampling were carried out. However, as the experimental vineyards and plots were not restricted and were all subjected to conventional agricultural management, some plots and monitoring devices were damaged during the study by the wildlife or farm machinery and had to be discarded. Hence, the validation was conducted on only six plots.

The study area was characterized by a Mediterranean sub-oceanic climate (Costantini *et al.*, 2013) with cool and rainy winters, with minimum monthly average air temperatures close to 0 °C, but hot summers, with a relevant number of days with maximum temperature higher than 30 °C (on the long term, June 8.3 days, July 17.5, August 17.3, and September 2.8). Average long-term annual precipitation was 800 mm, concentrated in autumn and springtime, potential evapotranspiration (ET₀) from April to September was about 850 mm (Hargreaves and Samani, 1982), and mean value of the Winkler index was 1,856 Degree Days.

Soil description followed the standard Italian methods (Costantini, 2007) and classification according to the World Reference Base for Soil Resources (WRB; FAO-IUSS-ISRIC, 2006). Six soil typological units (STUs) were identified in the study vineyards (Figure 1): Nebbiano (NEB), Torricella (TOR), Miniera (MIN), Santa Lucia (SLC), and Leccio 1 and Leccio 2 (LEC1, LEC2). The soil profiles at the eleven sites (named BRO1-2, BRO4-7 and BRO9-13) are described in Tables 1 and 2. Nebbiano is a preserved reddish palaeosol, deep, moderately structured and with loamy or fine loamy texture, developed on ancient fluvial terrace deposits (Plio-Pleistocene period); two sites were chosen represented by profiles BRO4 and BRO6. The gravel content is moderate (10-25 %) with fine to medium

particles. The soil is strongly structured and well drained, with low calcium carbonate (CaCO₃) content (< 3%), moderate organic matter (1.2-1.7 %), sub-alkaline pH (7.7-8.4), and moderate available water capacity (AWC) (110-125 mm m⁻¹). The soil was classified Cutanic Luvisol (Hypereutric, Profondic, Clayic) according to WRB (FAO-IUSS-ISRIC, 2006). Torricella is a pale-brown, clay-loamy and strongly

gravelly (20-50 %) soil, developed on a tertiary calcareous flysch (sites BRO1 and BRO2). The soil is moderately structured, well drained, with high CaCO₃ content (about 25 %), moderate organic matter (1.4-2.3 %), sub-alkaline pH (7.6-8.3), and low to moderate AWC (90-115 mm m⁻¹). It was classified Haplic Cambisol (Calcaric, Skeletic). Miniera is a greyish, clayey soil developed on Pliocene marine

Table 1 – Soil profile descriptions.

Site (BRO)	Horizon	Depth (cm)	Moist colour	Redox mottles	Skeleton (%)	Structure	Consistence	Vine roots (n·m ⁻²)		
								coarse	medium	fine
1	Ap	20	2.5Y5/4	absent	30	weak	resistent	0.3	0.7	2.0
	Bw	110	2.5Y5/4	10yr5/6, 1%	30	weak	resistent	0.0	1.7	0.0
	BC	130+	2.5Y5/5	10yr5/6, 2%	55	weak	resistent	0.0	0.0	0.0
2	Ap	28	10YR4/3	2.5y7/3, 1%	35	weak	resistent	0.0	0.3	0.7
	Bw	100	2.5Y5/5	absent	35	weak	resistent	0.0	1.7	0.0
	BC	120+	2.5Y4/5	absent	55	weak	resistent	0.0	0.0	0.0
4	Ap1	35	7.5YR4/4	absent	20	weak	friable	0.0	0.7	1.0
	Ap2/A	85	7.5YR5/8	absent	20	weak	friable	0.7	1.3	1.0
	Ap2/Bw	85	7.5YR4/6	absent	25	weak	friable	0.7	1.3	1.0
	Bwg	130+	7.5YR5/8	10yr7/8, 35%	40	weak	resistent	0.3	0.0	0.0
5	Ap	25	10YR4/6	7.5yr5/8, 1%	10	weak	resistent	0.0	0.3	0.7
	Bwg	68	10YR4/6	5yr5/8, 10%	3	weak	resistent	1.0	1.0	1.0
	Cg1	100+	5Y7/1	absent	1	weak	resistent	0.0	0.7	0.7
6	Ap1	25	10YR4/6	absent	10	weak	friable	0.0	0.3	0.7
	Ap2/A	110	7.5YR4/4	10yr5/4, 3%	20	weak	friable	1.0	1.0	1.0
	Ap2/Btg	110	7.5YR4/6	10yr5/4, 35%	20	moderate	friable	1.0	1.0	1.0
	Btg	140+	10YR5/8	10yr6/3, 5%	3	moderate	resistent	0.0	0.7	0.7
7	Ap1	20	10YR4/4	7.5yr5/6, 3%	3	weak	friable	0.0	2.0	2.0
	Ap2/A	85	2.5Y3/3	absent	2	weak	friable	1.0	1.0	1.0
	Ap2/Bw	105+	10YR4/3	absent	2	weak	friable	0.0	1.0	0.0
9	Ap	20	10YR4/3	10yr6/4, 1%	3	weak	friable	0.3	0.3	5.0
	Bw	70	10YR5/6	10yr6/3, 1%	1	weak	friable	0.7	1.0	1.3
	2Bt	140+	10YR5/4	absent	1	weak	resistent	0.7	0.3	0.0
10	Ap	60	10YR4/6	absent	10	weak	friable	1.0	1.3	2.0
	2Bt	120+	10YR5/4	absent	1	weak	resistent	0.7	0.7	0.0
11	Ap	40	10YR4/6	absent	4	moderate	friable	0.7	1.0	3.3
	Bw	100	10YR5/6	absent	4	moderate	friable	0.7	1.7	2.0
	BC	130+	10YR6/8	10yr7/2, 1%	15	massive	friable	0.3	2.3	0.3
12	Ap	35	10YR4/6	absent	4	weak	friable	0.0	0.7	2.3
	Bw	100	10YR5/6	2.5y6/4, 1%	4	moderate	friable	1.3	2.7	2.0
	BC	130+	10YR6/8	10yr7/2, 1%	30	massive	friable	0.3	1.0	1.7
13	Ap1	30	10YR4/4	absent	12	moderate	resistent	0.0	0.3	0.3
	Ap2	75	10YR5/6	10YR5/1, 25%	3	moderate	resistent	1.3	1.0	1.3
	Bkg	110	10YR5/6	10YR5/1, 25%	0	moderate	resistent	2.0	1.7	1.7
	CBg	120+	10YR4/2	2.5Y4/0, 40%	0	massive	very resistent	0.0	0.0	0.0

Table 2 – Soil chemical and physical characteristics.

Site (BRO)	Horizon	Texture		BD g cm ⁻³	pH	EC μ S cm ⁻¹	CaCO ₃		OC g kg ⁻¹	N total g kg ⁻¹	AWC g 100g ⁻¹	CEC meq 100 g ⁻¹
		Sand dag kg ⁻¹	Clay dag kg ⁻¹				Total dag kg ⁻¹	active dag kg ⁻¹				
1	Ap	22	37	1.1	7.6	454	26.3	7.1	13.6	1.2	9.8	17.5
	Bw	17	42	1.5	8.2	312	25.5	6.8	8.7	0.9	11.4	17.3
	BC	30	35	n.d.	7.9	400	30.8	7.4	10.4	0.8	8.0	16.2
2	Ap	26	39	1.4	8.3	176	25.3	4.5	8.1	0.8	9.0	21.1
	Bw	30	42	1.1	8.3	473	27.5	5.6	6.1	0.7	8.9	20.3
	BC	28	43	n.d.	7.9	340	27.5	5.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	Ap1	48	29	1.3	7.7	316	2.6	2.5	9.9	0.8	9.2	15.3
	Ap2/A	48	31	1.2	8.4	249	1.6	1.2	7.5	0.7	11.4	14.7
	Ap2/Bw	49	26	1.2	7.6	200	1.1	0.5	4.3	0.3	11.9	12.7
	Bwg	50	25	1.3	7.6	302	1.1	1.0	4.3	0.4	13.0	13.5
5	Ap	26	48	1.5	8.4	482	2.4	1.2	5.8	0.6	11.6	18.0
	Bwg	24	52	1.4	8.5	414	1.1	1.0	3.1	0.4	13.2	17.5
	Cg1	24	44	n.d.	8.3	300	0.9	0.7	4.4	0.5	13.0	14.1
6	Ap1	39	36	1.4	8.7	239	2.5	1.3	6.9	0.5	7.1	14.8
	Ap2/A	43	33	1.5	8.0	292	2.2	1.3	9.8	0.6	6.1	15.6
	Ap2/Btg	45	34	1.6	7.8	286	3.4	1.3	5.4	0.4	10.7	14.7
	Btg	54	27	n.d.	7.7	401	0.9	0.7	3.7	0.3	9.8	16.5
7	Ap1	28	40	1.2	8.0	477	1.8	1.6	6.3	0.5	11.5	23.8
	Ap2/A	28	40	1.5	8.0	137	7.4	2.1	9.7	0.8	9.5	23.4
	Ap2/Bw	18	52	n.d.	8.4	337	4.4	2.4	3.9	0.4	11.2	19.9
9	Ap	48	29	1.4	7.8	221	0.6	0.3	8.8	1.0	9.2	16.4
	Bw	46	30	1.6	8.5	200	0.5	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	22.3
	2Bt	22	42	n.d.	8.2	198	0.5	0.4	2.4	0.5	12.0	22.3
10	Ap	46	32	1.5	7.7	124	1.1	0.7	2.6	0.4	7.6	15.9
	2Bt	26	39	1.4	8.2	189	4.6	2.0	5.6	0.6	8.7	17.1
11	Ap	52	20	1.5	8.1	124	15.6	3.0	6.5	0.7	9.2	10.7
	Bw	60	17	1.3	8.4	276	17.3	3.3	2.8	0.4	6.5	9.8
	BC	58	17	1.4	7.6	325	10.9	2.2	1.8	0.2	8.4	9.5
12	Ap	72	10	1.2	8.4	473	6.4	1.1	0.2	0.2	6.9	7.7
	Bw	70	12	1.3	7.8	513	5.5	1.2	0.1	0.2	7.0	7.9
13	Ap1	46	32	1.2	7.8	416	17.8	2.7	44.4	1.4	7.5	29.4
	Ap2	n.d.	n.d.	1.3	n.d.	n.d.	9.2	1.3	16.5	0.9	12.3	15.1
	Bkg	16	45	1.4	8.2	612	36.3	5.5	17.1	0.8	10.2	18.5
	CBg	16	54	n.d.	8.2	270	15.2	3.1	11.8	0.6	10.6	12.4

BD, bulk density; EC, salinity; CaCO₃, calcium carbonate; OC, organic carbon; AWC, available water capacity; CEC, cation exchange capacity; n.d., not detected.

clays with some sandy-gravelly lenses, sometimes with lignite residue and gypsum crystal in the parent material (sites BRO5 and BRO13). The soil is poorly structured or massive, especially in depth, where it often shows redoximorphic features (redox mottles and Fe-Mn nodules). The CaCO₃ and the organic matter content are both low, the pH is sub-alkaline (8.3-8.5), and the AWC is moderate to high (130-170 mm m⁻¹). The soil was classified Endogleyic Stagnosol (Eutric, Clayic). Leccio 1, a Cutanic Luvisol (Ruptic, Hypereutric), and Leccio 2, a Brunic Arenosol (Calcaric, Eutric), were both situated on marine sands and conglomerates (sites BRO9 and 10 for LEC1, BRO11 and 12 for LEC2). Leccio 1 is a rather preserved soil and it is placed on stable surfaces or in impluvia. Sometimes it buries an older soil developed on the tertiary flysch. It is reddish in colour, deep, with sandy-clay loamy texture, and common medium and fine gravels. It has scarce CaCO₃ (0.5-4.5 %) and exchangeable potassium (48-143 mg kg⁻¹), good drainage and a moderate AWC (120-130 mm m⁻¹). Leccio 2 is the most eroded soil on the marine sands, brownish in colour, poorly structured or loose, loamy sandy textured and with variable gravel content. The CaCO₃ is moderate (5-15 %), the organic matter is low (0.4-1.1 % in the Ap horizon), drainage is excessive and the AWC is low to moderate (90-110 mm m⁻¹). Santa Lucia, a Stagnic Cambisol (Calcaric, Clayic), is formed on the relatively more recent Plio-Pleistocene fluvio-lacustrine clays (sites BRO7). It is a brown soil, loamy-clay textured, moderately structured, showing sometimes ferric nodules or a petroferric horizon in depth (about 1-1.5 m deep). This soil is usually poorly gravelly, plastic and with a firm consistency when dry. The CaCO₃ is moderate (1.8-12 %) and the organic matter is scarce (1-1.2 % in the Ap horizon). The soil is somewhat poorly drained and has moderate AWC (130-150 mm m⁻¹). All the six studied soils were fully bases saturated, but not saline, and showed low electro-conductivity values (<500 μS cm⁻¹). Nitrogen content was always low or very low, with relatively higher values in sites BRO1, BRO9, and BRO11, and lowest values in the very sandy and eroded site BRO12.

2. Field analysis

The vegetative behaviour of the grapevines was recorded at specific phenological phases and yield components were measured at harvest (yield per vine, cluster and mean berry weight (MBW), number of clusters per vine). Ψ_{stem} was monitored at veraison (first days of August) with a pressure chamber, according to the methodology proposed by Choné *et al.* (2001). Measurements were performed between 10

and 11 am on non-transpiring mature leaves that had been bagged before measurement. Water availability or deficit, expressed as the difference between measured soil water content and wilting point, was evaluated during the veraison-harvest phases. Monitoring of the soil water content was performed by FDR (Frequency Domain Reflectometry) sensors at 11 different sites, at intervals of about 15 days over 3 growing seasons (2008-2010). Each site had 3 FDR replicated measurement points, placed under the same vine row at a distance of about 5-6 m apart. Two reference depths (5-35 and 35-75 cm) were selected according to literature (White, 2003). Moreover, for each site the 3-year average water content of the 5-75 cm depth layer, related to the veraison-harvest period, was calculated. Data for the sites BRO2, BRO9 and BRO10 were incomplete, due to damage to the monitoring wells.

3. Laboratory analysis

The isotopic ratio ¹³C/¹²C (δ¹³C) was measured in the wine ethanol by Isotope Ratio Mass Spectrometry. The δ¹³C was expressed in parts per thousand variations, referred to the international standard (V-PDB) ratio (Farquhar *et al.*, 1989). Wines were analysed twice.

Traits of grape quality (sugar content, sugar accumulation rate, titratable acidity, total and extractable anthocyanins and polyphenols) were analysed in the berries and the musts according to OIV (2000) and Glories (2001). YAN was determined with the enzymatic-spectrophotometric method (Foodlab, 2013) and measured in the grape musts from the different experimental vineyards in the year 2008-2010, or plots in the year 2011.

Routine soil analysis of the air-dried < 2 mm fraction followed the official Italian methods (MIPAF, 2000). Laboratory analyses were carried out on each soil horizon up to the rooting depth. Soil texture was tested in the laboratory by the sieve-pipette method. CaCO₃ content was measured volumetrically by the addition of HCl in a Dietrich-Fruhling calcimeter. Active CaCO₃ was analysed with a solution of ammonium acetate; this is the more active fraction of CaCO₃, which easily dissolves and precipitates. Soil organic carbon content was determined by using the Walkley-Black procedure (Walkley and Black, 1934); pH and electrical conductivity were measured in a 1:2.5 (w w⁻¹) water suspension; cation exchange capacity (CEC) was measured by use of 1 M sodium acetate solution at pH 7.0; and exchangeable bases were extracted with 1 M NH₄⁺ acetate solution at pH 7.0 and measured by flame photometry (Na, K, and

Ca) and atomic absorption spectrometry (Mg). Bulk density (BD) was obtained with the core method (Robertson and Paul, 2000), averaging two or three replicate samples. AWC was estimated as the difference between soil water content at field capacity (FC) and wilting point (WP). Soil moisture content at -33 kPa (FC) and -1500 kPa (WP) of disturbed samples of the benchmark profiles were analysed in laboratory by the pressure-plate system (Kassel and Nielsen, 1986) on replicated samples. The moisture content at FC and WP (mm m⁻¹) were measured on the fine earth fraction and the values were corrected for the gravel content according to Gardner (1986).

4. Climatic and bioclimatic elaborations

ET₀ was estimated according to Hargreaves and Samani (1982) with the aim to compare the climatic conditions of the 4-year study period with the long-

term averages. The ombrothermic diagram of Bagnouls and Gaussen (1953) was adopted to characterize the climate of the year and highlight the occurrence of arid conditions. The monthly precipitation and the mean monthly temperature were plotted on the same graph, doubling the values on the scale of precipitation; the dry months are those where the rainfall curve goes below that of temperature, indicating the inversion of the hydric balance. A month is considered “dry” when the value of the sum of the monthly rainfall is equal to or less than twice the value of the average monthly temperature ($P \leq 2T$).

The availability of daily data of solar radiation, maximum and minimum temperature, average wind speed and average temperature of the dew point allowed the estimation of ET₀ according to Penman and Monteith (ET_{OPM}; ASCE-EWRI, 2004). This parameter was used to estimate crop evapotranspiration (ETc) according to Allen *et al.* (1998):

$$ETc = ET_{OPM} \times Kc$$

Kc is the crop coefficients for the vine. The adopted monthly values (Doorenbos and Kassam, 1979) were different along the growing season (0.45 April, 0.65 May, 0.70 June, 0.75 July and August, 0.70 September) to take into account the vine phenological phases and the soil coverage. The climatic water deficit (WDC) for the vine was calculated from April 1 to September 30, as follows:

$$WDC = P - ETc$$

where P is the monthly rainfall.

Two specific bioclimatic indices were also used to characterize the viticultural environment:

The growing degree-days or Winkler index (IW; Winkler, 1962) was calculated using the following formula:

$$IW = \sum_{01/04}^{31/10} (T_{med} - 10)$$

where *T_{med}* is the mean daily air temperature (°C). The index was calculated for the period from April 1 to October 31.

The Heliothermal index of Huglin (IH; Huglin, 1986) was calculated as follows:

$$IH = \sum_{01/04}^{30/09} \frac{(T_{med} - 10) + (T_{max} - 10)}{2} \times K$$

where *T_{med}* is the mean daily air temperature (°C), *T_{max}* is the maximum daily air temperature (°C), and K is the length of day coefficient (range from 1.02 to

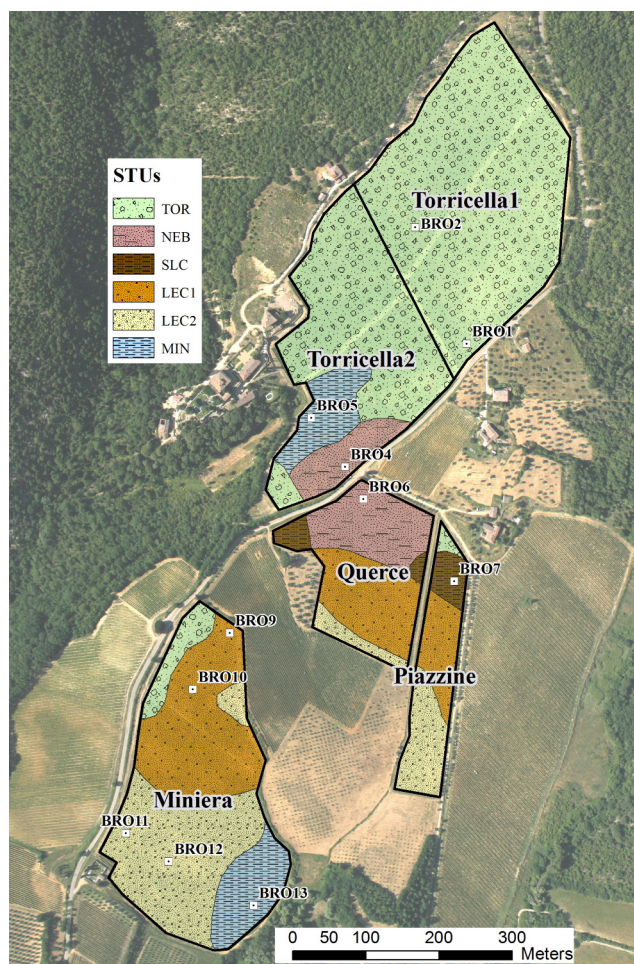


Figure 1 – Soil map of the five experimental vineyards and eleven sites (BRO1-2, BRO4-7 and BRO9-13).

Soil typological units (STUs): Nebbiano (NEB), Torricella (TOR), Miniera (MIN), Santa Lucia (SLC), and Leccio 1 and 2 (LEC1 and LEC2). For more details, please see M&M and Tables 1 and 2.

1.06 between 40° and 50° of latitude, 1.03 at Brolio); in the northern hemisphere, the index is calculated based on the period from April 1 to September 30.

5. Sangiovese performance

The vine performance of Sangiovese was evaluated by means of a synthetic indicator worked out by Bucelli *et al.* (2010), which makes use of a selected set of vegetative and productive parameters to estimate the score obtained in the wine panel test, as follows:

$$Y = 8.689 \text{ }^\circ\text{Brix} - 141.881 \text{ }^\circ\text{Brix d}^{-1} + 0.042 \text{ EPI} + 16.546 \text{ MBW} - 170.646$$

where Y is the score at the wine panel test, °Brix is the berry sugar content at harvest, °Brix d⁻¹ is the sugar

accumulation rate, EPI is the extractable polyphenol index from berry skin, and MBW is the mean berry weight at harvest.

The equation, validated for the Sangiovese variety cultivated in the province of Siena, tells us that the wine score obtained in a specific year and plot is higher when the sugar content in berries at harvest is high, the sugar accumulation is slow, the polyphenol content in the berry skin is high, and berries are not stunted.

6. Statistical analysis

Data were submitted to analysis of variance and regression analysis, using Statistica software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Table 3 – Climatic indices and rainfall during the growing season of the 4 years of study.

Year	Winkler index	Huglin index	April - September rain (mm)
2008	1750	2279	332
2009	1969	2566	266
2010	1721	2282	437
2011	1943	2597	145
Long term	1856	2181	358

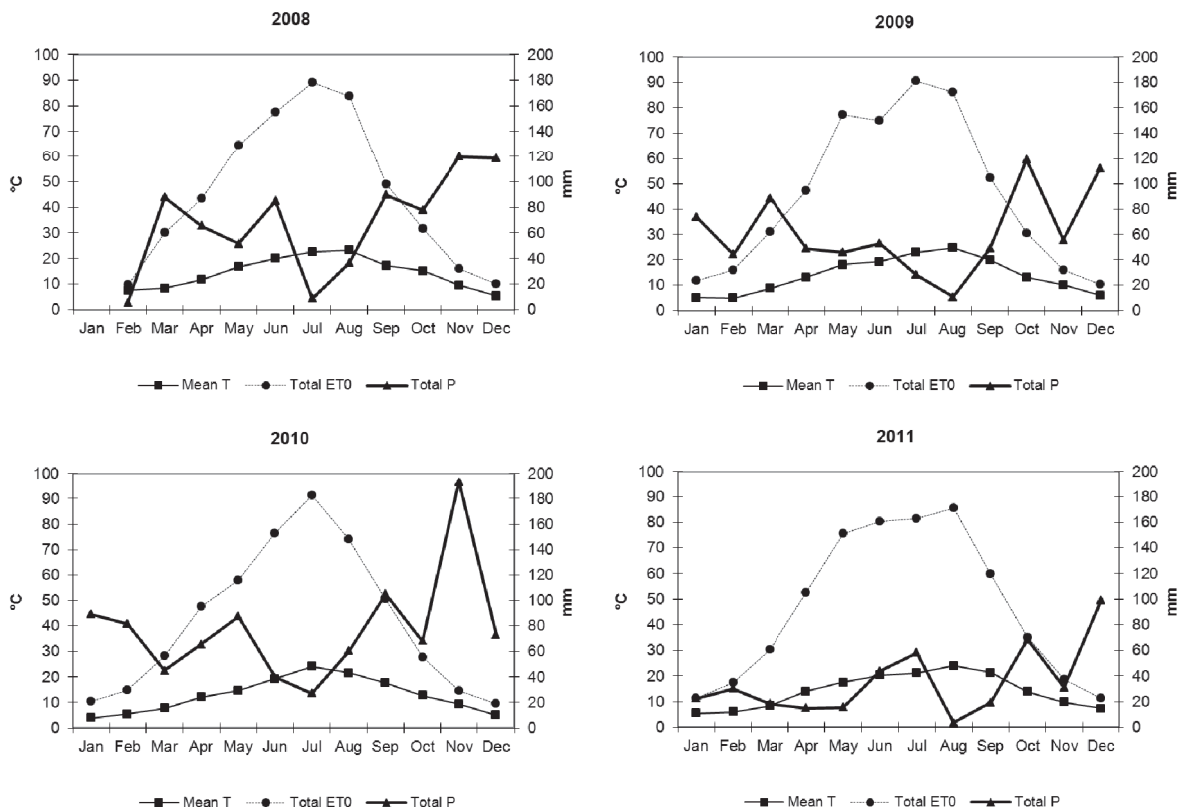


Figure 2 – Ombrothermic diagrams of the studied years (T temperature, ET₀ evapotranspiration, P precipitation).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Climatic conditions during the study

The weather during the study was quite different each year, and in the years 2010 and 2011 compared to long-term average (Figure 2). The year 2010 was the coldest and wettest: annual precipitation was 936 mm and seasonal ET_0 was 795 mm, whereas 2011 was the warmest and driest: annual precipitation was 424 mm and seasonal ET_0 was 870 mm.

The ombrothermic diagrams (Figure 2) highlighted that in the year 2008, which is the most representative of long-term climate, drought conditions occurred at the beginning of July and persisted until mid-August, with July being the driest month; the year 2009 was characterized by a longer period of “drought”, which started at the beginning of July and continued until mid-September, with August being the driest month; the year 2010 showed moderate drought conditions that occurred from mid-June until the end of July; finally, the year 2011 was very dry, arid conditions occurred from mid-March until mid-June, and then again from the beginning of August until the end of September.

In the year 2008, the maximum ET_0 occurred in July and August, roughly coinciding with the period of maximum relative aridity. In 2009, ET_0 values as high as those recorded during the «drought» period were also estimated in May. In 2010, the peak values of July were lower than in the two previous years. In 2011, there were high values of ET_0 from May until August.

Meteorological conditions during the growing period in the 4 years of study were also characterized by Huglin and Winkler indices through the data of the weather station placed in the vineyards and compared with the long-term data recorded at the nearby station of Gaiole in Chianti. They were slightly lower than the

long-term average in 2008 and 2010, whereas they were higher in 2009 and 2011 (Table 3).

Rainfall during the growing period in 2009 and 2011 was lower than the long-term average (316 mm) and higher in the year 2010. In 2009, rainfall was concentrated in the post-flowering and pre-harvest periods, while in 2008 total rainfall, showing an amount similar to that of the long-term average, was concentrated in a few heavy downpours; by contrast, in 2010 rainfall was evenly distributed throughout the summer, with greater intensity than in the previous two years. In 2011, rainfall during the growing season was scarce and concentrated in June and July (data not reported).

The climatic water deficit, estimated during the vine growing season on a monthly basis, further highlighted the differences between the years of study. A pronounced water deficit occurred in 2009 and was even more pronounced in 2011, when the vine was always under potential water deficit conditions. The cumulative potential climatic deficit from July to September was -68.8 mm in 2008, -114.7 mm in 2009, 36.7 mm in 2010, and -120.2 mm in 2011 (Figure 3).

2. Soil water availability

The water availability for the period between the beginning of July and the harvest, which is considered critical for the accumulation of sugars and the development of secondary metabolites in the grapes, is shown in Figure 4. The figure shows the difference between mean field soil water content and lab water content at a tension of -1,500 kPa (standard wilting point) during the period from veraison to harvest. The presence of negative values can be explained recalling that vines are able to absorb water from depths greater than that monitored and at tensions stronger than -1,500 kPa (White, 2003).

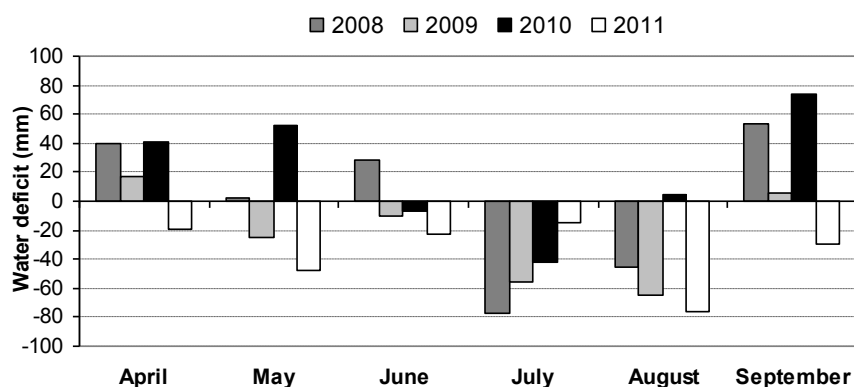


Figure 3 – Climatic water deficit for vine in the four study years.

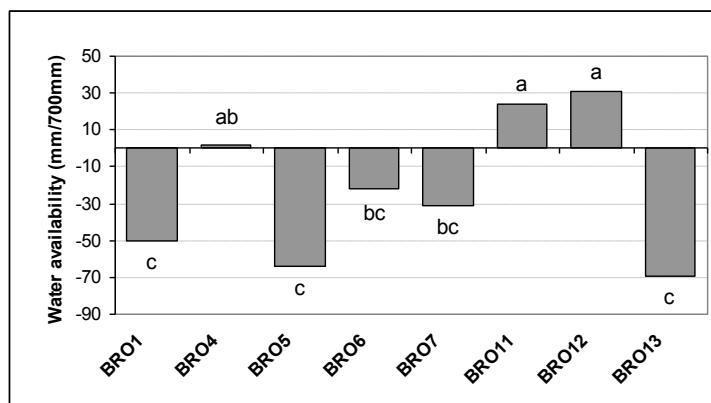


Figure 4 – Mean soil water availability in the 5- to 75-cm depth between the beginning of July and the harvest (2008-2010). Bars marked with different letters are significantly different for $P < 0.05$ according to the HSD Tukey's test.

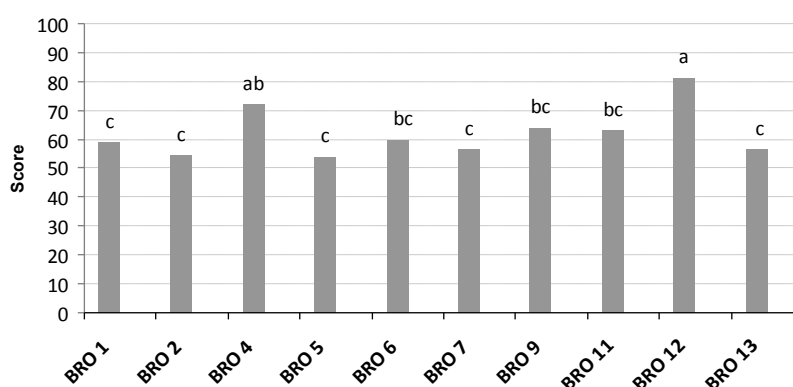


Figure 5 – Mean values of Sangiovese performance in the studied sites (2008-2010). Bars marked with different letters are significantly different for $P < 0.05$ according to the HSD Tukey's test.

Despite the considerable climatic differences that occurred in the first three years, the statistical analysis of the mean soil moisture did not reveal significant differences between years (about -18 mm on average). On the other hand, there was a high variability between sites, and each site showed similar behaviour throughout the monitoring period. In fact, significant differences emerged among the different monitoring sites.

It is not surprising that a positive difference occurred in sandy soils (BRO11 and BRO12), whereas clayey soils showed the most negative values (BRO1, BRO5 and BRO13). Actually, water retention capacity of the studied soils was not only affected by the texture, but also by soil structure, gravel, and stone content. Therefore, moisture in poorly structured or very stony clayey soils did not translate into a larger volume of water effectively present in the soil and available to the vines.

3. Sangiovese performance

Grape production during the studied years was characterized by rather low values (general average of

1.66 kg per plant), as pursued by the farm, but without any statistical relationship with the viticultural results (Table 4) and the calculated performance. On the other hand, sites showed statistically significant differences for some of the other parameters, in spite of the uniform and severe pruning (Table 4). The effect of the agricultural husbandry was also evidenced by the absence of a significant difference between years in terms of mean berry weight and yield. On the contrary, the effect of year was significant on sugar content and accumulation, pointing to higher values in 2010, and in particular on polyphenol content.

The score of the mean three-year Sangiovese performance obtained in the studied sites was always above 50, which means that in all plots the quality potential of the grapes was good. The performance ranged significantly between years (on average, 58 in 2009 versus 64 in both 2008 and 2010), and especially between sites (Figure 5). Sites BRO12 and BRO4 showed significantly higher performances compared to the others, especially compared to BRO1, 2, 5, 7 and 13.

Table 4 – Main viticultural results.

Site	year	Sugar content °Brix	Sugar accumulation rate °Brix day ⁻¹	MBW* g	Yield per plant kg	Extractable polyphenol index mg kg ⁻¹
BRO 1	2008	20.12	0.33	1.95	1.72	1675
	2009	20.60	0.34	1.79	1.45	1465
	2010	21.38	0.39	2.06	1.46	1790
	mean	20.70 b	0.35 bc	1.93 bc	1.54 b	1643 ab
BRO 2	2008	21.85	0.36	1.95	1.52	1423
	2009	21.43	0.35	1.90	1.62	1352
	2010	21.00	0.38	1.92	1.20	1731
	mean	21.43 ab	0.36 abc	1.92 bc	1.45 b	1502 ab
BRO 4	2008	22.20	0.36	2.07	1.51	1640
	2009	22.30	0.37	2.49	1.24	1399
	2010	22.40	0.41	2.22	1.47	1947
	mean	22.30 ab	0.38 ab	2.26 ab	1.41 b	1662 ab
BRO 5	2008	19.63	0.32	2.03	1.61	1677
	2009	19.70	0.32	2.17	1.95	1165
	2010	20.97	0.38	2.17	1.73	1727
	mean	20.10 b	0.34 c	2.12 abc	1.76 ab	1523 ab
BRO 6	2008	21.40	0.35	1.97	1.28	1536
	2009	21.07	0.35	2.04	2.22	1232
	2010	22.85	0.42	2.09	n.d.	2016
	mean	21.77 ab	0.37 abc	2.03 abc	1.75 ab	1595 ab
BRO 7	2008	21.92	0.36	2.02	1.69	1287
	2009	21.70	0.36	1.90	n.d.	1336
	2010	22.76	0.41	2.22	1.70	2003
	mean	22.13 ab	0.38 abc	2.05 abc	1.70 ab	1542 ab
BRO 9	2008	22.01	0.36	2.27	2.85	1515
	2009	20.70	0.34	2.58	2.43	1433
	2010	20.71	0.38	2.27	n.d.	1687
	mean	21.14 ab	0.36 abc	2.37 a	2.64 a	1545 ab
BRO 10	2008	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	19.96	0.36	n.d.	n.d.	1244
	2010	22.88	0.40	n.d.	n.d.	n.d.
	mean	21.42 ab	0.38 abc	-	-	1244 b
BRO 11	2008	20.85	0.34	2.15	2.25	1496
	2009	22.50	0.37	1.97	1.67	1337
	2010	23.26	0.42	2.01	1.06	2080
	mean	22.20 ab	0.38 abc	2.04 abc	1.66 b	1638 ab
BRO 12	2008	23.35	0.38	1.76	0.75	1837
	2009	23.00	0.38	1.97	1.12	1722
	2010	23.32	0.42	1.84	1.51	2089
	mean	23.22 a	0.39 a	1.86 c	1.13 b	1883 ab
BRO 13	2008	19.74	0.32	2.09	1.83	1528
	2009	19.70	0.32	2.08	1.23	1513
	2010	22.33	0.41	2.01	0.89	1937
	mean	20.59 b	0.35 bc	2.06 abc	1.32 b	1659 ab
Year	2008	21.31 b	0.35 b	2.03 a	1.70 a	1561 b
	2009	21.15 b	0.35 b	2.09 a	1.66 a	1382 c
	2010	22.17 a	0.40 a	2.08 a	1.38 a	1901 a
	mean	21.54	0.37	2.07	1.58	1615

*MBW, mean berry weight and n.d., not detected; in each column, mean values with different letters are significantly different for $P < 0.05$ according to the HSD Tukey's test.

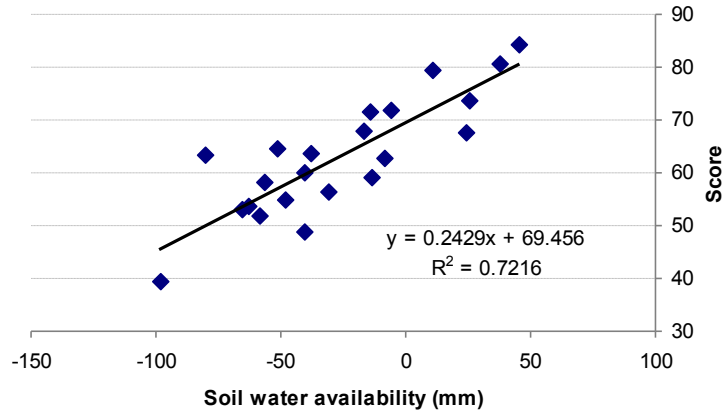


Figure 6 – Data plotted from Sangiovese performance and soil water availability in the 5- to 75-cm depth in seven sites during the years 2008-2010. Negative values indicate mean soil water contents below conventional wilting point at the measured depth between veraison-harvest phases.

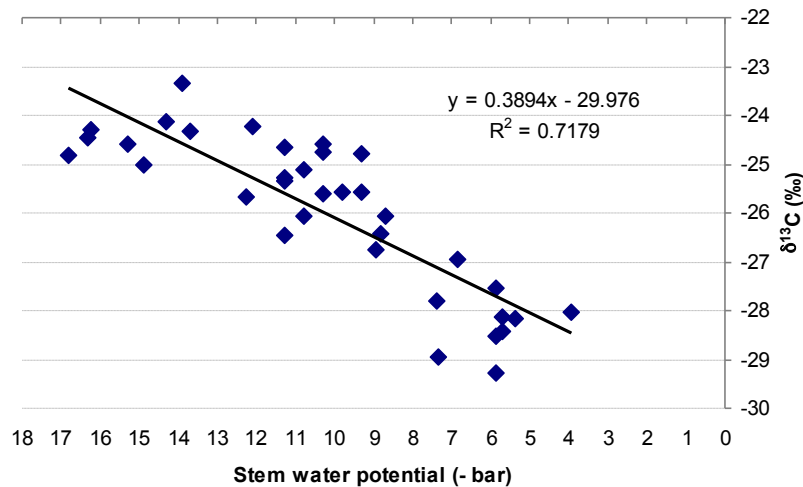


Figure 7 – Data plotted from $\delta^{13}\text{C}$ and stem water potential measured at veraison in four (2010) or eight (2011) sites.

It is worthwhile to note that the Sangiovese performance in the studied plots was positively related to soil water availability at 5- to 75-cm depth, with a rather high determination coefficient (Figure 6). This outcome was particularly interesting, since previous studies had indicated that the viticultural result of Sangiovese is generally limited by large water availability, as it causes superfluous growing at the expense of the target grape quality (Storchi *et al.*, 2005; Scalabrelli *et al.*, 2006; Costantini *et al.*, 2008; Palliotti *et al.*, 2011).

4. Carbon isotopes measured on wine ethanol

As expected, $\delta^{13}\text{C}$ determined in the wine samples was rather well correlated with Ψ_{stem} (Figure 7). The Ψ_{stem} threshold of -12 bar, reported in the literature to separate stress from no stress water conditions, corresponded to a $\delta^{13}\text{C}$ value of -25.3‰ (broadly equivalent to -23.7‰ in the must, according to

Rossmann *et al.*, 1996). The value was slightly lower than that reported in the literature for red wines, but matched well with the outcomes obtained from Sangiovese cultivated in different experimental settings (Costantini *et al.*, 2010; Palliotti *et al.*, 2008).

In few cases, the measured Ψ_{stem} values were lower than -12 bar, but most values were lower than -9 bar, corresponding to a $\delta^{13}\text{C}$ value of -26.5‰. If we take -9 bar Ψ_{stem} as a threshold for Sangiovese to point to the occurrence of incipient water stress, the results indicated that many of the observed plants were suffering from moderate or severe water stress at the date of measurement.

As a whole, the general mean $\delta^{13}\text{C}$ value obtained in the wines of all plots and years, -25.48‰ (-23.78‰ in the must), pointed to an average water stress. Significant differences occurred between years as well as between sites. Limiting water nutrition was

stronger in 2008, moderate in 2009, and low in 2010 (Table 5).

Means with different letters indicate significantly differences between sites in the same year for $P < 0.05$, or between year averages for $P < 0.01$, according to the HSD Tukey's test.

As for the influence of year, it is noteworthy that there was no clear relationship between $\delta^{13}\text{C}$ values and climatic deficit during the entire growing season, the veraison-harvest phases (Table 5), or the Winkler and Huglin indices. However, in the wettest year (i. e., 2010) we obtained the most negative $\delta^{13}\text{C}$ values, and the amount of climatic deficit during July, namely the time before full veraison, seemed to have a trend similar to that of $\delta^{13}\text{C}$ values.

On the other hand, sites showed a similar ranking in all years, in other words, no statistical interaction between the effects of the site and year occurred. This means that there was a clear differentiation of the three-year mean values between sites, in particular, BRO4 and BRO12 showed the lowest values, indicating no or very little water stress, while all the others were under the threshold of moderate stress (-26.5‰), with BRO1, BRO2, BRO5, BRO6, BRO7, BRO10, and BRO11 under the threshold of strong stress (-25.3‰) (Figure 8).

The most interesting outcome of the isotopic characterization of the wines, however, was achieved when $\delta^{13}\text{C}$ values were related to the viticultural and oenological results, as synthesized in the performance index (Figure 9). In this case, the correlation was contrary to expectation, that is, the performance increased when the water stress decreased. This result was particularly striking since $\delta^{13}\text{C}$ values were not particularly low, and could confirm a particular sensitivity of the Sangiovese performance to water limitations, similar to those caused by an excess of

Table 5 – $\delta^{13}\text{C}$ values in the studied years 2008, 2009, 2010.

Site	2008	2009	2010
BRO 1	-24.13 bc	-23.35 e	-25.02 c
BRO 2	-24.27 bc	-24.18 cde	-25.88 bc
BRO 4	-26.90 a	-27.62 ab	-28.24 a
BRO 5	-25.17 b	-24.48 cde	-25.74 bc
BRO 6	-23.92 c	-23.66 de	-24.83 c
BRO 7	-23.97 c	-25.02 c	-26.40 b
BRO 9	-24.32 bc	-26.85 b	-27.90 a
BRO 10	-24.24 a	-24.45 cde	-25.70 bc
BRO 11	-23.84 c	-24.20 cde	-25.22 bc
BRO 12	-27.47 a	-28.88 a	-28.59 a
BRO 13	-24.69 bc	-24.78 cd	-26.36 b
Average	-24.87 C	-25.22 B	-26.35 A

Means with different letters indicate significantly differences between sites in the same year for $P < 0.05$, or between year averages for $P < 0.01$, according to the HSD Tukey's test.

humidity. Thus, Sangiovese exhibited high adaptation but also sensitivity to dry conditions.

5. Yeast-assimilable nitrogen (YAN)

Similarly to soil nitrogen content, which was always low, YAN measured in the must obtained from the bulk yield of the five experimental vineyards was at all times rather low, that is, much lower than the 120-140 mg L⁻¹ threshold usually considered as a reference value to assess limiting condition (Ojeda and Salmon, 2011). On average, the three-year mean of YAN was 86.7 mg L⁻¹, without significant differences between years and rather low differences between vineyards (Figure 10). Then we can assume that nitrogen nutrition was always limiting, although water stress conditions changed significantly between years and sites.

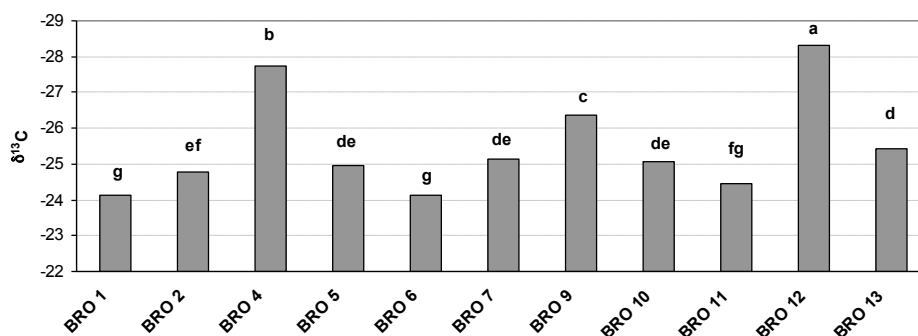


Figure 8 – Mean values (2008-2010) of $\delta^{13}\text{C}$ in the wines produced in the experimental plots. Bars marked with different letters are significantly different for $P < 0.05$ according to the HSD Tukey's test.

6. The validation year

In the year 2011, the overall mean $\delta^{13}\text{C}$ indicated moderate water stress conditions, ranging from no (BRO4) to strong stress (BRO1, BRO5, and BRO11) (Table 6). Therefore, the selected subset of plots could be considered well representative of the experimental field variability. Also in this year, $\delta^{13}\text{C}$ values did not reflect the seasonal climate (Table 3) and the potential water deficit (Figure 3); rather, they were very much similar to those obtained in the same sites during the previous years (Table 6).

The performance score was on average higher than in previous years, but the site ranking was the same. Although the limited set of data did not allow a significant correlation between the variables, in the year 2011 it resulted in an inverse relationship between $\delta^{13}\text{C}$ and performance.

The YAN value was always low to very low. The limited amount of data did not permit generalization, however, there was a direct relation between performance and YAN. Thus, the plot with the worst performance showed the strongest water deficit and

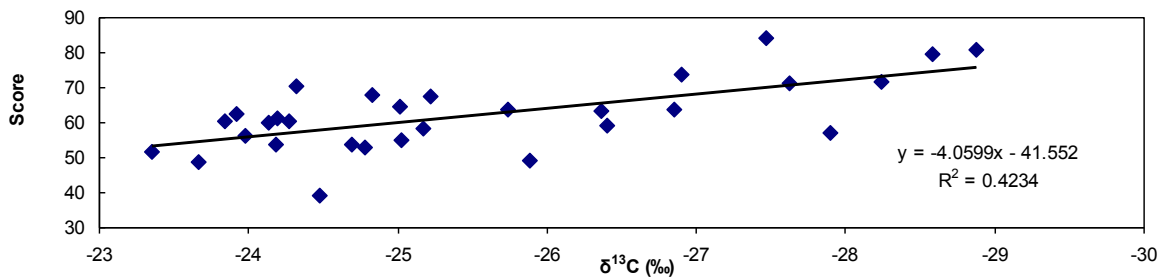


Figure 9 – Data plotted from Sangiovese performance and $\delta^{13}\text{C}$ in eleven sites during the years 2008-2010.

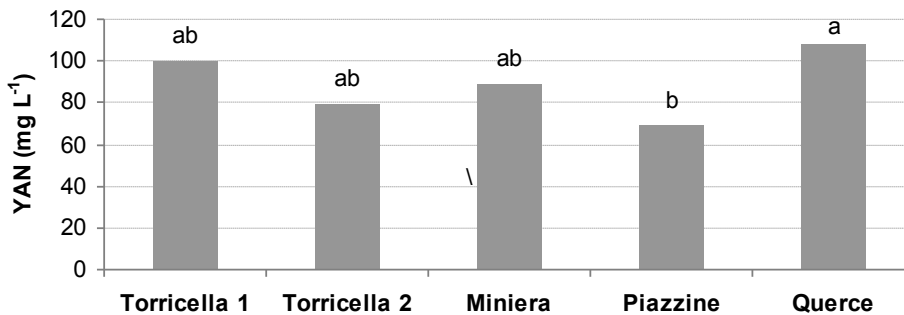


Figure 10 – Mean values (2008-2010) of YAN (Yeast-Assimilable Nitrogen) in the wines produced in the experimental vineyards.

Bars marked with different letters are significantly different for $P < 0.05$ according to the HSD Tukey’s test.

Table 6 – Yeast-assimilable nitrogen (YAN) in the must.

2011			
Soil	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Performance (score)	YAN (mg L^{-1})
BRO 1	-24.00 c	81.6 ab	104.0 ab
BRO 2	nd	63.0 ab	69.0 ab
BRO 4	-28.12 a	91.6 ab	119.3 a
BRO 5	-24.47 c	58.7 b	57.3 b
BRO 11	-24.58 c	96.1 a	97.0 ab
BRO 13	-25.95 b	71.9 ab	107.7 ab
Average	-25.42	77.1	92.4

Means with different letters are significantly different for $P < 0.05$ according to the HSD Tukey’s test, n.d. : non detected

the lowest nitrogen availability, whereas the best performance corresponded to moderate or no water stress and relatively higher nitrogen availability.

CONCLUSIONS

The soil survey of the experimental vineyards revealed a large natural variability of soil environments, increased by the mechanical works carried out during the activities of surface preparation before planting. Besides enhancing site specificity, the deep upsetting of the original soil profile and the stripping of the surface horizons favoured the outcropping of stones and biologically poor, deep soil layers. Therefore, the studied soils were in most cases of low fertility, because of their lithological nature as well as a consequence of pre-plantation activities.

The target oenological result pursued by the farm was the enhancement of wine quality and site specificity by means of limited yield and adoption of organic farming. Viticultural husbandry limited fertilization and implemented high plant density, moderate vigour rootstock, severe pruning and thinning of bunches, and a semi-permanent grass cover.

The values of $\delta^{13}\text{C}$ were significantly correlated with leaf water potential. A $\delta^{13}\text{C}$ in the wine of -26.5‰ corresponded to a Ψ_{stem} of -9 bar, while a Ψ_{stem} of -12 bar matched with a $\delta^{13}\text{C}$ of -25.3‰. The outcomes of the field monitoring of soil water availability confirmed the crucial role played by water supply on Sangiovese performance, but with a direct relationship, contrary to what is considered a general rule for red wines. In fact, the best performance was achieved where water nutrition was not limited, that is, in the plots where the $\delta^{13}\text{C}$ in the wine was lower than -26.5‰ and the Ψ_{stem} at veraison higher than -9 bar.

The unexpected relationship between $\delta^{13}\text{C}$ values and performance scores could be related to the nitrogen nutrition. Actually, all the studied soils showed low or very low nitrogen content, consequently, nitrogen content in the must was also low or very low. In the plots where water availability was relatively higher, nitrogen plant uptake was favoured, YAN was relatively higher, and so was Sangiovese performance. It must be stressed, however, that the used Sangiovese performance evaluation was a simplified approach, which did not allow to highlight possible particular aromas that might have been produced in very limiting soil conditions.

In conclusion, the $\delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{stem} water stress indicators alone cannot be used to foresee vine performance if another important factor, like nitrogen availability, is limiting. The relationship between $\delta^{13}\text{C}$

and Sangiovese performance was not as expected, since poor soil fertility, in particular low nitrogen content, and the adopted viticultural husbandry, always prevented vine luxuriation, also in non-limiting water conditions.

Acknowledgements: The authors are grateful to Dr Massimiliano Biagi, agronomist at the “Barone Ricasoli” farm, for the excellent technical assistance. This research was funded by the CRA-Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura (Project ISSUOVINO) and by the “Barone Ricasoli” farm. The authors also thank the reviewers and Prof. Kees van Leeuwen for their useful comments and suggestions.

REFERENCES

- Allen R.G., Pereira L.S., Raes D. and Smith M., 1998. Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements. In: *Irrigation and Drainage Paper No. 56*. FAO, Rome.
- Andrenelli M.C., Magini S., Ntarelli L., Vignozzi N., Agnelli A., Bucelli P., Pellegrini S., Priori S. and Costantini E.A.C., 2011. Applicazione di tecniche innovative in viticoltura di precisione. *EQA - Int. J. Environ. Qual.* **7**, 103-112.
- ASCE-EWRI, 2004. The ASCE standardized reference evapotranspiration equation. In: *Standardization of Reference Evapotranspiration - Task Committee Final Report*. ASCE Environmental and Water Resources Institute. Reston, VA.
- Äyräpää T., 1971. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. *J. Inst. Brew.*, **77**, 266-275.
- Bagnouls F. and Gaussen H., 1953. Saison sèche et indice xérothermique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, **88**, Fasc. 3/4.
- Bell S.J. and Henschke P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **11**, 242-295.
- Bucelli P., Costantini E.A.C. and Storchi P., 2010. It is possible to predict Sangiovese wine quality through a limited number of variables measured on the vines. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **44**, 207-218.
- Chapman D.M., Roby G., Ebeler S.E., Guinard J.-X. and Matthews M.A., 2005. Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **11**, 339-347.
- Choné X., van Leeuwen C., Dubourdieu D. and Gaudillere J.P., 2001. Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Ann. Bot.*, **4**, 477-483.
- Costantini E.A.C., Barbetti R., Bucelli P., L'Abate G., Lelli L., Pellegrini S. and Storchi P., 2006. Land peculiarities of the vine cultivation areas in the province of Siena (Italy), with indications concerning

- the viticultural and oenological results of Sangiovese vine. *Boll. Soc. Geol. Ital.*, **6**, 147-159.
- Costantini E.A.C. (Ed.), 2007. *Linee Guida dei Metodi di Rilevamento e Informatizzazione dei Dati Pedologici*. CRA_ABP, Firenze, Italia, 296 p. (In Italian, with English summary) [On-line at <http://abp.entecra.it/soilmaps/ita/downloads.html>].
- Costantini E.A.C., Barbetti R., Bucelli P., L'Abate G., Pellegrini S. and Storchi P., 2008. Scale dependence of soil and climate functional characteristics for qualitative Sangiovese vine production. In: *Proc. XXXI OIV Congress, Verona*. Available on CD-ROM. Org. Int. Vigne Vin, Paris, France.
- Costantini E.A.C., Pellegrini S., Bucelli P., Barbetti R., Campagnolo S., Storchi P., Magini S. and Perria R., 2010. Mapping suitability for Sangiovese wine by means of $\delta^{13}\text{C}$ and geophysical sensors in soils with moderate salinity. *Eur. J. Agron.*, **33**, 208-217.
- Costantini E.A.C., Fantappiè M. and L'Abate G., 2013. Climate and pedoclimate of Italy. In: *The Soils of Italy*. Costantini E.A.C. and Dazzi C. (Eds.), World Soils Book Series, Springer, pp. 19-37. DOI: 10.1007/978-94-007-5642-7.
- Deluc L.G., Quilici D.R., Decendit A., Grimplet J., Wheatley M.D., Schlauch K.A., Mérillon J.M., Cushman J.C. and Cramer G.R., 2009. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics*, **10**, no. 212.
- Deschepper G., Cassassolles X., Dabas M. and Pernet D., 2006. Complémentarité des mesures de résistivité électrique des sols et du $\delta^{13}\text{C}$ du moût dans l'étude et la valorisation des terroirs viticoles. In: *VITh International Terroir Congress*, Bordeaux, pp. 232-236.
- Doorenbos J. and Kassam A.H., 1979. Yield response to water. In: *Irrigation and Drainage Paper No. 33*. FAO, Rome, 193 p.
- FAO, IUSS, ISRIC, 2006. *World Soil Resources Reports No. 103*. World reference base for soil resources, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 133 p.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R. and Hubick K.T., 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 503-537.
- Foodlab, 2013. *Determinazione dell'APA nel Mosto*. <http://www.foodlab.it/analisi-alimentari/apa-vino.html> [online, last accessed 12.02.2013].
- Fregoni M., 2006. Il Sangiovese, vitigno autoctono e internazionale: evoluzione e strategie di sviluppo. In: *Proc. 2nd International Symposium "Sangiovese: Typical and International Vine. Identity and Peculiarity"*. ARSIA, Firenze (Italy), pp. 21-30.
- Gardner W.H., 1986. Water content. In: *Methods of Soil Analysis Part 1: Physical and Mineralogical Methods*, 2nd edition. Klute A. (Ed.), Agron. Monogr., 9, ASA and SSSA, Madison, WI, USA, pp. 493-544.
- Glories Y., 2001. Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation de la vinification. *Progr. Agric. Vitic.*, **118**, 347-350.
- Guix-Hebrard N., Voltz M., Trambouze W., Garnier F., Gaudillere J.P. and Lagacherie P., 2007. Influence of watertable depths on the variation of grapevine water status at the landscape scale. *Eur. J. Agron.*, **27**, 187-196.
- Hargreaves G.H. and Samani Z.A., 1982. Estimating potential evapotranspiration. *J. Irrig. Drain Eng.*, **108**, 225-230.
- Huglin P., 1986. *Biologie et Écologie de la Vigne*. Payot Lausanne, Paris.
- Kassel D.K. and Nielsen D.R., 1986. Field capacity and available water capacity. In: *Methods of Soil Analysis Part 1: Physical and Mineralogical Methods*, 2nd edition. Klute A. (Ed.), Agron. Monogr., 9, ASA and SSSA, Madison, WI, USA, pp. 901-926.
- Martini E., Comina C., Priori S. and Costantini E.A.C., 2013. A combined geophysical-pedological approach for precision viticulture in the Chianti hills. *Boll. Geo. Teor. Appl.*, **54**, 165-181.
- MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali), 2000. *Metodi di Analisi Chimica del Suolo*. Violante P. (Ed.), Franco Angeli, Milan.
- Murisier F., Zufferey V. and Spring J.L., 2012. Pratiques viticoles: passé, présent et futur. *Rev. Œnol. Tech. Vitivini. Œnol.*, **145**, 41-43.
- O.I.V., 2000. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. OIV, Paris.
- Ojeda H. and Salmon J.M., 2011. Stress hydriques et teneurs azotées des raisins et moûts. *Rev. Œnol. Tech. Vitivini. Œnol.*, **141S**, 51-52.
- Palliotti A., Silvestroni O., Petoumenou D., Vignaroli S. and Berrios J.G., 2008. Evaluation of low-energy demand adaptive mechanisms in Sangiovese grapevine during drought. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **42**, 41-47.
- Palliotti A., Poni S., Silvestroni O., Tombesi S. and Bernizzoni F., 2011. Morpho-structural and physiological performance of Sangiovese and Montepulciano cvv. (*Vitis vinifera*) under non-limiting water supply conditions. *Funct. Plant Biol.*, **38**, 888-898.
- Peyrot des Gachons C., van Leeuwen C., Tominaga T., Soyer J.P., Gaudillère J.P. and Dubourdieu D., 2005. Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc in field conditions. *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 73-85.

- Reynard J.S., Zufferey V., Nicol G.C. and Murisier F., 2011. Vine water status as a parameter of the « terroir » effect under the non-irrigated conditions of the Vaud viticultural area (Switzerland). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **45**, 139-147.
- Robertson G.P. and Paul E.A., 2000. Decomposition and soil organic matter dynamics. In: *Methods in Ecosystem Science*. Sala O.E., Jackson R.B., Mooney H.A. and Howarth R.W. (Eds.), Springer, New York, pp. 104-116.
- Rossmann A., Schmidt H.-L., Reniero F., Versini G., Moussa I. and Merle M.H., 1996. Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **203**, 293-301.
- Scalabrelli G., D'Onofrio C., Macchia A., Rosellini D., Bertuccioli M. and Boselli M., 2006. Comportamento agronomico del vitigno Sangiovese in 11 zone del Chianti Classico. In: *Proc. Int. Symposium "Sangiovese"*. ARSIA, Firenze (Italy), pp. 530-539.
- Storchi P., Costantini E.A.C. and Bucelli P., 2005. The influence of climate and soil on viticultural and enological parameters of 'Sangiovese' grapevines under non-irrigated conditions. *Acta Hort.*, **689**, 333-340.
- Trégoat O., van Leeuwen C., Choné X. and Gaudillère J.P., 2002. The assessment of vine water and nitrogen uptake by means of physiological indicators influence on vine development and berry potential (*Vitis vinifera* L. cv Merlot, 2000, Bordeaux). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **36**, 133-142.
- van Leeuwen C., Gaudillère J.P. and Trégoat O., 2001. Evaluation du régime hydrique de la vigne à partir du rapport isotopique $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **35**, 195-205.
- van Leeuwen C., Trégoat O., Choné X., Jaeck M.E., Rabusseau S. and Gaudillère J.P., 2003. Le suivi du régime hydrique de la vigne et son incidence sur la maturation du raisin. *Bull. O.I.V.*, **867-868**, 367-379.
- van Leeuwen C. and Seguin G., 2006. The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res.*, **17**, 1-10.
- van Leeuwen C., Trégoat O., Choné X., Bois B., Pernet D. and Gaudillère J.P., 2009. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **43**, 121-134.
- Walkley A. and Black I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.*, **37**, 29-38.
- White R.E., 2003. *Soils for Fine Wines*. Oxford University Press, New York.
- White R., Balachandra L., Edis R. and Chen D., 2007. The soil component of terroir. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **41**, 9-18.
- Winkler A.J., 1962. *General Viticulture*. University of California Press, Berkeley.
- Zsófi Z., Gál L., Szilágyi Z., Szűcs E., Marschall M., Nagy Z. and Bálo B., 2009. Use of stomatal conductance and pre-dawn water potential to classify terroir for the grape variety Kékfrankos. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **15**, 36-47.
- Zufferey V. and Murisier F., 2007. Assessment of plant hydraulics in grapevine on various « terroirs » in the Canton of Vaud (Switzerland). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **41**, 95-102.

The sensory evaluation of 2,4,6-trichloroanisole in wines

Maria Carla Cravero,* Federica Bonello, Maria del Carmen Pazo Alvarez, Christos Tsolakis and Daniela Borsa

This work proposes a sensory method to verify the 'cork taint' defect in food and beverages. This off-flavour has considerable economic impact in wine but occasionally can occur in other food and beverages. In wine, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is generally considered to be the main compound responsible for this taint. It is an easily recognized compound because of its low sensorial threshold, and it is described as a mouldy and damp cardboard odour. This sensory method, developed in wine, consists of specific panel training to recognize TCA in a series of olfactory tests. The effectiveness of the panel was tested with contaminated wines in which the TCA content had been previously determined by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) analysis. This sensory method is useful to train a panel able to recognize the 'cork taint' defect in different situations (legal appraisals or quality assurance systems). The use of a reliable sensory assay can reduce the number of chemical analyses and the proposed method can be applied to other beverages such as beer. Copyright © 2015 The Institute of Brewing & Distilling

Keywords: TCA; sensory analysis; wine; mouldy taint; cork taint

Introduction

The 'mouldy taint' of wine, which is commonly known as 'cork taint', is frequently due to the presence of chloroanisoles and bromoanisoles and is one of the main reasons for the rejection of a wine by consumers. This has considerable economic impact. As reported in a recent review (1), during the International Wine Challenge of London over a 3 year (2006–2008) period, it was observed that 7% of the wines exhibited 'off-characters' and 30% of these defects were due to cork taint, a figure very similar to that due to reduction-related faults.

Numerous compounds can be responsible but the most important one is 2,4,6-trichloroanisole (TCA), which can contaminate the cork and winery materials (2). It is recognized as the major cause of cork taint in the wine industry (1,3). TCA is a product of the fungal (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Actinomyces* and *Streptomyces*) methylation of a chloro-organic compound (tri-chlorophenol). A similar reaction on tetra- or penta-chlorophenols leads to tetra- or penta-chlorophenols. More studies are still required to clarify some aspects: the origin of the chlorophenolic precursors of anisoles; the microbiological agents; the time of formation of the metabolites; and the factors affecting their retention in the corkwood (1).

TCA odour is defined as mouldy, damp cardboard (4,5) and it is very easily recognized because of its low sensory threshold, which is from 0.03 to 1–2 ng/L in water and 4 ng/L in a white wine for trained assessors (6,7). Other compounds have been found in corked wine and their corks (8): 2,3,4,6-tetrachloroanisole with a perception threshold of 4 ng/L in water and 20 ng/L in wine with a mouldy odour; 1-octen-3-ol with a perception threshold of 20000 ng/L in white wine with a mushroom, metallic odour; 1-octen-3-one with a perception threshold of 20 ng/L in white wine with a mushroom, metallic odour; guaiacol with a perception threshold of 20000 ng/L in wine and smoky, phenol, medicinal odours; geosmin, which originates from contaminated grapes,

with a perception threshold of 1–10 ng/L in water and 25 ng/L in white wine and earthy, mouldy and dirty odours; and 2-methylisoborneol with a perception threshold of 30 ng/L in wine and earthy and mushroom odours.

It is now accepted that cork is not the only source of chloroanisole contamination (2). Other molecules originating from the contaminated atmosphere of the winery have been identified in tainted wines. These compounds include 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, 2,3,4,5,6-pentachlorophenol and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole, which has an unpleasant odour (perception threshold 4000 ng/L). Michel (9) also identified 2,4,6-tribromoisole, a compound with a very low perception threshold (0.5 ng/L in white wines) and an unpleasant mouldy and mushroom odour, as a contaminant of cork stoppers, bottles and cellars. The compound 2,4,6-tribromoisole is a derivative of 2,4,6-tribromophenol (a fireproofing agent used for various materials); it is highly volatile and therefore easily dispersed into the atmosphere. Simpson *et al.* (10) identified 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine as one of the compounds responsible for a mouldy aroma in bottled wine, having a sensory threshold of 2.1 ng/L, similar to that of TCA. Weingart *et al.* (11) showed that geosmin (*trans*-1,10-dimethyl-*trans*-9-decalol) was more prevalent than TCA in a sample of 118 Austrian white and red wines.

The sensory detection of TCA causes difficulties associated with panellist fatigue, differing levels of sensitivity and professional experience, and substrate influence. In a study using trained assessors and wines spiked with TCA, it was reported that the ma-

* Correspondence to: M. C. Cravero, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria CRA-ENO, Centro di Ricerca per l'Enologia, Via Pietro Micca 35, 14100 Asti, Italy. E-mail: mariacarla.cravero@entecra.it

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria CRA-ENO, Centro di Ricerca per l'Enologia, Via Pietro Micca 35, 14100 Asti, Italy

trix had a considerable influence on the perception of TCA (12). In white wines, the TCA perception threshold ranged from 5 to 7 ng/L, depending on the different wine olfactory characteristics, while in red wines it was 10 ng/L, with the exception of a Barbera wine, in which it was 15 ng/L. Identification proved particularly difficult in wood-aged wines and furthermore it was observed that a higher alcohol content may reduce the volatility of TCA. It is even more difficult to determine what the consumer threshold should be and, according to Prescott *et al.* (13), it is likely to be 3.1 ng/L in a white wine. It was noted in the same study that a certain percentage of consumers have a very high threshold for TCA or do not consider it unpleasant.

It should be remembered that the 'odour detection threshold' is the lowest concentration at which a particular odorant is perceivable by the human sense of smell, but its identification is not required at that level. This should not be confused with the 'odour identification (or recognition) threshold', which is the concentration at which an odorant is not only detected, but is also recognized by the human sense of smell (ISO 5492).

Macku *et al.* (14) described a sensory screening for large-format natural corks, and they found it to be a quick and nondestructive screening tool. TCA is one of the most important contaminants found in other foods and beverages such as beer, milk, water, dried fruits, cocoa powder and seafood (15). In beer production, TCA causes a musty taint typical of damp cellar and mould and it can originate from different areas such as the source water or raw materials or, alternatively, it can be produced within the brewery or can migrate from materials used in aging or packaging (16).

Generally in a legal appraisal between wine and cork producers, it is necessary to evaluate a large number of samples, depending on the total number of potentially contaminated bottles. A simple and easily applicable sensory method is therefore proposed to verify the TCA contamination in wine, which could be applied in legal appraisals or in wine quality assurance systems. It entails only olfactory testing, since legal appraisals normally involve only olfactory examinations of the potentially contaminated wines. This procedure was first developed using wine because of its economic impact, but it can be also easily adapted for other beverages such as beer or water.

Materials and methods

Sensory analysis

All of the sensory tests were carried out in a test room specifically designed for sensory analysis (ISO 8589) containing individual tasting booths, in which the temperature and humidity could be controlled. All of the test glasses (ISO 5494) contained 30 mL of liquid, dispensed using a measuring cylinder, and maintained at a temperature of 20°C.

Chemicals

Chemicals used were as follows: commercial mineral water with a minimal mineral content (dry residue <25 and hardness in French degrees <1); commercial, nonaromatic, dry white table wine (cv *Ugni Blanc*), produced and stored without using wood, with an alcohol content of 11% (v/v); commercial, nonaromatic, dry red table wine (cv *Sangiovese*), produced and stored without using wood, with an alcohol content of 12% (v/v); 2,4,6-TCA of purity 99.9% (Riedel-de Haën, Germany); and absolute ethanol, purity 99.8% (Carlo Erba, Italy).

Stock solution A consisted of 10 mg/L TCA. A 1 mg aliquot of the TCA standard was weighed into a stoppered flask (to avoid dissipation of TCA, which is extremely volatile in the environment) and this was transferred into a 100 mL volumetric flask with absolute ethanol. Intermediate solutions were prepared as follows:

- Intermediate Solution B – 0.10 mg/L. A 1 mL aliquot of stock solution A was transferred into a 100 mL volumetric flask in a 50% solution of absolute ethanol and water.
- Intermediate Solution C – 0.001 mg/L. A 1 mL aliquot of intermediate solution B was transferred into 100 mL of water or dry white wine or dry red wine, depending on the type of test that was to be prepared.
- Intermediate Solution D – 100 ng/L. A 20 mL aliquot of intermediate solution C was transferred into 200 mL of water or dry white wine or dry red wine, depending on the type of test that was to be prepared.
- Intermediate Solution D was used to prepare the following solutions: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0 and 16.0 ng/L in water or dry white wine or dry red wine, depending on the type of test that was to be prepared.
- Intermediate Solution E – 10 ng/L. A 10 mL aliquot of intermediate solution D in 100 mL of water or dry white wine or dry red wine, depending on the type of test that was to be prepared.
- The 0.25 and 0.5 ng/L solutions in water, dry white wine or dry red wine, depending on the type of test that was to be conducted, were prepared from intermediate solution E.

All the solutions were prepared 24 h before tasting to stabilize them and stored at 4°C for no more than 5 days. The intermediate solutions were only used once for preparing the final solutions.

Panel selection and training

A group of 17 subjects (seven male and 10 female, between 28 and 46 years of age), all staff at the CRA-ENO, were familiarized with the TCA odour before being selected for the panel and trained.

First step – panel selection. After describing the odour of TCA as damp, mouldy cardboard, a series of TCA identification tests were carried out using various TCA solutions of the following concentrations 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0 and 16.0 ng/L in water (series I), in a white wine (series II) and in a red wine (Series III).

The TCA concentrations were presented in ascending order and each subject was asked to evaluate 10 solutions. The control (water or wine) was in the initial position, followed by nine glasses containing water or wine with the same or a higher TCA concentration (from 0 to 16 ng/L). Each series of tests was repeated in triplicate on three different days.

The sensory sheet presented to the panel contained the following information:

Test for identifying the detection and the identification threshold for an odour.

Answer YES if the sample is perceived to be identical to the control, NO if it is different.

State the perceived odour for each glass when possible.

Afterwards, only the results of the identification threshold were considered.

Second step – selected panel training. Three series of duo–trio tests were carried out to verify the TCA selected panel identification threshold. Moreover, the assessors were requested to indicate

if he/she perceived a specific odour in one of the samples. The duo-trio test is a method of difference testing in which the reference is assessed first, followed by two samples, one of which is the same as the reference. The assessors must identify the sample that is different from the reference. This method is statistically less efficient than the triangle test but it was chosen because it was easier to perform by the assessors (ISO 10399:2004).

The following solutions with TCA were submitted to the assessors for comparison with the control:

- Series I water – 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 ng/L.
- Series II white wine – 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 ng/L.
- Series III red wine – 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0 ng/L.

Duplicates of each repetition set were performed on the same day, using a different evaluating order each time, and leaving at least 1 h between the two sessions. The duo-trio test results were processed according to the number of assessors, using statistical tables (17), with $p < 0.05$.

The performance of the panel was then tested by asking the assessors to evaluate some batches of potentially TCA-contaminated wines, whose TCA content had also been determined by chemical analyses. The first case concerned a study about the impact of two types of closures – a two-disc cork and a synthetic stopper – on the organoleptic characteristics of a white wine (Cortese) and a red wine (Barbera) during aging. The TCA content was only determined in all of the wine samples and not in the stoppers, following the experimental plan. In particular, 20 bottles of each wine bottled with a two-disc cork were compared using the duo-trio test with 20 bottles of the same product bottled with a synthetic stopper. The duo-trio tests were realized with four repetitions after 3, 6, 9, 12 and 18 months of bottling. All the bottles were stored under temperature-controlled conditions at 20°C.

The second case concerned a legal appraisal and required the sensory evaluation of a batch of a commercial Barolo wine (vintage 2001) stoppered with cork, potentially contaminated by TCA. The test was carried out with the following procedure and the questionnaire shown in Fig. 1 coming from a previous study (18). It required the assessors to identify any possible extraneous odours such as mouldy, damp cardboard, mushroom, metallic, earthy, mud, medicinal or off-odour descriptors related to the cork taint, in the samples provided.

date:	name of the assessor:				
The assessor should indicate which odour he/she can identify in the wines					
SAMPLE n°:	312	457	674	129	281
List of odours					
mushroom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
metallic	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
earthy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
mouldy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
mud	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
damp cardboard	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
medicinal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
others:					
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
none of these odours	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figure 1. Example of the test assessment questionnaire used to identify some possible off-odours in the wines.

Procedure for wines potentially contaminated with TCA

The 85 Barolo wine samples were identified using a three-number code. A maximum of 8 to 10 samples were evaluated per day or per session; a minimum break of 30 min was scheduled between two successive sessions if, for practical reasons, it was necessary to carry out several sensory sessions on the same day. An interval of 2–5 min was allowed between one sample and the next. A random distribution of the samples was used. Forty-five bottles were compared with a control wine that had been clearly identified as coming from the same lot and not contaminated by TCA. A number of control samples were also placed amongst the others, but masked. In this case, the TCA chemical analysis was carried out only in the samples where TCA contamination was perceived by the panel. Forty bottles from the same batch were given a sensory evaluation without a control wine and the TCA content was determined by chemical analysis in all of these samples.

Chemical analysis of anisoles

The sensory results were assayed simultaneously by chemical analysis using a method derived by Chatonnet *et al.*, by Solid Phase Microextraction- Gas Chromatography Mass Spectrometry/ Electron Impact- Single Ion monitoring (HSSPME GC/MS/EI-SIM) (19). The method in use was validated by the cited authors (17) by an intra-laboratory validation study and employed for this work as described below with a detection limit of 0.50 ng/L.

Chemical standards

The following chemical standards were used: 2,4,6-trichloroanisole deuterium (2,4,6-TCA d⁵), purity 98.0% as the internal standard for chemical determinations (Promochem, Cambridge Isotope Laboratories Inc.); TCA, 99.6% (Riedel-de Haën, Germany); 2,4,6-tribromoanisole (TBA), 99% (Sigma-Aldrich, USA); 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA), 95%; 2,2,4,5,6 pentachloroanisole (PCA), 99.3% (Ultra Scientific, North Kingstown RI, USA); and absolute ethanol, acetone 99.8%, hexane 97% and sodium chloride 99.5% (Sigma-Aldrich). PDMS fibre, 100 µm film thickness, from Supelco was used with the SPME holder.

Preparation of stock solutions of anisole compounds

Stock solutions at a concentration of 100 µg/mL were obtained from 10 mg of each chemical standard accurately weighed and dissolved in 100 mL of hexane–acetone (90:10 v/v) using a 100 mL graduated flask. Six mixed anisole solutions were obtained by sequential dilution of the previously listed standards (except the internal standard) in absolute ethanol in a concentration range of 10–0.1 µg/mL.

Preparation of stock solutions of internal standard

Five 2,4,6-trichloroanisole deuterium solutions were obtained by sequential dilution of the internal standard stock solution in absolute ethanol in a concentration range of 10–1 µg/mL.

Calibration solutions

The calibration solutions consisted of a wine-simulant solution (12% ethanol in water acidified to pH 3.2) spiked with anisole solutions at 0.1 and 1 ng/mL to obtain eight different concentrations of

anisoles (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0 and 20.0 ng/L) and 2,4,6-TCA d⁵ as internal standard at 6.6 ng/L.

Sample preparation

A 10 mL aliquot of each standard solution was placed into a 20 mL headspace flask with sodium chloride (3 g) addition. The flask was crimped using an aluminium capsule over a perfect airtight, disposable elastomer septum. A PDMS fibre (100 µm film thickness) was prepared according to the manufacturer's recommendations and used with a manual SPME holder. The fibre was exposed in the headspace of the liquid sample for 15 min at an incubation temperature of 35°C with stirring. The organic compounds absorbed onto the fibre were thermally desorbed into the injector (equipped with a SPME liner) at 260°C using a splitless injection of 2 min. The wines samples were prepared as described above but with the addition of 60 µL of 2,4,6-TCA d⁵ (1 ng/L) as the internal standard.

GS-MS conditions

The analysis was carried out using a GC Agilent 6890 coupled with an 5973 N Quadrupole Mass Spectrometer with a 70 eV electron impact with the following parameters: column, DB5, J&W, 30 m × 0.25 mm; phase thickness, 0.25 µm; transfer line, 280°C; ionization source, 230°C; quadrupole mass analyser, temperature 150°C.

The temperature programme was as follows: 50°C for 2 min; from 50 to 130°C at 25°C/min; increased from 130 to 200°C at 5°C/min; maintained at 200°C for 5 min; increased from 200 to 280°C at 25°C/min with a final isotherm of 5 min.

The internal standard was TCA-d⁵ = 215 *m/z* (quantifying ion) with a dwell time of 50 ms and the selected ions of each molecule were as follows: 2,4,6-TCA = 195, 212 (quantifying ion) *m/z*; 2,4,6-TBA: 327 and 344 (quantifying ion) *m/z*; 2,3,4,6-TetraCA = 231, 246 (quantifying ion) *m/z*; PCA: 265 and 280 (quantifying ion) *m/z*.

The system was calibrated using a range of known concentrations, analysed under the same conditions. The standard solutions were prepared as previously described. Determinations were carried out in duplicate.

Results and discussion

Panel selection and training

After the first step (panel selection) only 12 assessors were chosen (seven women and five men). The others were excluded as they did not recognize the TCA odour. The TCA identification thresholds in water, white and red wine of the selected 12 assessors are shown in Fig. 2. The assessors were selected according to their ability to clearly identify TCA. The mean identification thresholds of the panel were 4.6 ng/L in water, 6.7 ng/L in dry white wine and 7.1 ng/L in dry red wine.

The results of the second step (panel training; Table 1) showed that the test in water was statistically significant at 2 ng/L TCA content, but it was only at 3 ng/L TCA that at least 50% of the assessors (six people) recognized the defect as attributable to TCA, while 100% of the group recognized it at 5 ng/L. For the white wine, the test was statistically significant at 3 ng/L, but it was only at 4 ng/L that at least 50% of the assessors identified the off-odour.

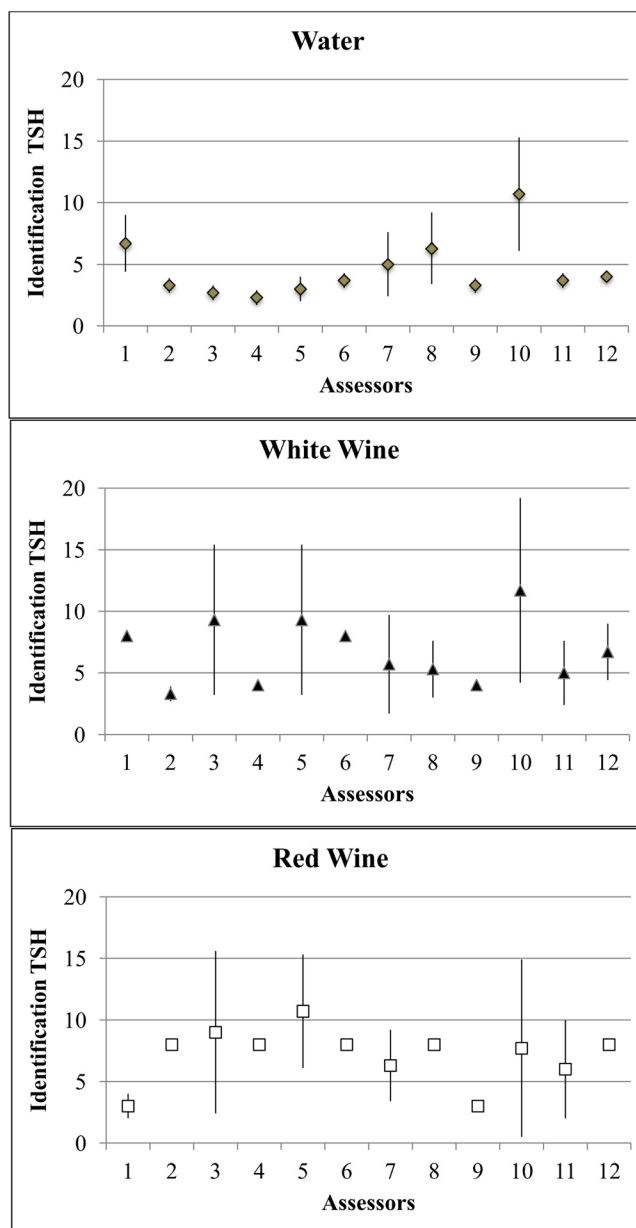


Figure 2. Panel selection (first step): 2,4,6-trichloroanisole (TCA) identification threshold (TSH) mean ± standard deviation (ng/L) for the 12 selected assessors in water, white wine and red wine.

In the case of red wine, there was a difference between the two repetitions: the first test was statistically significant at a minimum TCA content of 7 ng/L and the olfactory identification threshold was 6 ng/L; for the second test, it was statistically significant at 5 ng/L, but not at 6 or 7 ng/L and it became significant again at 8 ng/L. The identification threshold chosen was 7 ng/L, despite the fact that at least 50% of the assessors recognized the contaminant at 6 ng/L in both repetitions.

The TCA identification threshold was identified as the quantity at which the duo-trio was significant and at least the 50% of the selected assessors clearly described the off-odour. A lowering of the TCA identification threshold of the selected panel (Table 2) from the first step to the second step was observed, especially with water and white wine. In particular, it decreased from 4.6 to 3.2 ng/L in water and from 6.7 to 4.3 ng/L in the white wine. In the red

Table 1. Panel 2,4,6-trichloroanisole (TCA) olfactory identification threshold check: statistical significance of the duo-trio tests in water, white and red wine (in duplicate); number of assessors who correctly identified TCA

	TCA content						
	2 ng/L	3 ng/L	4 ng/L	5 ng/L	6 ng/L	7 ng/mL	8 ng/nL
<i>Water repetition I</i>							
Statistical significance of the duo-trio test	11/12*	12/12*	12/12*	12/12*	12/12*		
Number of correct TCA identifications	4/12	8/12	11/12	12/12	12/12		
<i>Water repetition II</i>							
Statistical significance of the duo-trio test	11/12*	12/12*	12/12*	12/12*	12/12*		
Number of correct TCA identifications	5/12	9/12	10/12	12/12	12/12		
<i>White wine repetition I</i>							
Statistical significance of the duo-trio test		10/12*	11/12*	12/12*	12/12*	12/12*	
Number of correct TCA identifications		3/12	7/12	10/12	12/12	12/12	
<i>White wine repetition II</i>							
Statistical significance of the duo-trio test		12/12*	12/12*	12/12*	12/12*	12/12*	
Number of correct TCA identifications		3/12	7/12	10/12	11/12	12/12	
<i>Red wine repetition I</i>							
Statistical significance of the duo-trio test			4/12	8/12	7/12	10/12*	10/12*
Number of correct TCA identifications			1/12	3/12	7/12	9/12	12/12
<i>Red wine repetition II</i>							
Statistical significance of the duo-trio test			8/12	10/12*	8/12	6/12	11/12*
Number of correct TCA identifications			2/12	4/12	7/12	9/12	12/12

* Test statistically significant ($p < 0.05\%$).

Table 2. Mean TCA identification threshold (ng/L) in water, white and red wine after selection and training

	First step – Mean TCA identification threshold (ng/L)	Standard deviation	Second step – Mean TCA identification threshold (ng/L)	Standard deviation
Water Wine	4.6	1.4	3.2	0.04
White Wine	6.7	2.6	4.3	0.08
Red Wine	7.1	2.2	7.6	0.59

wine the variability amongst the assessors decreased, but the panel identification threshold remained similar (7.1 and 7.6 ng/L) and the standard deviation decreased from 2.2 to 0.59.

Sensory evaluations of contaminated wines

To test the effectiveness of the training carried out, the selected panel was asked to examine some batches of contaminated wines. The sensory results were compared with those of the chemical analyses. In all the samples analysed the anisoles listed in the method description were estimated, but TCA was only present in some of the wines (Table 3).

The contaminant TCA was found in seven samples of the white wine Cortese by GC-MS analysis at concentrations ranging from 1.0 to 16.9 ng/L (Table 3). The TCA content was not related to the period of aging. The sensory results showed that the duo-trio test was

Table 3. TCA content in the Cortese and the Barbera wines analysed during aging and corresponding sensory results: number of assessors who identified TCA in the contaminated samples and statistical significance of the duo-trio tests

TCA content (ng/L) ± standard deviation	Aging	TCA olfactory identification	Statistical significance of the duo-trio tests
<i>Cortese</i>			
1.0 ± 0.22	18 months	—	n.s.
1.2 ± 0.25	9 months	—	n.s.
1.4 ± 0.30	12 months	—	10/12*
2.1 ± 0.31	18 months	3/12	10/12*
3.1 ± 0.31	18 months	7/12	11/12*
3.6 ± 0.32	3 months	8/12	11/12*
16.9 ± 2.02	3 months	12/12	12/12*
<i>Barbera</i>			
1.0 ± 0.24	12 months	—	n.s.
1.0 ± 0.25	18 months	—	n.s.
1.4 ± 0.22	18 months	—	n.s.
2.8 ± 0.32	18 months	—	n.s.
3.3 ± 0.34	12 months	2/12	10/12*
3.3 ± 0.32	18 months	2/12	10/12*
3.6 ± 0.35	12 months	4/12	10/12*
5.2 ± 1.42	9 months	5/12	10/12*
8.4 ± 2.00	18 months	12/12	12/12*
14.5 ± 2.22	6 months	12/12	12/12*

* Test statistically significant ($p < 0.05\%$). n.s., Not significant.

statistically significant at 1.4 ng/L of TCA, but identification only occurred from 3.1 ng/L, which was lower than the panel TCA identification threshold in a white wine after the panel training (4.3 ng/L, Table 2). This result could be due to this type of wine having a lower odour intensity than the commercial wine used during the training.

The results for Barbera red wine (Table 3) showed that 10 samples bottled with cork were contaminated with TCA and the duo-trio test was statistically significant starting from 3.3 ng/L TCA. The panel clearly identified the defect only in the samples containing 8.4 and 14.5 ng/L, similar to the results obtained for the red wine during the training.

The fact that the duo-trio test in both wines was already statistically significant at very low concentrations of TCA indicates that the panel distinguished the TCA contaminated wine from the control bottled using a synthetic cork (and which was not contaminated by TCA). Generally, the synthetic closure causes a different wine evolution compared with the cork closure, preserving the product characteristics in a different manner. Other similar experiences, in which the same wine was bottled using different types of closures, in particular, natural and synthetic corks, have pointed out a different wine evolution associated with the type of closure used, which was evident at a sensory level (20). With regard to the panel's performance, the results obtained in this experiment confirmed the success of the panel training procedure.

In the second case, relating to a wood-aged Barolo wine (vintage 2001), at least 70% of the assessors identified nine contaminated bottles, in which the TCA content ranged from 9 to 29 ng/L (Table 4). Three other bottles were identified as contaminated by the 30% of the assessors, but the chemical analysis showed the absence of the TCA in two of these bottles, while only one of the three contained TCA at a level of 2.3 ng/L.

Table 4. TCA sensory identification in 12 Barolo samples compared with a control and in eight Barolo samples without control and the related TCA content

Number of sensory identifications of mouldy taint	TCA content (ng/L) ± standard deviation
<i>With a control</i>	
4/12	0
4/12	0
4/12	2.3 ± 0.32
9/12	8.7 ± 1.5
8/12	10.0 ± 1.8
12/12	10.8 ± 1.82
11/12	14.8 ± 1.9
10/12	15.7 ± 1.92
12/12	20.0 ± 1.90
11/12	24.1 ± 1.98
11/12	26.4 ± 2.01
12/12	28.8 ± 2.05
<i>Without a control</i>	
3/12	0
4/12	0
4/12	0
4/12	0
5/12	3.2 ± 0.42
12/12	16.2 ± 1.70
11/12	16.3 ± 1.75
11/12	27.0 ± 1.95

The other 40 bottles from the same batch were evaluated without a control wine and at least 75% of the assessors identified three contaminated bottles, in which the TCA content was about 16 or 27 ng/L (Table 4). One bottle containing 3 ng/L of TCA was identified as contaminated by five of the 12 assessors (41%); three bottles were assessed to be contaminated by four assessors (33%); and one bottle by three assessors (25%), but there was no TCA in any of these.

As it has been observed by other authors (12), it was more difficult for the panel to detect TCA in wood-aged red wines, especially without a control wine. The panel identified the TCA potentially contaminated samples using some of the descriptors listed in Fig. 1.

Conclusions

The compound TCA is generally recognized as the main compound responsible for the 'mouldy taint' in wine and is the most easily recognized one because of its low sensorial threshold. A methodology to perform a sensory method to identify TCA in wines has been described that consists of specific panel selection and training. The panel TCA identification threshold was identified as the quantity at which the duo-trio was significant and at least 50% of the selected assessors clearly described the off-odour. The results obtained in some of the experiments generally confirmed the goodness of the panel training, as they were able to identify the TCA content at a very low concentration.

According to the literature, the wine character can influence panel performance. Identification of this off-odour in red wines aged in wooden barrels, especially without a control sample, was more difficult. Nevertheless, if at least 50% of the assessors of the trained panel were able to identify the TCA in the sample, the sensory response can be considered valid.

The use of a reliable sensory assay for contaminants in a batch of wine could reduce the number of the chemical analyses needed if the potentially contaminated samples can be compared with a control. Moreover, this sensory method could be easily applied in beer, water or other beverages, by adapting it to the different matrix or to different compounds correlated to cork taint (e.g. geosmin or 2,4,6-tribromoisole) or to other off-flavours.

Acknowledgements

The authors wish to thank the panel assessors for their availability during the sensory sessions and for their contribution to the experiments conducted on the contaminated wines.

References

- Silva, M.A., Julien, M., Jourdes, M., and Teissedre, P.-L. (2011) Impact of closures on wine post-bottling development: A review. *Eur. Food Res. Technol.* 233, 905–914.
- Mirabel, M., De Beauregard, D., Riquier, L., and Bertrand, A. (2007) Traitements des vins moisis, bouchonnés: Le point sur la question. *Bull. OIV* 80(914–916), 201–209.
- Sifton, M.A., and Simpson, R.F. (2005) Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 226–240.
- Dubois, P., and Rigaud, J. (1981) A propos des goûts de bouchons. *Vigne Vins* 301, 48–49.
- Tanner, H., Zanier, C., and Buser, H.R. (1981) 2,4,6-Trichloroisole: A dominant component of cork flavour. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau* 117, 97–103.
- Griffith, N.M. (1974) Sensory properties of the chloroisoles. *Chem. Sens. Flav.* 1, 187–195.

7. Casey, J. (2003) Controversies about corks. *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.* 475(August), 68–74.
8. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubordieu, D. (2006) in Chemical nature, origins and consequences of the main organoleptic defects, *Handbook of Enology*, 2pp. 256–261, Wiley, Chichester.
9. Michel, G. (2003) Les goûts de bouchon, mise au point. *Rev. Fr. Oenol.* 202 (September/October), 20–22.
10. Simpson, R.F., Capone, D., and Sefton, M.A. (2004) Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5425–5430.
11. Weingart, G., Schwartz, H., Eder, R., and Sontag, G. (2010) Determination of geosmin and 2,4,6-trichloroanisole in white and red Austrian wines by headspace SPME-GC/MS and comparison with sensory analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 771–779.
12. Mazzoleni, V., and Maggi, L. (2007) Effect of wine style on the perception of 2,4,6-trichloroanisole, a compound related to cork taint in wine. *Food Res. Int.* 40, 694–699.
13. Prescott, J., Norris, L., Kunst, M., and Kim, S. (2005) Estimating a 'consumer rejection threshold' for cork taint in white wine. *Food Qual. Pref.* 16, 345–349.
14. Macku, C., Gonzalez, L., Schleussner, C., Mesquitass, A.C., Herwatt, J.W., Kircht, L.C., and Schwartz, R.J. (2009) Sensory screening for large-format natural corks by 'dry soak' testing and its correlation to headspace solid-phase microextraction (SPME) gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) releasable trichloroanisole (TCA) analysis. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7962–7968.
15. Wells, D. (2007) *Organohalogen Taints in Foods*, pp. 1–15, Australian Food & Grocery Council, Canberra.
16. McGarrity, M.J., McRoberts, C., and Fitzpatrick, M. (2003) Identification, cause, and prevention of musty off-flavors in beer. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 40, 44–47.
17. Roessler, E.B., Pangborn, R., Sidel, J.L., and Stone, H. (1978) Expanded statistical tables for estimating significance in paired preference, paired difference, duo–trio and triangle tests. *J. Food Sci.* 43, 940–941.
18. Bonello, F., Ubigli, M., and Cravero, M.C. (2003) 'Il gusto di tappo': Valutazione sensoriale dei difetti riferibili al sughero. *OICCE Times IV*(3), 29–33.
19. Chatonnet, P., Labadie, M. D., and Boutou, S. (2005) Study of chloroanisole assay and TCA assay validation in wine and cork stoppers soaked in diluted alcohol solution using SIDA-HSPME-GC-MS/EI/SIM. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 39, 137–147.
20. Cravero, M.C., Ponte, C., Bonello, F., Serpentino, M. L., and Ubigli, M. (2003) Tappo sintetico e di sughero a confronto. *L'Imbottigliamento XXVI*(8), 62–75.

EFFECT OF THE ADDITION OF FRUIT JUICES ON GRAPE MUST FOR NATURAL BEVERAGE PRODUCTION

L. CHIUSANO^{1,2*}, M. C. CRAVERO¹, D. BORSA¹, C. TSOLAKIS¹,
G. ZEPPA² and V. GERBI²

¹CREA Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria
Centro di Ricerca per l'Enologia, Via Pietro Micca 35, 14100 Asti, Italia

²Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari,
L.go P. Braccini 2, 10095 Grugliasco, Torino, Italy

*Corresponding author: Tel. + 39 0141 433814, Fax + 39 0141 436829,
e-mail: mariacarla.cravero@entecra.it

ABSTRACT

The consumer attention for products with healthy properties is increased in time, and fruit juices, for their ease of consumption, can satisfy this demand providing them bioactive compounds. The grape juice has numerous health benefits demonstrated by several studies such as, among other, the antioxidant activities and the positive functions of their phenolic compounds. This work is aimed at blending grape and others fruits in a new fruit juice made only with natural ingredients of local production. The grape juice (cv Barbera) has substituted water and its percentage was fixed (70%). It was mixed with apple (cv Golden delicious), pear (cv Williams) and peach (cv Red Haven) juices to obtain 25 different prototypes. In each of these at least two fruit juices were present and added in a percentage variable from 0 to 25%, with a step of 5%. The objectives of this study were to check the feasibility of the mixing process and the evaluation of the samples overall pleasantness.

Other sensory aspects of samples were also evaluated by consumers with a JAR (just-about-right) structured scale. The results didn't reveal particular technological problems regarding the blending process. The Brix mean value of the samples was about 15.3, with a significant reduction compared to that of the grape juice (about 19). The pH mean value of the samples (3.44) was significantly higher than that of the grape juice (3.36). The titrable acidity and the antioxidant capacity mean value of the samples was, namely, 6.22 g L⁻¹ and 535.18 mg L⁻¹. The penalty analysis of the liking test pointed out the importance of the persistence in mouth. The overall pleasantness was significantly ($p \leq 0.01$) positively correlated with the °Brix/acid ratio ($r=0.54$) and samples with the highest percentage of pear juice were generally preferred.

- Keywords: fruit, grape must, health, juice, sensory analysis -

INTRODUCTION

Fruit consumption has a positive impact on health (O'NEIL *et al.*, 2011) and, including also vegetables, five are their daily servings (FSA, 2010), though this advice is generally ignored (WOOTTON-BEARD and RYAN, 2011). In this regard, the "Dietary Guidelines for Americans" consider the 100% fruit juice as alternative to whole fruit (USDA, 2010). Indeed, fruit juices in general are deemed as one of the main sources of bioactive compounds for diet (RODRIGUEZ-ROQUE *et al.*, 2014). Even if the link between weight and sweetened beverages, including fruit juice 100%, must be taken into account, referring to these latter, there is no consistent association (O'NEIL *et al.*, 2011) and, actually, these have demonstrated to improve nutrient adequacy among children and adolescents of 2-18-year-olds (O'NEIL *et al.*, 2012). Also grape has proved to have numerous health benefits, such as antioxidant activity and the functions of flavonoid compounds (VISLOCKY and FERNANDEZ, 2010; WOOTTON-BEARD and RYAN, 2011). Grape-based products may prevent cardiovascular diseases, decrease oxidative stress and protect against atherosclerosis. Results from animal models suggest that especially purple grape juice more effectively improves blood lipids (VISLOCKY and FERNANDEZ, 2010). From an organoleptic and sensory perspective, grape juice is characterised by a high concentration of sugars and acids, a low pH and, generally, a very poor odour/aroma. Thus, grape juice has a high-energy value, which reduces the nutritional, while its high acidity and low odour/aroma intensity can reduce consumer preference. OJEDA *et al.* (2009) highlighted the too high sugar content of the pure grape juice and, for this reason, it is important to reach a right sugar/acids balance to develop appreciable grape juice. To reach this result it is necessary to use the optimal grape variety and/or mixing it with other fruit. The blending, indeed helps to improve flavour, taste, and nutritive value and it reduces the cost of production, improves storability and inhibits microbial growth (BHARDWAJ and PANDEY, 2011). As reported by BATES and MORRIS (2001), the reasons for producing blends are many and all attributable to adjust and improve acceptability. The aim of this work was to develop an innovative concept of fruit juice obtained by mixing grape with other fruit juices to reduce its sugar concentration, acidity and to improve its olfactory profile. The tested fruit juices (peach, pear and apple) were chosen based on their appreciation by consumers, low acidity and sugar content, high antioxidant activity and high odour/aroma intensity. The use of grape must would also help to reduce the wine surplus that, currently, amounts to, approximately, 30 million hec-

tolitres world wide (RAMOS *et al.*, 2012; AYLWARD, 2012).

MATERIALS AND METHODS

Juice production

The grape juice (cv Barbera) was provided by Terre dei Santi (Castelnuovo Don Bosco, Asti, Italy), while the other fruit juices were provided by Valter Valle Farm (San Damiano d'Asti, Asti, Italy). The apple, pear and peach juices were obtained from the Golden delicious, Williams and Red Haven cultivars, respectively. For juice production, fruits were directly pressed, and the juice was filtered and stored at +1°C until use. Because the aim of this study was to develop a new grape-based juice, the percentage of grape juice was fixed (70%) and the other fruit juices were added in percentages from 0 to 25%, with a step of 5% (Table 1).

Table 1 - Experimental plan of blending.

Sample code	Barbera juice (%)	Fruit juices (%)		
		Pear	Peach	Apple
S-1	70	0	5	25
S-2	70	0	10	20
S-3	70	0	15	15
S-4	70	0	20	10
S-5	70	0	25	5
S-6	70	5	0	25
S-7	70	5	5	20
S-8	70	5	10	15
S-9	70	5	15	10
S-10	70	5	20	5
S-11	70	5	25	0
S-12	70	10	0	20
S-13	70	10	5	15
S-14	70	10	10	10
S-15	70	10	15	5
S-16	70	10	20	0
S-17	70	15	0	15
S-18	70	15	5	10
S-19	70	15	10	5
S-20	70	15	15	0
S-21	70	20	0	10
S-22	70	20	5	5
S-23	70	20	10	0
S-24	70	25	0	5
S-25	70	25	5	0

This ratio was defined taking into account that, generally, in a fruit juice, the fruit/water ratio is approximately 35:65 (FÜGEL *et al.*, 2005) and in this study water was replaced by grape juice. Because for each beverage at least two fruit juices must be present, a total of 25 mixed juices were obtained. The prototypes were then bottled, pasteurised (105°C, 25 min) and stored at ambient temperature.

Three replicates for each of the 25 recipes are been prepared.

Reagents

Folin-Ciocalteu reagent, sodium hydroxide, glucose, fructose, phosphoric acid, methanol, sulphuric acid, caesium chloride, tartaric, malic and citric acids were purchased from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q gradient A10 instrument (Millipore Corporation, Billerica, USA).

Analyses

Density, extract, pH, sulphur dioxide, titrable acidity, total sugars, glucose, fructose, ashes and potassium of grape must were determined in accordance with the Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 of 17 September 1990, while tartaric, malic and citric acids were determined by HPLC (CANE, 1990). The polyphenolic composition of the grape must and fruit juices (total polyphenols, anthocyanin and flavonoid contents) was determined by spectrophotometry (DI STEFANO *et al.*, 1989). The glucose, fructose, total sugars, ashes, titrable acidity, pH, tartaric acid, malic acid, citric acid and potassium of the fruit juices and beverages were determined in accordance with Italian Standard Methods (DM 03/02/1989). The fruit juice antioxidant capacity, expressed as Vitamin-C Equivalent Amount or VEAC Index, was determined according to KIM *et al.* (2002). The colour was measured using a Konica Minolta spectrophotometer CM-5 (Minolta Corp, Osaka, Japan) in the CIELab colour system with a D65 illuminant. The parameters measured were L* (whiteness or brightness/darkness), a* (redness/greenness) and b* (yellowness/blueness). Each sample was evaluated in a 40-mL cuvette (1-cm thickness). All evaluations were performed in triplicate.

Liking test

As reported by MAMMASSE and SCHLICH (2014), literature recommend a range from 50 to 100 consumers in hedonic tests and generally no replication are needed. Taking into account this and the limited quantity of samples, the liking test was executed once by recruiting 50 consumers (22 males and 28 females, aged 26-65 years).

They have received an invitation and voluntarily have participated to the tests. All tests were conducted individually, and social interaction was not permitted. The test was performed inside an air-conditioned meeting room with white light. The temperature was approximately 21 °C, and the relative humidity was approximately 50%. Tests were performed from 11 a.m. over 5 days. For each session, five experimental

beverage samples (approximately 30 mL each) were presented in a completely randomised and balanced order. The samples were offered to the consumers in coded plastic cups. Natural bottled water was provided to each participant for palate cleansing. To decrease fatigue, there was a 5 minutes break between each sample. During each break, the consumers rinsed their mouths with water. All beverages were evaluated for specific parameters by consumers on a Just-about-right (JAR) structured scale, and then the consumers were asked to express the overall pleasantness of each product.

For JAR evaluation, consumers rated the samples on a 5-point JAR scale (1 = much too low, 2 = a little too low, 3 = just about right-JAR, 4 = a little too much, and 5 = much too much) for five sensory parameters: colour, odour, aroma, sweet taste and persistence in the mouth. For the overall pleasantness evaluation, a segment of known length (100 mm), limited to the extremes of two adjectives of opposite meaning (bipolar scale) was used. Consumers were asked to mark the line that corresponded to their degree of overall pleasantness. The data were collected on a paper card. According to PAGÈS *et al.* (2014), the 5 JAR variables were reduced to 3 for data evaluation: "not enough" (by grouping the "much too low" and "a little too low" responses), "JAR" and "too much" (by grouping the "much too much" and "a little too much" responses). This grouping of variables leads to simpler analyses, and it allows for obtaining more stable results because non-JAR categories are associated with higher frequencies (PAGÈS *et al.*, 2014).

Statistical analysis

Compositional data and overall pleasantness were examined by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test ($p \leq 0.05$) as a multiple range test with XLSTAT 2011 (Addinsoft SARL, California, USA) and then used for a Principal Component Analysis, also performed with XLSTAT 2011 (Addinsoft SARL, California, USA). The °Brix/acid ratio and the overall pleasantness were subjected to Pearson's test (r). The JAR data were subjected to a penalty analysis with XLSTAT-MX 2014.2.07 (Addinsoft SARL, California, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Compositional aspects

The compositions of grape and fruit juices used for beverage production are reported in Table 2, while the composition of the obtained beverages are reported in Tables 3 and 4.

As highlighted by MORALES-DE LA PENA *et al.* (2010), the overall quality of a fruit juice

Table 2 - Composition of grape and fruit juices used for beverages production. Data are expressed as mean \pm SD.

	Fruit juices			Grape juice	
	Pear	Peach	Apple		
Glucose (g L ⁻¹)	19.08 \pm 0.2	39.78 \pm 0.2	20.41 \pm 0.2	Glucose (g L ⁻¹)	86.94 \pm 0.2
Fructose (g L ⁻¹)	75.43 \pm 0.4	41.59 \pm 0.5	61.94 \pm 0.2	Fructose (g L ⁻¹)	94.82 \pm 0.09
Ashes (g Kg ⁻¹)	2.6 \pm 0.03	4.3 \pm 0.02	2.7 \pm 0.02	Ashes (g L ⁻¹)	3.4 \pm 0.1
Potassium (mg Kg ⁻¹)	1720 \pm 0.2	3542 \pm 6	1540 \pm 0.4	Potassium (mg Kg ⁻¹)	1223 \pm 5
°Brix	13.5 \pm 0.4	11.5 \pm 0.3	11 \pm 0.2	°Brix	19 \pm 0.3
Total Acidity (g L ⁻¹)	4.3 \pm 0.2	4.85 \pm 0.3	4.13 \pm 0.1	Total Acidity (g L ⁻¹)	6.26 \pm 0.04
pH	3.73 \pm 0.03	3.79 \pm 0.01	3.76 \pm 0.01	pH	3.36 \pm 0.05
Tartaric acid (g L ⁻¹)	0.281 \pm 0.01	0.233 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	Tartaric acid (g L ⁻¹)	2.73 \pm 0.02
Malic acid (g L ⁻¹)	0.312 \pm 0.03	0.892 \pm 0.02	1.028 \pm 0.01	Malic acid (g L ⁻¹)	2.35 \pm 0.03
Citric acid (g L ⁻¹)	0.588 \pm 0.03	0.788 \pm 0.04	nd	Citric acid (g L ⁻¹)	0.1 \pm 0.01
Polyphenols (mg Kg ⁻¹)	126.7 \pm 5	81.9 \pm 4	96.5 \pm 4	Polyphenols (mg L ⁻¹)	446 \pm 6
				Density (g L ⁻¹)	1.07715 \pm 0.0004
				Extract (g L ⁻¹)	206.6 \pm 0.4
				Free Sulphur Dioxide (mg L ⁻¹)	nd
				Total Sulphur Dioxide (mg L ⁻¹)	11.2 \pm 0.4
				Anthocyanins (mg L ⁻¹)	228 \pm 1.74

(nd – not determined).

is evaluated by a few parameters such as soluble solids, pH and acidity. The grape juice displayed a total soluble solids content of 19 °Brix with approximately 170 g L⁻¹ of sugars, while the peach, apple and pear juices exhibited 11.5, 11.0 and 13.5 °Brix, respectively. The mean value of °Brix for new beverages was approximately 15.3, with a significant reduction with respect to grape juice, approximately 19. The obtained value is similar to that of a fruit juice (GUNATHILAKE *et al.*, 2014) and ideal for the formulation of nutraceutical food beverages (SARAVANAN and ARADHYA, 2011a). The content of fructose in apple juice (approximately 62 g L⁻¹) was higher than that reported by WU *et al.* (2007) but lower than that reported by WILL *et al.* (2008) and MARKOWSKI *et al.* (2009). Additionally, the fructose content of pear juice (approximately 75 g L⁻¹) was higher than that reported by COLARIC *et al.* (2006). Acidity is one of the most important quality parameters for fruit juices (BHARDWAJ and PANDEY, 2011), as confirmed by AL BITTAR *et al.* (2013), who included this factor in the sensory analysis of an innovative grape juice enriched in polyphenols. Nevertheless, LIU *et al.* (2006) highlighted that: “high acidity has a negative influence on the palatability of table grapes, as well as the suitability for wines”. The value of the total acidity, expressed as tartaric acid, of the grape juice used in this study (6.26 g L⁻¹) is comparable to that reported for juices made with different grape cultivars (MARSELLÉS-FONTANET *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2006; SOYER *et al.*, 2003). The main organic acid in grape is tartaric acid, which has a pK₁ of 3.04, followed by malic acid, which has a pK₁ of 3.40 (LIU *et al.*, 2006). The

grape juice had a tartaric acid content of 2.73 g L⁻¹, similar to juice reported by LIU *et al.* (2006). The pH value also plays an important role in the preparation of beverages (BHARDWAJ and PANDEY, 2011). The blending process here studied is aimed to increase the pH value of grape must (3.36). Our obtained results indicated that the addition of fruit juice with pH values of 3.79 (peach), 3.76 (apple) and 3.73 (pear) increased the pH of grape juice so that it reached a mean value of 3.44 in the prepared beverages. In his research on the properties of fruit juices used for functional beverages, GUNATHILAKE *et al.* (2014) reported a pH of 3.60 for apple juice, while ANDRÉS *et al.* (2014) in their evaluation of the bioactive compounds in non-fermented beverages highlighted that the pH ranged between 3.20 and 4.01, in agreement with SAARELA *et al.* (2011). Typically, the pH values of fruit juices are below 4, or even 3, depending on the fruits used. The amount of organic acids in the fruit juices depended on the cultivar: apple displayed the highest amount of malic acid, with a content of 1.028 g L⁻¹, while pear juice had the highest citric acid content (0.588 g L⁻¹). AGUILAR-ROSAS *et al.* (2007) reported a malic acid content below 0.35 g L⁻¹ for the same cultivar, whereas BURON-MOLES *et al.* (2014) reported a malic acid content of 1.4 g L⁻¹. For beverages, the most abundant organic acid was malic acid, with a mean content of 2.84 g L⁻¹, while the mean tartaric acid amount in these samples was 2.39 g L⁻¹. For this compound, the concentration was similar among all of the beverages because the same quantity of grape must was used and because the quantity of tartaric acid is very low for fruit juice. The highest values were

Table 3 - Composition of samples obtained by mixing grape juice and fruit juices of pear, peach and apple and results of Anova with Tukey's test. Data are expressed as mean \pm SD. For samples code see Table 1. Values in each column having different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Sample code	Extract (g L ⁻¹)	°Brix	Glucose (g L ⁻¹)	Fructose (g L ⁻¹)	Acidity (g L ⁻¹)	pH	Organic acids (g L ⁻¹)			Ashes (g kg ⁻¹)	Potassium (mg kg ⁻¹)	°Brix/acid ratio
							tartaric	malic	citric			
S-1	167.85±0.21	15.75±0.35 b	66.19±0.01 def	80.3±0.71 cd	6.00±0.00 j	3.44±0.01 fgh	2.52±0.00 ab	3.45±0.00 ab	0.55±0.03 cdefg	2.6±0.01 bc	1243±1.68 bcdefg	26.25
S-2	177.90±0.00	17.00±0.00 a	71.40±1.41 abcd	85.10±1.56 bc	6.15±0.00 h	3.45±0.01 cdefg	2.51±0.00 ab	3.32±0.09 ab	0.73±0.02 defg	2.7±0.02 bc	1298±4.15 abcdef	27.64
S-3	181.80±0.00	17.00±0.00 a	75.53±0.62 ab	87.44±0.55 ab	6.49± 0.06 ef	3.43±0.01ghi	2.69±0.03 ab	3.54±0.05 a	0.94±0.04 abcde	2.8±0.01 bc	1385±9.72 abc	26.19
S-4	183.10±0.00	17.00±0.00 a	76.18±0.81 a	85.95±0.78 abc	6.75±0.00 c	3.45±0.00 defg	2.76±0.34 a	3.60±0.26 a	1.32±0.30 ab	3.1±0.01 abc	1424±2.64 ab	25.19
S-5	181.45±0.21	17.20±0.00 a	75.47±0.18 ab	83.01±0.09 bc	6.94±0.00 b	3.44±0.01 fgh	2.66±0.18 ab	3.47±0.20 ab	0.28±0.02 fg	3.2±0.01 ab	1464±2.51 a	24.78
S-6	176.25±0.21	16.80±0.00 a	68.45±0.64 cde	85.78±0.82 bc	7.20±0.00 a	3.43±0.00 ghi	2.47±0.01ab	3.22±0.02 abc	0.18±0.00 g	2.6±0.01 c	1161±5.66 cdefg	23.33
S-7	174.30±0.00	16.80±0.00 a	70.39±1.42 bcd	85.02±1.56 bc	6.45±0.00 f	3.45±0.01 defg	2.51±0.04 ab	3.21±0.06 abc	0.20±0.02 g	2.7±0.01 bc	1233±0.69 bcdefg	26.05
S-8	178.05±0.21	16.90±0.14 a	73.62±3.69 abc	87.18±2.48 ab	6.60±0.00 d	3.45±0.01 defg	2.37±0.18 ab	3.18±0.01 abcd	0.22±0.03 g	3.2±0.00 ab	1275±0.65 abcdef	25.61
S-9	180.50±0.00	16.8±0.00 a	73.33±1.82 abc	86.15±0.62 ab	6.51±0.03 e	3.43±0.01 ghi	2.64±0.05 ab	3.30±0.07 ab	1.18±0.00 ab	3.1±0.01 abc	1304±0.16 abcdef	25.81
S-10	181.70±0.14	17.00±0.00 a	75.70±0.82 ab	86.54±0.41 ab	6.64±0.00 d	3.40±0.00 j	2.47±0.13 ab	3.22±0.01 abc	0.27±0.03 fg	3.2±0.03 ab	1370±3.08 abcd	25.60
S-11	182.10±2.23	17.00±0.00 a	76.33±1.14 a	84.12±1.20 bc	6.75±0.00 c	3.40±0.00 j	2.60±0.00 ab	3.09±0.09 abcde	0.21±0.00 g	3.5±0.01 a	1328±5.83 abcde	25.19
S-12	148.60±0.00	14.65±0.21 c	51.46±0.10 g	75.87±0.57 de	5.55± 0.00 o	3.39±0.00 j	2.30±0.04 ab	2.87±0.04 bcdef	0.35±0.27 efg	2.6±0.01 c	1059±9.92 g	26.40
S-13	134.00±0.00	13.10±0.14 e	45.21±0.16 hi	68.31±0.29 fg	5.70± 0.00 m	3.48±0.01 abc	2.21±0.04 ab	2.60±0.06 cdefg	0.79±0.14 bcdefg	2.6±0.01 c	1156±9.72 efg	22.98
S-14	132.90±0.00	13.00±0.00 e	45.68±0.25 hi	66.86±0.44 g	5.63±0.00 n	3.50±0.00 a	2.38±0.09 ab	2.65±0.08 cdefg	0.93±0.07 abcde	2.8±0.01 bc	1157±1.59 efg	23.09
S-15	136.00±0.00	13.10±0.14 e	48.33±0.66 ghi	67.92±0.91 fg	5.93±0.00 k	3.48±0.01 abc	2.33±0.04 ab	2.62±0.07 cdefg	1.14±0.06 abc	3±0.00 abc	1222±3.08 bcdefg	22.09
S-16	138.50±0.14	13.20±0.00 e	50.76±0.04 gh	68.92±1.02 fg	6.00±0.00 j	3.48±0.00 ab	2.29±0.03 ab	2.59±0.03 cdefg	1.51±0.20 a	3.1±0.01 abc	1245±3.94 bcdefg	22.00
S-17	134.60±0.14	13.20±0.00 e	44.51±0.35 i	70.63±0.42 efg	5.55±0.00 o	3.46±0.00 bcdef	2.27±0.02 ab	2.66±0.13 defg	0.72±0.03 bcdefg	2.6±0.03 bc	1118±1.57 efg	23.78
S-18	135.9±0.14	13.20±0.00 e	45.69±0.09 hi	69.90±0.37 fg	5.55±0.00 o	3.47±0.00 bcd	2.19±0.02 ab	2.38±0.01 fg	0.85±0.04 bcdef	2.6±0.03 bc	1121±0.49 efg	23.78
S-19	138.75±0.21	13.30±0.14 e	46.98±0.12 ghi	69.41±0.31 fg	6.08±0.00 i	3.47±0.01 bcde	2.11±0.12 ab	2.25±0.13 g	1.00±0.02 abc	2.9±0.01 abc	1171±3.66 defg	21.88
S-20	139.55±0.21	13.20±0.00 e	47.265±0.32 ghi	67.77±0.11 fg	6.08±0.00 i	3.46± 0.00 bcdef	2.02±0.29 b	2.08±0.36 g	1.06±0.10 abc	3±0.01 abc	1201±3.64 cdefg	21.71
S-21	141.10± 0.00	13.80±0.00 d	45.38±0.10 hi	72.92±0.30 ef	5.78±0.00 l	3.44±0.00 efgh	2.04±0.18 b	2.08±0.18 g	0.76±0.21 bcdefg	2.7±0.03 bc	1098±1.96 fg	23.88
S-22	168.20±0.00	15.80±0.00 b	60.86±1.21 f	82.54±1.05 bc	6.15±0.00 h	3.44±0.00 efgh	2.33±0.04 ab	2.51±0.09 efg	0.72±0.04 bcdefg	2.8±0.01 bc	1122±10.78 efg	25.69
S-23	169.80±0.00	15.80±0.00 b	62.97±0.71 ef	82.58±0.52 bc	6.3±0.00 g	3.42±0.01 hij	2.40±0.00 ab	2.49±0.10 efg	1.19±0.05 ab	3±0.01 abc	1242±2.39 bcdefg	25.08
S-24	172.25±0.21	16.10± 0.14 b	62.64±0.49 f	85.65±0.63 bc	6.30±0.00 g	3.44±0.00 efgh	2.37±0.03 ab	2.41±0.02 fg	1.12±0.17 abc	3±0.01 abc	1195±0.99 cdefg	25.56
S-25	176.50±0.14	17.00±0.00 a	70.34±4.38 bcd	91.74±5.41 a	6.49±0.00 ef	3.41±0.01 ij	2.32±0.08 ab	2.35±0.06 fg	0.21±0.05 g	2.9±0.02 abc	1251±8.68 abcdefg	26.19

found for beverages S-3 and S-4, which contained higher quantities of apple juice. The Brix/acid ratio (Table 3) is an important parameter usually used to control fruit quality. In this study a positive correlation ($r = 0.54$, $p \leq 0.01$) resulted between it and the overall pleasantness in accordance with JAYASENA AND CAMERON (2007). These authors reported that the °Brix/acid ratio compared with the °Brix alone demonstrated a higher degree of association with the consumer acceptability and it appeared a very useful maturity indicator. The peach juice exhibited the highest potassium content. This characteristic determined an increase in the content of this important component in the beverages containing high percentages of peach, e.g., sample S-5. The lowest value was determined for sample S-12, which was obtained without peach juice. The total polyphenols content ranged between 265.5 mg L⁻¹ for beverage S-5 and 407 mg L⁻¹ for beverage S-24, with a mean value of 359.30 mg L⁻¹. According to the total polyphenol contents of fruit juices, higher values were exhibited by beverages with high percentages of pear juice. The same beverage also displayed some of the highest values for the flavonoid content (627.5 mg L⁻¹, the highest) and antioxidant capacity (585 mg L⁻¹, the second highest one). For this parameter, the result for S-24 was similar to that of beverage S-1 (593 mg L⁻¹). The lowest value for the antioxidant capacity (464.41 mg L⁻¹) was displayed by beverage S-5. These results highlighted that the most interesting findings were obtained with a high quantity of apple or pear juice in the beverage, while a high content of peach juice led to a reduction of this parameter. The ANOVA and Tukey's test performed for each parameter of the beverages displayed high variability among all samples and strictly corre-

Table 4 - Polyphenol composition (PHEN - total polyphenols; TAI - anthocyanins; TFI - flavonoids; VCEAC - antioxidant capacity) and CIELab values of samples obtained by mixing grape juice and fruit juices of pear, peach and apple and results of ANOVA analysis with Tukey's test. Data are expressed as mean \pm SD. For sample code see Table 1. Values in each column having different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Sample code	PHEN (mg L ⁻¹)	TAI (mg L ⁻¹)	TFI (mg L ⁻¹)	VCEAC (mg L ⁻¹)	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
S-1	384.5 \pm 4.95 cd	84 \pm 1.41 abc	540.5 \pm 44.55 cdefgh	593.83 \pm 10.40 a	68.14 \pm 2.86 ab	32.18 \pm 0.46	11.20 \pm 0.43
S-2	389.5 \pm 2.12 bcd	84.5 \pm 2.12 abc	478 \pm 4.24 ghijkl	578.38 \pm 1.04 ab	64.75 \pm 0.01 b	33.9 \pm 0.10	11.675 \pm 0.15
S-3	366 \pm 1.41 efg	82 \pm 2.82 abcd	407.5 \pm 20.51 i	526.17 \pm 4.16 abcd	66.28 \pm 0.45 ab	33.56 \pm 0.19	11.36 \pm 0.26
S-4	362 \pm 0.7 gh	82.5 \pm 1.06 abc	497 \pm 4.95 fghijk	468.09 \pm 20.28 cd	66.63 \pm 0.19 ab	32.72 \pm 0.51	10.52 \pm 0.27
S-5	265.5 \pm 6.36 o	80 \pm 0.00 abcde	447 \pm 2.83 jkl	464.41 \pm 10.40 d	66.65 \pm 1.98 ab	34.84 \pm 1.72	11.23 \pm 0.30
S-6	402.5 \pm 4.95 ab	88.5 \pm 0.71 a	612.5 \pm 0.71 abc	534.26 \pm 48.87 abcd	64.89 \pm 0.25 b	32.94 \pm 0.40	11.31 \pm 0.28
S-7	405.5 \pm 3.54 a	88 \pm 0.00 ab	576 \pm 1.41 abcd	476.91 \pm 728 cd	64.13 \pm 0.93 b	32.75 \pm 0.07	10.89 \pm 0.01
S-8	385.5 \pm 2.12 cd	80.5 \pm 0.71 abcde	546.5 \pm 7.78 bcdefg	492.35 \pm 4783 bcd	63.85 \pm 1.52 b	33.52 \pm 2.33	10.97 \pm 1.19
S-9	380.5 \pm 2.12 de	81.5 \pm 0.71 abcd	545 \pm 5.66 cdefg	530.59 \pm 29.12 abcd	65.63 \pm 1.25 ab	33.85 \pm 0.76	11.46 \pm 0.59
S-10	362.5 \pm 2.12 fgh	80.5 \pm 0.71 abcde	517 \pm 1.41 defghi	480.59 \pm 10.40 cd	66.21 \pm 3.21 ab	34.4 \pm 2.77	11.25 \pm 1.00
S-11	338.5 \pm 4.95 ijk	79.5 \pm 0.71 abcde	490.5 \pm 7.1 fghijk	537.94 \pm 18.72 abcd	67.96 \pm 2.23 ab	33.8 \pm 1.33	10.9 \pm 0.72
S-12	377 \pm 1.41 def	82 \pm 0.00 abcd	581 \pm 1.41 abcd	577.65 \pm 0.00 ab	66.62 \pm 0.40 ab	33.49 \pm 1.94	9.45 \pm 0.47
S-13	334 \pm 0.00 jkl	67.5 \pm 0.71 gh	515.5 \pm 4.95 defghi	551.18 \pm 0.00 abcd	67.5 \pm 2.21 ab	31.66 \pm 0.46	9.81 \pm 0.01
S-14	325 \pm 4.24 klm	63.5 \pm 2.12 h	493.5 \pm 4.95 fghijk	510 \pm 2.08 abcd	68.51 \pm 1.62 ab	32.66 \pm 1.77	10.04 \pm 0.04
S-15	314.5 \pm 0.71 mn	68.5 \pm 2.12 gh	430 \pm 15.56 kl	506.32 \pm 11.44 abcd	70.09 \pm 0.14 ab	30.79 \pm 1.81	9.77 \pm 0.95
S-16	309.5 \pm 0.71 n	65.5 \pm 0.71 gh	436 \pm 9.90 jkl	510.74 \pm 15.60 abcd	74.03 \pm 4.72 a	31.21 \pm 1.16	9.26 \pm 1.27
S-17	350 \pm 4.24 hi	72 \pm 1.41 efgh	552.5 \pm 6.36 bcdef	583.53 \pm 12.48 a	66.6 \pm 0.62 ab	32.86 \pm 1.14	11.09 \pm 0.09
S-18	342 \pm 1.42 ij	69.5 \pm 2.12 fgh	514 \pm 2.83 defghi	551.17 \pm 33.28 abcd	68 \pm 2.18 ab	33.46 \pm 1.28	10.93 \pm 0.60
S-19	333 \pm 1.14 jkl	67 \pm 0.00 gh	503 \pm 0.00 efghij	540.88 \pm 6.24 abcd	69.48 \pm 1.60 ab	32.71 \pm 1.05	10.76 \pm 0.69
S-20	321 \pm 1.41 lmn	64.5 \pm 2.12 gh	469 \pm 8.49 hijkl	551.18 \pm 29.12 abcd	67.82 \pm 2.71 ab	33.63 \pm 2.10	9.95 \pm 0.09
S-21	365 \pm 4.24 fg	68 \pm 0.00 gh	571 \pm 1.41 abcde	546.76 \pm 12.48 abcd	67.49 \pm 0.49 ab	32.6 \pm 1.43	10.56 \pm 1.41
S-22	395.5 \pm 0.71 abc	80 \pm 7.07 abcde	618 \pm 49.5 ab	576.91 \pm 728 ab	63.95 \pm 1.63 b	34.42 \pm 0.86	11.88 \pm 0.30
S-23	376 \pm 2.83 defg	73 \pm 1.41 defg	556 \pm 0.00 abcdef	548.24 \pm 0.00 abcd	70.73 \pm 5.76 ab	32.09 \pm 1.22	10.05 \pm 1.86
S-24	407 \pm 7.07 a	78 \pm 1.41 cdef	627.5 \pm 4.95 a	585 \pm 37.43 a	65.57 \pm 1.23 ab	32.27 \pm 0.23	11.68 \pm 0.23
S-25	390.5 \pm 7.78 bcd	79 \pm 5.66 bcde	576 \pm 46.67 abcd	556.32 \pm 1.04 abcd	66.51 \pm 0.28 ab	32.82 \pm 0.91	10.89 \pm 0.59

lated with the composition of each single fruit juice and the different percentages used for beverage production. In fact, there were no differences between the beverages for the CIELab parameters a* and b* only, and this is due to the high grape must percentage used.

Sensory aspects

Concerning the overall pleasantness, the ANOVA highlighted significant differences among the 25 experimental beverages (Table 5).

Even if the content of grape juice was kept constant in all of the beverages at 70%, the different percentages of other fruit juices can influence the acceptability. The most appreciated samples (S-22, S-24 and S-23) had the highest pear juice percentages, while the least appreciated (S-14, S-12, S-1 and S-16) had the lowest pear juice concentrations. The least appreciated was beverage S-14, which was obtained with a mix of apple, pear and peach juices at the same percentage (10%). Penalty analysis was used because with this test it is possible to identify the sensory attributes that have the largest influence on consumer liking and provides directions for product reformulation (ARES *et al.*, 2014) and also allows one to determine if a specific product attribute is "just about right" (TAYLOR, 2013). Penalty analysis combines JAR variables and overall liking tests

to find correlations between a decrease in consumer acceptance and attributes not at the JAR level. This analysis, based on multiple comparisons, is aimed to identify and determine if the rankings on the JAR scale are related to significantly different results in the liking scores for each sensory attribute studied on the JAR scale. This can be achieved by evaluating the mean decrease in overall liking versus percentage of not-JAR variables (i.e., the low percentage of not-JAR evaluation determines a low mean decrease in overall liking). When some not-JAR categories receive at least 20% (Pareto principle) responses for an attribute, this becomes a candidate for penalty analysis. Penalty analysis uses the 20% cut-off theory on the percentage of not-JAR consumers based on the Pareto principle (i.e., the Pareto principle recognises that "80% of effects occur from 20% of causes" or the 80-20 rule) and signifies several common occurrences in everyday phenomena. Therefore, the 20% cut-off is used as a general rule for penalty analysis (NARAYANAN *et al.*, 2014). In Fig. 1 are reported the JAR scores for each parameter used in the beverage evaluation.

The colour was judged "just right" by 50% of the consumers, odour by 37%, aroma by 38% and persistence in the mouth by 39%. In general, the "JAR" value was chosen by a higher number of assessors: the higher frequency was highlighted by the "a little too low" val-

Table 5 - Mean values of overall pleasantness and results of ANOVA and Tuckey's test. Data are expressed as the mean \pm SD. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Sample code	Fruit juices			Overall pleasantness	Tuckey test (p < 0.05)
	pear (%)	peach (%)	apple (%)		
S-22	20	5	5	56.98	a
S-24	25	0	5	55.3	ab
S-23	20	10	0	55.14	ab
S-8	5	10	15	54.18	abc
S-9	5	15	10	54.08	abc
S-2	0	10	20	54.04	abc
S-25	25	5	0	53.07	abcd
S-5	0	25	5	53.36	abcde
S-11	5	25	0	52.36	abcdef
S-3	0	15	15	50.82	abcdefg
S-4	0	20	10	50.56	abcdefg
S-6	5	0	25	50.54	abcdefg
S-7	5	5	20	49.72	abcdefg
S-10	5	20	5	48.9	abcdefg
S-21	20	0	10	48.38	abcdefg
S-15	10	15	5	46.36	abcdefgh
S-20	15	15	0	45.7	bcdefgh
S-17	15	0	15	43.8	cdefgh
S-18	15	5	10	42.9	defgh
S-19	15	10	5	42.68	efgh
S-13	10	5	15	42.6	efgh
S-16	10	20	0	42.46	fgh
S-1	0	5	25	41.96	fgh
S-12	10	0	20	40.86	gh
S-14	10	10	10	36.36	h

ue for only the odour. Fig. 1 also demonstrates that the “much too much” and “much too low”, although they may affect the overall pleasantness, do not weigh significantly on it because of their low frequency in the responses of con-

sumers. The variables can then be grouped into two main groups with “a little too much” or “a little too low”. The first group corresponds to “much too much”, while the second corresponds to “not enough” for the parameters of

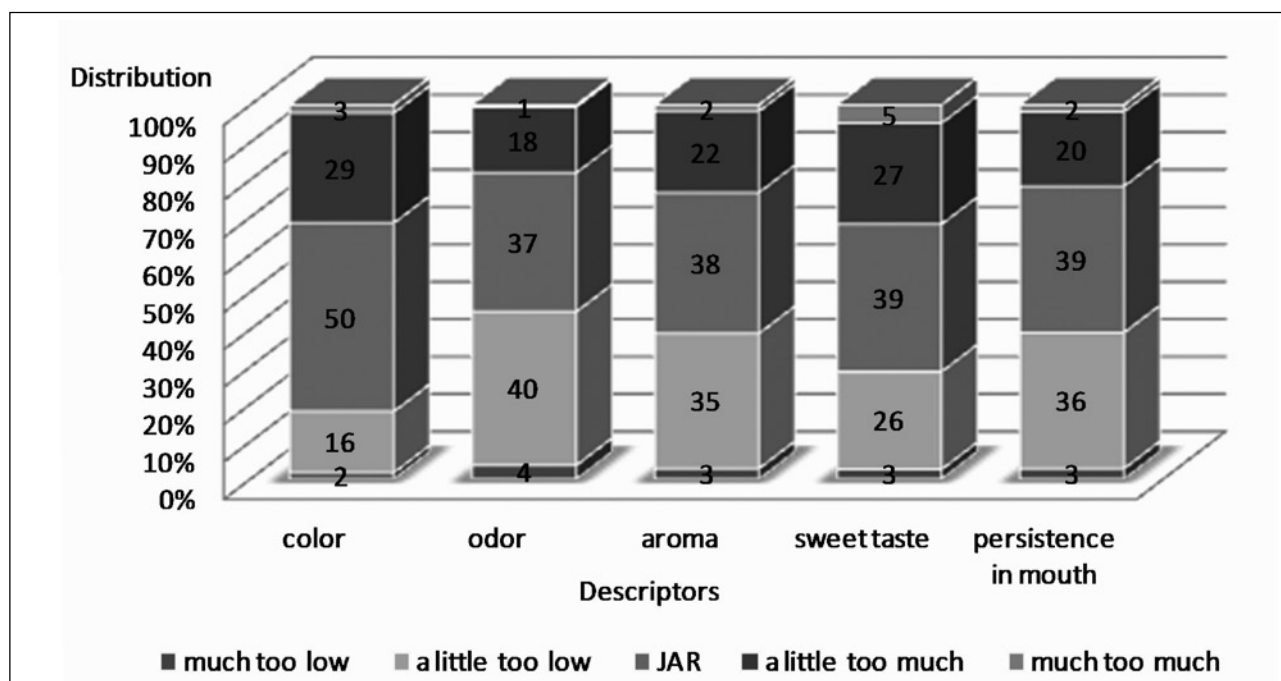
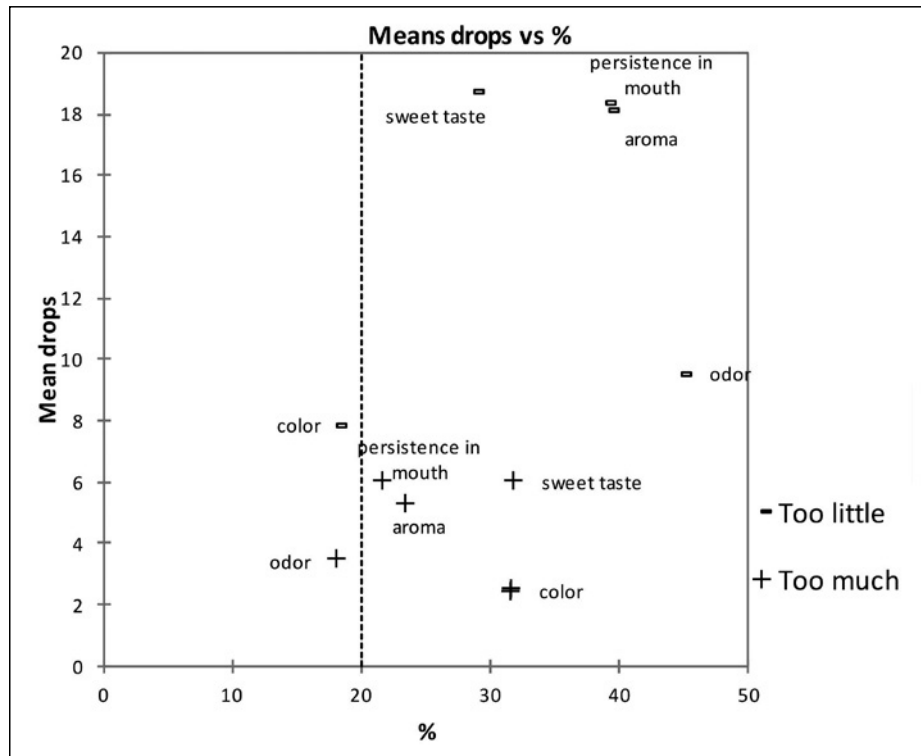


Fig. 1 - Distribution of JAR scores for each sensory attribute evaluated.

Fig. 2 - Penalty analysis from JAR data. Not-JAR data with a frequency <20% of total responses are not considered significant.



colour, aroma, sweet taste and persistence in the mouth. In Fig. 2 are displayed the distribution of frequency and then their effect on the mean drop in overall pleasantness.

Sweet taste, aroma and persistence in mouth exhibited a higher effect on the overall pleasantness if classified as “not enough”. Also important for determining the overall pleasantness was the odour, if classified as “not enough”.

When the sensory parameters were classified as “too much”, they had less impact on the overall pleasantness. A principal component analysis was also performed to highlight the correlation between chemical-physical parameters and overall pleasantness. The first two components explained 72.82% of the variance (Fig. 3).

The first component explained 50.74% of the variance and was mainly correlated with the to-

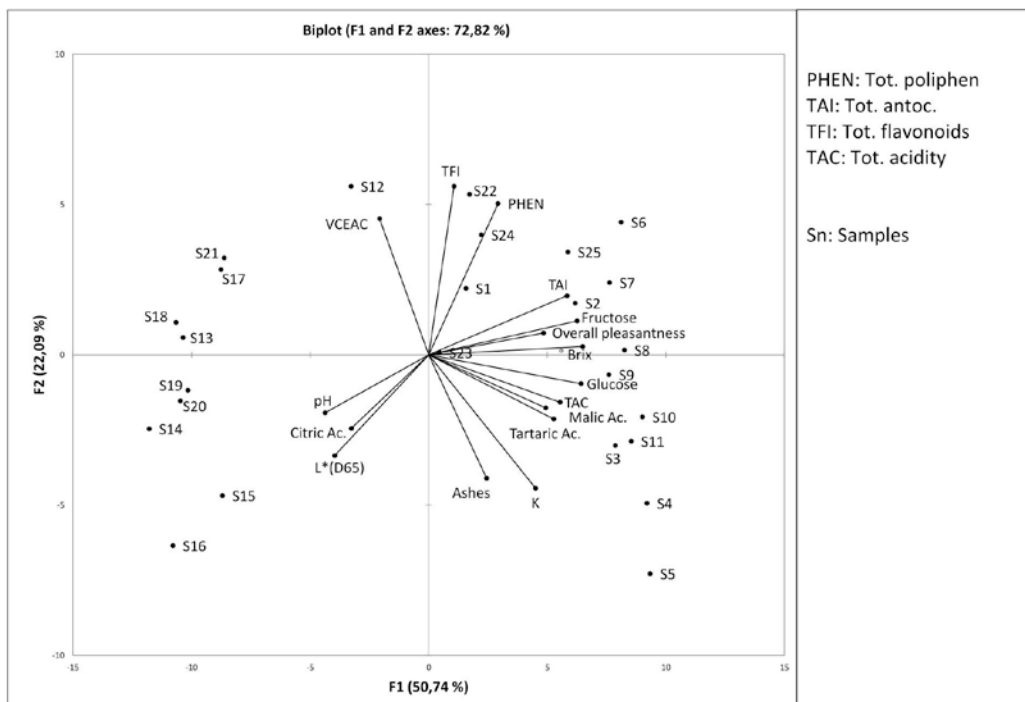


Fig. 3 - Distribution on plane defined by the first two components of chemical-physical parameters, overall pleasantness and beverage samples.

tal soluble solids, glucose and fructose contents, which corresponded to 12.1, 11.8 and 11.2%, respectively, of the total variance explained by this axis. The second component that explained 22.08% of the total variance is associated with the flavonoids, total polyphenols and antioxidant capacity, accounting for 20.7, 16.7 and 13.5%, respectively, of the total variance explained by this axis. The overall pleasantness was positively correlated with the contents of the total soluble solids and fructose and negatively correlated with the pH, citric acid content and L*. Because the overall pleasantness is located in the upper right graph quadrant, all of the beverages placed in the same quadrant are the most appreciated. In particular, the highest appreciation was found for the S-22, S-24 and S-23 samples, as also demonstrated by Table 5. The less appreciated samples are on the lower left side of the graph. They can be grouped into two groups: S-16, S-15, S-14, S-20 and S-19 in the lower left quadrant of the PCA graph and S-13, S-18, S-17, S-21 and S-12 in the upper left quadrant. The first group exhibited a more transparent colour, with a high value for L* and higher pH and citric acid contents. The second group demonstrated a low overall pleasantness but a high antioxidant capacity. In this group, it must be highlighted that beverage S-14, with the same percentages of fruit juice (10-10-10), had the lowest appreciation and the highest pH.

CONCLUSIONS

One of the first internationally accepted descriptions of functional food has been provided by DIPLOCK *et al.* (1999) according to which: "a food product can be considered functional if together with the basic nutritional impact it has beneficial effects on one or more functions of the human organism...". Taking this into account, and also of the scientific evidence regarding the benefits of the products based on grapes to human health, the results obtained in this study have shown that these experimental fruit juices have functional characteristics. Additionally, as reported by BHARDWAJ and PANDEY (2011), it may be concluded that the formulation of mixed beverages can satisfy consumer tastes and preferences. In particular, the overall pleasantness results indicate a tendency of consumers to prefer samples with the highest percentage of pear juice, followed by samples containing mixtures of peach and apple juices.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Regione Piemonte through the "Regional Operational Programme" - Regional Competitiveness and Employment - F.E.S.R. 2007/2013. The authors thank all of the consumers and the technical operator, Mrs. Maria Rosa Lottero - CRA-ENO, for her collaboration in the liking test.

REFERENCES

- Aguilar-Rosas S.F., Ballinas-Casarrubias M.L., Nevarez-Moorillon G.V., Martín-Belloso O. and Ortega-Rivas E. 2007. Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: effects on physicochemical properties and flavour compounds. *J. Food Eng.* 83: 41.
- Al Bittar S., Périno-Issartier S., Dangles O. and Chemat F. 2013. An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chem.* 141: 3268.
- Andrés V., Villanueva M.J., Mateos-Aparicio I. and Tenorio M.D. 2014. Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity of mixed beverages based on fruit juices with milk or soya. *J. Food Nutr. Res.* 1 (53): 71.
- Ares G., Dauber C., Fernández E., Giménez A. and Varela P. 2014. Penalty analysis based on CATA questions to identify drivers of liking and directions for product reformulation. *Food Qual. Prefer.* 32: 65.
- Aylward D. 2012. Demarcation: a dynamic methodology for quality grading within the Australian wine industry. *Int. J. Qual. Innov.* 2:18.
- Bates R.P. and Morris J.R. 2001. Juices and beverages blends. Ch. 9. In: "Principles and practices of small and medium scale fruit juice processing". Bates R.P., Crandall P.G. and Morris J.R. (Ed. FAO), p. 95-100. FAO Agricultural Services Bulletin - Rome.
- Bhardwaj R.L. and Pandey S. 2011. Juice Blends—A way of utilization of under-utilized fruits, vegetables, and spices: a review. *Crit. Rev. Food Sci.* 51: 563.
- Buron-Moles G., Torres R., Amoako-Andoh F., Vinas I., Teixidó N., Usall J., Keulemans W. and Davey M.W. 2014. Analysis of changes in protein abundance after wounding in 'Golden Delicious' apples. *Postharvest Biol. Tec.* 87: 51.
- Cane P. 1990. Il controllo della qualità dei vini mediante HPLC: determinazione degli acidi organici. *Enotecnico* 26: 67.
- Colaric M., Stampar F., Solar A. and Hudina M. 2006. Influence of branch bending on sugar, organic acid and phenolic content in fruits of 'Williams' pears (*Pyrus communis* L.). *J. Sci. Food Agr.* 86: 2463.
- Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines.
- D.M. 03/02/89 - Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali - parte generale.
- Di Stefano R., Cravero M.C. and Gentilini N. 1989. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *Enotecnico* 25: 83.
- Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwel M., Bornet F., Fern E.B. and Roberfroid M.B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document - *Brit. J. Nutr.* 81 S1-S27. Supplement Number 1.
- Food Standard Agency. 2010. Eatwell: 8 tips for making healthier choices. Available from: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/publication/eatwell0708.pdf>. Accessed 2014 August 8.
- Fügel R., Carle R. and Schieber A. 2005. Quality and authenticity control of fruit purees, fruit preparations and jams—a review. *Trends Food Sci. Tech.* 16: 433.
- Gunathilake K.D.P.P., Yu L.J. and Vasantha Rupasinghe H.P. 2014. Reverse osmosis as a potential technique to improve antioxidant properties of fruit juices used for functional beverages. *Food Chem.* 148: 335.
- Kim D.O., Ki W.L., Lee H.J., Lee C.Y. 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3713.
- Jayasena V. and Cameron I. 2007. °Brix/Acid Ratio as a predictor of consumer acceptability of Crimson seedless table grapes. *J. Food Quality.* 31: 736.
- Liu H.F., Wu B.H., Fan P.G., Li S.H. and Li L.S. 2006. Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1526.
- Mammasse N., Schlich P. 2014. Adequate number of consumers in a liking test. Insights from resampling in seven studies. *Food Qual. Prefer.* 31: 124.
- Markowski J., Baron A., Mieszczakowska M. and Plochanski

- W. 2009. Chemical composition of French and Polish cloudy apple juices. *J. Hort. Sci. Biotech. ISAFRUIT*, Special Issue: 68.
- Marsellés-Fontanet Á.R., Puig-Pujol A., Olmos P., Mínguez-Sanz S. and Martín-Belloso O. 2013. A comparison of the effects of pulsed electric field and thermal treatments on grape juice. *Food Bioprocess Technol.* 6: 978.
- Morales-de la Peña M., Salvia-Trujillo L., Rojas-Graü M.A. and Martín-Belloso O. 2010. Impact of high intensity pulsed electric field on antioxidant properties and quality parameters of a fruit juice-soymilk beverage in chilled storage. *Food Sci. Technol.-Leb.* 43: 872.
- Narayanan P., Chinnasamy B., Jin L. and Clark S. 2014. Use of just-about-right scales and penalty analysis to determine appropriate concentrations of stevia sweeteners for vanilla yogurt. *J. Dairy Sci.* 97: 3262.
- Ojeda H., Escudier J.L., Albagnac G., Sivry A. and Guyot P. 2009. Diversification des produits de la vigne: création d'une filière « Jus de Raisin ». *Revue des CEnologues* 30.
- O'Neil C.E. and Nicklas T.A. 2012. Fruit juice consumption is associated with improved nutrient adequacy in children and adolescents: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006. *Public Health Nutr.* 15: 1871.
- O'Neil C.E., Nicklas T.A., Zhanovc M. and Fulgoni V.L. III. 2011. Diet quality is positively associated with 100% fruit juice consumption in children and adults in the United States: NHANES 2003-2006. *Nutr. J.* Available from: <http://www.nutritionj.com/content/10/1/17>.
- Pagès J., Berthelo S., Brossier M. and Gourret D. 2014. Statistical penalty analysis. *Food Qual. Prefer.* 32: 16.
- Ramos V., Ramalho P., Vivas C. and Sousa A. 2012. Global competitive dynamics and innovation in the Brazilian wine sector: an analysis of Vale do São Francisco pole. Conference Proceedings of 35th World Congress of Vine and Wine; Izmir, Turkey, 18 - 22 June 2012. Paris, France: The International Organization of Vine and Wine (OIV).
- Rodríguez-Roque M.J., Rojas-Graü M.A., Elez-Martínez P., Martín-Belloso O. 2014. In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. *Food Res. Int.* 62: 771.
- Saarela M., Alakomi H.L., Mättö J., Ahonen A.M., Puhakka A. and Tynkkynen S. 2011. Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *Int. J. Food Microbiol.* 149: 106.
- Saravanan K. and Aradhya S.M. 2011a. Potential nutraceutical food beverage with antioxidant properties from banana plant bio-waste (Pseudostem and Rhizome). *Food Funct.* 2: 603.
- Soyer Y., Koca N. and Karadeniz F. 2003. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *J. Food Compos. Anal.* 16: 629.
- Taylor K.B.S. 2013. Evaluation of flavor variation in Swiss cheese from five factories using selected ion flow tube mass spectrometry (sift-ms), descriptive sensory analysis, and consumer testing. Thesis. Graduate Program in Food Science and Nutrition. The Ohio State University. Columbus.
- U.S. Department of Agriculture, U.S. Department of Health and Human Services. 2010. Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government. Printing Office, December 2010.
- Vislocky L.M. and Fernandez M.L. 2010. Biomedical effects of grape products. *Nutr. Rev.* 68: 656.
- Will F., Roth M., Olk M., Ludwig M. and Dietrich H. 2008. Processing and analytical characterization of pulp-enriched cloudy apple juices. *Food Sci. Technol.-Leb.* 41: 2057.
- Wootton-Beard P.C. and Ryan L. 2011. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int.* 44: 3135.
- Wu J., Gao H., Zhao L., Liao X., Chen F., Wang Z. and Hu X. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem.* 103: 88.