



***CORSO DI DOTTORATO IN
BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI***

XXII CICLO

***Influenza del trattamento post-raccolta con etilene sulla
disidratazione e sulla macerazione delle uve Aleatico e
Montepulciano.***

Coordinatore: Prof. Marco ESTI

Tutor: Prof. Fabio MENCARELLI

Co-Tutor: Dr. Rinaldo BOTONDI

Dottorando: Luigi LODOLA

INDICE

CAPITOLO I

SVILUPPO DELL'UVA

1.1 Aspetti generali	3
1.2 Morfologia dell'acino	4
1.3 Ingrossamento dell'acino d'uva	4
1.4 Aumento del contenuto di solidi solubili	6
1.5 Metabolismo e diminuzione degli acidi	8

DISIDRATAZIONE DELL'UVA

1.6 Sovramaturazione e appassimento	10
1.7 Utilizzo dell'ambiente naturale	12
1.8 Utilizzo di un ambiente artificiale	14

CAPITOLO II

COMPOSTI FENOLICI ED ETILENE

2.1 Sintesi di composti fenolici	16
2.2 Antociani	17
2.3 Flavoni	19
2.4 Tannini	20
2.5 Etilene e maturazione dell'uva	20
2.6 Glicosidasi ed enzimi di parete	23

CAPITOLO III

LA MACERAZIONE

3.1 Principi della macerazione	27
3.2 Influenza del tempo di macerazione	28
3.3 Macerazione con enzima	29
3.4 Caratteristiche della varietà Montepulciano d'Abruzzo	30
3.5 Caratteristiche della varietà Aleatico	30

CAPITOLO VI

MATERIALI E METODI

4.1 Procedure di trattamento	32
4.2 Determinazione degli zuccheri	34
4.3 Determinazioni enzimatiche	36
4.4 Indice dei polifenoli totali	39
4.5 Indice di antociani totali	40
4.6 Composti volatili	41
4.7 Conclusioni	50

BIBLIOGRAFIA	51
---------------------------	----

CAPITOLO I

SVILUPPO DELL'UVA

1.1 Aspetti generali

Dopo la fioritura, con la fecondazione ed i relativi stimoli ormonali, l'ovario del fiore inizia la divisione cellulare ed il proprio accrescimento, cioè ha inizio la fase di allegagione. Dal punto di vista descrittivo è bene suddividere l'evoluzione dell'uva sulla vite, in tre periodi:

- Periodo erbaceo: va dall'allegagione, momento in cui il piccolo acino si è formato, all'invaiaura, momento in cui cambia colore. Durante questo periodo l'uva è verde, colorata dalla clorofilla, di consistenza dura; non contiene che il 2% di zuccheri ed il 30% in acidità.

- Invaiaura o fase traslucida: corrisponde all'epoca fisiologica della colorazione dell'uva; contemporaneamente l'acino si ingrossa e diventa elastico; l'uva bianca passa dal verde al giallo, l'uva nera passa dal verde al rosso chiaro e poi al rosso scuro. In condizioni ideali le uve di un vigneto cambiano di colore in una quindicina di giorni. Gli zuccheri delle uve aumentano improvvisamente.

Si osserva un certo sincronismo tra l'arresto della crescita dei tralci, lo scurirsi e la lignificazione del raspo e l'invaiaura, ma la correlazione non è assoluta; la maturazione dell'uva e quella del legno sono indipendenti. La lignificazione del raspo e la sua colorazione si verificano solo più tardi.

- Maturazione: va dall'invaiaura alla maturazione completa. A seconda della varietà la fase di maturazione può durare dai 20 ai 50 giorni; nell'arco di questo periodo, l'uva tende ad ingrossarsi, accumula zuccheri e perde acidità.

Si distingue la maturazione "fisiologica", momento in cui l'acino d'uva ha raggiunto il suo maggior diametro e il tenore massimo di zuccheri, e la maturazione cosiddetta "tecnologica" che definisce il momento in cui essa deve essere raccolta, secondo la sua destinazione. Le date di questi due stadi di maturazione non sempre coincidono.

1.2 Morfologia dell'acino

Botanicamente il frutto della vite è una bacca che deriva dall'evoluzione dell'ovario fecondato (Coombe, 1976;).

È costituito da un epicarpo (buccia), da un mesocarpo e da un endocarpo:

- Epicarpo: è caratterizzato da un tessuto membranoso con un'epidermide cutinizzata (cuticola) priva di stomi dove si può formare, maggiormente in alcune varietà piuttosto che in altre, uno strato ceroso detto pruina dello spessore di 1.6-1.8 μm che ha una notevole importanza nel trattenimento dei lieviti e nella resistenza allo stress. Nella buccia sono presenti acido tartarico, composti fenolici (antociani, e flavoni) tannini, aromi, (linalolo, geraniolo, nerolo, ecc.), enzimi, ed altri...

La genesi della cuticola avviene tre settimane dopo la fioritura. Le cellule della buccia hanno una distinta attività metabolica svolgendo alcuni fisiologici e biochimici cambiamenti durante lo sviluppo e la maturazione, dimostrando che questo tessuto ha una funzione endocrina deputata alla regolazione dello sviluppo di altri tessuti pericarpici.

- Mesocarpo e endocarpo: insieme compongono il sarcocarpo. Le cellule del mesocarpo sono caratterizzate da grandi vacuoli i quali contengono la maggior parte del succo che negli acini maturi raggiunge circa il 75-80% del peso della bacca (Lavee e Nir, 1986;) contro il 10% dei vinaccioli. Nella polpa vi sono: zuccheri (glucosio e fruttosio) acido tartarico e acido malico, pectine, sostanze colloidali, composti azotati, sostanze minerali ecc.

1.3 Ingrossamento dell'acino d'uva

Le dimensioni dell'acino variano secondo l'annata e soprattutto in funzione della piovosità.

La sua crescita segue una doppia curva sigmoidea (caratteristica di tutti i frutti con chicchi) (Coombe, 1976). La forma esatta della curva di crescita può variare considerevolmente, e sono state identificate delle divisioni in due, tre o quattro fasi

(Coombe, 1973, 1976, 1980; Allewldt et al.,1975; Allewldt e Koch, 1977; Coombe e Bishop, 1980; Allewldt et al., 1984).

Prendendo in esame parametri, quali, il diametro, la lunghezza ed il volume o peso degli acini, otteniamo un grafico dove si possono distinguere tre fasi:

1) un periodo di crescita rapida detto fase I che varia tra i 45 e i 60 giorni, è caratterizzata da un periodo di circa due o tre settimane di divisione cellulare molto rapida seguita da un marcato ingrandimento delle cellule che costituiscono l'acino (Pratt, 1971; Coombe, 1976; Lavee e Nir, 1986). Queste divisioni cellulari interessano maggiormente le cellule del pericarpo interno per i primi 5-10 giorni dopo l'antesi (Coombe, 1973; Pratt,1971), per proseguire poi nel pericarpo esterno, e alla fine nell'ipodermide e nell'epidermide, a 32-40 giorni dopo la fioritura (Considine e Knox, 1981; Pratt, 1971; Staudt et al.,1986).

Al termine di questa fase i semi raggiungono quasi la loro piena dimensione, mentre il peso secco del seme mostra uno schema bifasico durante tutta la crescita del frutto, il quale raggiunge le dimensioni finali intorno ai 70-75 giorni dopo l'antesi (Staudt et al., 1986). Durante questa fase la clorofilla è il pigmento predominante e gli acini mostrano un metabolismo molto attivo, con elevati livelli di respirazione e un rapido accumulo di acidi, il cui contenuto è paragonabile a quello degli zuccheri, 20 g/kg (Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971; Winkler et al., 1974).

2) un periodo di crescita lenta detto fase II che inizia tra i 35 e gli 80 giorni dopo l'antesi (Winkler et al., 1974). La durata di questo periodo di crescita lenta, detta anche fase di latenza, dipende dalla coltivazione e dalla varietà (precoce o tardiva, con semi o senza), dal periodo della fioritura (precoce o tardiva, con grappoli primari o secondari), dalla competizione tra i grappoli e l'ambiente dove la pianta vive (Pratt, 1971; Coombe, 1973, 1976; Alleweldt, 1977; Lavee e Nir, 1986). Per esempio, nelle varietà con semi, gli acini con maturazione o fioritura tardiva mostrano una fase di latenza distinta e prolungata, mentre nelle cultivar precoci e partenocarpiche (assenza di semi) questa fase è appena distinguibile (Coombe, 1980).

Durante questa fase gli embrioni si sviluppano rapidamente e in genere raggiungono la loro massima dimensione verso la fine di questo periodo; gli acini perdono la clorofilla e si indeboliscono; l'acidità raggiunge il livello più alto.

3) un periodo di un secondo e finale aumento delle dimensioni detto fase III segnato dalla fine del periodo di latenza, chiamato anche “véraison” o invaiatura, caratterizzato da un rapido cambiamento nell’aspetto e nella costituzione degli acini. I principali processi biochimici che si evidenziano sono: un’accelerazione della crescita, un indebolimento dell’acino e un incremento della deformabilità, un aumento del contenuto di glucosio, fruttosio, amminoacidi totali e liberi (soprattutto arginina e prolina), proteine totali e azoto totale (Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971; Coombe, 1973; Lavee e Nir, 1986). Inoltre si ha una diminuzione degli acidi organici (soprattutto acido malico) e dell’ammoniaca, una perdita di clorofilla dalla buccia e un accumulo di antocianine (nelle uve rosse), un calo della respirazione, ed infine un incremento dell’attività di alcuni enzimi, quali per esempio la saccarosio-fosfato-sintetasi, la saccarosio-sintetasi e l’esochinasi. Tale periodo dura circa 5-8 settimane (Winkler et al., 1974). Recentemente, Davies e Robinson (1996), attraverso la tecnica di “differential screening” in uve di Shiraz, hanno evidenziato un numero elevato di trascritti nell’uva in maturazione, legati alla sintesi di proteine di parete cellulare, di proteine da stress e proteine taumatine-simili. Ciò starebbe ad indicare che nell’ultima fase di maturazione gli acini procedono in un’attività di protezione contro gli stress di vario tipo, idrico o patogenico.

1.4 Aumento del contenuto di solidi solubili

Glucosio e fruttosio rappresentano il 99% dei carboidrati presenti nel succo d’uva, e hanno un incidenza sul peso fresco dell’acino maturo per il 12-27%, costituendo una larga parte del totale dei solidi solubili (Winkler et al., 1974; Hofacher et al., 1976).

Negli acini verdi, durante le prime fasi della loro crescita, il glucosio rappresenta circa l’85% del contenuto zuccherino, durante l’invaiatura il contenuto di glucosio è superiore al contenuto di fruttosio, per poi arrivare al momento in cui gli acini sono maturi in cui il rapporto glucosio/fruttosio si avvicina all’unità, mentre nelle uve surmature, generalmente il fruttosio supera il glucosio (Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971; Winkler et al., 1974; Possner e Kliwer, 1985; Coombe, 1987).

Il rapporto glucosio/fruttosio varia in funzione della cultivar e dell'andamento stagionale. Varietà contenenti più fruttosio alla maturazione possono essere raccolte e consumate prima rispetto alle varietà contenenti più glucosio, poiché il fruttosio ha un sapore più dolce. (Lavee e Nir, 1986).

Oltre ai due zuccheri citati, nell'uva ne sono presenti altri in piccole quantità; tra questi, riscontrabili in diverse varietà, ricordiamo il saccarosio (meno dello 0.1% negli acini maturi), raffinoso, stachioso, melibiosio, maltosio e galattosio; tra i pentosi abbiamo soprattutto arabinosio e xilosio, presenti in piccole quantità nelle uve mature (Winkler et al., 1974).

Il glucosio e il fruttosio sono più o meno uniformemente distribuiti nell'acino, tuttavia, prima dell'inizio della maturazione, la buccia e le parti più interne sono caratterizzate da concentrazioni di questi esosi molto più elevate rispetto a quelle dei tessuti epicarpici (Possner e Kliewer, 1985).

Gli zuccheri cominciano ad accumularsi rapidamente all'inizio della maturazione, anche se questo forte incremento, che avviene durante la fase III, potrebbe non essere dovuto all'incremento dell'attività fotosintetica (Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971).

La maggior parte degli zuccheri presente negli acini, comunque, è sintetizzata nelle foglie (sedi della fotosintesi clorofilliana) e si sposta attraverso il floema, come saccarosio, fino al frutto (Lavee e Nir, 1986); qui il saccarosio è idrolizzato a glucosio e fruttosio grazie all'azione dell'invertasi (Hardy, 1968; Saito e Kasai, 1978). Questo processo implica una serie di reazioni biochimiche quali: fosforilazione di glucosio e fruttosio, sintesi del saccarosio fosfato, idrolisi di saccarosio fosfato in saccarosio nelle foglie, trasporto e idrolisi di saccarosio nell'acino (Hawker, 1969).

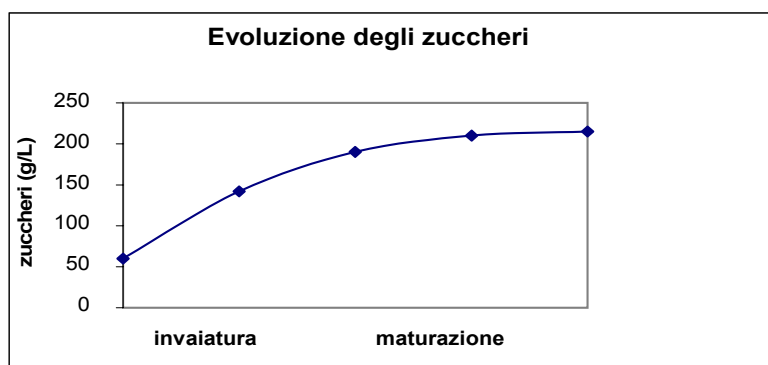


Figura 1. Andamento degli zuccheri durante le ultime 8 settimane di maturazione.

1.5 Metabolismo e diminuzione degli acidi

L'acidità dell'uva è composta principalmente da tre acidi organici: l'acido tartarico, l'acido malico, rappresentanti il 90% dell'acidità totale, e l'acido citrico, in concentrazioni variabili ma più basse, dell'ordine del 5-10%.

A questi si aggiungono tracce di altri acidi organici, quali, l'acido succinico, l'acido fumarico, l'acido acetico, l'acido glicolico, l'acido lattico, l'acido aconitico, l'acido chinico, l'acido scichimico, e l'acido mandelico.

E' noto come l'acidità dell'uva diminuisca durante la maturazione. Questa diminuzione progressiva dell'acidità si spiega studiando il comportamento dell'acido tartarico e dell'acido malico.

La respirazione è una delle principali cause di questa diminuzione, ma ci sono anche altre cause di diminuzione degli acidi, come per esempio il fatto che l'acido malico si trasforma in zuccheri verso la fine della maturazione. Quindi, il tenore dell'acidità dell'uva che matura, considerato in un dato momento, dipende da fenomeni di migrazione, che portano agli acini questi acidi, e da fenomeni di respirazione che li ossidano con svolgimento di anidride carbonica.

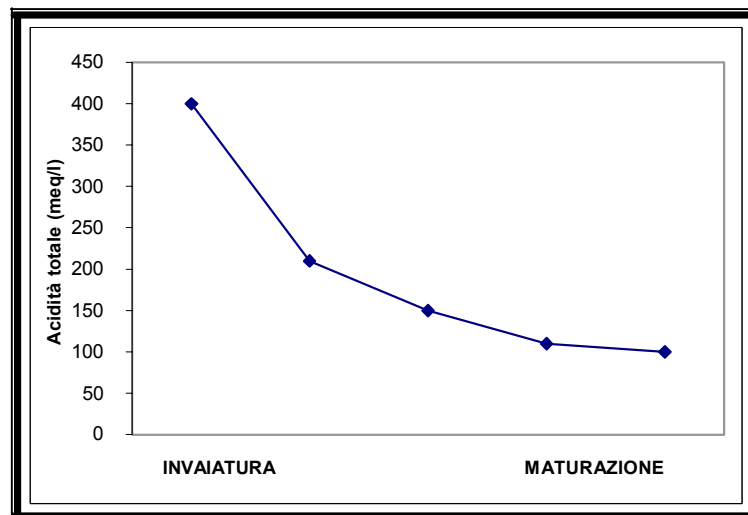


Figura 2. Andamento dell'acidità totale durante le ultime 8 settimane di maturazione.

L'uva sembra essere l'unico frutto coltivato a fini commerciali ad accumulare acido tartarico in quantità apprezzabili (Saito et al., 1968; Ruffner, 1982). Si accumula negli acini prima dell'invasatura e tende a diminuire col tempo, (Ruffner, 1982; Iland et al., 1988).

Si ritiene che l'origine dell'acido tartarico sia esclusivamente legata al gruppo dei carboidrati, e vari composti sono stati identificati come suoi precursori. Il glucosio, in base ad esperimenti di marcatura, è stato il primo ad essere suggerito (Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971) con gradi di trasformazione dello zucchero in acido che si aggirano intorno al 50-60% della quantità di glucosio (Ruffner et al., 1974; Ruffner, 1982). Altri composti identificati come precursori dell'acido tartarico sono l'acido glicolico e l'acido ascorbico.

Il saccarosio, invece, è il principale precursore dell'acido malico negli acini, attraverso processi metabolici quali, la glicolisi e la β -carbossilazione (Ruffner et al., 1976; Ruffner e Hawker, 1977). La maturazione degli acini è accompagnata da una marcata alterazione del metabolismo del malato (Kriedemann, 1968; Possner et al., 1983), e il calo dell'acidità durante la maturazione stessa implica principalmente il consumo di malato (Ruffner et al., 1977; Saito et al., 1978) molto probabilmente dovuto all'azione dell'enzima malico NADP-dipendente (Hawker, 1969; Lakso et al., 1975, 1978). Il quoziente respiratorio ha, infatti, valori vicini all'unità nell'acino verde e aumenta fino ad un valore intorno a due nel frutto dopo l'invasatura (Kriedemann, 1969; Koch et al., 1978), dimostrando la teoria secondo cui la respirazione contribuisce significativamente al degrado del malato.

Perciò, il calo del contenuto di acido malico durante la maturazione è il risultato di una ridotta sintesi di malato, come conseguenza dell'inibizione della glicolisi che porta ad un accumulo di zuccheri (Ruffner et al., 1983a).

L'acido tartarico e l'acido malico non hanno evoluzioni parallele in quanto sono sintetizzati nella vite attraverso vie diverse. Essi non vengono degradati con la stessa intensità: l'acido malico scompare più rapidamente dell'acido tartarico, e mentre il contenuto di acido tartarico nell'acino d'uva varia entro limiti ben ristretti, il tenore in acido malico continua a diminuire, all'inizio con grande rapidità, in seguito più lentamente con l'avvicinarsi della maturazione.

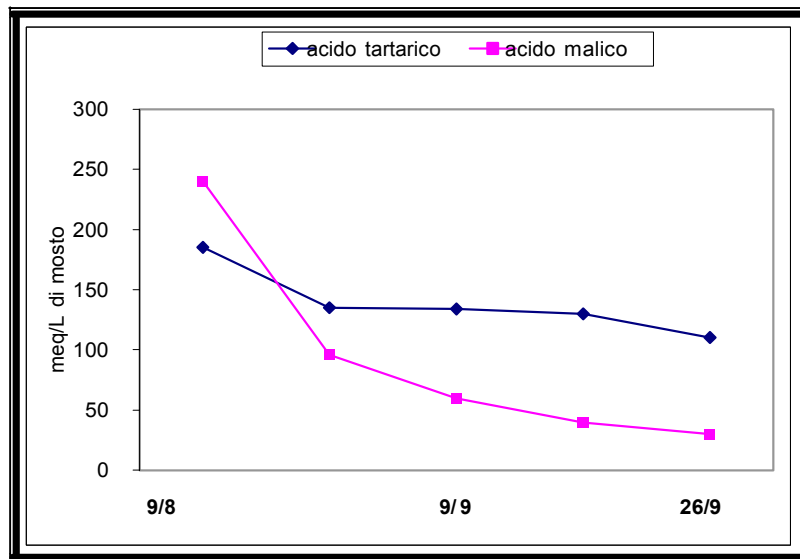


Figura 3. Evoluzione degli acidi malico e tartarico durante la maturazione.

DISIDRATAZIONE DELL'UVA

1.6 Sovramaturazione e appassimento

Nella maggioranza dei vini da dessert si ricorre alla sovraturazione delle uve o al loro appassimento più o meno spinto, non solo per avere una materia prima più ricca di zuccheri, ma anche per avere un prodotto più ricco in profumi, in glicerina, ecc. da cui una maggiore corposità, con una vera e propria ridondanza nei componenti aromatici presenti nel vino finito.

Il maggiore aumento in sostanze ossidabili che così ne deriva, non costituisce di regola un problema poiché è abbastanza comune la ricerca di effetti maderizzanti, derivanti appunto da un ambiente nettamente ossidante.

La sovraturazione si effettua lasciando i grappoli sulla pianta per un tempo, variabile oltre il limite di maturazione normale, quando ovviamente le condizioni climatiche lo consentono.

L'appassimento invece si può fare mantenendo i grappoli sulla pianta, o più comunemente con i grappoli conservati e raccolti in ambienti particolari e disposti su appositi supporti, o ancora ricorrendo all'appassimento artificiale.

In queste situazioni può ricorrere o meno, e in senso positivo o negativo, lo sviluppo della *Botrytis*.

La *Botrytis cinerea*, è un fungo microscopico che in presenza di determinate condizioni ambientali si sviluppa sulla bacca provocando una disidratazione senza degradare la polpa. Le condizioni ideali per lo sviluppo di questa “muffa nobile” sui grappoli, sono tipiche di certe zone d’Italia, in particolare delle regioni interne del centro della Penisola, come l’Umbria, dove la tradizione dell’Orvieto dolce prodotto da uve bottrizzate è molto antica.

Il problema principale legato alla produzione di questi vini riguarda la difficile ammissibilità, da parte del disciplinare di produzione, nell’utilizzo di una percentuale minima di uve bottrizzate.

Questo ostacolo rischia di compromettere una tradizione antichissima, e spesso il vino che si ottiene è il semplice risultato di uve surmature, che difettano della tipica impronta della muffa nobile.

Oggi la produzione dei vini muffati si estende anche ad altre regioni italiane che si cimentano in produzioni simili, ottenendo, talvolta, risultati sorprendenti.

L’uva durante l’appassimento passa da uno stato “vitale” ad uno “non vitale”.

Questo passaggio è strettamente dipendente dai fattori fisici che facilitano il processo di disidratazione quali temperatura ed umidità relativa. È stato visto che trattamenti a temperatura superiori a 50°C, provocano un aumento simultaneo degli zuccheri e dell’acidità; fra i 45°C ed i 50°C un arricchimento in zuccheri senza variazione dei valori di acidità; fra i 40°C ed i 45°C un accrescimento in zuccheri con diminuzione dell’acidità; fra i 35°C ed i 40°C la disacidificazione è l’effetto prevalente sulla concentrazione in zuccheri (Zironi et al., 1987).

In particolare si riscontra un’intensa demolizione dell’acido malico, dei carboidrati (principalmente il glucosio), delle sostanze azotate e una solubilizzazione delle sostanze polifenoliche. Questo contesto varia notevolmente se vi è sviluppo di agenti fungini ed in particolare di *Botrytis cinerea*, che comporta un’ulteriore diminuzione del contenuto glucidico, la scomparsa di acido tartarico e sostanze azotate ed un arricchimento in componenti minori come gli acidi galatturonico, gluconico e succinico, glicerina, polioli, enzimi ossiacidi e sostanze colloidali di varia natura (Corte et al., 2001).

Una variazione consistente durante l'appassimento dell'uva è sicuramente quella aromatica in cui i terpeni giocano un ruolo preponderante soprattutto per le uve aromatiche. Dall'invasatura, i terpeni seguono nelle uve una curva di variazione caratteristica, che comporta cinque fasi. Durante la prima l'insieme dei terpeni aumenta rapidamente, nella seconda si ha un netto rallentamento della crescita e talvolta addirittura un decremento; tale fase ha una durata di sette giorni ed è seguita da un nuovo e rapido incremento che raggiunge il suo massimo (massimo aromatico) a circa otto giorni dall'inizio della fase. Successivamente inizia una diminuzione dei terpeni più o meno rapida, a cui segue la fase di sovraturazione durante la quale continuano a decrescere più lentamente (Boidron et al., 1981; Di Stefano et al., 1995). Nel caso delle uve a sapore semplice, i composti volatili presenti, sono rappresentati essenzialmente da aldeidi ed alcoli a sei atomi di carbonio, oltre ad un numero imprecisato di componenti vari non correlabili alla cultivar. Sia nel caso delle uve aromatiche che in quelle a sapore semplice, la vitalità cellulare e l'intensità dello stress idrico e osmotico durante l'appassimento, possono modificare significativamente il profilo aromatico con formazione di composti di fermentazione degli zuccheri e di amminoacidi (alcoli) e loro derivati, per reazione con gli acidi a dare esteri e lattoni (Sanz et al., 1997).

1.7 Utilizzo dell'ambiente naturale.

In alcuni casi la fase di arricchimento delle uve mature si limita alla conservazione dei grappoli ancora sulla pianta per un tempo dell'ordine di due settimane oltre il normale momento della maturazione (condizioni meteorologiche permettendo). È questo ad esempio il caso del Picolit, vino da dessert dalle caratteristiche del tutto particolari, che rifugge dalla maderizzazione. A tale scopo ben si prestano i suoi grappoli spargoli (o addirittura con acini radi), sui quali si può intervenire con la torsione a mano del peduncolo onde interrompere l'afflusso di liquido dalla pianta per impedire il parziale reintegro della frazione traspirata. Certo che, con questo sistema si incorre facilmente in sensibili perdite per azione degli uccelli (le altre uve sono già vendemmiate) e per le condizioni meteorologiche

avverse. È per tali motivi che di solito si preferisce la raccolta dell'uva matura ed il suo appassimento in condizioni di maggior controllo e praticità.

Le uve raccolte possono essere poste su stuoie collocate a terra, laddove le condizioni di soleggiamento siano buone, con l'ausilio di copertura notturna dei grappoli contro le condense di rugiada che, fra l'altro, favorirebbero un marciume indesiderato.

Le uve possono ancora essere disposte su graticci di cannuccia sovrapponibili, posti in locali ben asciutti e ventilati detti "fruttai". In questi stessi locali le uve possono essere collocate o in piccoli plateaux sovrapposti, disposte in un unico strato, o in reti verticali su cui si fa impigliare un'ala di ciascun grappolo, o ancora in catene verticali di ganci di ferro ad S (quest'ultime consentono adeguati scuotimenti dei grappoli allo scopo di eliminare gli acini deteriorati affinché non restino a contatto con quelli sani).

Altre volte si ricorre semplicemente a strati di paglia disposti all'aperto o al coperto a seconda delle possibilità offerte dal clima locale. Da ciò il noto nome di "vins de paille" con cui in Francia sono chiamati alcuni vini da dessert.

Comunque, all'aperto o al coperto, è di fondamentale importanza il mantenimento di una bassa umidità relativa dell'ambiente, per contrastare lo sviluppo di marciumi.

A tale proposito notevole importanza viene attribuita anche alla varietà di uva così conservata, in relazione alla robustezza della buccia e dello strato protettore di pruina. Si ottengono così dei cali ponderali mediamente fra il 20 e il 35%.

La fase di appassimento va considerata peraltro come sede di fenomeni distruttivi. Anche se percentualmente vi è un arricchimento in zuccheri per disidratazione, in realtà il peso netto degli zuccheri della massa cala, e talvolta anche cospicuamente.

Tale evento trova ragione nel fatto che, specialmente per temperature dell'ordine dei 35°C (caso del soleggiamento) si verifica un'attiva respirazione cellulare, con conseguente consumo di zuccheri; ma non soltanto quest'ultimi sono coinvolti nel fenomeno respiratorio. Notevole è pure il decremento degli acidi, anzi il loro calo per combustione è proporzionalmente maggiore di quello degli zuccheri (Amati et al., 1983).

A tal proposito, nell'appassimento senza intervento di *Botrytis*, è l'acido malico quello maggiormente soggetto a combustione respiratoria, specialmente a

temperature dell'ordine di 35°C. A questa temperatura la respirazione è 6-7 volte più intensa che a 15°C, mentre a temperature superiori, ad esempio a 60°C, le cellule muoiono e la respirazione cessa. A quest'ultima temperatura cioè si verifica solamente la disidratazione, senza diminuzione respiratoria degli acidi, i quali anzi risultano così aumentati per concentrazione da disidratazione.

L'acido tartarico diminuisce invece di poco, poiché subisce una combustione nettamente minore rispetto al malico. Il citrico invece non viene interessato dal fenomeno respiratorio per cui ne risulta un certo aumento, sempre per disidratazione. Altri componenti che aumentano sono i componenti fosforati e azotati nonché i polisaccaridi. Le modificazioni della parete cellulare causano poi una buona migrazione del colore al succo, rilevabile al momento della pigiatura o pressatura delle uve così conservate.

Certamente nei primi giorni, quando l'umidità è ancora elevata, e gli acini molto ricchi in liquido, il rischio dell'attacco fungino è molto alto. Dopo qualche tempo invece la disidratazione già avanzata ostacola sensibilmente l'alterazione sanitaria (De Rosa, 1987).

1.8 Utilizzo di un ambiente artificiale

Poiché l'appassimento in fruttajo è un sistema sensibilmente aleatorio per il pericolo di sopravvenienze patogene, e di lunga durata (anche fino a qualche mese) per cui richiede un elevato immobilizzo economico e strutturale (locali cioè di notevole ampiezza e impegnati per tempi molto lunghi, oltre ad essere spesso costruiti solo per tale intendimento), destano interesse i sistemi di appassimento artificiale mediante l'uso di celle condizionate dal punto di vista igrotermico.

Mediante l'utilizzo di aria riscaldata, con un umidità relativa notevolmente contenuta (ad esempio: 30°C con un umidità relativa del 60%), si riduce il tempo di appassimento ad 1/6 o ad 1/8 del tempo necessario per l'appassimento naturale in fruttajo, con un calo in peso del 35-45%.



Figura 4. Cella di appassimento.

Sempre a titolo di esempio: mentre dopo 80 giorni di fruttajo si può avere un calo intorno al 25%, dopo 10 giorni di cella condizionata si raggiunge il suddetto 35-45%. Altri vantaggi riguardano l'evidente risparmio di mano d'opera, la riduzione delle perdite per marciume volgare, l'aumento della concentrazione in zuccheri di un 35-55% favorita dall'assenza della loro demolizione ad opera della *Botrytis*, il cui sviluppo è nettamente ostacolato dalla bassa umidità relativa adottata, notevole diminuzione dell'acido malico, più spinta che nel fruttajo tradizionale, scarsa diminuzione dell'acido tartarico, da cui in conclusione un moderato aumento dell'acidità per disidratazione, con un aumento di glicerina, nel vino risultante, dello stesso ordine che nell'appassimento in fruttajo (De Rosa, 1987).

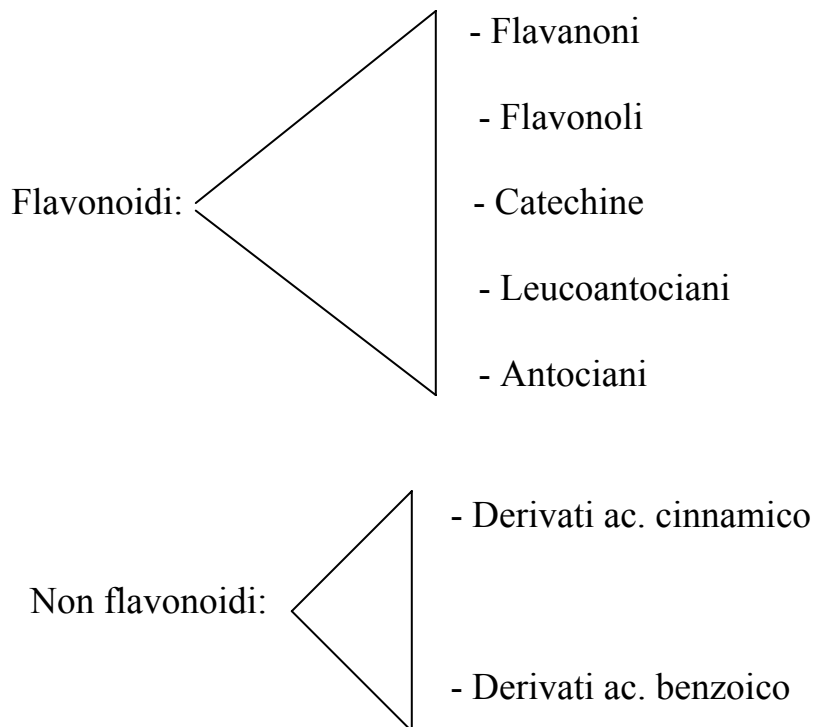
CAPITOLO II

COMPOSTI FENOLICI ED ETILENE

2.1 Sintesi di composti fenolici

Durante la maturazione dell'uva in particolare nelle varietà a bacca rossa è possibile osservare un cambiamento della colorazione dovuto alla perdita di clorofilla e ad un accumulo di fenoli la cui importanza è oggi ampiamente verificata sia perché ricoprono un ruolo fondamentale in quanto, sono responsabili del colore, del gusto e dell'aroma del frutto fresco e quindi dei vini, sia perché sono state qualificate, in base a recenti studi, come molecole in grado di poter prevenire e contrastare malattie cardiovascolari nell'uomo.

Le sostanze polifenoliche sono localizzate principalmente nelle parti solide del grappolo cioè nelle buccie, nei vinaccioli, nei raspi e vengono classificati in due gruppi (Singleton et al., 1969; Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971):



2.2 Antociani

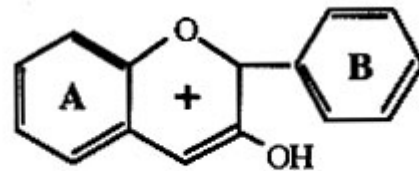
Gli antociani non esistono in natura sotto la forma antocianidina bensì sotto la forma antocianina (glucoside), in quanto le antocianidine (aglicone) sono sempre esterificate da una o più molecole di zucchero, il che conferisce loro stabilità e tale complesso prende il nome di antocianina o antociano nel linguaggio comune.

Le antocianine sono i principali pigmenti coloranti dell'uva e possono essere distinti in pigmenti "primitivi", come la cianina e la delphinina, e pigmenti "stabili", come la peonina e la malvina (Roggero et al., 1986). Sono costituiti da due anelli benzenici uniti mediante un anello eterociclico e presentanti a seconda dell'antociano, varianti ai vertici degli anelli benzenici o dell'anello eterociclico. I gruppi sostituenti sono -OH in posizione 3, 5, 7. Si trovano in forma glicosilata, ovvero i gruppi fenolici sono legati a saccaridi (mono, di, tri...) con legame glucosidico (saccaride reagisce con l'alcol formando un glucoside), normalmente in posizione 3 ma può essere anche in posizione 5. I saccaridi che più spesso formano questi legami sono glucosio, ramnosio e galattosio. Nella *Vitis vinifera* la glicosilazione avviene con monoglicosidi in posizione 3 mentre nelle viti americane con diglucosidi. E' quindi possibile scoprire eventuali frodi e tagli attraverso la tecnica cromatografica, che separa le varie componenti. Gli agliconi presentano ai vari vertici, dei gruppi ossidrilici (OH) e talvolta anche gruppi metossilici (-OCH₃) ed in base alla loro posizione deriva l'esistenza nelle uve rosse, di sei agliconi: cianidina, delphinidina e pelargonidina se presentanti solo gruppi ossidrilici; malvidina, petunidina e peonina se presentanti anche gruppi metossilici. L'aglicone del glucoside si chiama antocianidina. I glucosidi possono essere acilati, cioè si formano esteri tra il gruppo alcolico dello zucchero e un acido, che di solito è il paracumarico o il cinnamico. Ci può essere idrolisi del legame glucosidico, con conseguente produzione dell'antocianidina e dello zucchero.

Lo ione flavilio è la parte reattiva grazie alla carica positiva sull'ossigeno (elettrondeficenza), e si stabilizza solo dopo l'acquisto di elettroni.

Al variare del pH la struttura e il colore subiscono modificazioni, il colore tende al blu a pH alcalini mentre a pH neutri prevale la forma incolore, a pH acidi è stabile

la colorazione rossa. Anche l'ossidazione di SO₂ porta a prodotti incolori ma reversibili, infatti al momento della svinatura la presenza di ossigeno favorisce il ritorno del colore.



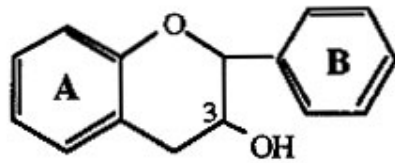
antocianidina

Le antocianidine in soluzione possono essere libere o legate ai tannini, quest'ultimo caso avviene durante l'invecchiamento, creando il tipico colore rosso mattone.

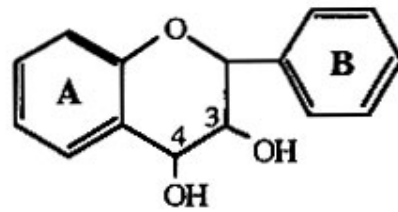
L'accumulo delle antocianine nelle bucce procede parallelamente, all'incremento del contenuto zuccherino ed è localizzata soprattutto nei primi 3-6 strati subepidermici (Kataoka et al., 1983; Hrazdina et al., 1984), in particolare i contenuti di cianina e di delphinina crescono fortemente durante le prime settimane di maturazione, diminuendo lentamente fino alla vendemmia, indice della loro trasformazione in pigmenti stabili. La sintesi e l'accumulo di antocianine negli acini è influenzata da diversi fattori esogeni, tra questi la luce, la temperatura, il volume del raccolto e l'area della foglia (Buttrose et al., 1971; Kliewer et al., 1971; Ribéreau-Gayon, 1971,1972;); ed inoltre hanno un'importanza affatto trascurabile i regolatori della crescita della pianta e, in particolar modo l'etilene, oggetto del nostro studio, e l'acido abscissico (ABA) che incrementano la biosintesi degli antociani. Gli zuccheri endogeni erano considerati le cause agenti della sintesi di antocianine e altri composti fenolici (Pirie e Mullins, 1976, 1977), ma altre ricerche hanno dimostrato che i trattamenti che aumentano il tasso sintetico delle antocianine, come la luce e l'etilene, non hanno effetti sui livelli di zucchero negli acini (Wicks e Kliewer, 1983). Tuttavia non è stato stabilito se questi trattamenti influiscono sulla redistribuzione dei carboidrati solubili tra gli strati cellulari epidermici e subepidermici e tra gli organuli subcellulari e i composti senza influire sul totale dei carboidrati solubili della buccia.

2.3 Flavoni

Sono fenoli caratterizzati come gli antociani da un gruppo ossidrilico al vertice 3. Nei vini bianchi sono presenti in quantità molto modeste e tali da non interferire sul colore mentre nei vini rossi la loro presenza è in proporzioni nettamente superiori.

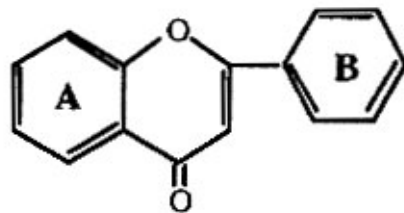


flavanolo (flavan-3-olo)

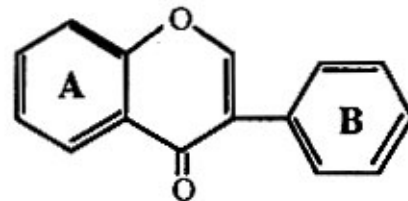


flavandiolo (flavan-3,4-diolo)

Nelle varietà di uva rossa, i flavoni sono meno presenti rispetto alle antocianine ma, la copigmentazione di antocianine con flavonoli influenza l'intensità del colore nell'uva. La loro colorazione caratteristica è gialla, (dal latino flavus = giallo) mascherata nei vini rossi dal rosso-violaceo coprente degli antociani.



flavone



isoflavone

I più importanti flavoni riscontrati nelle uve sono: il 3-glucoside di kaempferolo, la quercitina, la miricetina e la quercitina 3-glucoronide (Ribéreau-Gayon, 1964; Cheynier et al., 1986).

2.4 Tannini

Tra le sostanze polifenoliche ricordiamo i tannini, composti fenolici (alcoli aromatici) con strutture molto complesse e pesi molecolari compresi fra 500 e 3000. i quali formano complessi insolubili con le proteine e altri composti. Per la maggior parte i tannini sono contenuti nel raspo e si definiscono idrolizzabili, diversi da quelli condensati presenti nella buccia che quindi si ritrovano principalmente nei vini rossi.

Nei tannini idrolizzabili, il polimero può essere idrolizzato con produzione di monomeri i quali vengono aggiunti nelle operazione di chiarifica oppure sono presenti nel legno delle botti da invecchiamento.

I tannini condensati invece sono polimeri che hanno da 2 a 8 unità monomeriche che per essere stabili, il loro peso molecolare deve oscillare tra 600 e 2500 g/mol.

I tannini presenti nell'uva sono dei tannini condensati, costituiti da da 2 a 8 unità monomeriche di flavolani, la formula generale e' simile a quella degli antociani, con le differenze che l'anello centrale ha legami semplici e non c'è lo ione flavilio.

Durante la maturazione, la concentrazione dei fenoli totali negli acini aumenta generalmente per un breve periodo all'inizio del processo di crescita, per poi presentare una leggera fase di declino (Dumazert et al., 1973; Kataoka et al., 1983; Singleton, 1966). Tuttavia i fenoli totali per acino aumentano fino a maturazione piuttosto tarda, mostrando che i processi responsabili della loro sintesi sono ancora attivi, anche se con produzioni minori (Singleton, 1966).

2.5 Etilene e maturazione dell'uva

L'etilene sembra non avere un ruolo molto importante durante le fasi della maturazione infatti per questo motivo l'uva rientra tra i frutti non climaterici che non reagiscono allo stimolo di tale ormone.

La più alta concentrazione di etilene endogeno si verifica durante l'antesi successivamente diminuisce rapidamente mantenendosi a livelli bassi e costanti fino alla maturazione (Coombe et al., 1973; Weaver et al., 1978)

Tuttavia la produzione dell'etilene durante e dopo l'invasatura cresce lievemente presentando un picco nella concentrazione dell'etilene interno (fino a 0.4 mL/L) (Alleweldt et al., 1977) o nella sua produzione (fino a 0.5 mL/kg per giorno) e, nonostante ciò, questo non è correlato con un aumento del clivaterio respiratorio. D'altro canto, il forte incremento nei valori del quoziente respiratorio dopo l'invasatura, unito alla simultanea diminuzione degli acidi, all'accumulo massiccio di zuccheri e al cambiamento di colore, suggerisce un'alterazione delle caratteristiche fisiologiche e biochimiche dell'acino, in cui l'etilene, anche se in piccole quantità, solo o combinato con altri ormoni, può avere un ruolo importante.

Durante la crescita e la maturazione, i livelli di acido abscissico (ABA) e etilene prodotti nel frutto, come risposta ai composti a base di etilene o rilascianti etilene, mostrano che i livelli endogeni di ABA nella polpa possono mediare la reazione all'etilene esogeno o endogeno (Coombe et al., 1973). L'ABA deve accumularsi fino ad un certo valore soglia al fine di agire in modo sinergico con l'etilene nella stimolazione della maturazione. Di conseguenza, la maturazione dell'acino è ritardata, se l'ABA è sotto il livello soglia, e innalzamenti di etilene applicato in modo esogeno o indotto, mantengono l'ABA a livelli bassi. Tale implicazione dell'ABA nella maturazione dell'acino potrebbe coinvolgere cambiamenti nella permeabilità della parete cellulare durante l'invasatura, permettendo ai carboidrati e all'acqua di entrare più velocemente nelle cellule dell'acino (Alleweldt et al., 1975). In alternativa, l'ABA sembra aiutare la maturazione accelerando la gluconeogenesi (Palejwala et al., 1985).

L'effetto dell'etilene esogeno, o dei composti rilascianti etilene sotto il nome generico di "etephon", è stato ampiamente discusso negli ultimi 10-15 anni (Szyjewicz et al., 1984). In generale l'applicazione spray di "etephon" accelera lo sviluppo del colore nelle varietà rosse, fa aumentare il contenuto in solidi solubili, riduce l'acidità, induce l'abscissione degli acini (facilitando così la raccolta meccanizzata), e diminuisce la consistenza e la solidità di alcune varietà di uva (Szyjewicz et al., 1984).

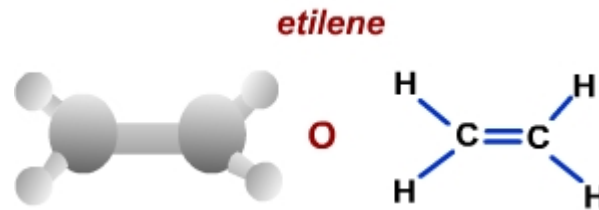


Figura 5. Struttura chimica dell'Etilene.

Il trattamento con l'etilene nei frutti non climaterici provoca una iperproduzione respiratoria ma senza cambiamenti significativi a livello metabolico, ad eccezione di un effetto sulla colorazione dell'epicarpo.

La potenzialità dell'etilene nell'espressione della trascrizione dei geni, accelerando la sintesi di antocianidina, è stata studiata da molti autori, primo fra tutti Loulakakis (1997), dimostrando che l'etilene induceva la trascrizione di un gene denominato *pvmom1* in colture di cellule di uva in sospensione, inoltre un elemento di risposta è stato individuato anche nel *Vvht1* (*vitis vinifera* esoso transporter1) gene promotore dell'uva (Fillion et al., 1999). Recentissimi studi nell'ambito della genetica molecolare hanno infine evidenziato che nelle uve trattate con etilene durante l'invasatura si verifica un accumulo del 30% rispetto al controllo, di una maggiore trascrizione dei geni responsabili della via biosintetica degli antociani che codificano per calcione sinteasi (CHS), calcione isomerasi (CHI), flavone 3-idrossilasi (F3H), 3-O-glicosilasi transferasi (UFGT) leucoantocianidina diossigenasi (LDOX), diidroflavonol 4-riduttasi (DFR), tutti enzimi responsabili della biosintesi di antocianidine (Kobayashi et al. 2001).

Altre tesi sono state formulate per quanto riguarda gli effetti dell'etilene sulla risposta ad attacchi di patogeni e sembrerebbe che essa abbia un ruolo chiave nell'espressione di alcuni geni deputati alla biosintesi di molecole di risposta allo stress causato ad esempio dalle basse temperature e dalle infezioni virali, (Reid et al., 1997; Choi e al., 1996).

2.6 Glicosidasi ed enzimi di parete

La cellulosa è il più abbondante polisaccaride presente nella parete cellulare (da 30% al 50%) e si presenta sotto forma di microfibrille costituite da arrangiamenti paracristallini di catene di β 1-4 glucosio.

La pectina è costituita da tanti monomeri di acido galatturonico, legati 1,4 e più o meno esterificati. Realmente però non è un colloide lineare, ma ci sono dei gruppi di ramnogalattani e arabinogalattani, legati tra di loro in una conformazione che non è lineare ma che può portare una o più ramificazioni, quindi tende ad avere una struttura globulare, con la quale è più facile che si abbiano delle interazioni con il mezzo circostante. Agli estremi della catena ci sono gruppi funzionali (molti gruppi oh), che possono interagire con il mezzo circostante e formare soprattutto ponti ad idrogeno con l'acqua. Queste sostanze contengono dei gruppi acidi che fanno capo all'acido galatturonico e numerosi zuccheri (arabinosio, galattosio, mannosio, ecc.). Non ce ne sono grandi quantità nel mosto e nei vini, proprio per effetto degli enzimi pectolitici endogeni o esogeni, queste sostanze colloidali ci interessano nelle prime fasi di vinificazione.

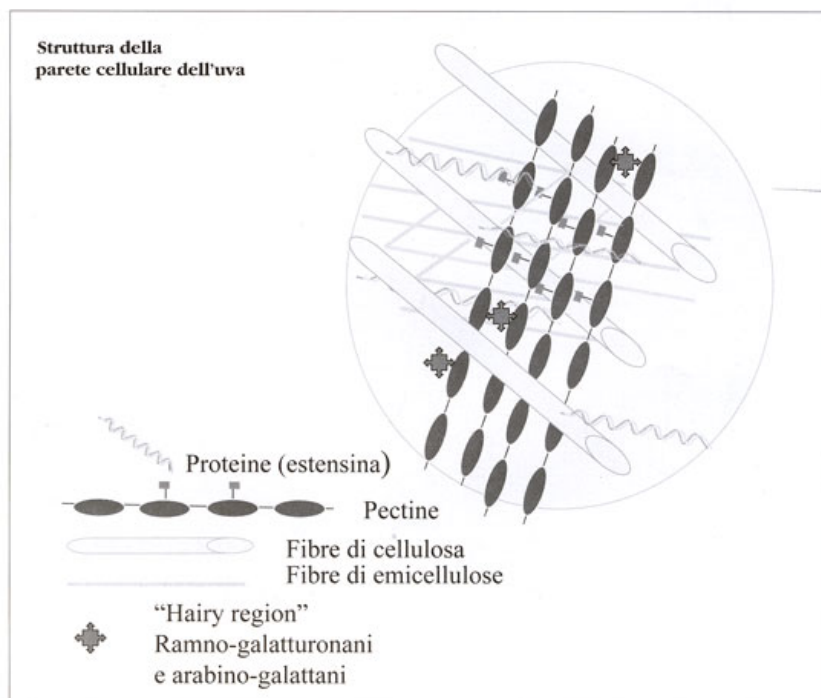


Figura 6. Struttura semplificata della parete cellulare dell'uva.

Sulla struttura del vino finito sono molto più importanti i polisaccaridi a carattere neutro, che hanno strutture simili agli arabinani e agli arabinogalattani 2 che si trovano nei polisaccaridi acidi, però hanno ramificazioni minori e pesi molecolari molto più elevati. Mentre i polisaccaridi acidi sono costituiti da zuccheri e acidi uronici, i polisaccaridi neutri hanno all'interno anche una frazione costituita da amminoacidi e peptidi. Quindi sono strutture colloidali costituite non solo da zuccheri, ma anche sostanze di tipo azotato.

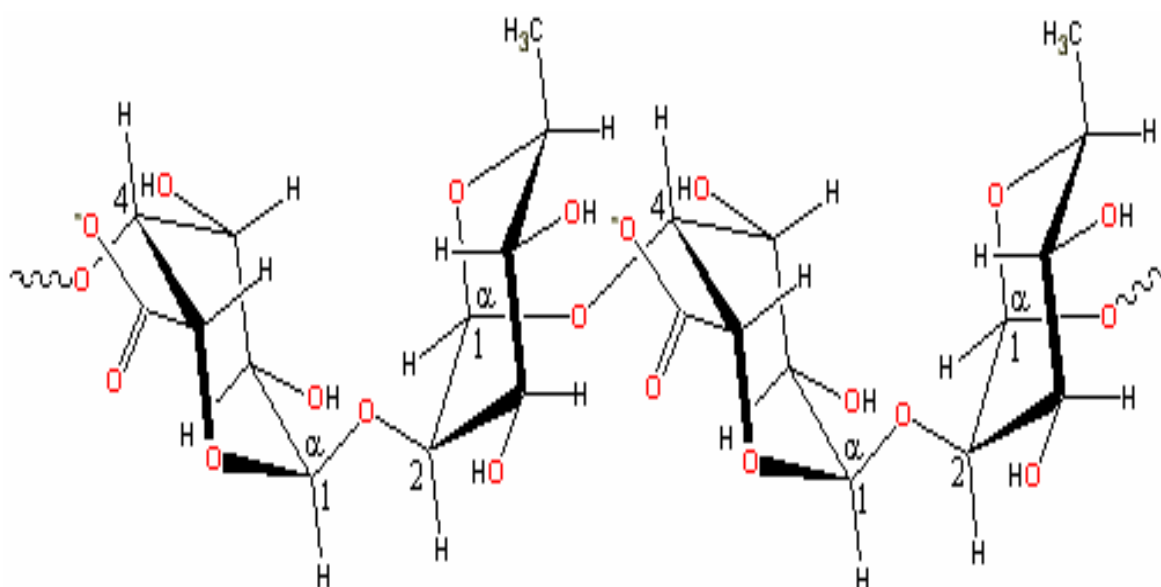


Figura 7. Struttura chimica della pectina.

La pectin metilesterasi è un enzima che gioca un ruolo molto importante nella fisiologia e nel metabolismo della maggior parte delle piante superiori durante la crescita cellulare, ma è prodotto anche da diversi microrganismi, soprattutto patogeni, come *B.cinerea* (Lee *et al.*, 1979). La PME agisce sui polisaccaridi strutturali della parete cellulare vegetale e catalizza selettivamente l'idrolisi di gruppi metilici in posizione 6 dell'acido galatturonico, liberando metanolo (Figura 4) e rendendo la pectina altamente polimerizzata, suscettibile di ulteriore depolimerizzazione grazie alle poligalatturonasi (PG). Questa degradazione provoca la perdita di consistenza dei frutti durante la maturazione.

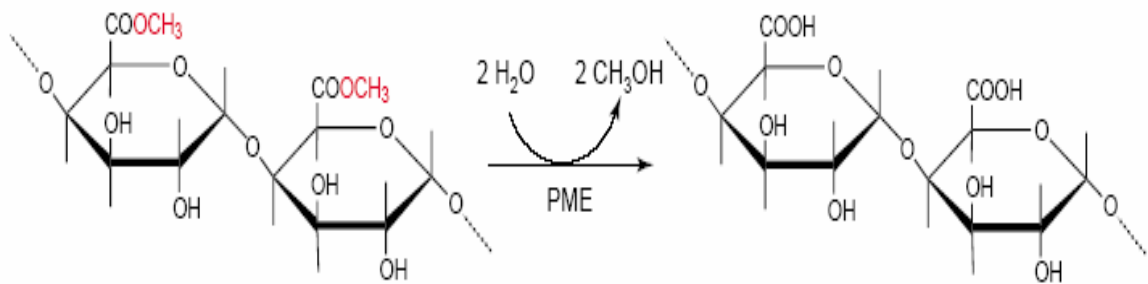


Figura 8. Meccanismo di idrolisi della pectin metilesterasi.

I preparati enzimatici pectolitici, comunemente chiamati "**pectinasi**", racchiudono delle attività pectinasi, emicellulasi e cellulasi concomitanti, e sono costituiti da un pool di diverse attività in grado di rompere la catena delle pectine solubili in punti diversi:

- la poligalatturonasi scinde il legame tra due molecole di acido galatturonico i cui gruppi acidi non sono esterificati con alcol metilico;
- la pectin metil esterasi rompe il legame estere con l'alcol metilico.

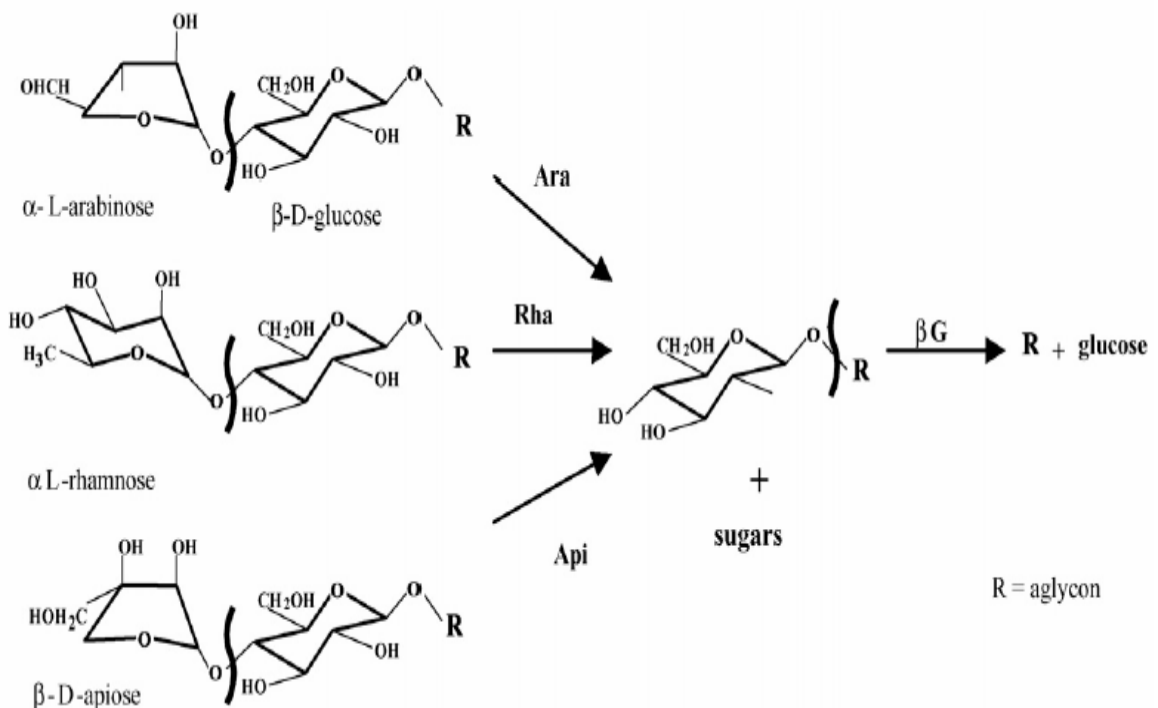


Figura 9. Sequenza del meccanismo di azione delle glicosidasi.

Queste attività permettono di idrolizzare i polisaccaridi acidi e neutri dell'uva che, localizzati nella parete pectocellulosica e nella lamella mediana delle cellule dell'acino, conferiscono rigidità. I polisaccaridi idrolizzati in frammenti di varie dimensioni e liberati nel mosto permettono di ridurre considerevolmente la viscosità dei mosti e, eliminando la funzione colloidale protettiva sulle altre macromolecole, facilitano la successiva fase di defecazione dei mosti e cioè l'allontanamento delle parti solide con le fecce grossolane.

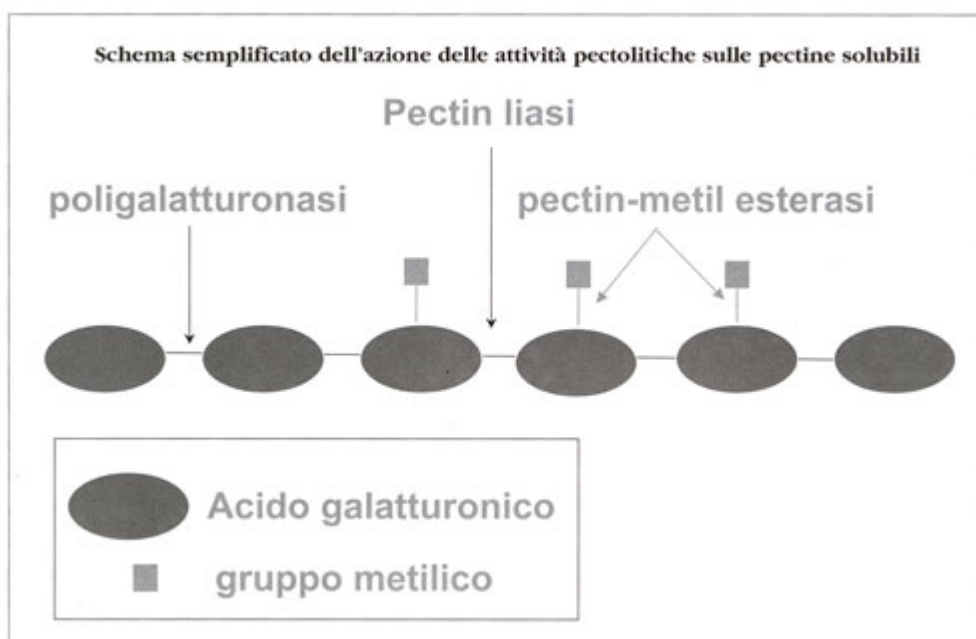


Figura 10. Schema semplificato dell'azione degli enzimi pectolitici.

CAPITOLO III

LA MACERAZIONE

3.1 Principi della macerazione

Il passaggio nel succo in fermentazione dei costituenti della vinaccia, in particolare dei composti fenolici (antociani e tannini), dipende da diversi fattori elementari la cui risultante costituisce la cinetica globale della macerazione. I fenomeni sono complessi e non si limitano ad un aumento regolare delle sostanze estratte. In effetti, tra i diversi fattori, alcuni tendono ad aumentare i composti fenolici altri a diminuirne il tenore e non agiscono necessariamente nello stesso modo sui diversi costituenti di questa famiglia. Alcuni meccanismi che regolano la macerazione:

Estrazione e dissoluzione delle diverse sostanze. La dissoluzione è il passaggio di un costituente dai vacuoli delle cellule delle parti solide della vinaccia nella fase liquida. Questa dissoluzione dipende prima di tutto dalla varietà e dallo stato di maturazione delle uve; ciò è ben evidente nel caso degli antociani: in alcuni casi, dopo la pigiatura delle uve, si ottengono mosti intensamente colorati, in altri casi bisogna attendere 24-48 ore per una estrazione efficace. La dissoluzione è facilitata anche dalla distruzione dei tessuti, sia per via enzimatica, sia per la loro frantumazione di tipo meccanico, che è tanto più rilevante quanto più la pigiatura è intensa. Essa dipende, infine, dalle diverse operazioni che concorrono alla lacerazione delle cellule provocata dalla distruzione dei tessuti: solfitazione, anaerobiosi, presenza di etanolo, temperature elevate, tempo di contatto.

Diffusione nella massa delle sostanze estratte. La dissoluzione si produce nella vinaccia, il liquido che si impregna diventa rapidamente saturo di costituenti estratti e gli scambi si arrestano. L'ulteriore dissoluzione dipende dalla diffusione nella massa delle sostanze così estratte. Questa diffusione è assicurata essenzialmente dal rinnovamento del mosto che impregna le vinacce, effettuato mediante i rimontaggi o per affondamento (follatura) delle vinacce.

Naturalmente, la quantità di antociani e di tannini che si ritrova nel vino dipende, prima di tutto, dal loro tenore nella materia prima e, in tale ottica, uve ben mature costituiscono la prima condizione per ottenere un vino ricco e colorato. Nel vino non si ritrova che una frazione della quantità potenzialmente estraibile presente nelle uve; essa dipende, da una parte, dalla facilità di estrazione dei composti fenolici e, dall'altra, anche dai procedimenti di estrazione adottati. Il dosaggio dei composti fenolici nelle diverse parti del grappolo ed il confronto con i tenori ritrovati nel vino, nella media, indica che solamente circa il 20-30% della quantità potenzialmente estraibile delle uve si ritrova nel vino.

3.2 Influenza del tempo di macerazione

La dissoluzione dei composti fenolici, contenuti nelle parti solide del mosto in fermentazione, varia in funzione del tempo; ma non esiste proporzionalità tra la durata della macerazione ed il tenore in composti fenolici. Si sa anche che l'intensità colorante, cresce per 8-10 giorni, e in seguito diminuisce. Osservando le curve nella figura di seguito riportata, si nota bene l'andamento dell'intensità colorante con un massimo all'8° giorno, seguito da una diminuzione nei giorni successivi.

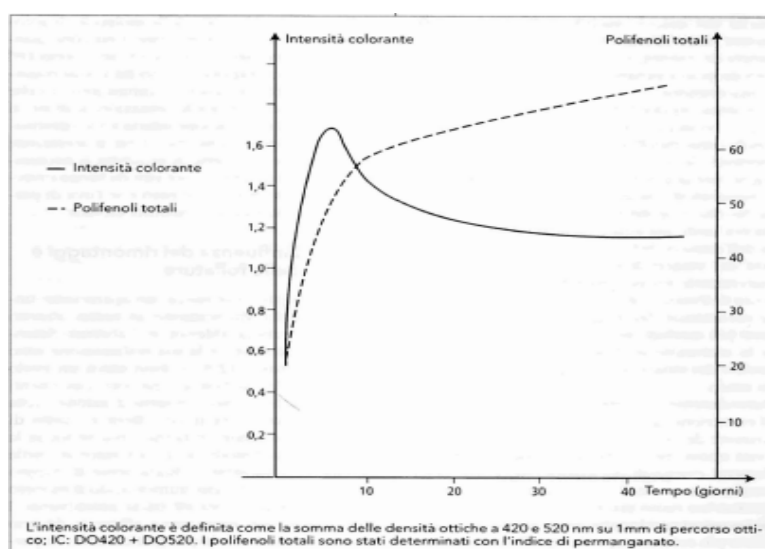


Figura 11. Andamento dell'intensità colorante e dei polifenoli totali nel corso della macerazione.

L'evoluzione dei polifenoli totali è diversa: dopo una prima fase che dura qualche giorno, in cui il loro aumento è molto rapido, si osserva un rallentamento. La differenza nel comportamento dipende dalla concentrazione in tannini, circa 10 volte più rilevante nelle uve (bucce e vinaccioli) di quella degli antociani. In un caso come nell'altro, si verifica un aumento nei primi giorni, in seguito le perdite sono in proporzione molto meno importanti per i tannini, per i quali il bilancio globale di variazione resta sempre positivo.

I diversi organi del grappolo (bucce, vinaccioli, raspi) possiedono composti fenolici specifici la cui estrazione è variabile in funzione delle condizioni. Gli antociani delle bucce, per la cui dissoluzione non è necessaria la presenza di etanolo, sono estratti per primi. La dissoluzione dei tannini delle bucce comincia più tardi, ma essa è facilitata dalla comparsa dell'etanolo. Infine, per l'estrazione dei tannini dei vinaccioli è necessario un tempo di macerazione ancora più lungo, perché la presenza dell'etanolo è necessaria per l'eliminazione preliminare dei lipidi dei vinaccioli. I tannini delle bucce sono più morbidi, ma possono diventare amari se la maturazione delle uve è insufficiente; quelli dei vinaccioli sono più rugosi, ma meno amari.

Naturalmente, queste informazioni relative all'evoluzione del colore e degli antociani in funzione del tempo di macerazione riguardano i vini di "pronta beva", per i quali gli antociani sono gli elementi essenziali del colore. Nel corso della conservazione e dell'invecchiamento, i tannini giocano un ruolo fondamentale ed i vini ottenuti con lunghe macerazioni risultano, allora, più colorati rispetto a quelli prodotti con macerazioni brevi, anche se all'inizio si osserva il contrario. Una macerazione lunga, quindi, permette di acquisire la necessaria ricchezza di tannini per vini da lungo invecchiamento, a condizione però che l'uva di partenza ne contenga una quantità elevata.

3.3 Macerazione con enzima.

E' stata condotta un'ulteriore prova alle medesime condizioni sopra citate, prevedendo l'aggiunta, per ciascun un campione in macerazione di 1,5 g di enzima Lafazym CL per uso enologico. Lafazym CL è un preparato enzimatico che stimola

l'attività pectinasica; il formulato commerciale viene preparato a partire da un estratto purificato e concentrato di substrati di coltura di ceppi selezionati di *Aspergillus niger* non OGM. I tempi e le modalità di campionamento per questa seconda sperimentazione sono state le medesime condotte per la prima prova.

3.4 Caratteristiche della varietà Montepulciano d'Abruzzo.

La varietà utilizzata per questo studio è stata il Montepulciano d'Abruzzo detta anche Uva abruzzese o Torre di Passeri. Da sempre considerata erroneamente come sinonimo di Sangiovese, la cultivar ha origini pressoché sconosciute, si pensa sia stata introdotta in Abruzzo intorno al XIX secolo mentre oggi è coltivata in tutta l'Italia centro-meridionale ad eccezione della Calabria. Questo vitigno è caratterizzato da foglie di grandezza media la cui pagina superiore è di colore verde carico e bollosa, mentre la pagina inferiore risulta verde grigiastro e lanuginosa. Produce grappoli a media bassa altezza, di media grandezza, di forma conica, serrati e spesso alati con acini subovali, buccia pruinosa di colore nero violaceo consistente e quasi coriacea, mentre la polpa risulta sciolta o quasi molle a sapore semplice. Il vitigno è di media vigoria e produttività, preferisce terreni a medio impasto e profondi, per una perfetta maturazione necessita di climi caldi o colline ben esposte; l'epoca di germogliamento è tardiva mentre quella di maturazione è di quarta epoca (1-7 ottobre). Il vino ottenuto da quest'uva è di colore rosso rubino o granato, di sapore asciutto, neutro, tannico, alcolico, adatto alla media e lunga conservazione. Entra nella composizione del vino D.O.C. Montepulciano d'Abruzzo e di numerosi altri vini del centro e sud Italia.

3.5 Caratteristiche della varietà Aleatico.

In Italia il vitigno venne introdotto dai Greci in tempi molto remoti. Questa varietà, molto probabilmente, è una variazione del Moscato Nero.

Il vitigno entra in diversi disciplinari come componente di svariate doc, le più importanti delle quali sono l'Elba Aleatico e Val di Cornia in Toscana e l'Aleatico di Gradoli nel Lazio e le varie doc presenti territorialmente in Puglia.

Oggi, pur essendo diffuso in molte regioni della penisola, viene coltivato principalmente in Toscana, Puglia, Lazio, Campania e Sicilia, dove aggiunge una sfumatura dolce, simile a quella del moscato, ai profumi degli uvaggi locali. Il grappolo è spargolo, piramidale, alato, con peduncolo erbaceo di colore verde chiaro. L'acino è medio-grande, ellissoide, con buccia spessa e pruinosa, di colore verde in ombra, giallo o tendente al bruno se esposta al sole; la polpa è croccante e piuttosto tannica. I mosti presentano generalmente una acidità totale media scarsa.

Il vino si presenta rosso granato con la ricchezza aromatica del moscato, ha sapore fruttato, morbido e vellutato. In passato era allevato ad alberello basso con pochi speroni (2-3), con produzioni limitate e contenuto zuccherino elevato; attualmente la forma di allevamento più comune è la spalliera, con rese tuttavia contenute per mantenere nel vino i caratteri di morbidezza e corposità, quella “forza calorica”, garbata ma evidente al palato, che testimonia la “solarità” delle sue origini.

CAPITOLO VI

MATERIALI E METODI

4.1 Procedure di trattamento.

L'uva di varietà Aleatico è stata accuratamente raccolta dopo una valutazione in campo della piena maturazione ed immediatamente portata al laboratorio di postraccolta della facoltà per essere sottoposta al trattamento con etilene.

L'uva è stata selezionata accuratamente scartando i grappoli malati e quelli che non avevano caratteristiche omogenee per entrare a far parte del campione (grado di maturazione globale del grappolo, grado di compattezza, dimensione).

I campioni selezionati sono stati per 48 ore a contatto con una atmosfera di etilene 1000 ppm in aria a 20°C , successivamente il campione trattato e uno di riferimento (che è tal quale dopo la raccolta senza il trattamento con etilene) sono stati inseriti in una cella di appassimento con elevata umidità relativa 45% (± 5), a 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e con ventilazione forzata a 1 m/s con un assorbitore di CO₂ al carbonato di calcio, il tutto per sottoporre i campioni a disidratazione controllata.



Figura 12. Uva in cassette pronte per l'appassimento in cella climaterica.

I grappoli di uva sono stati sottoposti a campionamento a tempi prestabili una volta raggiunto il grado di appassimento deciso e nello specifico oltre che al tempo zero sono stati fatti altri 3 step: 15%, 30%, e 40% di disidratazione. Giornalmente i grappoli di riferimento venivano pesati per valutare il calo peso giornaliero e per stabilire quando era il momento di procedere al campionamento.

I campioni sono stati effettuati prelevando in vari grappoli diversi acini interi che poi sono andati a costituire campioni da circa 1,5 Kg che sono stati tempestivamente congelati a -20°C in attesa delle analisi stabilite.

L'ultima parte della sperimentazione ha riguardato la prova di macerazione delle uve di varietà Montepulciano d'Abruzzo con presenza di etilene in saturazione. L'uva è stata selezionata accuratamente scartando i grappoli malati e quelli che non avevano caratteristiche omogenee per entrare a far parte del campione (grado di maturazione globale del grappolo, grado di compattezza, dimensione) successivamente sono state pesate quantità uguali (2,5 Kg) per ogni campione e inseriti in recipienti ermetici confrontando i dati con un campione di riferimento tal quale. I campioni sono stati sottoposti a leggera pressatura e poi messi in macerazione per la durata di 5 giorni a temperatura di 20 °C con rimontaggi manuali effettuati ogni volta che veniva fatto un campione. I tempi di campionamento sono stati individuati in 4 step: tempo zero, 24 ore, 48 ore e tempo finale.



Figura 13. Recipienti ermetici per il trattamento con etilene.

È stata eseguita anche una prova in parallelo con quella di macerazione con etilene mediante l'aggiunta di 1,5 g di enzima Lafazym CL per uso enologico sia sul campione tal quale sia su quello trattato con etilene. Lafazym CL è un preparato enzimatico che riporta attività pectinasica contenete ceppi selezionati di *Aspergillus niger* non OGM.

4.2 Determinazione degli zuccheri

Il contenuto di zuccheri degli acini è stato misurato singolarmente e poi mediato per ogni campione con un rifrattometro digitale (Atago, Japan) usando 50 acini ogni volta. La determinazione è stata fatta seguendo il Regolamento CEE n°2676/90.

Si riporta l'indice di rifrazione a 20°C, espresso in valore assoluto o in percento in massa di saccarosio, nella tabella corrispondente per ottenere il grado zuccherino in grammi/litro o in grammi per chilogrammo di mosto, di mosto concentrato e di mosto concentrato rettificato. Le determinazioni sono state effettuate con rifrattometro digitale *ATAGO modello PR-32*.

Sono riportati nella figura 15 i vari livelli di concentrazione degli zuccheri durante la fase di disidratazione, da notare come l'eccessiva carenza di acqua nell'ultimo stadio ha portato lo strumento a registrare una misurazione fuori scala (≥ 33 grado brix).

Saccarosio % (m/m)	Indice di rifrazione a 20 °C	Massa volumica a 20 °C	Zucchero in g/l	Zucchero in g/kg	Titolo alcolometrico % vol. a 20 °C
25.0	1.37232	1.1049	249.7	226.0	14,84
25.1	1.37249	1.1053	250.7	226.8	14,90
25.2	1.37266	1.1057	251.7	227.6	14,96
25.3	1.37283	1.1062	253.0	228.7	15,03
25.4	1.37300	1.1068	254.4	229.9	15,11
25.5	1.37317	1.1072	255.4	230.7	15,17
25.6	1.37335	1.1076	256.4	231.5	15,23
25.7	1.37353	1.1081	257.8	232.6	15,32
25.8	1.37370	1.1087	259.1	233.7	15,39
25.9	1.37387	1.1091	260.1	234.5	15,45
26.0	1.37405	1.1095	261.1	235.3	15,51
26.1	1.37423	1.1100	262.5	236.4	15,60
26.2	1.37440	1.1106	263.8	237.5	15,67
26.3	1.37457	1.1110	264.8	238.3	15,73
26.4	1.37475	1.1114	265.8	239.2	15,79
26.5	1.37493	1.1119	267.2	240.3	15,88
26.6	1.37510	1.1125	268.5	241.4	15,95
26.7	1.37528	1.1129	269.5	242.2	16,01
26.8	1.37545	1.1133	270.5	243.0	16,07
26.9	1.37562	1.1138	271.8	244.1	16,15
27.0	1.37580	1.1144	273.2	245.2	16,23
27.1	1.37598	1.1148	274.2	246.0	16,29
27.2	1.37615	1.1152	275.2	246.8	16,35
27.3	1.37632	1.1157	276.5	247.9	16,43
27.4	1.37650	1.1163	277.9	249.0	16,51
27.5	1.37667	1.1167	278.9	249.8	16,57
27.6	1.37685	1.1171	279.9	250.6	16,63
27.7	1.37703	1.1176	281.3	251.6	16,71
27.8	1.37721	1.1182	282.6	252.7	16,79
27.9	1.37739	1.1186	283.6	253.5	16,85
28.0	1.37757	1.1190	284.6	254.3	16,91
28.1	1.37775	1.1195	286.0	255.4	16,99
28.2	1.37793	1.1201	287.3	256.5	17,07
28.3	1.37810	1.1205	288.3	257.3	17,13
28.4	1.37828	1.1209	289.3	258.1	17,19
28.5	1.37846	1.1214	290.7	259.2	17,27
28.6	1.37863	1.1220	292.0	260.3	17,35
28.7	1.37881	1.1224	293.0	261.0	17,41
28.8	1.37899	1.1228	294.0	261.8	17,47
28.9	1.37917	1.1233	295.3	262.9	17,55
29.0	1.37935	1.1239	296.7	264.0	17,63
29.1	1.37953	1.1244	298.1	265.1	17,71
29.2	1.37971	1.1250	299.4	266.1	17,79
29.3	1.37988	1.1254	300.4	266.9	17,85
29.4	1.38006	1.1258	301.4	267.7	17,91
29.5	1.38024	1.1263	302.8	268.8	17,99
29.6	1.38042	1.1269	304.1	269.9	18,07
29.7	1.38060	1.1273	305.1	270.6	18,13
29.8	1.38078	1.1277	306.1	271.4	18,19
29.9	1.38096	1.1282	307.4	272.5	18,26

Figura 14. Tabella riportante il tenore zuccherino dei mosti e dei mosti concentrati espresso in grammi/litro e in grammi/chilogrammo, determinato per mezzo di un rifrattometro graduato in percentuale in massa di saccarosio a 20 °C o in indice di rifrazione a 20 °C. È anche riportata la massa volumica a 20 °C.

Disidratazione		0%		15%		30%		40%
	Controllo	Etilene	Controllo	Etilene	Controllo	Etilene	Controllo	Etilene
saggio	23,6	23	25,9	25,5	27,9	30,2	≥33	≥33
saggio	24,7	24,8	27	28,8	25,3	28,5	≥33	≥33
saggio	25	21,6	25,1	27,5	25,4	30,2	≥33	≥33
saggio	29,5	20,1	28,6	26,6	26,4	25	≥33	≥33
saggio	23,4	22,1	25,4	30,8	25,9	30,1	≥33	≥33
saggio	25	20,4	23,2	28,2	27,2	29	≥33	≥33
saggio	23	16,1	24,5	22,5	28,3	29,8	≥33	≥33
saggio	26	24,4	27,2	27,6	27,4	27,1	≥33	≥33
saggio	20,8	21,1	25,2	22,5	25,7	27,2	≥33	≥33
Grado	23,5	21,9	26,1	20,5	28,8	28,3	≥33	≥33
Brix medio	24,45	21,55	25,82	26,05	26,83	28,54	≥33	≥33

Figura 15: I risultati ottenuti dal saggio di acini a campione sono riportati.

4.3 Determinazioni enzimatiche.

Per la PME (pectin metilesterasi) l'estrazione è stata ottimizzata utilizzando 15 gr di acini interi dopo che i vinaccioli sono stati allontanati e poi pestellati in un mortaio di pietra refrigerato in frigo e il tutto immerso in azoto liquido che veniva versato nel mortaio durante il pestellamento per ridurre in polvere il materiale vegetale e allo stesso tempo mantenere la temperatura bassa per preservare l'integrità degli enzimi da saggiare dopo l'estrazione. (Hagerman A.E. et al., 1986)

Il materiale sotto forma di polvere veniva centrifugato a 17000 rpm per 1 h at 4°C in tubi di plastica con una soluzione tampone di fosfato a pH 7.5, 1 mM di EDTA, 5 % PVPP (polivinilpirolidone) e 2M NaCl. Alla fine il surnatante veniva recuperato e filtrato su colonnoline di Sephadex G25 per eliminare i polifenoli che potevano interferire con le letture allo spettrofotometro.

Il saggio è stato eseguito allo spettrofotometro in cuvetta da 3 ml fatto con indicatore Bludibromotimolo 0,01% usandone 0,15 ml con l'aggiunta di 0,165 ml Pectina citrus 0,5% p/v sciolta in acqua e portata a pH 7,5 con NaOH 0,1 M e aggiunta di 400 µl di estratto più 0,12 ml di tampone 0,01M il tutto agitando gentilmente la cuvetta.

Si effettua una lettura nel tempo per 6 minuti a 620 nm valutando il decremento nella parte lineare che si identifica tra il 3° e il 6° minuto. Il bianco è fatto contro acqua.

L'attività enzimatica è poi espressa in $\mu\text{mol}/\text{min}^* \text{g}$ di peso secco.

Per la PG (poligalatturonasi) l'estrazione è stata ottimizzata utilizzando 15 gr di acini interi dopo che i vinaccioli sono stati allontanati e poi pestellati in un mortaio di pietra refrigerato in frigo e il tutto immerso in azoto liquido che veniva versato nel mortaio durante il pestellamento per ridurre in polvere il materiale vegetale e allo stesso tempo mantenere la temperatura bassa per preservare l'integrità degli enzimi da saggiare dopo l'estrazione. (Hagerman A.E. et al., 1986)

Il materiale sotto forma di polvere veniva centrifugato a 17000 rpm per 1 h a 4°C in tubi di plastica con una soluzione tampone di fosfato a pH 7.5 con l'aggiunta di 1mM EDTA 5% di PVPP (polivinilpirolidone), 0,5M di NaCl e 2%PeG (polietilenglicole). Per il saggio è stata seguita la seguente procedura: 0.4 ml di estratto che sono stati incubati con 1,2 ml di acetato di sodio 0.2 M a pH 4.5 e 1,2 ml acido poligalatturonico allo 0.5%. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 1 h in bagnetto termostato e successivamente aggiungere 20 μl DNS per una bollitura di 5 minuti al fine di far complessare il reagente colorato con il campione. (Lohani et al., 2004)

La lettura allo spettrofotometro è stata effettuata a 540 nm. L'attività enzimatica è stata espressa in $\mu\text{mol}/\text{min}^* \text{g}$ di peso secco.

Il DNS è stato preparato con di tartrato sodico di potassio al 30% e NaOH 0,4 M.

Per 100 ml di soluzione di DNS sono stati usati: 30 gr di tartrato sodico di potassio al 30% con 0,1 grammi DNS e 1,6 gr NaOH 0,4 M il tutto portato a volume fino a 100 ml con acqua. Il composto è attivo efficacemente per un mese se viene conservato in bottiglia scura. Successivamente è stata fatta una curva di taratura con DNS a diverse concentrazioni per correlare l'intensità colorante (colore giallo acceso) del composto con le diverse assorbanze registrate con letture puntiformi allo spettrofotometro.

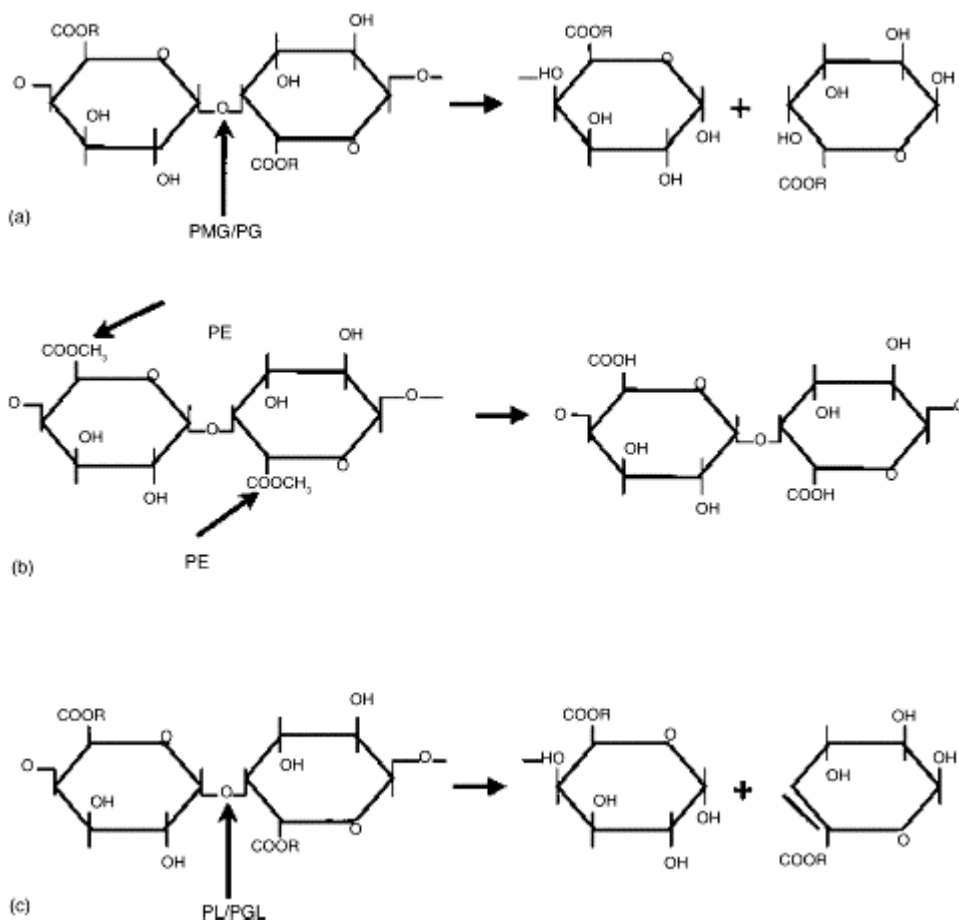


Figura 16: modo d'azione delle pectinasi: (a) R = H per PG e CH₃ per PMG; (b) PE; e (c) R=H per PGL e CH₃ per PL. La freccia indica il legame idrolizzato dalla pectinasi.

Per il saggio dell' α galactosidasi, β galactosidasi, α mannosidasi, β glicosidasi, α glicosidasi l'estrazione è stata ottimizzata utilizzando 5 gr di acini interi dopo che i vinaccioli sono stati allontanati e poi pestellati in un mortaio di pietra refrigerato in frigo e il tutto immerso in azoto liquido che veniva versato nel mortaio durante il pestellamento per ridurre in polvere il materiale vegetale e allo stesso tempo mantenere la temperatura bassa per preservare l'integrità degli enzimi da saggiare dopo l'estrazione.

Il tutto veniva centrifugato per 1 h a 4°C in 4 mL di tampone fosfato 50 mM a pH 5.2 addizionato con NaCl 1.4 mM, 0.2% (peso/vol) di cisteina e 1% (peso/vol) di PEG (polietilenglicole). (Fils-Lycaon et al., 1991)

Il surnatante veniva prelevato alla fine della centrifugazione e passato in una colonnina PD10 Sephadex preattivata con tampone per eliminare le impurità che avrebbero alterato la lettura successiva.

Prima dell'incubazione l'estratto (0,2 ml di enzima) veniva inserito in tubi di vetro sigillati con tappo in gomma con 0,8 ml di substrato corrispondente alla glicosidasi da saggiare, il bianco è stato fatto con enzima bollito per 5 min e sempre 0,8 ml di substrato corrispondente. L'incubazione è avvenuta a 37°C per massimo 1 h in bagnetto termostato con diversi tempi a seconda dell'enzima come riportato nella figura sottostante.

Glicosidasi	Incubazione
β galactosidasi	30 minuti
α mannosidasi	30 minuti
β glucosidasi	45 minuti
α glucosidasi	45 minuti
α galactosidasi	1 ora

Figura 17. Tempi di incubazione delle varie glicosidasi.

Il tempo di incubazione delle glicosidasi è stato deciso in base all'attività specifica di ogni enzima, in quanto quelli più attivi venivano lasciati in incubazione un tempo minore (β galactosidasi e α mannosidasi) perché reagivano più velocemente con il corrispondente substrato. Per l' α galactosidasi invece si è dovuto optare per un ora di incubazione nel bagnetto termostato per poter registrare una lettura apprezzabile. Tutti i risultati poi sono stati convertiti in attività enzimatica riferita ad un minuto di tempo ed espressi in $\mu\text{mol}/\text{min}^* \text{g}$ di peso secco.

4.4 Indice dei polifenoli totali.

Per la determinazione di questi composti è stata utilizzata la metodica di Di Stefano *et al.*, 1989. Il metodo si basa sulla reazione di ossidazione dei fenoli con il

reattivo di Folin-Ciocalteu (Singleton, Rossi 1965) e la conseguente formazione di ossidi blu che vengono dosati per via spettrofotometrica.

Il reattivo di Folin-Ciocalteu è l'ossidante più comunemente usato. Esso è composto da una miscela di acidi fosfo-molibdico e tungstenico che riducendosi producono ossidi di colore blu. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione del riducente.

Previa aggiunta del reattivo di Folin-Ciocalteu i campioni sono stati "separati" con un passaggio su cartuccia C18; questa, prima dell'uso è stata attivata con 2ml di metanolo e 5 ml di acqua. I campioni si diluiscono 10 volte con H₂SO₄ 1N e 1 ml di diluito si fa passare attraverso la cartuccia C18. Si lava con 2 ml di H₂SO₄ 0,1N e si eluiscono i composti fenolici in un matraccio da 20 ml con 2 ml di metanolo e 5 ml di acqua. Si aggiungono al contenuto del matraccio 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo circa 3-5 minuti 4 ml di Na₂CO₃ al 10%. Si porta a segno con acqua e dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm su 1 cm di p.o. contro un bianco preparato sostituendo al campione H₂O. Siccome il campione presentava un precipitato, prima della lettura è stato centrifugato per 10 minuti.

Si esegue il seguente calcolo:

$$\begin{aligned} (+) \text{ catechina mg/l} &= E_{1\text{cm},700 \text{ nm}} * 186,5 * \text{diluizioni} * 1/v \\ v &= \text{volume di campione diluito prelevato} \end{aligned}$$

Le centrifugazioni sono state eseguite con centrifuga *BECKMAN modello JA-21* utilizzando un *rotore modello JA-17*. Le letture spettrofotometriche sono state eseguite utilizzando una spettrofotometro *Perkin Elmer Instr. Modello Lambda 25 UV/VIS Spectrometer*.

4.5 Indice di antociani totali.

Per la determinazione di questi composti è stata utilizzata la metodica di Di Stefano *et al.*, 1989.

I campioni si diluiscono da 20 a 50 volte con etanolo cloridrico (70:30:1; etanolo : H₂O : HCl conc.), trattandosi di mosti, e si agitano. Nello specifico si è convenuto per una diluizione di 25 volte. Si registra lo spettro di assorbimento da 230 a 700 nm così da poter determinare con un'unica preparazione del campione l'indice di antociani totali e l'indice dei flavonoidi totali; si segna l'assorbanza (E_{1cm, λ max vis}) nel punto di massimo assorbimento nel visibile tra 536-540 nm con 1 cm di Percorso Ottico.

Si esegue il seguente calcolo:

$$\text{Antociani totali mg/l} = (E_{1\text{cm}, \lambda \text{ max vis}}) * 16,17 * \text{diluizioni}$$

4.6 Composti volatili.

E' stata eseguita una analisi per valutare la componente del profilo aromatico aromatico delle uve Aleatico durante il processo di disidratazione mediante gas cromatografia usando una microestrazione di fase solida come descritto da Chkaiban et al. 2007.

Nello specifico sono stati utilizzati 5 ml di uva spremendo le bacche e poi sono state inserite in beute di vetro da 25mL (Supelco, Sigma-Aldrich co, St. Louis, Mo, S.U.A.). successivamente è stato aggiunto di 5 ml CaCl₂ saturato (1:1 p/V) ed omogeneizzato con 200 µl di una soluzione titolata di 1 penten-3-one (5 g/l nel milli-q acqua). La soluzione è stata disposta in un bagno termostatico a 20 ± 1 °C. Dopo il periodo di equilibramento di 10 minuti, i composti volatili sono stati estratti per 30 minimi.

Prima di ogni saggio la colonna è stata pulita con una iniezione a 250 °C per sette minuti. L'elio è stato usato come il gas inerte (27 cm/s). I risultati sono stati espressi come area dei picchi divisa per 1.000.

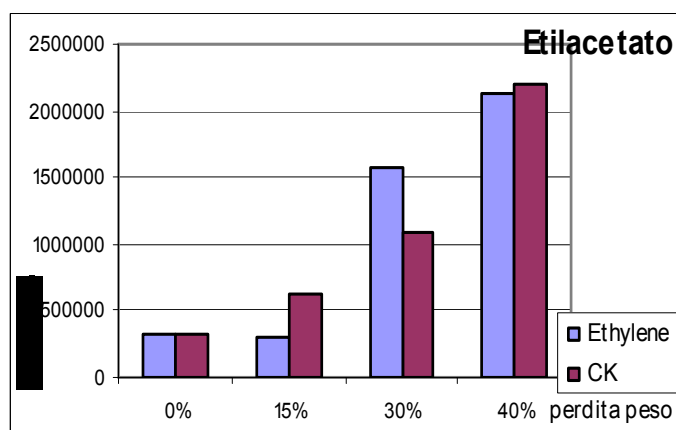
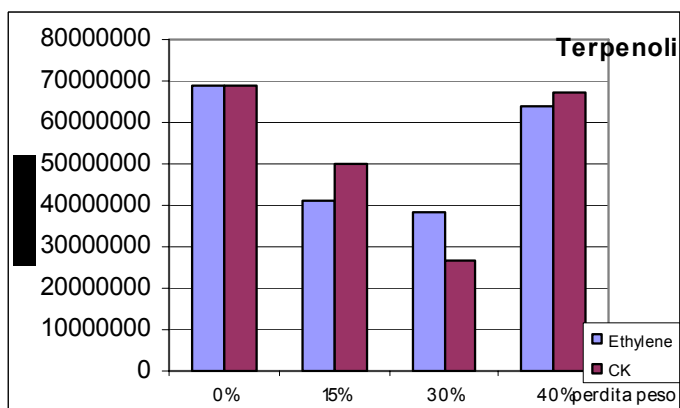
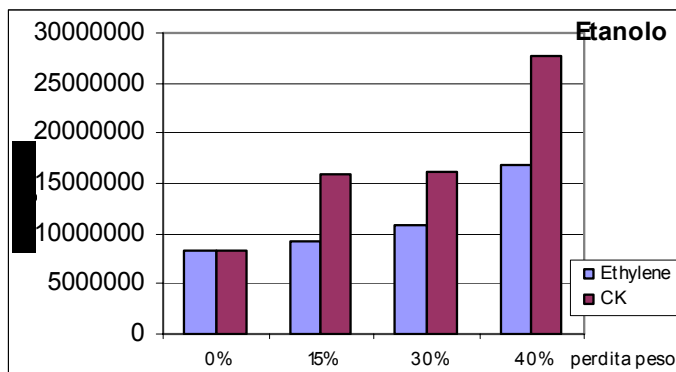


Figura 18. Grafici dei composti volatili. L'andamento dell'etanolo è sempre in crescita nei diversi step con una maggiore formazione nel campione non trattato. I terpenoli hanno subito un decremento fino allo step del 30% in tutte e due le tesi considerate per poi subire un innalzamento nello step del 40%. L'etilacetato ha avuto un andamento sempre in progressiva crescita con alternanza di maggior presenza nel campione trattato e la tesi di riferimento.

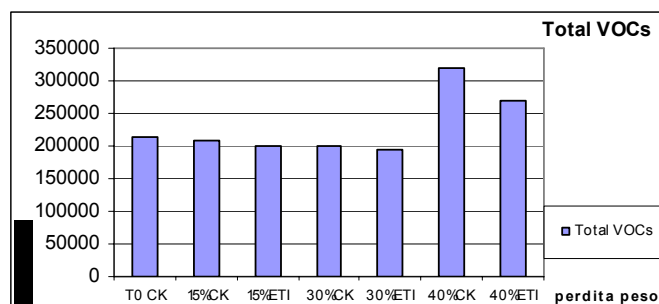


Figura 19. Grafico dei composti volatili totali. La sommatoria dei VOCs totali ha avuto un andamento sempre costante nei primi tre step per poi subire un evidente innalzamento solo nella parte finale (step del 40% di disidratazione).

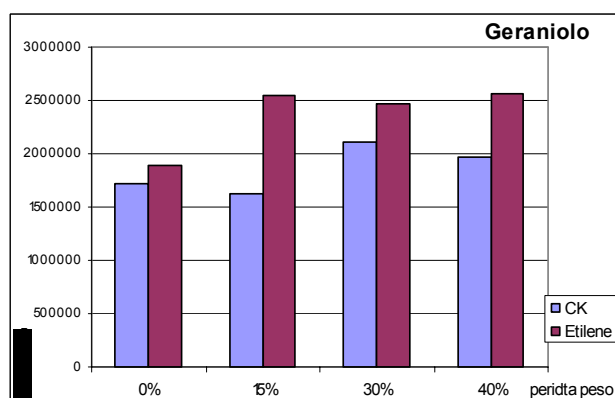


Figura 20. Grafico del composto volatile geraniolo. Il geraniolo ha avuto un innalzamento dopo il primo step di disidratazione per poi rimanere costante fino alla fine della prova con una maggior presenza nel campione sottoposto a trattamento

	T0	15% CK	15% ET	30% CK	30% ET	40% CK	40% ET
C6	34850c	47552b	46847b	47906b	57518a	47553b	48170b
Geraniol	233b	214b	255a	210b	249a	237°	212b
acetaldehyde	16792d	42600c	47182b	47236b	45000b	64930a	62497a
ethyl acetate	328e	620d	520d	1085c	1582b	2195°	2126a
acetic acid	2907d	2817d	2752d	3062d	4342c	5464b	6641a
Ethanol	8410e	15923b	9317d	16226b	10747c	27781a	16814b
isoamyl acetate	55073b	50559b	38530d	46500c	43200c	66022a	37057d
isoamyl alcohol	17151c	17256c	15646d	16562c	16439c	21254a	19608b
hexyl acetate	356c	241d	272d	249d	324c	430b	580a
ethyl hexanoate	248b	140d	174c	135d	197c	237b	336a
ethyl eptanoate	6239b	5436c	8393a	5132c	6033b	3785d	8636a

Figura 21. Tabella dei composti volatili.

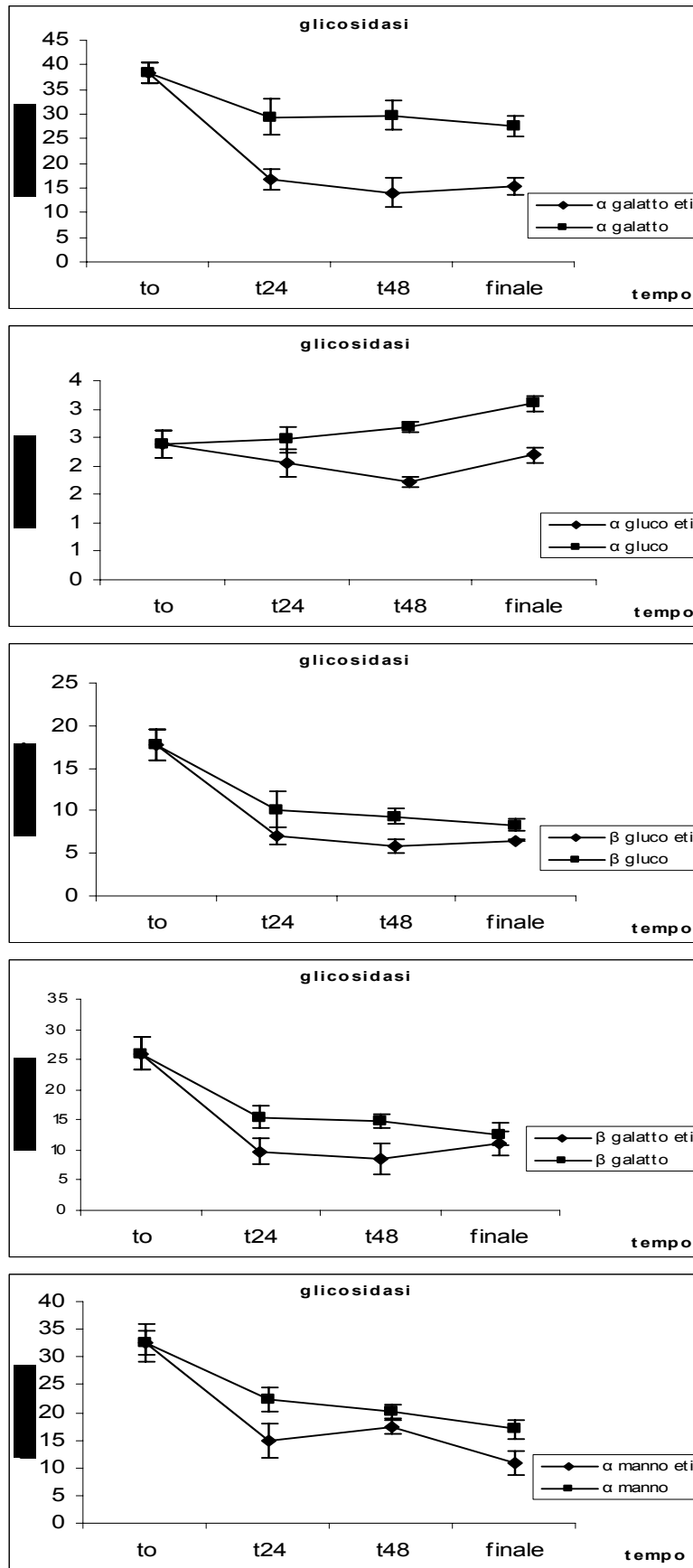


Figura 22. Grafici dell'attività delle varie glicosidasi in macerazione.

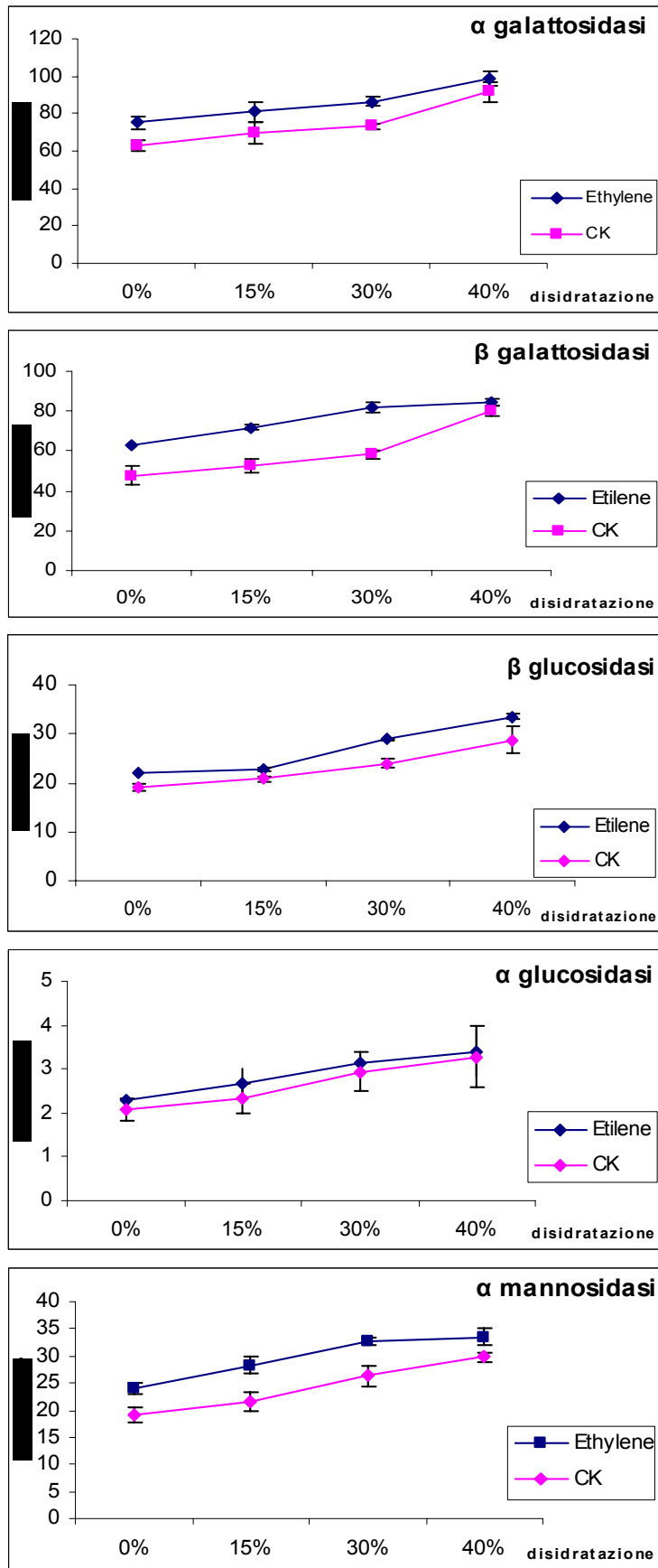


Figura 23. Grafici dell'attività delle varie glicosidasi in disidratazione.

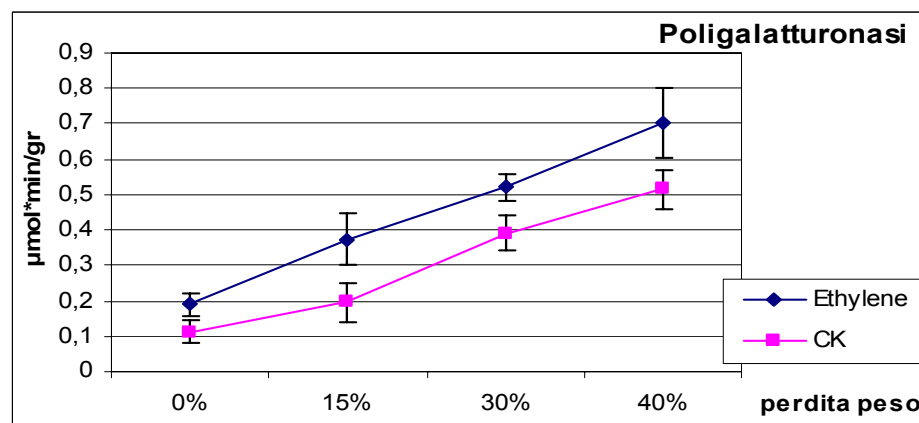
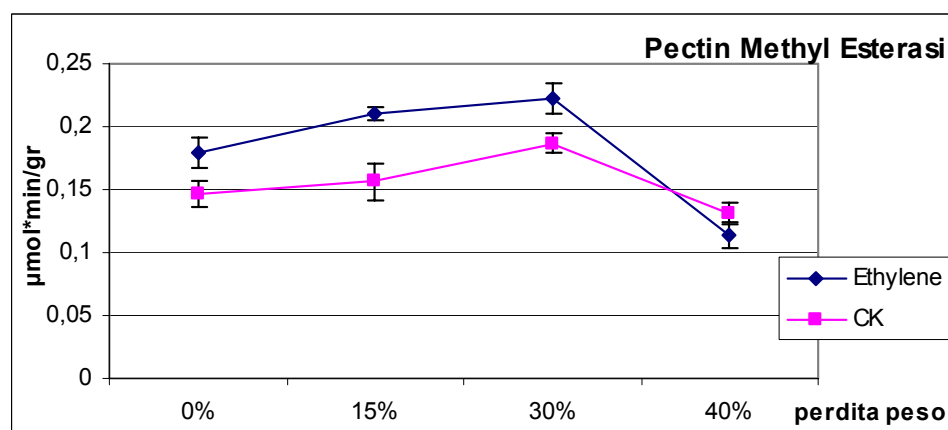
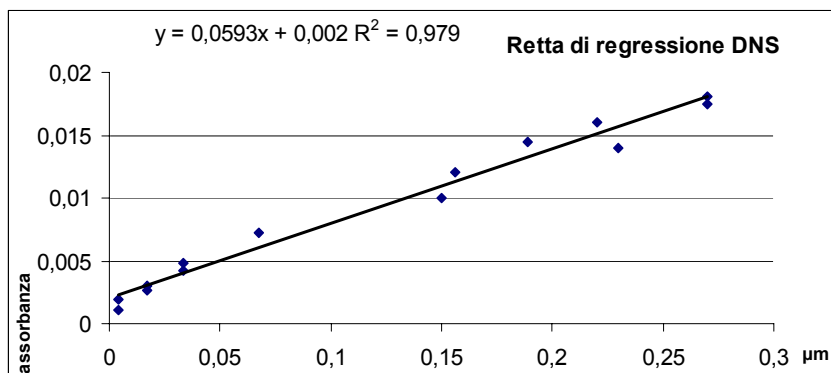


Figura 24. Grafico della retta di taratura del DNS e grafici delle PME e PG. Nel grafico relativo alla PME nei primi tre step iniziali si evidenzia significativamente una maggiore attività nel campione sottoposto a trattamento con etilene per poi subire un decremento nello step del 40% in tutti e due i campioni. La PG ha un andamento costantemente in aumento in tutti gli step analizzati sempre evidenziando una maggiore attività nel campione trattato con etilene.

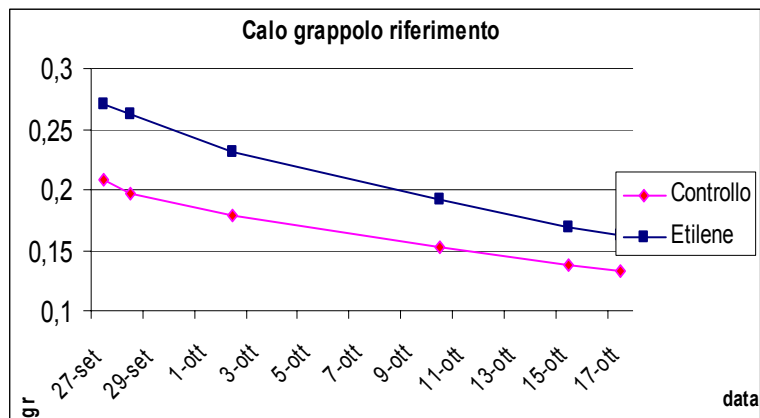
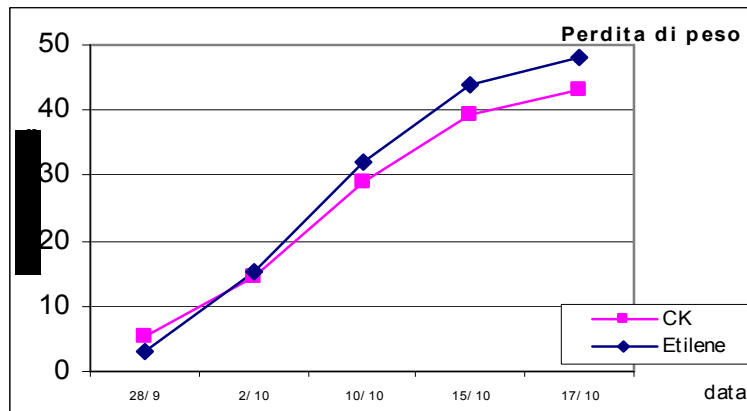


Figura 25. Grafici relativi alla perdita peso. Dai grafici si evidenzia una maggiore perdita di peso (5-6%) nel campione trattato con etilene, lo stesso risultato si è ottenuto dalla misurazione del grappolo di riferimento per ogni campione.

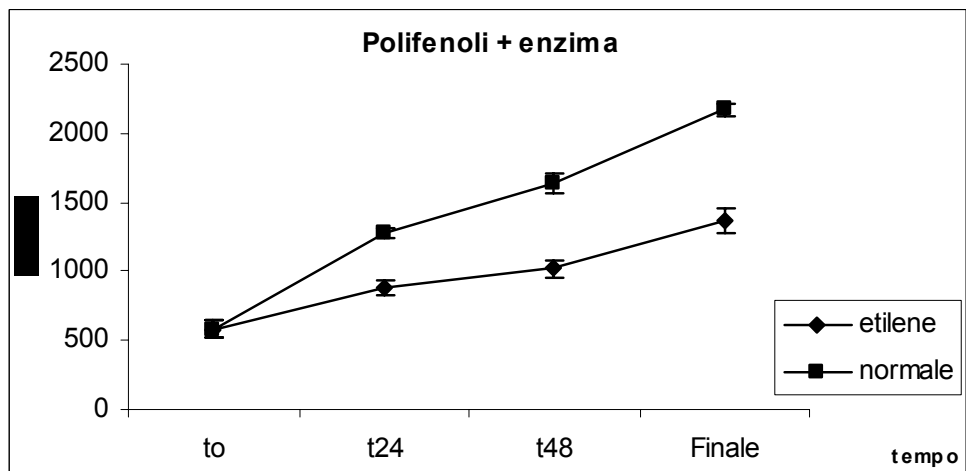
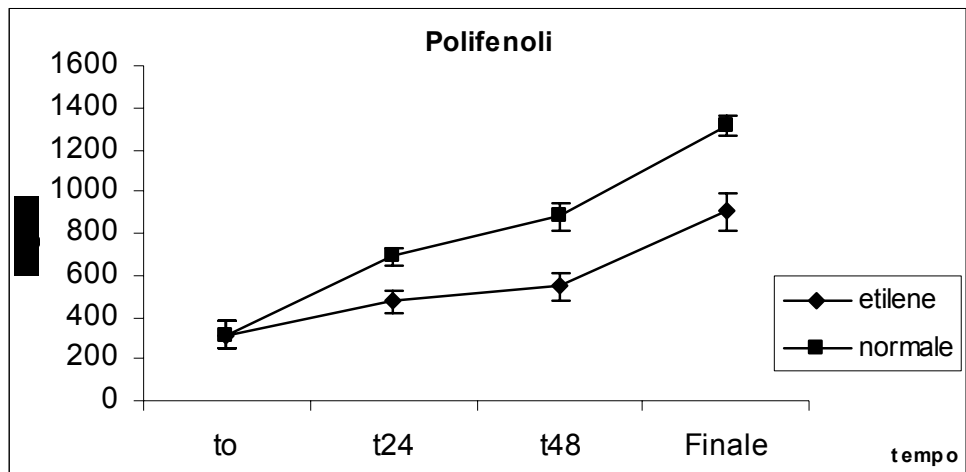


Figura 26. Grafici relativi al contenuto dei polifenoli. Il contenuto dei polifenoli durante la macerazione è stato sempre in costante aumento sia nella tesi trattata con etilene che in quella non trattata evidenziando però una maggiore estrazione nel campione non trattato, infatti il campione trattato con etilene aveva sempre in tutti gli step una presenza di polifenoli sempre minore. Il trattamento con enzima ha avuto un effetto positivo aumentando l'estrazione dei polifenoli rispetto al campione tal quale in tutti gli step di macerazione fino al tempo finale.

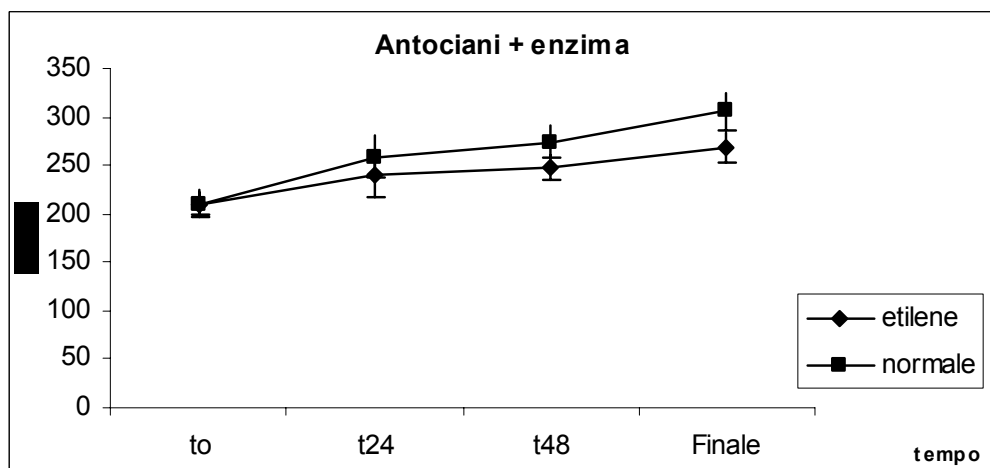
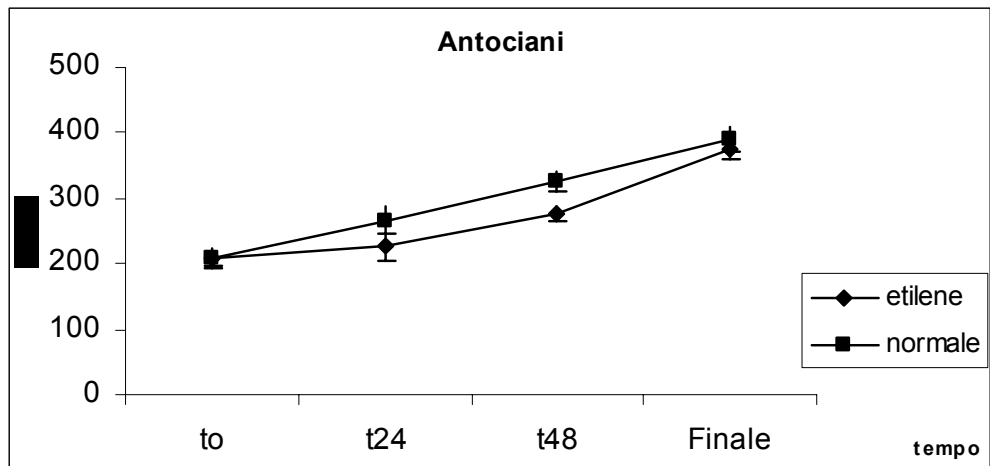


Figura 27. Grafici relativi al contenuto degli antociani. Il contenuto degli antociani durante la macerazione è stato sempre in leggero aumento sia nella tesi trattata con etilene che in quella non trattata evidenziando però una maggiore estrazione nel campione non trattato, infatti il campione trattato con etilene aveva sempre in tutti gli step una presenza di antociani sempre minore. Il trattamento con enzima non ha avuto un effetto positivo sull'estrazione degli antociani rispetto al campione tal quale ma ha avuto un leggero effetto inibente.

4.7 Conclusioni.

I risultati più interessanti alla fine della sperimentazione sono stati quelli relativi al trattamento di etilene durante la disidratazione in quanto è stato ben evidente l'incremento della velocità di disidratazione dovuta ad una attivazione dei vari enzimi di parete studiati (pectin metilesterasi, poligalatturonasi, α galactosidasi, β galactosidasi, α mannosidasi, β glicosidasi e α glicosidasi) stimolati dal trattamento con etilene. Questo ha favorito un maggior calo peso. (Figura 25)

I composti volatili hanno subito un sostanziale aumento solamente nell'ultimo step di disidratazione (40 %) in particolar modo l'etilacetato e l'etanolo hanno subito un evidente aumento in seguito al trattamento dell'etilene in tutti gli step di disidratazione analizzati. (Figura 18-21)

Anche i terpenoli aumentavano leggermente a seguito del trattamento con etilene durante la disidratazione mentre i composti C6 non modificavano la loro concentrazione totale. (Figura 18) La concentrazione dei polifenoli nel succo aumentava con il procedere della macerazione come ci si aspettava, ma il trattamento con etilene in saturazione ha sortito un effetto inibitorio nei confronti della loro estrazione. Questo risultato era in accordo con la più ridotta attività degli enzimi di parete delle cellule, in particolare delle glicosidasi α galactosidasi, β galactosidasi, α mannosidasi, β glicosidasi e α glicosidasi, che era significativamente più bassa durante la macerazione con gorgogliamento di etilene rispetto ai campioni macerati con il gorgogliamento all'aria. (Figura 26) Il contenuto degli antociani durante la macerazione è stato sempre in leggero aumento sia nella tesi trattata con etilene che in quella non trattata evidenziando però una maggiore estrazione nel campione non trattato, infatti il campione trattato con etilene aveva sempre in tutti gli step una presenza di antociani sempre minore. (Figura 27)

Il trattamento con enzima pectolitico Lafazym CL ha sortito un effetto positivo sul contenuto finale dei polifenoli totali su tutti e due i campioni analizzati (sia sul controllo che su quello trattato con etilene in saturazione). Invece per quello che riguarda il contenuto degli antociani non si è registrata una differenza apprezzabile tra il campione trattato con enzima pectolitico Lafazym CL né sul controllo né in quello trattato con etilene in saturazione.

BIBLIOGRAFIA

Amrani Joutei K., Bouya D., Saucier C. And Gloriesy.,2006. Influence de l'éthylène sur les maturités phénolique et cellulaire des raisins au cours de la vinification. *Cahiers Agricultures*, 15, 371-374.

Amati A., Ferrarini R., Riponi C., Zironi R. 1983. Una nuova tecnologia per l'appassimento delle uve-Vigne e Vini, 10 (9): 27-35.

Amrani Joutei K., Bouya D., Saucier C. And Gloriesy.,2006. Influence de l'éthylène sur les maturités phénolique et cellulaire des raisins au cours de la vinification. *Cahiers Agricultures*, 15, 371-374.

Bellincontro A., Fardelli A., Desantis D., Rotondi R. And Mencarelli F., 2006. Postharvest ethylene and 1-MCP treatments both affect phenols, anthocyanins, and aromatic quality of Aleatico grapes and wine. *Austral. J. Grape Wine Res.*, 12, 141-149.

Boidron J.N., Leveque F., Bertrand A. 1981. I derivati terpenici e l'aroma delle uve e dei vini. *Vini d'Italia*, 37-44.

Botondi R., De Santis D., Bellincontro A., Vizovitis K., Mencarelli F., 2003. Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51, pp. 1189-1200.

Botondi R., Desantis D., Bellincontro A., Vizovitis K. AND Mencarelli F., 2003. Influence of ethylene inhibition by 1-MCP on apricot quality, volatiles evolution, and glycosidases activity of low and high aroma varieties of apricots. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1189-1200.

Cabanne C. and Donèche B., 2001. Changes in polygalacturonase activity and calcium content during ripening of grape berries. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 52, 331-335.

Cardarelli M., Botondi R., Vizovitis K. And Mencarelli F., 2002. Effects of exogenous propylene on softening, glycosidase, and pectinmethylesterase activity during postharvest ripening of apricots. *J. Agric. Food Chem.*, 50,1441-1446.

Chervin C., El-Kereamy A., Latche J.P., Lamon J. and Bouzayen M., 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climateric fruit. *Plant Science*, 167, 1301-1305.

Chervin, C.a, Terrier, N.b, Ageorges, A.b, Ribes, F.a, Kuapunyakoon, T. 2006 Influence of ethylene on sucrose accumulation in grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* Volume 57, Issue 4, Pages 511-513.

Chkaiban L., Botondi R., Bellincontro A., DE Santis D., Kefalas P. and Mencarelli F., 2007. Influence of postharvest water stress on lipoxygenase and alcohol dehydrogenase activities, and on the composition of some volatile compounds of Gewürtztraminer grapes dehydrated under controlled and uncontrolled thermohygrometric conditions. *Austral. J. Grape Wine Res.*, 13, 142-149. *Industria delle Bevande*, 214,114-121.

Coombe, B. G., C R Hale., 1973. Fruit setting, development and ripening, *ISHS Acta Horticulturae* 240. *Plant Physiol.* Apr ;51 :629-634.

Corte V., Oliva D., Ragusa M., Strano M., 2001. Aspetti tecnici, microbiologici e chimici connessi con i sistemi di appassimento delle uve. *L'Enologo*, 12:87-93.

Costantini V., Bellincontro A., DE Santis D., Botondi R. and Mencarelli F., 2006. Metabolic changes of Malvasia grapes for wine production during postharvest drying. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3334-3340.

Craker L.E., Wetherbee P.J., 1973. Ethylene, carbon dioxide, and anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* 52, pp. 177-179.

Crank, J. 1975. *Mathematics of diffusion* (2nd ed.). London: Oxford University Press.

De Rosa T. 1987. *Vini liquorosi e da dessert*. AEB Brescia.

Deytieux-Belleau C., Vaillet A., Donèche B. and Geny L., 2008. Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 638-646.

Di Stefano R., Borsa D., Gentilini N., Corino L., Tronfi S., 1997. Evoluzione degli zuccheri, degli acidi fissi, e dei composti fenolici durante l'appassimento in fruttajo. *Rivista di Viticoltura ed Enologia*, 1, 33-41.

Di Stefano R., Gentilini N., Bottero S., Garcia-Moruno E., Borsa D., Trinco S. 2001. Alcuni metabolici primari e secondari dell'uva Verduzzo a diversi gradi di appassimento. *Riv. Vitic. Enol.*, 54, (1), 17-35.

Di Stefano R., Maggiorotto G., Borsa D. 1992. Mosto concentrato rettificato da Moscato Bianco. *Ist. Sperim. per l'Enologia*, Asti.

Di Stefano R., Maggiorotto G., Melia V., Di Bernardi D., 1995. Evoluzione dei composti terpenici durante il processo di appassimento dell'uva Zibibbo di Pantelleria. *L'enotecnico*, 10: 73-84.

Dimambro D., Massantini R. and Mencarelli F., 2008. Miglioramento della qualità del vino Merlot in annate sfavorevoli mediante parziale disidratazione in condizioni

El-Kereamy A., Chervin C., Roustan J.P., Cheynierv., Souquet J.M., Moutounet M., Raynal J., Ford C., Latché A., Pech J.C. and Bouzayen M., 2003.

Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*, 119, 175-182.

Fils-Lycaon B. and Buret M., 1991. Changes in glycosidase activities during development and ripening of melon. *Postharvest Biol. Technol.*, 1, 143-151.

Fischer R.L. and Bennett A.B., 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 675-703.

Flores F., El Yahyaoui F., de Billerbeck G., Romojaro F., Latche A., Bouzayen M., Pech J.C., Ambid C., 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.* 53, pp. 201-206.

Fox A J., Pozo-Insfran D., Lee J.H., Sargent S.A. and Talcott S.T., 2005. Ripening-induced chemical and antioxidant changes in bell peppers as affected by harvest maturity and postharvest ethylene exposure. *HortScience*, 40, 732-736.

Franco M., Peinado RA., Medina M., MORENO J., 2004. Off-vine drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximenez grape variety. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3905-3910.

Golding J.B., Shearer D., McGlasson W.B., Wyllie S.G., 1999. Relationship between respiration, ethylene, and aroma production in ripening bananas. *J. Agric. Food Chem.* 47, pp. 1646-1651.

Gunata Z., Bittour S., Briloeut J.M., Bayonovec., Cordonnier R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Res.*, 184, 139-149.

Hagerman A.E. and Austin P.J., 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J.Agric. Food Chem.*,34, 440-444.

Hale C R., Coombe B.G. and Hawker J.S., 1970. Effect of ethylene and 2-Chloroethylphosphonic acid on the ripening of grapes. *Plant Physiol.*, 45, 620-623.

Han-Chul Kang., Seon-Hwa Lee, (2001) Characteristic of alfa-galactosidase associated with grape flesh. *Phytochemistry* 58 (2001), Pages 213-219.

Jiang Y., Joyce D.C. and Terry L. A., 2001. 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biol. Technol.*, 23, 227-232.

Jian-Ye Chen, Peng-Fei Wen, Wei-Fu Kong, Qiu-Hong Pan, Si-Bao Wan and Wei-Dong Huang 2006 Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology* Volume 163, Issue 2, Pages 115-127.

Kader A.A., 1983. Influence of harvesting methods on quality of deciduous tree fruits. *HortScience* 18, pp. 409-411.

Kang H. And Lee S., 2001. Characteristics of an "-galactosidase associated with grape flesh. *Phytochemistry*, 58, 213-219

Karakurt Y. and Huber D.J., 2002. Cell wall-degrading enzymes and pectin solubility and depolymerisation in immature and ripe watermelon in response to exogenous ethylene. *Physiol.*

Lohani S., Trivedi PK. and NATH P., 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: Effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biol. Technol.*, 31, 119-126.

Mencarelli F., Massantini R., Botondi R., 1996. Influence of impact surface and temperature on the ripening response of kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 8, pp. 165-177.

Mencarelli F., Massantini R., Lanzarotta L. Botondi R. 1994. Accurate detection of firmness and color changes in the packing of table grapes with paper dividers. *J. Of Hort. Sci.* 69(2): 299-304.

Mencarelli F., De Santis D., Bellincontro A., Prospero P., Botondi R., Tiberi D. 2006 Controllo accurato dell'ambiente di appassimento per la valorizzazione di uve di varietà autoctone dell'Italia centrale destinate alla produzione di vini dolci. *Convegno Nazionale "Vitigni Autoctoni Minori"*.

Miller A.R., Dalmaso J.P., Kretzman D.W., 1987. Mechanical stress, storage time, and temperature influence cell wall-degrading enzymes, firmness, and ethylene production by cucumbers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112, pp. 666-671.

Mitchell J.J., Van Staden J., 1983. Cytokinins and the wounding response in potato tissue. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 109, pp. 1-5.

Nandwal A.S., Maan A., Kundu B.S., Sheokand S., Kamboj D.V., Sheoran A., Kumar B., Dutta D., 2000. Ethylene evolution and antioxidant defence mechanism in *Cicer arietinum* roots in the presence of nitrate and aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol. Biochem.* 38, pp. 709-715.

Nicolosi Asmundo C. Cataldi Lupo M.C. Campisi S., Russo C. 1990. La Malvasia delle Lipari: influenza delle tecnologie di produzione sui componenti volatili dell'aroma. *Vigneevini*, XVII, 4, 33-37.

Nishiyama K., Guis M., Rose J.K.C., Kubo Y., Bennett K.A., Wangjin L., Kato K., Ushijima K., Nakano R., Inaba A., Bouzayen M., Latche A., Pech J.C., Bennett A.B., 2007. Ethylen regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J. Exper. Bot.*, 58, 1281-1290.

Nunan K.J., Davies C., Robinson S.P. and Fincher G.B., 2001. Expression patterns of cell wall modifying enzymes during grape berry development. *Planta*, 214, 257-264.

Palmeri R., Spagna G. (2007), α -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application, *Enzyme Microb. Technol.*, 40: 382-389.

Park S.K. and Noble A.C., 1993. Monoterpenes and monoterpene glycosides in wine aromas. ACS symposium series. Beer and wine production. Washington DC:ACS, 99-109.

Pesis E., Ackerman M., Ben-Aire R., Feygenberg O., Feng X., Apelbaum A., Goren R., Prusky D., 2002. Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 24, pp. 171-181. *Plantarum*, 116, 398-405.

Pinelo M., Anis Arnous and Anne S. Meyer (2006) Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* Volume 17, Issue 11, Pages 579-590.

Rawlyer A., Arpagaus S., Braendle R., 2002. Impact of oxygen stress and energy availability on membrane stability of plant cell. *Annals of Botany* 90, pp. 499-507.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdieu D., 1998. *Traité d'Oenologie. 2. Chimie du Vin - Stabilisation et traitements*, Dunod Éd, Paris. 91-98.

Ryan C.A., Farmer E.E., 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, pp. 651-674.

Ryberau-Gayon J., Peynaud E., Ryberau-Gayon P., Sudraud P. 1975. *Science et Technique du Vin*. Dunod. Paris. 99-101.

Sanz C., Olias J.M., Perez A.G., 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In *Phytochemistry of fruit and vegetables*, Eds. Tomas-Barberan F.A. and Robins R.J., Clarendon Press, Oxford (UK), 125-155.

Sarry J.E. and Gunata Z., 2004. Plant and microbial glucoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.*, 87, 509-521.

Sitrit Y. and Bennet A.B., 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a reexamination. *Plant Physiol.*, 116, 1145-1150.

Smith D.L., Abbott J.A. and Gross K.C. 2002. Downregulation of tomato β -galactosidase: 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*, 129, 1755-1762.

Sozzi G.O., Camperi S.A., Cascone O. and Frascina A.A., 1998. Galactosidases in tomato fruit ontogeny: decreased galactosidase activities in antisense ACC synthase fruit during ripening and reversal with exogenous ethylene. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, 237-244.

Szyjewicz E., Rosner N., Kliewer W. M., 1984. Ethephon ((2-Chloroethyl) phosphonic Acid, Ethrel, CEPA) in Viticulture. *American Society for Enology and Viticulture*. 35:3:117-123.

Trincherò G.D., Sozzi G.O., Covatta F., Frascina A., 2004. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene extends postharvest life of Bartlett pears. *Postharvest Biol. and Technol.*, 32, 193-204.

Weaver R.J. and Montgomery R. 1974. Effect of ethephon on coloration and maturation of wine grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 39-41.

Yang S.F., Hoffman N.E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, pp. 155-189.

Zironi R., Ferrarini R., 1987. La surmaturazione delle uve destinate alla vinificazione-*Vigne e Vini* n.4.

SITI WEB CONSULTATI

www.lavinium.com

<http://it.wikipedia.org>

www.oiv.int

<http://eur-lex.europa.eu/it>

www.scuolaenologica.it

www.tigulliovino.it

www.assoenologi.it

www.vinit.net

www.wordreference.com

www.vinoe.com

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va alla mia famiglia per avermi sempre sostenuto.

Un grazie al Prof. Marco Esti, Prof. Fabio Mencarelli e Prof. Mauro Moresi.

Grazie alla Dott. Rinaldo Botondi e ai tecnici Roberto Forniti e Alessio Fardelli per il loro prezioso contributo tecnico.

Grazie a tutti i miei colleghi di studio che con disponibilità e generosità mi hanno accompagnato in questi tre anni di gioiose esperienze.

Grazie alle persone che ho incontrato nel passato, che sono con me nel presente e mi accompagneranno in futuro.