



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI  
TORINO MILANO PALERMO SASSARI FOGGIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE INTERATENEO  
IN  
SCIENZE VITICOLE ENOLOGICHE**

*TESI DI LAUREA*

# **Interventi tecnologici per il miglioramento della shelf life del Moscato d'Asti**

Relatore: Prof. Vincenzo Gerbi

Candidato: Mattia Malabaila

Anno Accademico 2019/2020



## Sommario

3. INTRODUZIONE .....	1
3.1 Moscato bianco .....	1
3.2 Storia del Moscato d’Asti.....	1
3.3 Focus di studio del progetto .....	3
3.3.1 Flottazione .....	4
3.3.2 I lieviti nei mosti e l’acetaldeide .....	7
3.3.3 Il diossido di zolfo in enologia.....	10
3.3.4 I terpeni .....	13
3.3.4 I tioli varietali.....	19
4. SCOPO DELLA TESI .....	23
5. MATERIALI E METODI .....	24
5.1 Gestione del vigneto “Scrapona” .....	24
5.2 Diagramma flusso vinificazione e spumantizzazione Scrapona 2019 .....	26
5.3 D’all’uva al mosto in cella frigo .....	27
5.4 Dal mosto stoccato al Moscato d’Asti DOCG .....	30
5.5 Test delle pectine.....	31
5.6 Test di flottazione.....	32
5.7 Analisi torbidità e stabilità proteica .....	33
5.8 Test di filtrabilità .....	33
5.9 Analisi microbiologiche .....	34
5.10 Analisi Terpeni .....	36
5.11 Analisi tioli varietali.....	37
6. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	38
6.1 Maturazione uva .....	38
6.2 Prove di enzimaggio .....	39
6.3 Sanitizzazione serbatoi .....	40
6.4 Prove di flottazione .....	41

6.3 Prove di filtrazione .....	45
6.3 Flottazione e filtrazione in cantina .....	47
6.4 Conservazione e fermentazione alcolica del mosto .....	51
6.5 Aromi .....	54
8. CONCLUSIONI.....	61
9. BIBLIOGRAFIA.....	63

## 3. INTRODUZIONE

### 3.1 Moscato bianco

Il Moscato bianco è una varietà a bacca bianca, aromatico presente in moltissime realtà enologiche italiane, e non solo. Presenta una gran quantità di appellativi come *di Canelli*, *di Strevi*, *di Frontignan* o *Muscat blanc à petits granis*, ed è da questa varietà che si producono il Moscato d'Asti e l'Asti DOCG. È il vitigno capostipite dell'intera famiglia dei Moscati, e a svelare la parentela tra le diverse cultivar è stata la biologia molecolare utilizzata dal Centro di ricerca per la viticoltura di Conegliano e la Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (Crespan e Milani, 2001).

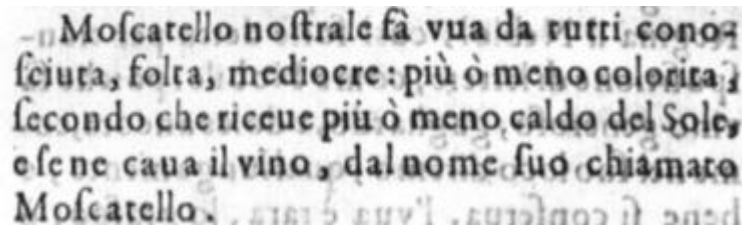
Della famiglia dei Moscati, fanno parte alcune cultivar molto famose in Italia, ma anche nel resto del mondo, come quello Giallo, d'Alessandria (Zibibbo) e Rosa. Tutti i componenti di questa famiglia, sono rinomati e ricercati per la loro aromaticità dovuta alla presenza nella buccia e polpa di terpeni in gran quantità (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

Presenta un grappolo di media grandezza, cilindrico, allungato mediamente compatto o compatto (a seconda dei cloni) con acini medi (2.2 g/acino) con buccia sottile e colore a maturazione dal giallo verdastro (se l'acino è stato poco esposto al sole diretto) al giallo dorato-ambrato (se esposto direttamente ai raggi solari). Nello specifico il moscato bianco è caratterizzato da una buona vigoria ed una regolare produzione. È molto esigente per quanto riguarda il terreno, infatti i migliori risultati qualitativi si hanno con terreni tufacei-marnosi e calcarei (Dalmaso *et al.*, 1964). Presenta una buona resistenza al freddo e alla siccità, però è particolarmente suscettibile ad attacchi oidici, ma in particolar modo ad attacchi botritici sul grappolo nel periodo tardo estivo-autunnale.

### 3.2 Storia del Moscato d'Asti

Il termine Moscato deriva dalla lingua indo-iraniana in cui il termine "*mušk*" significa "profumato". Dal termine persiano, si è arrivati alla parola greca "*móschos*" e a quella latina "*muscus*", affiancandosi al vocabolo già presente in lingua latina come pianta appartenente alle *Briofite* (Failla e Forni; 2014).

Il fondatore della famiglia dei Moscati è stato selezionato in Grecia o forse nel Vicino Oriente nella seconda metà del primo millennio, arriva in Europa grazie alle Crociate, e così intorno al XIV secolo, inizia la coltivazione su larga scala di questa varietà aromatica. La diffusione di tale varietà è dovuta ai Marchesi del Monferrato, presenti in Piemonte fin dal XIV secolo che promossero la viticoltura piemontese.



Moscato nostro fa vna da tutti cono  
scuta, folta, mediocre: più o meno colorita,  
secondo che riceue più o meno caldo del Sole,  
e se ne caua il vino, dal nome suo chiamato  
Moscato.

Figura 1 Descrizione della varietà moscato presente nel libro "Della Eccellenza e diversità dei Vini" (Giovanni Battista Croce 1607)

Uno dei primi testi di carattere tecnico-divulgativo, inerenti questo vitigno e vino, è il "Della Eccellenza e diversità dei Vini" redatto dal gioielliere di Casa Savoia, Giovanni Battista Croce, in cui oltre a illustrare alcune caratteristiche tecniche del vitigno, in altri capitoli descrive le tecniche enologiche utilizzate all'epoca per il vino in questione (Figura 1). Nel XVIII secolo si iniziano a provare nuove tecniche di vinificazione, cercando di imitare i più famosi spumanti come lo *Champagne*, molto apprezzati dalla corte Sabauda, ma con scarsi risultati, dovuti ad una non adeguata conoscenza delle basi enologiche. Con l'arrivo di Carlo Gancia nella seconda metà del 1800, ci fu un impulso all'allora enologia piemontese. Il sig. Gancia inizia la produzione dei primi spumanti metodo classico a base moscato denominati "Moscato Champagne", sempre con problemi nella gestione del residuo zuccherino e con frequenti rifermentazioni indesiderate e quindi scoppio delle bottiglie, questo dovuto anche ad un inadeguato metodo di chiusura delle bottiglie. Pochi anni dopo in Francia si inizia ad utilizzare un tappo più lungo con un sistema di contenimento, che poi diventa la comune "gabbietta".

Grazie all'arrivo dell'autoclave nel 1895, ideata e provata dal Prof. Martinotti, poi brevettata dal francese Eugenie Charmat intorno al 1910, si verifica un cambiamento epocale per l'enologia piemontese e per la produzione del Moscato d'Asti, in quanto è possibile un controllo più accurato della fermentazione, della temperatura e della pressione interna alla vasca, per avere un decorso fermentativo migliore e un prodotto di qualità più elevato.

Nella "Regia Stazione Enologica Sperimentale di Asti" grazie al Direttore Prof. Martinotti e ai suoi collaboratori come il vicedirettore Dott. Mensio nel 1910, si sono svolte indagini inerenti la stabilità microbiologica dei mosti, poiché si effettuavano ripetute filtrazioni con i sacchi olandesi, che portavano ad un impoverimento delle sostanze azotate prontamente assimilabili, e quindi i lieviti non erano più capaci di avviare la fermentazione alcolica. Lo studioso e collaboratore della Regia Stazione, Garino-Canina, nel 1925 svolse ricerche inerenti le sostanze pectiche, da cui risultato importante eliminarle durante la lavorazione dei mosti di moscato, in quanto tale varietà ne è molto ricca (Tarantola, 1972).

Dagli anni '30 incrementano le novità tecnologiche nel mondo degli spumanti, ad esempio i "tappi a fungo" e le "gabbiette" come nuovi metodi di chiusura, un miglioramento tecnologico dei filtri che sostituiscono i famosi "sacchi olandesi" usati fino ad allora, le autoclavi che iniziano ad essere anche di manifattura italiana, come Gianazza, e l'ingresso dei primi filtri a piastre e dei pastorizzatori.

Nel 1931 si passa dai numerosi appellativi utilizzati per i vini a base moscato piemontesi, a tre definizioni: "Asti Spumante" – "Moscato d'Asti Spumante" – "Moscato d'Asti", dal 67' con la concezione delle DOC sono ammessi i termini "Asti Spumante" – "Moscato d'Asti Spumante" – "Moscato Naturale d'Asti" e dal '93 con l'arrivo della DOCG si è arrivati a "Moscato d'Asti" (il cosiddetto "tappo raso") e all'"Asti" ("spumante", che è possibile omettere). Dal 1 marzo 2017 sono ammesse per la denominazione Asti le specificazioni "demi-sec", "secco", "extra secco" (Tablino, 2017).

### 3.3 Focus di studio del progetto

Oggi giorno, ma già all'epoca di Giovan Battista Croce, come citato nel suo libro, per produrre vini dolci, nel nostro caso il Moscato d'Asti, bisogna lavorare immediatamente le uve, per preservarne al massimo le caratteristiche organolettiche della materia prima, con la formazione di un mosto limpido nel più breve tempo possibile.

Il mosto così ottenuto viene stoccato in vasche termo-condizionate per la conservazione, limitando al massimo le alterazioni chimiche e microbiologiche, per

poi essere utilizzato nel momento richiesto per far avvenire la fermentazione alcolica, stabilizzazione, confezionamento e successiva commercializzazione.

In aziende medio-grandi, come nel caso della Casa Vinicola Marengo, la lavorazione delle uve per ottenere il mosto che verrà stoccato, ha come obiettivo l'ottenimento di un prodotto finale con le migliori caratteristiche organolettiche, da qui la necessità di operare lavorazioni rapide ed efficaci, che si svolgono secondo lo schema indicato al paragrafo 5.2.

### 3.3.1 Flottazione

La flottazione è un processo fisico mediante il quale si sfruttano le leggi di Archimede e Stokes. È una operazione pensata in ambito agroalimentare alle fine degli anni '80, inizio anni '90 da diversi ricercatori tra cui Ferrarini *et al.* (1991). Questo principio si basa sull'affioramento delle sostanze solide in sospensione, grazie al basso peso specifico acquisito in seguito all'unione della particella con microbolle di gas iniettate nel mezzo liquido.

L'applicazione di tale metodologia di separazione dei solidi sospesi, con le tempistiche necessarie, verte su tre variabili fondamentali: la densità e la viscosità del mezzo e la densità della particella da separare. Bisogna infatti preventivamente operare un enzimaggio (aggiunta di enzimi pectolitici) del mosto, per idrolizzare e ridurre le catene polimetilgalatturoniche rendendole maggiormente idrofobe e quindi avere una

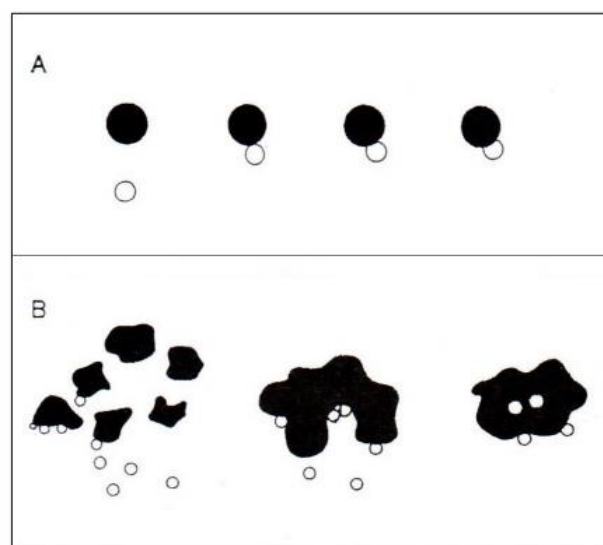


Figura 2 Modalità di aggregazione del gas ai solidi sospesi: A= adesione superficiale, B=inglobamento in flocculi (Nardin G. et al., 2006).



diminuzione della viscosità del mezzo. La ridotta dimensione della particella solida, porta anche ad un maggiore rapporto superficie/volume, quindi a un aumento della superficie di adesione con il gas, di conseguenza il peso specifico dell'intero agglomerato diminuisce. Per incrementare l'efficienza del processo è possibile aggiungere bentonite, gelatina, e altri coadiuvanti per ridurre le cariche elettrostatiche dei solidi sospesi, favorire l'ingrossamento del flocculo, la creazione di un angolo di contatto più elevato con la microbolla e una migliore risalita del complesso flocculo-bolla di gas (Wajsfelner, 1989; Ferrarini e Celotti, 1995). L'unione del gas con le particelle solide può avvenire per semplice adesione superficiale e la dimensione ottimale delle bolle di gas è di 120  $\mu\text{m}$ , poiché aderiscono meglio e seguono un moto laminare e non creano movimenti turbolenti durante la risalita nel mosto (De Vita P. et De Vita G., 2003). Una seconda modalità di unione tra solido-gas avviene per inglobamento della bolla all'interno del fiocco in sospensione durante la sua formazione (Figura 2).

L'aggiunta dei coadiuvanti può aiutare la pulizia del mosto e eliminare sostanze polimeriche come le proteine, che interferiscono con le lavorazioni successive del mosto, soprattutto la filtrazione. La bentonite è il coadiuvante con il maggiore effetto deproteinizzante, grazie alla sua carica elettrostatica e alla sua conformazione strutturale, il suo uso evita le precipitazioni della sostanza colorante (Blade et Boulton, 1988; Puig-Deu et al., 1999). Molti autori hanno effettuato prove in merito all'interazione della bentonite e altri coadiuvanti, con i principali composti del mosto e del vino, e anche con il quadro aromatico. Guillou et al. (1998) e Moio et al. (2004) reputano che i trattamenti a base di bentonite portino alla perdita di aromi, soprattutto glicosilati, ciò può avvenire mediante un allontanamento diretto (adsorbimento sulla bentonite) o indiretto (gli aromi legati alle proteine vengono eliminati durante l'allontanamento di queste ultime portando alla perdita sensoriale). Altri studi come Lambri et al. del 2012, reputano che la fermentazione alcolica promuova il degrado e/o la denaturazione di proteine "fragili", mentre quelle "forti" rimangono in soluzione e tendono a formare precipitati nel tempo. L'aggiunta di bentonite nel mosto può favorire la rimozione di queste proteine "forti" per fornire la stabilizzazione precoce del vino futuro. Inoltre, l'impatto della bentonite sulle sostanze colloidali del mosto non di matrice proteica può modificare l'attitudine delle proteine stesse portandole a

precipitare durante la fermentazione, quindi la bentonite può influenzare la stabilità dei vini ottenuti dopo la fermentazione. Come indicato da Lambri *et al.* del 2012 e Colangelo *et al.* del 2019, l'aggiunta di bentonite nei mosti, fino a dosi di 55 g/hl (con concentrazione maggiore di cationi di sodio) non porta a differenze significative sul quadro aromatico ed è in grado di migliorare la stabilità proteica e quella del colore sul vino moscato dopo la fermentazione alcolica. Vi è comunque un fattore annata che porta a differenze sui risultati, in quanto ci possono essere interazioni differenti tra colloidali, proteine e tannini.

Ad influenzare le tempistiche e il risultato finale del processo vi è la temperatura del mosto, in quanto condiziona notevolmente la viscosità e la densità del fluido, attenuando così la differenza di densità tra mosto e complesso solido-gas, diminuendo l'attività enzimatica e influenzando la velocità di affioramento spiegata dalla legge di Stokes.

La flottazione avviene grazie ad un pressurizzatore (massimo 5 bar con flusso di gas di 3,5-4 l/min) che crea micro-bolle, le quali si uniscono ai solidi presenti nel liquido, e affiorando originano uno strato di fecce sulla superficie del liquido trattato nell'arco di qualche ora. Questa tecnica può essere realizzata utilizzando gas inerte come l'azoto, per non intaccare i composti presenti nelle uve, oppure utilizzando aria atmosferica con la presenza di ossigeno. La scelta di questa tecnica per la separazione dei solidi solubili, porta già in vasca di flottazione una ossidazione delle frazioni polifenoliche facilmente ossidabili del mosto, che però saranno allontanate con le fecce in seguito al processo di flottazione. Inoltre, se si effettua la separazione mediante l'utilizzo di aria, si ha un maggiore effetto ossidante per quanto riguarda catechine e acidi idrossicinnamici, che verranno subito allontanati, oppure scompariranno poi in fermentazione alcolica, portando ad una stabilizzazione maggiore del mosto da futuri imbrunimenti (Ferrarini *et al.*, 1991; Gerbi *et al.*, 1995). La flottazione su mosti di uve Moscato è in grado di ridurre i solidi sospesi nel mosto a valori dello 0,5-1 % partendo da valori dell'ordine di 10-15 %, ed ottenere così valori nefelometrici in media inferiori a 50 NTU. Questa applicazione tecnologica porta alla diminuzione della carica di lieviti e il contenuto di colloidali. La carica di lieviti diminuisce all'incirca di un ordine di grandezza 10, facilitando così le successive operazioni di filtrazione. L'abbassamento del contenuto di colloidali varia tra 10 e 40

% per quanto riguarda la sola flottazione, mentre l'enzimaggio di due ore, porta ad una diminuzione del 50 % della concentrazione iniziale di colloidali (Gerbi *et al.*, 1995). Rispetto alla sedimentazione statica, questa tecnica permette una migliore stabilizzazione polifenolica e quindi riduzione della solforosa come antiossidante, consente una diminuzione della carica di lieviti più elevata, quindi maggiore stabilità microbiologica, una più efficiente microfiltrazione, un minore contatto tra mosto e fecce e una minore cessione di sostanze indesiderate.

### 3.3.2 I lieviti nei mosti e l'acetaldeide

Lieviti e batteri fanno parte della microflora naturale delle uve, e la carica microbica varia in relazione allo stato sanitario delle uve, alle pratiche colturali del vigneto, all'area geografica di coltivazione e alla maturità delle uve (Barata *et al.* 2012).

Come verificato da molti autori, la carica microbica sulle uve, si modifica anche con il variare della fase fenologica. Quando gli acini sono ancora immaturi, la carica è nell'ordine di  $10^3$  UFC/g e lieviti maggiormente presenti sono in particolar modo *Aureobasidium pullulans*, ma anche dei generi *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Candida*. Con il progredire della maturazione la carica aumenta fino a valori di  $10^5$ - $10^6$  UFC/g, in cui vi sono oltre ai lieviti precedentemente citati, anche i generi *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) e *Metschnikowia*. Se le uve sono danneggiate presentano un incremento della carica, soprattutto di questi ultimi, e si ha uno sviluppo maggiore di batteri acetici e lattici, oltre ad avere un incremento significativo di *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, che altrimenti normalmente sono presenti in quantità molto ridotte (Pretorius *et al.*, 1999, Fleet, 2003; Tofalo *et al.*, 2011; Alessandria *et al.*, 2015).

Con la rottura della bacca e la liberazione del succo d'uva, i lieviti non-*Saccharomyces* sono sottoposti a selezione in funzione di alcuni parametri inibenti del mosto, come il pH compreso tra 2,9 e 3,5 e l'elevato quantitativo di zuccheri fermentescibili. Oltre alle diverse operazioni in cantina (flottazione, filtrazione, basse temperature) l'aggiunta della solforosa porta ad una ulteriore selezione delle specie e diminuzione della carica microbica (Suzzi e Tofalo, 2018).

I lieviti presenti nelle prime fasi dopo la fuoriuscita di mosto appartengono soprattutto ai generi *Candida* e *Kloeckera* seguiti da *Metschnikowia* e *Pichia*. Inoltre sono presenti

anche lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* i quali possono derivare per la maggior parte da inquinamenti del mosto quando viene a contatto con attrezzature e serbatoi, o in seguito a selezione che avviene nel mosto-vino dovuta a condizioni operative (temperature, operazioni preliminari sul mosto) e prodotti selezionanti (anidride solforosa) (Constantí *et al.*, 1997; Charoenchai *et al.*, 1998). Questo porta a cambiamenti del profilo microbiologico dei mosti che vengono stoccati in cantina, o se si effettuano fermentazioni spontanee. Nel genere *Saccharomyces* ci sono 14 specie derivanti da selezione naturale, e sono state classificate da Kurtzman e Fell nel 1998, dividendole in *sensu stricto* e *sensu lato*. Nel primo gruppo rientrano tutte le specie di interesse enologico, come *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* e *S. uvarum* (*S. bayanus* var. *uvarum*). Di interesse enologico vi è anche una specie ibrida tra *S. eubayanus* e *S. uvarum*, che è la specie *S. bayanus* (var. *bayanus*) che porta il 37% del genoma della prima, e il 63% della seconda. Come descritto da Serra *et al.* nel 2005, le due specie di *S. bayanus* var. *uvarum* e var. *bayanus*, si distinguono per la loro adattabilità a bruschi cali di temperatura, in quanto la var. *uvarum* è meno sensibile, questo è in accordo con la definizione di lievito criotollerante utilizzata da Naumov nel 1996. *Saccharomyces uvarum* e ibridi naturali tra specie del genere *Saccharomyces* sono reputati i lieviti maggiormente presenti in caso di fermentazioni a basse temperature (Sipiczki M. 2002; González *et al.* 2006). Questa specie, è stata identificata a fine fermentazione in vini prodotti in zone fredde, nonostante non siano stati trovati sulle uve (Demuyter *et al.*, 2004); questo porta a pensare che rimangano vitali in cantina da una stagione all'altra e che colonizzino anche i mosti conservati a basse temperature. Giudici *et al.* (1995); Bertolini *et al.* (1996); González Flores *et al.* (2017) e altri autori indicano che *S. uvarum* è un lievito che produce poco acido acetico, minori quantità di alcol etilico e produce maggiori quantità di glicerolo e acido succinico. Produce anche sostanze odorose di interesse enologico come il 2-feniletanolo (sentore di rosa) e il 2-fenilettil-acetato (sentore floreale-fruttato). Nelle prime fasi di fermentazione, o in caso di avvii rallentati, il lievito non riesce ad effettuare la fermentazione alcolica completa, in quanto l'enzima piruvato decarbossilasi è debolmente espresso. Tale patrimonio enzimatico porta ad avere limitate quantità di acetaldeide che non verranno ridotte ulteriormente ad etanolo. Questo crea deviazioni a livello della glicolisi, come la fermentazione glicero-piruvica,

che serve ad evitare che il lievito vada incontro ad un accumulo eccessivo di trasportatori di elettroni (NADH) con conseguenze metaboliche per la cellula stessa, ma anche per produrre glicerolo, utile per l'equilibrio osmotico cellulare. Il NADH che si forma per ossidare la gliceraldeide-3-fosfato, deve essere riossidato per riequilibrare i pool enzimatici, formando a partire dal diidrossiacetone-1-fosfato (DAP) il glicerolo-3-fosfato, e in fine il glicerolo. Il piruvato che si è accumulato viene convertito in parte in acetaldeide, senza portare alla formazione dell'etanolo in quanto manca il NADH, ma favorendo ad esempio il legame con la solforosa presente nel mosto. È stato evidenziato che, all'aumentare della solforosa nel mosto, vi è un incremento della sottrazione di acetaldeide al suo normale decorso metabolico, e quindi un aumento del NADH da ossidare formando maggiori quantità di glicerolo (Neuberg, 1946) (Figura 3).

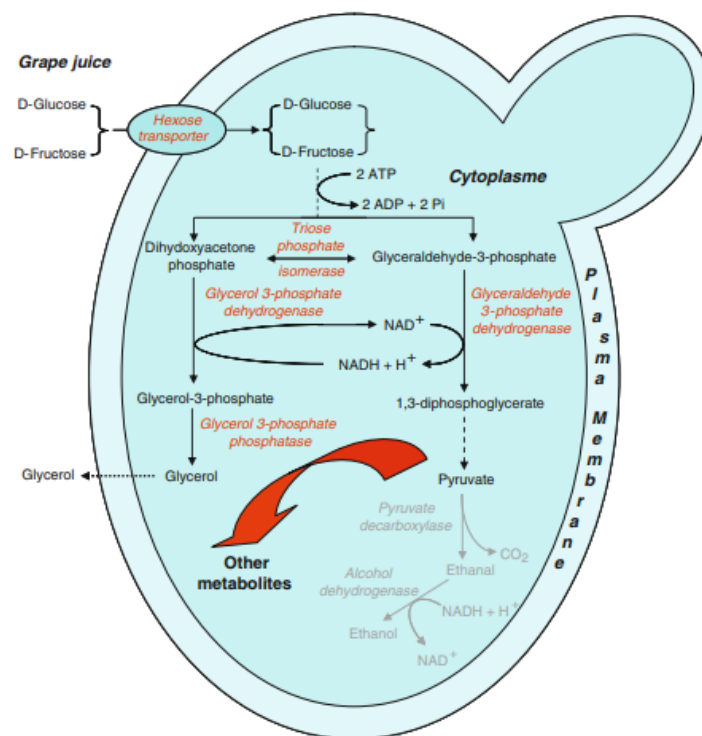


Figura 3 Fermentazione glicero-piruvica del lievito (Moreno-Arribas e Polo 2011).

Oltre all'acetaldeide, a partire dal piruvato, si forma ac. acetico, ac. succinico, acetoino, 2-3 butadiene. L'etanale ha un odore associato alla mela tagliata, noce o semplicemente descritta con il termine di "svanito". Come indicato dal Ribéreau-Gayon (2007b), se pochi milligrammi di questa aldeide sono liberi, cioè non legati con la

solforosa addizionata al vino, è subito percepibile olfattivamente e identificabile con i descrittori sopra indicati.

### 3.3.3 Il diossido di zolfo in enologia

Il diossido di zolfo, o meglio conosciuto come anidride solforosa, o  $\text{SO}_2$  è un composto utilizzato fin dal XVIII secolo come additivo nel vino come conservante. Questa molecola può essere addizionata come additivo enologico regolato dal Reg.(CE) n. 606/2009, ma può essere prodotto dai lieviti, anche appartenenti al genere *Saccharomyces* da qualche mg/l, fino ad arrivare ad alcuni casi a concentrazioni intorno a 100 mg/l (Suzzi e Tofalo, 2018). Le elevate quantità sono dovute ad un pool enzimatico molto attivo nel metabolismo dello zolfo, durante la riduzione del solfato a solfuro, soprattutto l'enzima solfato permeasi quando non è represso dalla metionina presente nella cellula. Ad influenzare le quantità prodotte di solfiti e solfuri nel vino sono la composizione del mosto, le condizioni anaerobiche in cui si svolge la fermentazione e il ceppo di lievito utilizzato in quanto si hanno diversi geni espressi.

L'anidride solforosa addizionata esplica 4 principali funzioni:

- Antisettico
- Antiossidante
- Antiossidasico
- Estraente in macerazione.

L'anidride solforosa che si addiziona al vino può essere sotto forma gassosa, liquida (soluzione di bisolfito di potassio o ammonio) o solida (metabisolfito di potassio). In qualsiasi forma la si aggiunga al mosto-vino, essa tenderà a solubilizzarsi secondo i seguenti equilibri:



La  $\text{SO}_2$  è chiamata frazione MOLECOLARE, mentre l' $\text{HSO}_3^-$  è detta frazione BISOLFITICA. La costante acida di questo equilibrio ( $\text{pK}_{a1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ) è di 1,81; questo significa che a pH enologici l'equilibrio tende verso destra, cioè al consumo della frazione molecolare per formare frazione bisolfitica.

L'HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> presenta un secondo equilibrio acido, con pKa<sub>2</sub> pari a 6,91 e quindi non viene considerato nelle dinamiche chimiche in campo enologico, perché ha una valenza marginale. Come ogni equilibrio chimico, la costante acida è influenzata dai parametri ambientali, nel nostro caso la pKa<sub>1</sub> aumenta con l'incremento del titolo alcolometrico (% v/v) e della temperatura (°C), ma diminuisce con l'accrescersi della forza ionica (I). L'incremento della pKa<sub>1</sub> porta ad avere una maggiore componente molecolare e una maggiore dissociazione della frazione combinata, con incremento anche della frazione libera, questo a parità di anidride solforosa totale.

Nel vino l'anidride solforosa è distinta in tre forme: combinata e libera, e in quest'ultima rientra la frazione molecolare, tutte e tre le frazioni assieme danno origine alla solforosa totale (Figura 4).

La frazione molecolare è quella che ha il maggior effetto antisettico, in quanto è la

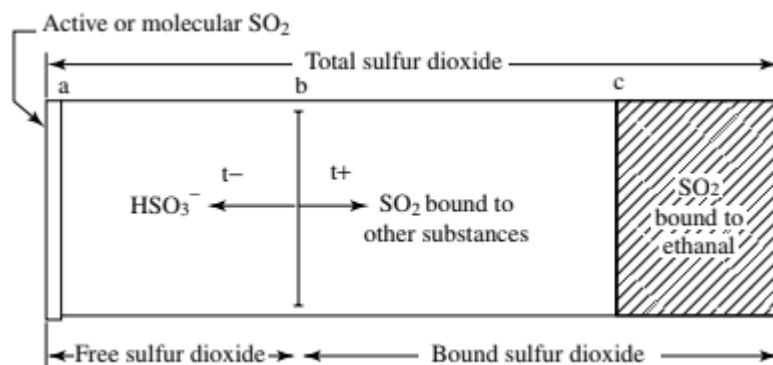


Figura 4 Rappresentazione delle diverse forme del diossido di zolfo nel mosto-vino (Ribéreau-Gayon del 2007a)

forma non ionizzata in grado di oltrepassare la membrana cellulare dei lieviti, e una volta entrata si dissocia secondo l'equilibrio precedentemente citato. La forma ionizzata andrà ad interferire con proteine a livello dei ponti disolfuro, con enzimi e vitamine, portando a morte il microrganismo (Romano e Suzzi, 1992). Per quanto riguarda i batteri lattici, anche la frazione combinata effettua un ruolo inibente, ma nell'ordine di 5-10 volte minore rispetto a quella libera e molecolare. Infatti, i batteri lattici sono già inibiti con 100 mg/l di solforosa totale e 10 mg/l di solforosa libera,

$$\text{SO}_2 \text{ molecolare (\%)} = \frac{100}{10^{\text{pH}-1,81} + 1}$$

Figura 5 Formula per il calcolo della solforosa molecolare (%) in funzione della solforosa libera, pH del mosto-vino e pKa

il tutto ulteriormente influenzato dal pH del mosto-vino. La frazione molecolare è calcolabile empiricamente come percentuale della frazione libera (Figura 5). La quantità di solforosa molecolare sufficiente per controllare i batteri è di 0,5-1 mg/l, mentre per quanto riguarda i lieviti sono necessari 1-2 mg/l.

La solforosa libera è quella frazione efficace nello svolgere la funzione antiossidante e antiossidasica, questa attività nei confronti delle ossidazioni da origine alla forma combinata della solforosa.

Questo perché l'attività antiossidante è dovuta alla proprietà dello ione bisolfito di essere un nucleofilo, cioè essere attratto da quegli atomi o parte di molecole aventi una parziale o totale carica positiva. Questa sua nucleofilia lo porta a bloccare quelle molecole ossidate e ossidanti come l'acetaldeide, zuccheri, acidi chetonici, polifenoli, e tutte quelle sostanze con deficit elettronico (elettrofili). Questi legami reversibili sono gestiti da costanti di equilibrio ( $K_d$ ) differenti per ogni composto, come equilibri chimici. Come dimostra la Figura 6 più è basso il valore della  $K_d$  maggiore è la percentuale

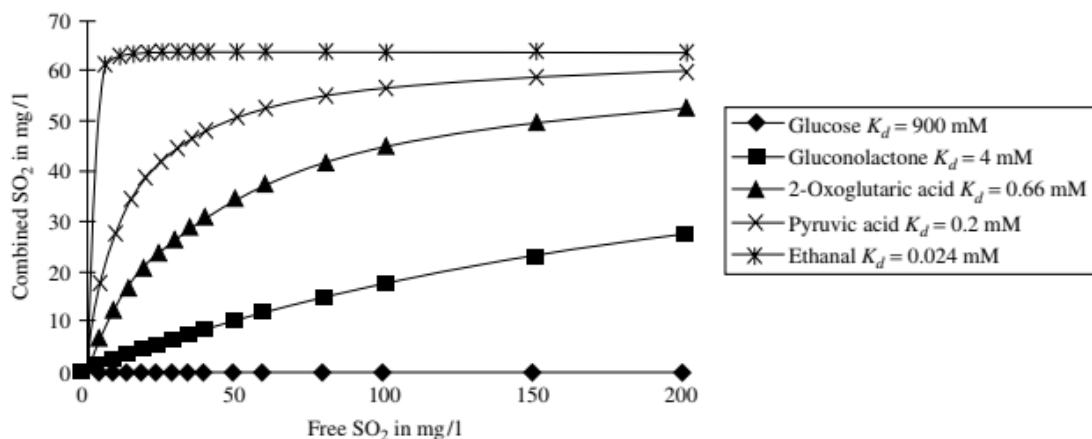


Figura 6 Curve di combinazione del diossido di zolfo con diversi composti alla concentrazione di mM in funzione del loro  $K_d$  (aRibéreau-Gayon del 2007).

del composto legato rispetto a quello libero dalla solforosa, e questo spiega anche perché vi è una frazione di solforosa combinata labile, che è quella legata a composti con  $K_d$  alto, mentre quella stabile è legata con composti che presentano una  $K_d$  bassa. Si può notare che l'acetaldeide è il composto carbonilico con maggiore stabilità del legame e questo porta ad una addizione istantanea tra l'acetaldeide libera nel mosto o vino con la frazione libera. Il legame si forma mediante addizione nucleofila, cioè gli elettroni maggiormente presenti sull'atomo di zolfo "attaccano", nel caso



dell'acetaldeide, il carbonio a cui sono legati i due atomi di ossigeno, che è un elettrofilo (Ribéreau-Gayon del 2007a).

### 3.3.4 I terpeni

Come citato nel Ribéreau-Gayon *et al.* del 2007b, il primo a pensare che i terpeni fossero i composti aromatici dell'aroma moscato è stato Austerweil nel 1946. Dopo di che molti studiosi si sono immersi nello studio di questi composti, a partire da Usseglio-Tomasset e collaboratori nel 1966, che individuarono il linalolo come l'alcol terpenico responsabile del sapore moscato. In seguito, altri autori come Stevens *et al.* (1966) e Terrier (1972), identificarono ulteriori molecole odorose come il nerolo, l' $\alpha$ -terpineolo, il citronellolo, il geraniolo, etc. (Di Stefano, 2013). Si pensa che in natura siano presenti più di 40.000 forme di terpenoidi, con diversa struttura chimica, e che derivino tutti da una stessa via biosintetica e sono classificati in funzione del numero di unità isopreniche da cui sono composti. I monoterpeni e i sesquiterpeni sono coinvolti nella comunicazione chimica tra piante e altri organismi come attrattori, deterrenti o segnalatori, con relazioni scoperte tra la produzione di sostanze volatili vegetali, l'attacco di erbivori e l'attrazione di predatori naturali (Dunlevy *et al.*, 2009). Sono dei metaboliti secondari composti da uno scheletro formato da più unità isopreniche (2-metil-1,3-butadiene). I terpeni di interesse enologico si tendono a classificare in funzione del numero di unità da cui sono formati: monoterpeni (due unità), e sesquiterpeni (tre unità), fino ad arrivare a tetraterpeni (8 unità isopreniche) definiti anche carotenoidi, rispettivamente di 10 e 15 e 40 atomi di carbonio. Quelli di maggiore interesse per l'uva a sapore moscato, sono i primi, i monoterpeni, i quali conferiscono il tipico aroma.

I monoterpeni sono definiti aromi varietali, cioè vengono sintetizzati nella bacca e se superano la soglia di percezione olfattiva rendono aromatiche le uve, i mosti e il vino. Sarebbe sbagliato ritenere che tali aromi siano caratteristici di una sola cultivar o gruppi di vitigni, in quanto sono presenti in molte varietà, al di sotto della soglia di percezione, influenzandone comunque l'aroma. I terpeni vengono sintetizzati dalla pianta sia nei fiori in forma molto abbondante, sia nella bacca; in quest'ultima sono presenti in tutte le fasi di accrescimento, anche se l'accumulo delle molecole odorose si ha dalla fase erbacea seguendo l'incremento del tenore zuccherino. L'accumulo

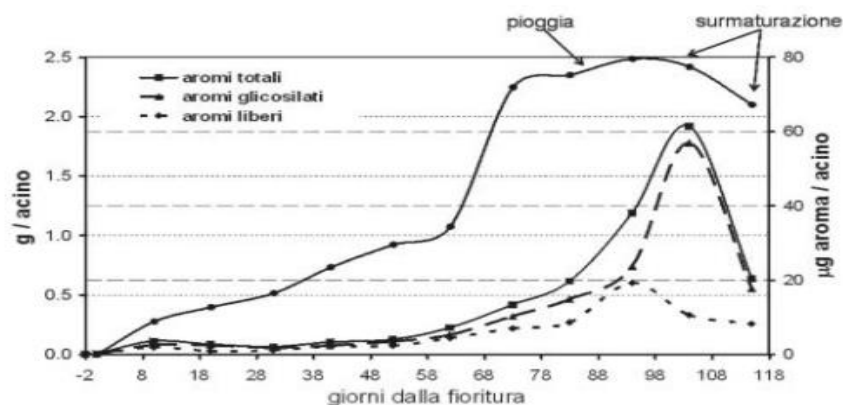


Figura 7 Curva di crescita dell'acino e concentrazioni delle componenti libere e glicosilate degli aromi in acini di "Moscato bianco" espresse in  $\mu\text{g}$  per acino. (D'Onofrio, 2011)

nell'uva porta ad un picco massimo qualche settimana antecedente la completa maturazione (Figura 7) e poi un decremento (Wilson et al., 1984; Gunata et al., 1985; D'Onofrio, 2011).

I monoterpeni vengono sintetizzati nella bacca secondo due vie metaboliche (Figura 8), una chiamata via dell'acido mevalonico (MVA), attiva nel citosol, e una via del 2-C-metil-D-eritritolo-4-fosfato (MEP), attiva nei plastidi. In vite la via di maggiore interesse è quella plastidiale, in cui il piruvato e la gliceraldeide-3-fosfato con una serie di reazioni di riduzione, e fosforilazione originano isopentenil difosfato (IPP) e il dimetilallil difosfato (DMAPP) (sono l'isoprene C5 da cui si originano i monoterpeni). Queste due molecole grazie al geranil pirofosfato sintetasi vengono unite mediante rottura di un legame fosfodiester e un attacco nucleofilo, con la formazione del geranil pirofosfato. Da questa unità C10 di base, le sintasi terpeniche facilitano varie reazioni e riarrangiamenti, producendo un'ampia varietà di prodotti finali monoterpeni. Il Farnesil pirofosfato sintasi catalizza le reazioni di condensazione tra le molecole DMAPP e IPP per produrre il farnesil pirofosfato intermedio C15 (FPP).

Questa unità base C15 funge da precursore chiave di un gran numero di prodotti naturali, compresi i sesquiterpeni (Duradeva et al., 2004). I monoterpeni possono formare idrocarburi semplici (limonene, etc.), alcoli (linalolo, geraniolo, nerolo, etc.), aldeidi (nerale, etc.), esteri (geranil acetato, neril acetato, etc.), acidi (acido geranico, etc.). I monoterpeni presentano uno o più centri chirali, e questo porta ad avere molecole con due o più forme isomeriche che presentano aroma e soglia di percezione differente.

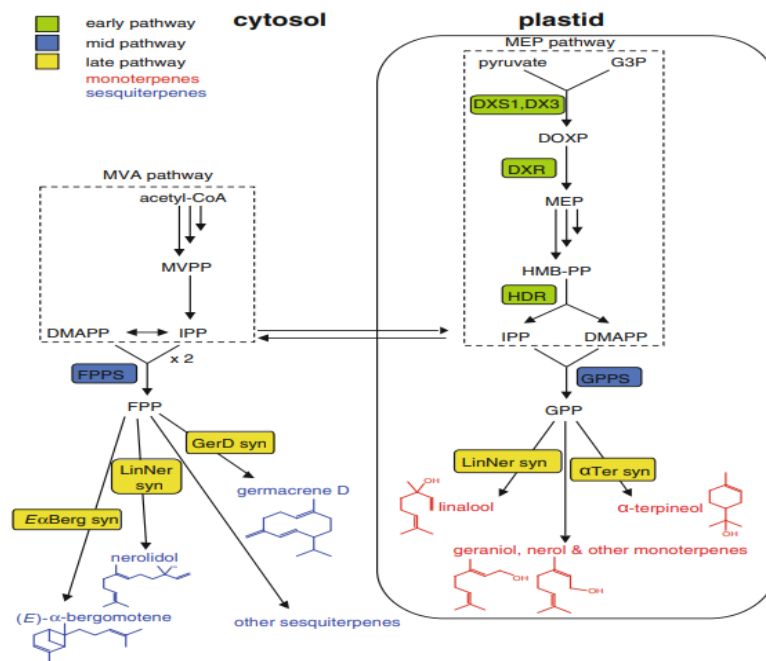


Figura 8 Schema della biosintesi dei monoterpeni e sesquiterpeni. (Martin *et al.*, 2012)

Dopo la loro formazione possono andare incontro all'unione con una molecola di  $\beta$ -glucosio, e poi con un pentoso come l'apiosio, l'arabinosio e il ramnosio, formando i terpeni glicosilati. Possono trovarsi sia all'interno della buccia, sia nella polpa e nei succhi vacuolari e sono sottoforma di agliconi o glicosidi. La presenza di queste forme libere e glicosilate furono scoperte e ipotizzate inizialmente da Cordonnier e Bayonove nel 1974, che cercarono di trovare un protocollo sperimentale per analizzarli e quantificarli. Per confermare l'effettiva presenza di questi composti nel Moscato bianco bisogna attendere il lavoro di Di Stefano del 1982, mentre la struttura chimica è stata scoperta da Williams nel medesimo anno. La forma glicosidica è quella utilizzata per l'accumulo da parte delle piante, in quanto è anche quella riconosciuta dai sistemi di trasporto per essere veicolata mediante i vasi floematici alla bacca, l'unione tra il terpene e il monosaccaride avviene grazie ad enzimi glicosiltrasferasi e si presume siano all'interno del citoplasma o associati alle membrane dei vacuoli (Bowles *et al.* 2006).

Generalmente la frazione glicosidica è maggiormente presente rispetto la forma libera, anche se nel moscato bianco tende ad avere concentrazioni uguali. I terpeni liberi non sono disposti equamente tra le varie parti della bacca, infatti il neroli e geraniolo sono maggiormente presenti nella buccia, mentre il linalolo e i dioli sono distribuiti equamente tra polpa e buccia. (Moreno e Peinado, 2012). La buccia è

maggiormente ricca delle forme libere, mentre quelle legate sono maggiormente localizzate nella polpa. La concentrazione dei diversi terpeni e la loro più o meno glicosilazione variano in funzione della varietà (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2007b)

Per quanto riguarda i moscati, tra cui anche quello bianco, la concentrazione di questi composti supera la soglia di percezione olfattiva che è differente per singolo composto, ma in totale la concentrazione può arrivare fino a 4-6 mg/l nel mosto o vino. Come indicato nella Figura 9, è possibile osservare che le soglie olfattive sono differenti per ogni singolo composto e che l'aroma che conferiscono varia dalla rosa (linalolo, nerolo e geraniolo), mugugno ( $\alpha$ -terpineolo), citronella (citronellolo) e tiglio (Ho-trienolo). Per quanto riguarda il Moscato bianco, il composto caratteristico è il

Monoterpene	Olfactory description	Olfactory perception threshold ( $\mu\text{g/l}^a$ )
Linalol	Rose	50
$\alpha$ -Terpineol	Lily of the Valley	400
Citronellol	Citronella	18
Nerol	Rose	400
Geraniol	Rose	130
Ho-trienol	Linden	110

Figura 9 Caratteristiche dei principali monoterpeneoli e relative soglie di percezione olfattive (determinate nei vini) (Ribéreau-Gayon del 2007b).

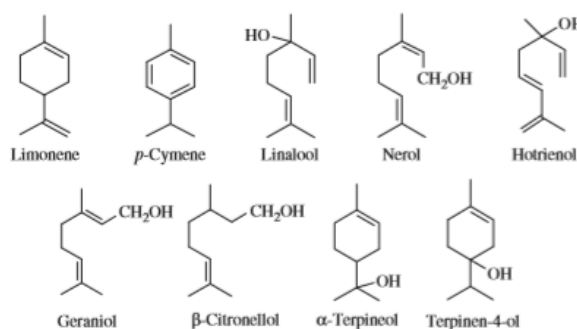


Figura 10 Principali Monoterpeni di interesse enologico (Moreno e Peinado, 2012).

linalolo, con i suoi derivati come  $\alpha$ -terpineolo, diandiol 1 e 2, ho-trienolo (Figura 10). Il legame con il  $\beta$ -glucosio rende la molecola meno volatile ma maggiormente percepita dalla mucosa olfattiva, in quanto la molecola è più solubile in acqua; mentre se legata con un eteroside diventa molto solubile e quindi per la legge di Henry, poco volatile. Le forme glicosilate essendo più solubili, una volta estratte rimangono maggiormente nel mosto-vino, senza disperdersi per volatilizzazione. Questo li rende un "polmone di accumulo", che in seguito a reazioni di idrolisi acida e enzimatica liberano terpeni liberi in seguito alla rottura del legame glicosidico.

La liberazione per idrolisi del glucosio avviene mediante una  $\beta$ -glucosidasi, mentre se bisogna liberare due monosaccaridi, è necessaria una doppia idrolisi in cui interviene prima una  $\alpha$ -ramnosidasi,  $\alpha$ -arabinosidasi, apiosidasi o xilosidasi per staccare il pentoso, e successivamente può intervenire la  $\beta$ -glucosidasi per liberare completamente l'aglicone. Questi enzimi sono presenti già nell'uva, ma a causa

dell'ambiente inibitorio (elevate concentrazioni di zucchero, pH e temperatura ambientale) del succo d'uva presentano un'attività limitata. Il ridotto pH dei mosti porta ad avere delle reazioni acido catalizzate di idrolisi sul lungo periodo, ma questo effettua anche una attività inibente per quanto riguarda gli enzimi come le  $\beta$ -glucosidasi,  $\alpha$ -arabinosidasi e  $\alpha$ -ramnosidasi che hanno un pH ottimale di 5. Ad ostacolare l'attività enzimatica vi è anche l'elevato quantitativo di zucchero presente nel mezzo liquido, il quale diventa un inibitore delle reazioni enzimatiche (Aryan *et al.*, 1987; Moreno e Peinado, 2012). Inoltre, questi enzimi, sia derivanti dall'uva, sia di origine microbiologica, hanno una scarsa specificità di substrato, di conseguenza la loro attività è ulteriormente ridotta.

La conversione da aroma glicosidato a libero può essere svolta anche da enzimi prodotti da *S. cerevisiae*, non-*Saccharomyces* e batteri lattici durante le rispettive fermentazioni alcoliche e malolattiche (per vini non come il Moscato d'Asti). In seguito a diversi studi (Darriet *et al.*, 1988; Ugliano *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2019) è stato evidenziato e confermato che *S. cerevisiae* esplica un intervento mediante diversi enzimi glucosidici, soprattutto nella prima parte della fermentazione alcolica, quando il tenore alcolico è contenuto e non inibisce l'enzima, ma l'incremento in terpeni liberi è molto ridotto. Altri lavori (Rosi *et al.*, 1994; Cordero-Otero *et al.*, 2003) sostengono che l'intervento di lieviti non-*Saccharomyces* porti ad un maggiore rilascio di terpeni liberi, rispetto all'utilizzo di ceppi di *Saccharomyces* o in fermentazioni miste o coinoculi. Come dimostrato da Rodríguez *et al.* (2010) *Candida pulcherrima*, produttrice di  $\beta$ -glucosidasi, nel Moscato d'Alessandria ha portato ad un incremento di  $\alpha$ -terpineolo e nerolo. Tuttavia, i vini prodotti dalla fermentazione mista con inoculazione simultanea o sequenziale con *S. cerevisiae* hanno mostrato concentrazioni considerevolmente inferiori di  $\alpha$ -terpineolo, nerolo e geraniolo rispetto a una monocoltura con *C. pulcherrima*. Ulteriori studi sulla fermentazione mista con *Debaryomyces hansenii* e *S. cerevisiae* del Moscato di Frontignan hanno fortemente indicato un aumento del rilascio di geraniolo a causa dell'idrolisi dei precursori corrispondenti (García-Carpintero *et al.*, 2011). Si stanno inoltre sperimentando nuovi approcci come l'utilizzo di ibridi tra specie differenti, come nel caso del lavoro di Bellon *et al.* (2013), in cui hanno evidenziato un maggiore rilascio di composti odorosi utilizzando un ibrido tra *S. cerevisiae* commerciale e *S. mikatae* (una specie non

precedentemente associata alla fermentazione alcolica). Inoltre, dal lavoro di Bisotto *et al.* (2015) si evidenzia che il problema principale della liberazione degli agliconi da parte dei microrganismi è dovuto ad un collo di bottiglia in merito ai trasportatori di membrana di queste molecole relativamente grosse e che non possono diffondere autonomamente attraverso la membrana per sola diffusione. Queste informazioni sono utili per programmi di selezione dei ceppi che hanno una attività maggiore di trasporto dei precursori glicosilati.

Gli enzimi utilizzati per incrementare l'aroma del mosto e vino, oltre a derivare da microrganismi presenti nel mezzo, possono essere anche prodotti da microrganismi esogeni e addizionati successivamente. L'uso di questi additivi inizialmente era collegato a altre attività secondarie come la cinnamato esterasica con formazione di off-flavour, che collegato all'attività decarbossilasica di *S. cerevisiae* porta alla formazione di fenoli volatili al di sopra della soglia di percezione. Grazie al lavoro di Gunata *et al.* (1993), si è iniziato a sviluppare preparati enzimatici privi dell'enzima sopra citato per evitare trasformazioni negative del prodotto finale. Il metodo utilizzato per arricchire effettivamente il vino in composti volatili è efficace solo quando si usano vini secchi, poiché la  $\beta$ -glucosidasi nelle preparazioni enzimatiche fungine è inibita dal glucosio; pertanto, l'idrolisi dei glicosidi terpenici non si completa nei vini dolci ottenuti da uve Muscat de Frontignan (Gunata *et al.*, 1990).

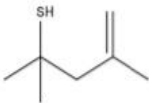
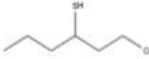
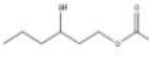
Oltre all'attività enzimatica, interessanti sono gli studi che riguardano la trasformazione dei terpeni liberi da parte dei lieviti, con variazione dei rapporti finali dei composti odorosi. Da lavori di Di Stefano *et al.* (1992) e Dugelay *et al.* (1992) è possibile osservare che il nerolo e il geraniolo durante la fermentazione alcolica sono stati trasformati in altri monoterpeni. Il nerolo è stato convertito in neril acetato e  $\alpha$ -terpineolo. Mentre dal geraniolo si sono formati il geranil acetato, citronellil acetato, citronellolo e linalolo.

Il pH, oltre a interferire con l'attività degli enzimi, ha un ruolo diretto sulla trasformazione dei precursori aromatici e sulle molecole stesse dei monoterpeni. Ad esempio da lavori di Williams *et al.* (1982) si evidenziano riorganizzazioni molecolari del geraniolo in linalolo e  $\alpha$ -terpineolo. Altri studi di Bordiga *et al.* (2013) hanno messo in evidenza trasformazioni, dovute al mezzo acido, del geraniolo e linalolo che vengono trasformati in  $\alpha$ -terpineolo, ho-trienolo e ossido cis di rosa.

Secondo studi di Parker *et al.* (2012) e Mayr *et al.* (2014) durante la degustazione i composti glicosilati, nel caso specifico i fenoli, vengono liberati contribuendo al sapore del vino attraverso l'idrolisi in bocca e la percezione retronasale dei composti aromatici liberati. Questo fa pensare che la stessa cosa valga per i composti terpenici. Come dimostrato da Cabaroglu e Canbas (2002), il contatto con la buccia aumenta i terpeni liberi e i glicosidi nel mosto e nel vino, inoltre si evidenzia un leggero incremento di composti fenolici in seguito al contatto con le bucce. Infatti si consiglia una macerazione al massimo di 24 ore, intervallo di tempo in cui si ha la massima estrazione dei composti volatili e la minore dei composti fenolici. Queste macerazioni pre-fermentative possono essere utili per incrementare il polmone di accumulo di composti aromatici, sia liberati nel lungo termine mediante idrolisi chimica, sia enzimatica mediata dai lieviti; ma anche percepiti direttamente dal consumatore al momento della degustazione.

#### 3.3.4 I tioli varietali

I tioli varietali sono anche conosciuti come mercaptani e sono composti solforati a bassa volatilità in quanto hanno un peso molecolare abbastanza elevato. Di questa famiglia fanno parte il 4-metil-4-mercapto-2-pentanone (4MMP) che dà origine a sentori di bosso e ribes nero, il 3-mercaptoesan-1-olo (3MH) e il 3-mercaptoesan-1-olo acetato (3MHA) con profumo di frutto della passione, pompelmo, scorza di agrume (Tominaga *et al.*, 1995; Roland *et al.*, 2011). Altri tioli varietali, che contribuiscono anche al sapore caratteristico, includono 4-mercapto-4-metil-pentan-2-olo (4-MMPOH), 3-mercaptopentan-1-olo e 3-mercaptoeptano-1-olo (Tominaga *et al.*, 1995). Questi composti aromatici influenzano i vini in quanto, nonostante siano presenti in basse concentrazioni (qualche decina o centinaia di ng/l) vengono percepiti in quanto la loro soglia olfattiva è molto bassa (Figura 11). I tioli varietali vengono sintetizzati nel corso della maturazione dell'uva, la comparsa del precursore del 4-MMP precede quella del 3-MH. Sono distribuiti in maniera non uniforme nell'acino: ad esempio nel Sauvignon i precursori Cys-4MMP e il Cys-4-MMPOH sono presenti per il 20% nella buccia e per l'80% nella polpa, mentre quello del 3-MH è equamente distribuito tra buccia e polpa (D'Onofrio, 2011).

Name	Structure	Aroma	Concentration range with regard to wine variety (ng/L)	Perception threshold (ng/L)
4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP)		Blackcurrant box-tree, broom, passion fruit	Sauvignon Blanc: 0.6–88 Gewurztraminer: nd–15 Reisling: nd–7.6	0.8
3-Sulfanylhexan-1-ol (3SH)		Grape fruit, citrus peel, passion fruit	Sauvignon Blanc: 26–18.700 Gewurztraminer: 1340–3280 Reisling: 407–562	60
3-Sulfanylhexyl acetate (3SHA)		Passion fruit, box tree, box wood	Sauvignon Blanc: 29–2510 Gewurztraminer: 0.5–5.7 Reisling: nd–6.4	4

Information summarized from Roland et al., 2011; Waterhouse et al, 2016; and Jeffery, 2016. *nd*, not detected

Figura 11 nome, struttura, aroma, concentrazione e soglia di percezione olfattiva dei tioli varietali più importanti (Ruiz et al., 2019).

I composti tiolici sono percepiti solo nei vini dopo la fermentazione alcolica in quanto nell'uva e nel mosto si trovano come precursori, cioè sono legati a composti che devono essere staccati, per poter rendere volatile la molecola. La quantità di precursori tiolici è influenzata dalla varietà, nutrizione azotata, stress idrico, esposizione e temperatura dell'uva e della pianta in vigneto. Le molecole legate al mercaptano sono il glutatione (GSH, tripeptide formato da acido glutammico cisteina e glicina), che originerà il dipeptide cisteina-glicina (Cys-Gly) e poi la cisteina (Cys). La liberazione del precursore avviene in quanto il lievito metabolizza i peptidi con liberazione di ammonio e catene carboniose (es. piruvato a partire dalla Cys). Queste reazioni sono di tipo enzimatico, ad opera di  $\beta$ -lasi che scindono il legame carbonio-zolfo, ma prima è necessario che il lievito nel vacuolo trasformi il precursore GSH-R in dipeptide R-Cys-Gly e infine in R-Cys; da qui nel citoplasma si ha la completa liberazione del tiolo e la successiva espulsione nel mosto-vino rendendolo volatile e percepibile (Figura 12). La capacità da parte del lievito di trasformare i precursori tiolici, secondo alcuni studi, è maggiore nelle prime fasi fermentative, in cui il lievito ha la crescita esponenziale (Ruiz et al., 2019). Un altro fattore importante è la tipologia di lievito utilizzato, infatti secondo molti studi, non tutti presentano una buona capacità  $\beta$ -liasica, e vi è una variabilità sia tra generi, sia all'interno della stessa specie. Non tutti i *S.cerevisiae* presentano la stessa attitudine nel scindere i legami carbonio-zolfo (Cordente et al., 2012) anche dovuto ad una diversa espressione genica; questo è stato dimostrato mettendo in evidenza una delezione del gene IRC7 (gene che codifica per l'enzima utilizzato per scindere la Cys-R), quindi codificando



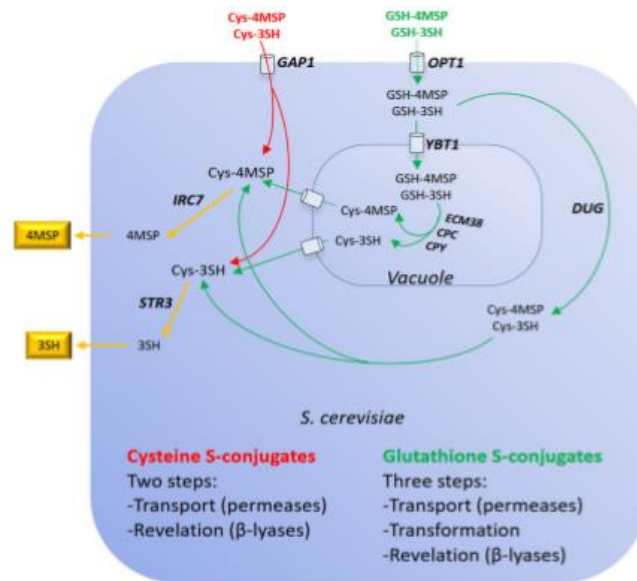


Figura 12 Processi metabolici e geni coinvolti per la liberazione dei precursori tiolici presenti nei mosti durante il processo fermentativo. (Ruiz *et al.*, 2019).

per un enzima con attività ridotta (Roncoroni *et al.*, 2011). Sono state evidenziate capacità superiori rispetto a *S.cerevisiae* da parte di *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* e *K. thermotolerans* di rilasciare dal suo precursore la molecola 3SH in quantità maggiore (Zott *et al.*, 2011). Il lavoro di Belda *et al.* (2017) e Englezos *et al.* (2018) dimostrano rispettivamente che il coinoculo sequenziale *T. delbrueckii* o *Starmerella bacillaris*, precedentemente a quelli di *Saccharomyces cerevisiae*, porta ad incrementi significativi dei composti tiolici, questo avviene in funzione della varietà di uva utilizzata come matrice di studio.

Oltre a derivare dalla matrice mosto, e quindi dai precursori originatisi nelle uve, i tioli derivano da percorsi alternativi rispetto a quelli sopra indicati. Infatti, secondo studi di Belda *et al.* (2017) e Pinu *et al.* (2012) il 4MMP, il 3MH e il 3MHA sono stati trovati in quantità maggiori a fine fermentazione rispetto ai precursori trasformati e ai quantitativi trovati nei mosti prima della fermentazione. Questo fa ipotizzare che il lievito sia in grado, mediante una via di biogenesi, di produrre tioli a partire da sostanze presenti e in parte auto prodotte. È stato ipotizzato che il 3MH derivi dal *E-2-esenale*, mentre il 4MMP derivi dall'ossido mesitilico in unione con l'acido solfidrico ( $H_2S$ ) portando alla formazione dei rispettivi tioli volatili. Il *E-2-esenale* nell'uva e nel mosto deriva dalla degradazione degli acidi grassi polinsaturi, che fanno parte della membrana cellulare dell'acino d'uva. L'acido linolenico viene ossidato in

posizione 13 ad opera di una lipossigenasi, con formazione di acido a 12 carboni e aldeidi ed alcoli a 6 carboni, tra cui il *E*-2-esenale. (Moreno e Peinado, 2012)

## 4. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro si propone come obiettivo il miglioramento della filiera produttiva e l'incremento qualitativo del Moscato D'Asti DOCG "Scrapona", che è già il fiore all'occhiello della Casa Vinicola Marengo di Strevi. L'attività sperimentale è stata svolta nel corso della vendemmia 2019 e nei mesi successivi.

Le uve per la produzione di questo vino derivano dal vigneto omonimo "Scrapona" locato in Valle Bagnario, con esposizione ottimale per la produzione di uve da utilizzare per questa tipologia di vino. Il mosto derivante dalle uve di questa vigna è stato sottoposto ad analisi e sperimentazioni in cantina per migliorare le fasi di illimpimento e conservazione del mosto, superando alcune criticità registrate in annate precedenti. Il mosto così ottenuto è stato poi stoccato in cella frigo per essere a disposizione dell'azienda per l'avvio della fermentazione in differenti periodi dell'anno. Il progetto prevede il controllo durante la fase di stoccaggio del mosto in cella frigo per evitare che insorgano trasformazioni microbiologiche e deterioramento del prodotto. Un controllo è avvenuto anche durante la fermentazione alcolica del mosto per osservare il processo microbiologico, ed evitare che modificazioni e produzioni elevate di sottoprodotti da parte del lievito possano avere un impatto sensoriale negativo sul prodotto finito.

Durante tutte le fasi di trasformazione del mosto e del vino, sono stati effettuati monitoraggi sugli aromi terpenici e tiolici, per comprendere meglio i punti deboli dell'intero processo che portano ad una perdita aromatica del prodotto.

Non va dimenticato che l'azienda è in corso di conversione da regime convenzionale a biologico, e questo obbliga l'azienda ad un minore quantitativo a disposizione di anidride solforosa come conservante (Reg. (CE) N. 203/2012) e quindi vi è richiesta una lavorazione più meticolosa in cantina.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Gestione del vigneto "Scrapona"

L'uva di moscato bianco utilizzata dall'azienda per la produzione del Moscato DOCG "Scrapona" deriva dall'omonima vigna sita in *Valle Bagnario* a Strevi (Figura 13) 44° 42' 23.5" N 8°29'46.4"E, piccolo comune a nord-est di Acqui Terme. Il vigneto è stato impiantato nel 1996, locato a 300 m s.l.m con esposizione sud-ovest e pendenza del 30% ca. Ha una dimensione di 5,7 ha, con 4200 ceppi/ha, sistema di allevamento a controspalliera e potatura a *guyot* e la disposizione dei filari è a girapoggio. Il terreno sottostante è di tipo calcareo-marnoso con pH di 5,5-6, e i portainnesti utilizzati sono il Kober 5BB e SO4 (berlandieri x riparia).



Figura 13 Vigna Scrapona in valle Bagnario a Strevi (AL)

Gli indici bioclimatici della zona sono 1600 per quello di Winkler e 2100 per Huglin, e questo conferma che la zona in cui è impiantato il vigneto è atta alla coltivazione di una varietà medio-precoce come il moscato bianco.

Il vigneto, in seguito a precedenti tesi e sperimentazioni (Boccaccio, 2016; Furlini, 2018), è stato condotto seguendo le pratiche di agricoltura biologica, in quanto è di interesse dell'azienda effettuare la conversione e successiva certificazione. Il terreno del vigneto in considerazione, viene condotto mediante un inerbimento a filari alterni, e la tecnica del sovescio nel filare lavorato con una multi-essenza (leguminose e graminacee) ogni 4 anni; inoltre non si effettua il diserbo chimico, ma le erbe infestanti vengono controllate mediante attrezzi che lavorano nel sotto-fila trainate dalla trattrice. Per il contenimento delle crittogame si utilizzano sostanze di origine naturale, prettamente a base di rame e zolfo e eventualmente sostanze ad azione sinergica per

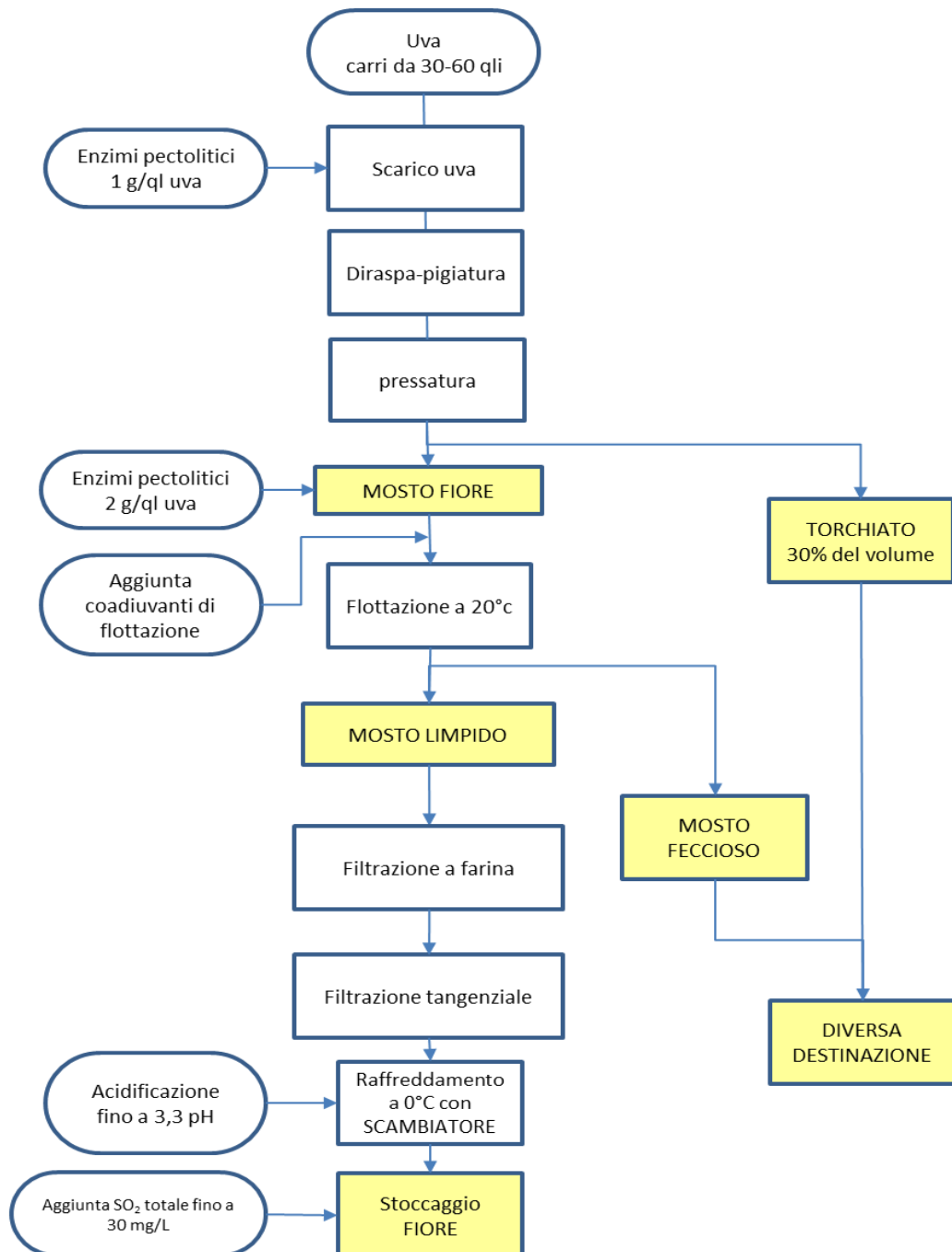
il controllo delle infezioni. Il vigneto Scrapona, seguendo le sperimentazioni precedenti, è suddiviso in due lotti principali che si differenziano solo per la pratica del diradamento che viene applicata nella parte del vigneto posta più in alto, questo per cercare di avere una maggiore concentrazione di aromi (Chapman *et al.*, 2004; Diago *et al.*, 2010; Kok, 2011). Tale pratica, come suggerito anche dagli autori appena citati, è stata svolta nei primi giorni di luglio, mentre si stava concludendo la fase fenologica dell'invasatura.

Durante l'ultimo periodo di maturazione delle uve, a partire dai primi giorni di agosto, è stato effettuato un controllo a cadenza settimanale, e sono state analizzate le uve per il controllo della maturità tecnologica, ma anche aromatica, soprattutto per il monitoraggio dei terpeni liberi, per capire il loro andamento stagionale e scegliere la data migliore per effettuare la raccolta.

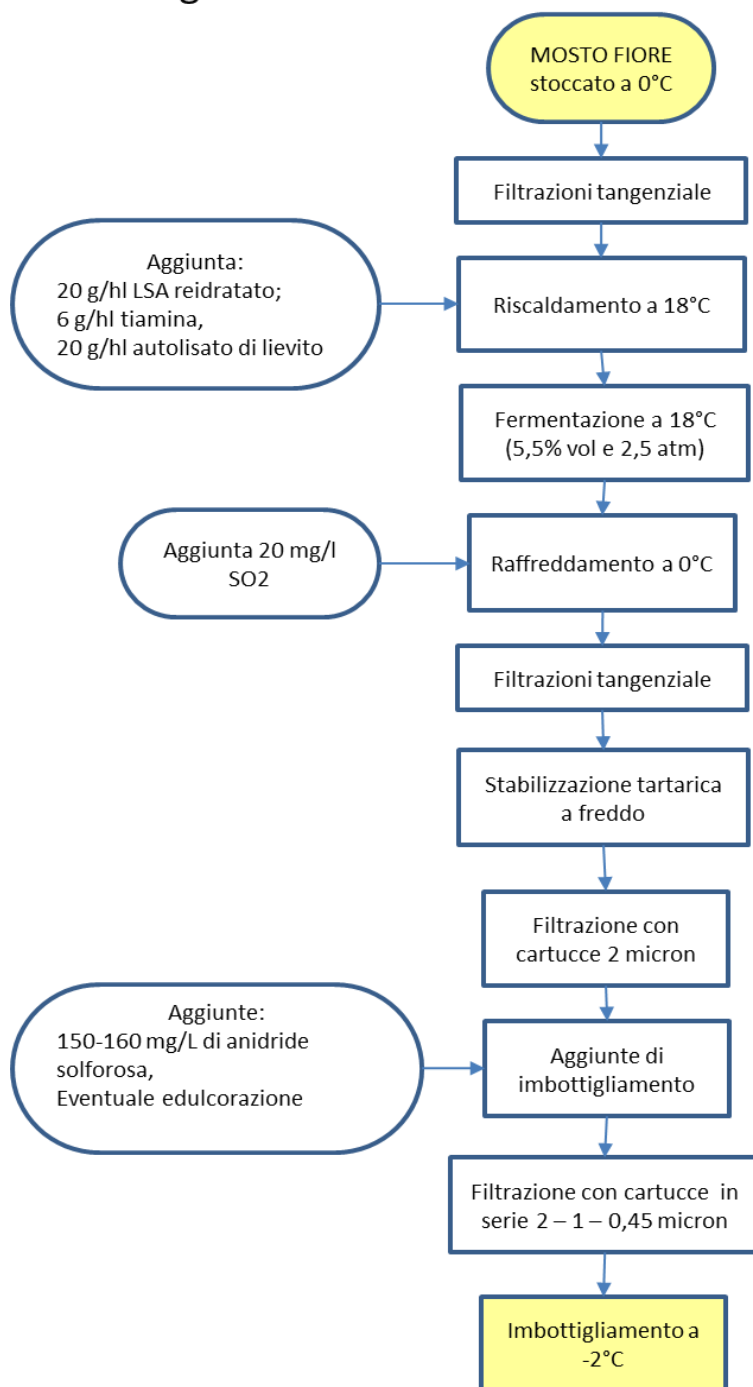
L'analisi delle uve e tutte le analisi sui composti volatili terpenici sono state svolte dal Consorzio per la Tutela dell'Asti sito a Isola d'Asti.

## 5.2 Diagramma flusso vinificazione e spumantizzazione Scrapona 2019

### Diagramma Flusso Moscato d'Asti: VINIFICAZIONE



## Diagramma Flusso Moscato d'Asti: SPUMANTIZZAZIONE



### 5.3 D'all'uva al mosto in cella frigo

La vendemmia è effettuata a mano, in ceste da 10 kg l'una e vuotato il contenuto in rimorchi da 3 a 6 t per il trasporto fino alla cantina per la successiva trasformazione. L'uva viene scaricata in una tramoggia con doppia coclea al suo interno (una trasportatrice e l'altra rompi-ponte) per convogliare i grappoli nella diraspa-pigiatrice.

Per il trasporto del mosto pigiato si utilizza una pompa ad ogiva posta al di sotto della pigiatrice.

Durante il processo di diraspa-pigiatura viene aggiunto 1 g/hl di enzima pectolitico Rapidase® Expression Aroma della ditta Enobrand s.a.s specifico per facilitare l'estrazione dei componenti aromatici presenti nelle bucce durante la fase di pressatura, studiato e testato appositamente per evitare l'estrazione di composti fenolici o altri componenti indesiderati.

La pressa utilizzata per le uve in oggetto di studio è costruita dalla Diemme (AR 80/MSC) con capacità all'incirca di 8 t. Il ciclo di lavoro completo prevede una durata di 250 minuti, nel caso delle uve utilizzate per il Moscato Scrapona, il mosto ottenuto dalla pressatura negli ultimi 30 minuti è stato destinato ad un altro utilizzo in quanto contiene sostanze dannose per la qualità del prodotto finale (Blouin e Peynaud, 2008). Dato che la pressatura in totale dura quattro ore, si è ritenuto un tempo sufficientemente lungo per avere un miglioramento del prodotto in seguito all'aggiunta dell'enzima sopra citato, nonostante le indicazioni tecniche consiglino un tempo ottimale di sei ore di contatto tra le parti solide e il mosto.

Il mosto in uscita dalla pressa viene convogliato in una vasca di accumulo e addizionato di enzima per la flottazione (cfr par.6.2), e tramite una pompa automatizzata dotata di un sensore di livello, per evitare che ci sia aspirazione di aria, viene trasportato nella vasca per la flottazione.

Il mosto, dopo aver sostato per due ore con l'enzima pectolitico, è addizionato di coadiuvanti di flottazione (cfr par.6.3). I coadiuvanti prima di essere aggiunti alla massa da trattare sono stati preventivamente preparati seguendo le istruzioni fornite dal produttore, per avere la massima efficienza. L'aggiunta è avvenuta mediante una pompa con miscelazione di circa mezz'ora per avere la massima omogeneizzazione con il mosto. Terminata questa operazione si procede ad operare la flottazione discontinua mediante l'uso del flottatore Fattoria 200 di Enomeccanica Bosio s.r.l.. La capacità oraria della pompa è di 200 hl/ora, con insufflazione di aria o azoto. Nel caso specifico il tempo di lavoro è di 30 minuti in quanto si lavorano ad ogni ciclo 100 hl di mosto.

Terminata questa operazione, dopo circa 8 ore di attesa per far avvenire la separazione delle fecce dalla fase liquida illimpidita, si opera una separazione dalla



valvola inferiore del mosto limpido con stoccaggio in una vasca in attesa di essere filtrato.

Il mosto flottato ottenuto viene filtrato mediante Filtro Velo a tele verticali, con superficie filtrante di 10 m<sup>2</sup>. Questa tipologia di filtro utilizza la farina fossile come coadiuvante di filtrazione, per creare il pannello filtrante. Il coadiuvante durante la preparazione del pannello aderirà alla superficie del supporto, grazie alla pressione che si esercita durante la fase di preparazione del setto poroso. Lo strato di farina fossile viene rimosso a fine ciclo di lavoro, in maniera molto agevole data la disposizione verticale dei supporti, ma sarà molto più delicata la gestione del filtro durante il processo lavorativo, in quanto se ci sono brusche alternanze di pressioni del liquido può collassare interrompendo il lavoro.



Figura 14 Cartuccia filtro tangenziale con fibre in polisulfone

Dopo aver operato la filtrazione brillantante mediante la farina fossile e il filtro Velo a tele verticali, si è terminato il processo di pulizia del mosto mediante una filtrazione tangenziale. Il filtro tangenziale utilizzato è della ditta KOCH-GLITSCH ITALIA S.r.l., modello WINEFILTER WF-4/6HP-M. Su tale impianto sono stati montati sei moduli filtranti WINEFILTER II 6" HOLLOW FIBER CARTRIDGE in polisulfone, la superficie filtrante del singolo modulo è di 17,2 m<sup>2</sup> con diametro di 1,1 mm. Le operazioni di conservazione, montaggio, pulizia e modalità d'uso sono state fornite dal costruttore e seguite in ogni lavoro effettuato. I moduli utilizzati (Figura 14) in questa campagna vendemmiale sono stati acquistati nuovi appositamente per la pulizia dei mosti. Dal costruttore non sono forniti dati di porosità assoluta delle membrane, ma sono classificati come filtri per la microfiltrazione, quindi consoni all'eliminazione dei lieviti presenti nel substrato da trattare, in quanto il diametro del poro è inferiore al micron.

Il mosto filtrato è stato stoccato in una vasca, condizionata mediante un sistema di refrigerazione ad aria, precedentemente detersa con soluzione sodica, successivamente neutralizzata con soluzione di acido citrico e infine sanitizzata con acido peracetico. La concentrazione delle soluzioni utilizzate durante il processo osservano le indicazioni inserite sul manuale dei singoli prodotti.

Una volta terminato il processo di filtrazione il mosto è stato addizionato di anidride solforosa, in funzione del pH del mosto, per ottenere un quantitativo di solfora molecolare di 0,5 mg/l. In seguito il mosto è stato raffreddato con l'aiuto di una unità di refrigerazione portatile della ditta RICA 2000 S.r.l. che presenta una capacità frigorifera di 25000 FG/h. Questo strumento è stato acquistato per accelerare i tempi richiesti in questo caso per refrigerare le masse di mosto e a fine fermentazione alcolica per bloccare l'attività dei lieviti, ma sarà utilizzato anche per riscaldare il mosto per l'avvio della fermentazione alcolica.

#### 5.4 Dal mosto stoccato al Moscato d'Asti DOCG

Il mosto rimane stoccato in cella frigo da qualche settimana a qualche mese, in quanto viene prelevato e fatto fermentare quando vi è richiesta di creare un nuovo lotto per la commercializzazione. Durante questo periodo sono state svolte delle analisi per valutare se vi è un incremento di acetaldeide o alcol svolto in seguito a possibili fermentazioni spontanee che possono compromettere la qualità del mosto stoccato. Inoltre sono state svolte analisi microbiologiche sia per la conta delle colonie, sia per l'identificazione dei lieviti presenti nel mezzo. Al momento dell'avvio della fermentazione alcolica il mosto viene portato naturalmente o mediante la macchina frigorifera a temperatura di inoculo dei lieviti (18° C).

Per la fermentazione alcolica è stato utilizzato un LSA (lievito secco attivo) SafCEno™ UCLM S325 commercializzato da HTS-enologia Italia; presenta come caratteristiche fermentative una rapidità nell'avvio dell'attività fermentativa, una buona capacità fermentativa nei mosti molto limpidi, una tolleranza all'alcol fino 12,5% vol./vol. e un fabbisogno nutrizionale medio alto. Mentre come caratteristiche metaboliche ha una resa zucchero/alcol di 16.5 g/L per 1% vol/vol, una bassa produzione di acidità volatile, SO<sub>2</sub> e acetaldeide (meno di 24 mg/L), una buona produzione di glicerolo

fino a 10g/L e presenta un'attività  $\beta$ -glicosidasi che permette l'esaltazione del potenziale aromatico delle uve terpeniche.

Il LSA è stato attivato seguendo le indicazioni presenti sulla scheda tecnica, utilizzando la dose di 20 g/hl, addizionati con 20g/hl con un attivante complesso BOvitality della ditta HTS-Enologia Italia. Dopo aver portato il pied de cuve alla temperatura del mosto da inoculare, si procede con l'aggiunta effettuando un rimontaggio di qualche secondo alla massa aggiungendo inoltre 5 g/hl di tiamina e 20 g/hl di Bstarter Simplex della ditta HTS-Enologia Italia. La fermentazione alcolica dura all'incirca 5 giorni, e si provvede a portare l'autoclave ad una pressione di circa 3 bar e con un alcol svolto di circa 5 % vol/vol., per far terminare la fermentazione si procede nell'abbassare la temperatura della massa a -2 °C e si lascia il mosto parzialmente fermentato (MPF) a contatto con le fecce di fermentazione. Il periodo di sosta è di circa 15-20 giorni, e poi mediante un separatore centrifugo isobarico Westfalia Separator AG si procede a separare le fecce e pulire il mosto dalle impurità, successivamente è stata aggiunta anidride solforosa.

Il MPF è stato portato a -3 °C, aggiunto di acido tartarico per far variare i valori di acidità, e abbassare il pH ad un valore consono per l'armonia sensoriale del vino finale. Posto a tale temperatura per circa due settimane si procede a stabilizzare il mosto dai sali instabili di bitartrato di potassio e tartrato di calcio.

Terminato il periodo per la stabilità tartarica si procede a filtrare il mosto-vino con cartucce da 2  $\mu$ m. Si effettuano le dovute aggiunte per l'imbottigliamento (anidride solforosa, rame, acido tartarico), dopodiché si procede all'imbottigliamento mediante l'imbottigliatrice isobarica presente in azienda mantenendo l'MPF a una temperatura di -2°C per evitare di avere problemi a causa della sovrappressione del prodotto. Prima della linea sono presenti cartucce a membrane poste in campane, con diametro fino a 0.45  $\mu$ m per avere un prodotto privo di cellule microbiche che possono originare problemi al prodotto una volta imbottigliato.

## 5.5 Test delle pectine

Analisi necessaria per valutare l'enzima pectolitico più adatto e il tempo necessario per far avvenire la completa idrolisi delle pectine. Si pone in una provetta 5 ml di etanolo acido (70 etanolo:30 acqua:1 acido cloridrico concentrato) e 2,5 ml di mosto

enzimato e si attende 5-10 minuti. Trascorso il tempo indicato, l'eventuale formazione e quantità di flocculo indica l'incompleta idrolisi e fornisce una indicazione sull'entità di pectina ancora presente. Per questa verifica sono state svolte le analisi usando tre differenti enzimi pectolitici: FLOTTOZIMA L (Enologica Vason S.p.a.), LAFASE XL CLARIFICATION (Laffort) e FLOTTOZIMA PLUS (Enologica Vason S.p.a.).

## 5.6 Test di flottazione

Le prove di flottazione sono state svolte utilizzando un miniflottatore da laboratorio della ditta JU.CLA.S®. Questo strumento serve per valutare in modo ottimale la giusta dose di coadiuvanti necessari per la flottazione su scala industriale.

L'apparecchio è formato da una bottiglia di pressurizzazione con capacità massima di 1 l, provvista di un tappo con raccordo IN/OUT e un riduttore di pressione con valvola di immissione del gas nella bottiglia.

Il campione deve essere enzimato, per essere certi mediante test precedentemente illustrato (vedi par. 5.3) che non vi siano pectine all'interno del mosto da analizzare. Si prelevano 700 ml di mosto enzimato e lo si inserisce nella bottiglia. Per i test sono stati utilizzati i prodotti sotto riportati a dosi variabili, a seconda del test, precedentemente dispersi in acqua a dosi del 5 o 10% m/v: MOSTOVIN COMPACT® (Gel di silice adsorbito su specifica bentonite attivata sodica e silici attivate; Enologica Vason S.p.A), SIL FLOK (Sol di biossido di silicio in soluzione al 30%; Esseco s.r.l. - Divisione Enartis), PREMIUM® GEL GRADO 1 (Gelatina animale purissima; Enologica Vason S.p.A) e PHYTOKOLL® VIP (Chiarificante di origine vegetale gluten-free; DAL CIN GILDO S.p.A). L'aggiunta dei coadiuvanti è stata eseguita inserendo in ordine prima i composti aventi cariche superficiali negative (MOSTOVIN COMPACT® e SIL FLOK) a seguire positive (PREMIUM® GEL GRADO 1 e PHYTOKOLL® VIP) e i diversi test prenderanno rispettivamente i seguenti acronimi (BENT, SOL, GEL e PHYTO). Si chiude la bottiglia con il tappo e la si collega con un tubo specifico al pressurizzatore fino a 4,5 bar, si miscela per tre minuti, si pressurizza nuovamente e si agita per altrettanti tre minuti. Si procede con il far fuoriuscire il liquido "gasato" in un cilindro graduato senza creare turbolenze, e si attende qualche minuto per far formare la separazione tra liquido e parti solide (Figura 15).

Successivamente sono stati valutati: i volumi finali di liquido in rapporto alla frazione solida flottata, la limpidezza e stabilità proteica.

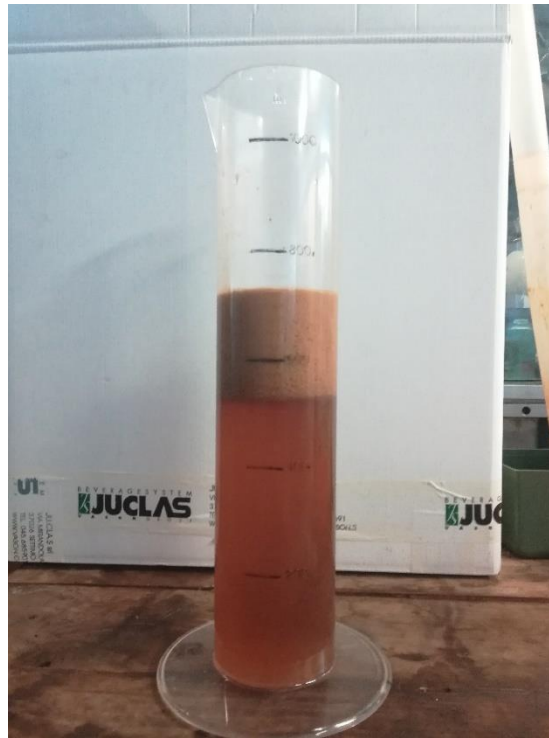


Figura 15 Campione di mosto flottato mediante il flottatore JU.CLA.S®

### 5.7 Analisi torbidità e stabilità proteica

Queste due analisi sono state effettuate sul mosto mediante misurazione nefelometrica secondo i metodi forniti dalla casa produttrice dello strumento (Strumento portatile per analisi di torbidità e bentonite nel vino - HI83749; HANNA INSTRUMENTS Italia srl).

### 5.8 Test di filtrabilità

Questa analisi è stata eseguita mediante l'utilizzo di una beuta con collegamento per il sottovuoto e apertura collegabile ad un bicchiere graduato con setto poroso situato tra i due contenitori. Il vuoto è creato mediante un "tubo venturi". Si è proceduto con l'inserimento della membrana filtrante Millipore® con diametro di 48 mm e porosità nominale  $0.65 \mu\text{m}$  e il collegamento di tutti i componenti. Successivamente si è riempito il bicchiere graduato fino al volume di 250 ml con il campione da analizzare e si avvia la formazione del vuoto. Con il defluire del liquido si è provveduto a

cronometrare il tempo necessario per la filtrazione del campione e ad elaborare i dati raccolti.

## 5.9 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche atte al conteggio e alla valutazione della carica microbica nelle diverse fasi di produzione, sono state svolte dal Laboratorio di Analisi SINERGO sito Nizza Monferrato.

Per la conta diretta della carica dei mosti o dei mosti in fermentazione, è stata utilizzata la camera Thoma utilizzando il campione tal quale. Il valore risultante da questa analisi è espresso come cellule su ml di campione.

Per la conta indiretta della carica microbica vivente, è stata utilizzata la semina in capsule Petri utilizzando il terreno Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN) agar che è adatto per i lieviti di interesse enologico. Le capsule Petri dopo lo spatolamento, tecnica utilizzata usando 0.1 ml campione, tal quale o diluito in soluzione Ringer sterile, vengono poste in stufa termostata a 30°C per 24-48 h. Dopo questo periodo di crescita è possibile contare le colonie di lieviti che sono cresciute sul terreno, e il dato così ottenuto sarà espresso in CFU (cellule formanti colonia) su ml.

Sono state svolte anche analisi di tipo identificativo dei diversi genere e specie di lieviti presenti nei mosti. Queste indagini sono state svolte presso il laboratorio di analisi microbiologiche del DISAFA (Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari) dell'Università di Torino a Grugliasco.

Il metodo utilizzato prevede l'utilizzo di capsule Petri con all'interno i lieviti cresciuti dopo spatolamento, prelevate le colonie con morfologie differenti tra loro, e isolate su capsule Petri contenenti WLN agar sterile per isolare colonie singole. Le colonie singole ottenute sono poi utilizzate per inoculare yeast extract-peptone-dextrose (YPD) brodo posto in provette per far crescere la singola coltura. I diversi substrati sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA genomico secondo il metodo di Cocolin *et al.* (2000). Gli estratti genomici sono quantificati mediante Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Celbio, Milan, Italy) per valutare il quantitativo di DNA e standardizzare la concentrazione a 100 ng/ $\mu$ l circa. Tale soluzione è stata utilizzata per l'amplificazione del DNA utilizzando una Mix 50  $\mu$ l contenente una soluzione Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, primer ITS1 e ITS4 e Taq Polimerasi e 200 ng di DNA estratto.

Le amplificazioni sono state eseguite mediante un termociclatore DNA PTC-200 Motore MJ Research (Bio-Rad, Milano, Italia), come descritto da Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Ottenuta l'amplificazione del gene 5.8S rRNA si è provveduto ad effettuare i tagli enzimatici mediante tre diversi RFLP: Cfo I, Hinf I e Hae III. Successivamente sono stati separati sia i prodotti di amplificazione, sia i frammenti dopo taglio enzimatico rispettivamente su gel di agarosio all'1,5 e 3% con colorante al bromuro di etidio mediante separazione elettroforetica. I frammenti sono separati accanto ad un marker con scala di 100bp per poter valutare la lunghezza dei frammenti e confrontarli con le lunghezze riportate in letteratura (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999, Granchi *et al.*, 1999, Guillamon *et al.*, 1998, Sabate *et al.*, 2002) o mediante un database online ([www.yeast-id.org](http://www.yeast-id.org)), (Figura 16).

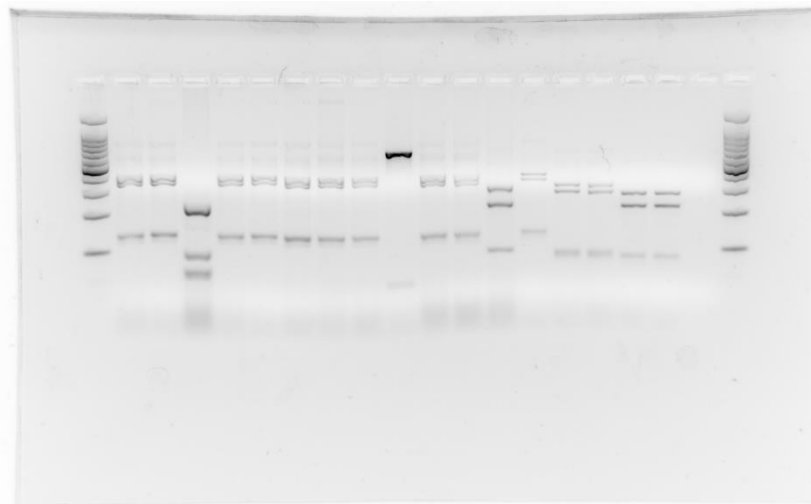


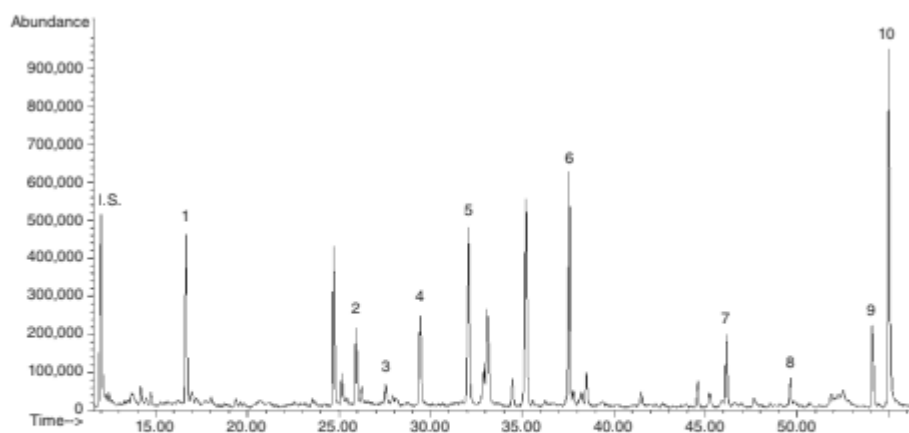
Figura 16 Gel di agarosio dopo taglio enzimatico Cfo I e corsa elettroforetica.

Dopo aver identificato i diversi campioni per genere, si è provveduto ad amplificare il dominio D1-D2 del gene 26S rRNA (Kurtzman e Robnett; 1997) dei campioni di interesse per far sequenziare i genomi e identificare in modo univoco la specie del lievito. Per questa amplificazione nella Mix 25  $\mu$ l sono stati utilizzati i primers NL1 e NL4, differenti dai sopra citati, mantenendo inalterate le proporzioni degli altri componenti. I campioni amplificati sono stati inviati presso un centro esterno per il sequenziamento. Le sequenze del dominio D1-D2 del gene 26S rRNA sono state ricevute e queste sono confrontate con quelle inserite in database online BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Questo fornisce un risultato con una percentuale di somiglianza, che se superiore al 97 %, è possibile confermare il genere e la specie indicata. Più è elevata la percentuale maggiore è la somiglianza tra la

sequenza del campione e quella presente nel database, e quindi più siamo certi del risultato fornito.

## 510 Analisi Terpeni

Le analisi dei terpeni riguardanti i primi tre campionamenti delle uve sono state svolte dal Laboratorio interno del Consorzio di Tutela dell'Asti, locato a Isola d'Asti; mentre l'ultimo campione di uva e tutti i campioni di mosti e MPF sono stati analizzati dal Laboratorio Sinergo Soc. Coop. Di Nizza Monferrato. Entrambi i laboratori hanno utilizzato il metodo dove vengono aggiunti 200 ml di estratto (uva o mosto) a 200 µl soluzione di eptanolo (180 mg/l acqua/etanolo 1:1 v/v) come standard interno e la soluzione viene fatta passare attraverso una cartuccia C 18 da 10 g (ad esempio, Sep-Pak, Waters) precedentemente attivato dal passaggio successivo di 30 mL di diclorometano, 30 ml di metanolo e 30 ml di acqua. Dopo il caricamento del campione, sali, zuccheri e altri composti polari vengono rimossi lavando la cartuccia con 50 ml di acqua, e la frazione contenente composti liberi viene recuperata



**Figure 4.6.** The GC/MS-EI (70 eV) chromatogram recorded in SCAN mode of free aroma compounds of a *Muscat* grape skins extract. I.S., internal standard (1-heptanol); peak 1. linalool; peak 2. *trans*-pyranlinalool oxide; peak 3. *cis*-pyranlinalool oxide; peak 4. nerol; peak 5. geraniol; peak 6. Ho-diendiol I; peak 7. Ho-diendiol II; peak 8. hydroxycitronellol; peak 9. 7-hydroxygeraniol; peak 10. (*E*)-geranic acid.

Figura 17 Cromatogramma GC/MS-EI dopo estrazione dei composti terpenici, dove è possibile osservare: 1 linalolo, 2 t-piranlinalolo-ossido, 3 c-piranlinalolo-ossido, 4 nerolo, 5 geraniolo, 6 diendiol 1, 7 diendiol 2, 8 idrossicitronellolo, 9 idrossigeraniolo, 10 acido geranico (Di Stefano 1991).

mediante eluizione con 50 ml di diclorometano. La soluzione di diclorometano è concentrata a 2 - 3 mL per distillazione usando una colonna Vigreux di 40 cm di lunghezza e infine fino a 200 µl sotto un flusso di azoto prima dell'analisi GC / MS.



Quello riportato in Figura 17 è un profilo tipo di una analisi GC/MS dei monoterpeni liberi di un estratto di bucce di Moscato bianco (Di Stefano, 1991).

### 5.11 Analisi tioli varietali

Un'aliquota (50  $\mu$ l) di una soluzione etanolica (concentrazioni finali di 500 ng/l di ciascuno standard interno) è stato aggiunto a 20 ml di vino. In seguito si procede all'aggiunta di EDTA 2Na (20 mg), acetaldeide al 50% (80  $\mu$ l) e reagente DTDP scongelato di recente (10 mM, 200  $\mu$ l). Dopo 30 minuti, il campione è stato passato attraverso una cartuccia Bond Elut C18 da 6 ml, 500 mg, precedentemente condizionata con 6 ml di metanolo, seguita da 6 ml di acqua. La cartuccia è stata lavata con 12 ml di metanolo al 50%, essiccata all'aria per 5 minuti ed eluita con 3 mL di metanolo. L'eluato è stato raccolto, concentrato con un leggero flusso di azoto a 25 ° C usando un evaporatore TurboVap LV e ricostituito con etanolo al 10% (200  $\mu$ l) per poi eseguire l'analisi mediante HPLC-MS/MS (Capone *et al.*, 2015).

## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.1 Maturazione uva

Tabella 1 Analisi chimica e fisica per il monitoraggio della maturazione delle uve.

	pH	acidità totale g/l	ac. Tartarico g/l	ac.malico g/l	zuccheri g/l	alcool potenziale % vol.	APA mg/l	peso 100 acini g
19-ago-19								
Diradata	3,17	7,97	7,42	3,19	186	11,2	77	175
Non-Diradata	3,09	10,01	7,91	4,81	162	9,7	54	183
26-ago-19								
Diradata	3,27	6,25	7,28	1,86	200	12,0	138	182
Non-Diradata	3,28	6,86	6,90	2,72	196	11,8	79	178
02-set-19								
Diradata	3,40	5,39	6,62	1,34	226	13,6	132	169
Non-Diradata	3,40	6,16	7,01	2,16	203	12,2	70	182
09-set-19								
Diradata	3,47	4,79	6,27	1,18	228	13,7	-	192
Non-Diradata	3,37	5,60	6,68	1,60	206	12,4	-	210

Tabella 2 Analisi dei principali aromi del moscato bianco durante la maturazione

	linalolo ug/l	ossido C ug/l	diendiolo1 ug/l
19-ago-19			
Diradata	287	158	957
Non-Diradata	259	145	895
26-ago-19			
Diradata	342	156	808
Non-Diradata	286	159	994
02-set-19			
Diradata	346	196	689
Non-Diradata	234	143	563
09-set-19			
Diradata	378	164	322
Non-Diradata	255	96	176

La maturazione dell'uva è stata monitorata a partire dai primi di agosto, circa dalla seconda metà della fase di maturazione. Come è possibile osservare dalla Tabella 1, un minore carico produttivo ha portato ad un incremento del pH, una sensibile riduzione (rispetto al lotto di grappoli Non-Diradato) dell'acido malico, acido tartarico ed acidità totale. Nelle ultime due settimane di maturazione si è assistito ad una

riduzione anche del peso degli acini per quanto riguarda le prove Diradate. Al contrario si è potuto apprezzare un incremento della quantità di zuccheri e dell'APA nelle prove Diradate rispetto alle prove Non-Diradate. Per quanto riguarda i composti monoterpenici (Tabella 2) si è potuto registrare un maggiore accumulo in linalolo e ossido C, e una minore diminuzione del diendiolo 1 rispetto al trattamento Non-Diradato. Tale andamento è in accordo con alcuni lavori in letteratura in cui un minore carico produttivo, porta ad una concentrazione maggiore in composti monoterpenici nelle uve a maturazione (Chapman *et al.*, 2004; Diago *et al.*, 2010; Kok, 2011). Grazie a queste conferme è auspicabile effettuare un moderato diradamento dei grappoli per avere un arricchimento in composti volatili o precursori d'aroma. D'altro canto, non bisogna dimenticare che si ha un innalzamento del pH e diminuzione dell'acidità totale e soprattutto dell'acido malico, che sono la colonna portante per la freschezza e armonia delle sensazioni gustative del prodotto finale. In un periodo storico in cui a causa del cambiamento climatico le temperature stanno aumentando, una minore disponibilità idrica e un aumento dell'anidride carbonica nell'atmosfera incrementano l'impoverimento dell'acidità delle uve e dei vini, è necessario porre maggiore attenzione a tali pratiche agronomiche per evitare di avere dei mosti eccessivamente sbilanciati (Kizildeniz *et al.*, 2018).

## 6.2 Prove di enzimaggio

Tale prova è stata effettuata per valutare il corretto dosaggio, la tipologia di enzima e le tempistiche necessarie per avere una efficace idrolisi delle pectine per ridurre il più possibile la viscosità del mosto. Da quanto è stato possibile osservare, il tempo minimo perché l'enzima abbia efficacia è di un'ora e mezza con campione posto a 20°C. Sono stati valutati tre tipologie di enzima due in polvere e uno liquido (cfr. par. 5.5). Da quanto è possibile osservare dalla Figura 18, la prova 1 con all'interno FLOTTOZIMA L (Enologica Vason S.p.a) ha dimostrato già dopo un'ora, di avere la quantità minore di pectina residua, (Figura 18 A) provetta di sinistra, e dopo un'ora e mezza nessun residuo di pectina denaturabile dalla soluzione di etanolo cloridrico.

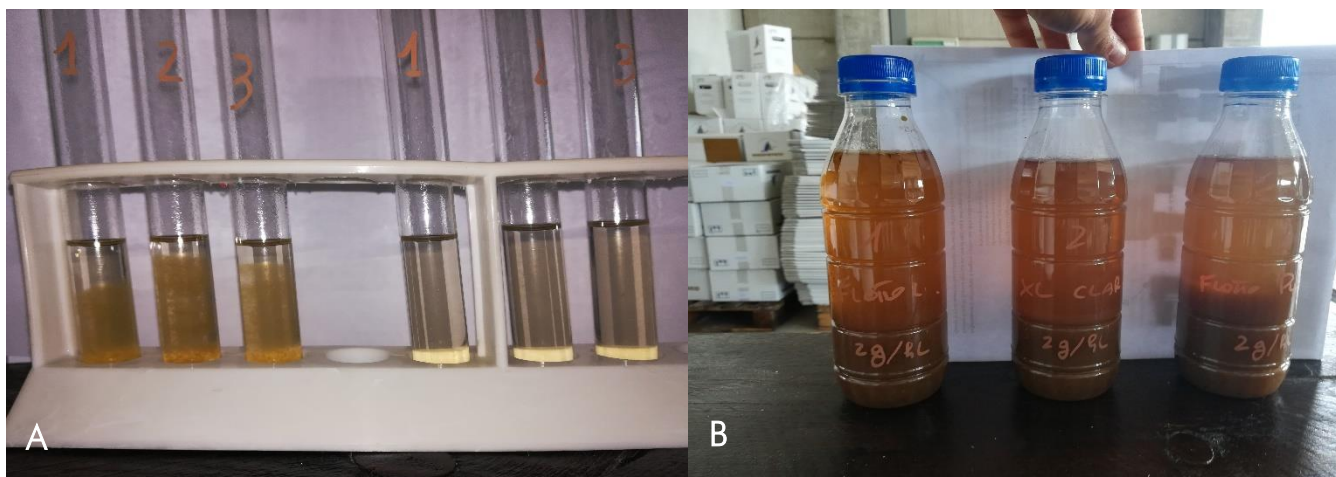


Figura 18 Prove di enzimaggio su moscato Scracona: A: analisi con l'aggiunta di etanolo cloridrico dopo 1 e 1.5 ore; B: sedimentazione del mosto enzimatico dopo 1.5 ore

Inoltre ha presentato una maggiore limpidezza del mosto chiarificato e con feccia meno voluminosa (Figura 18 B), presumibilmente perché gli enzimi hanno avuto una maggiore capacità degradativa delle catene polisaccaridiche. Per questo motivo è stato scelto l'enzima numero 1 per l'enzimaggio del mosto.

### 6.3 Sanitizzazione serbatoi

Questo focus è stato preso in considerazione poiché da analisi precedenti, è emersa una elevata concentrazione di lieviti *Saccharomyces uvarum* nel mosto durante lo stoccaggio in cella frigo, con successivi problemi di deterioramento del prodotto. Questi lieviti, come indicato da Charoenchai *et al.* (1998), si presume che derivino dal contatto del mosto con le attrezzature e l'ambiente di cantina. Inoltre, si ipotizza una loro conservazione di anno in anno, dato che non si riscontra una loro presenza sull'uva in vigneto (Demuyter *et al.*, 2004). Sono stati effettuati alcuni tamponi sulle vasche di stoccaggio per valutarne la carica microbica dopo un ciclo di detersione e sanitizzazione (detergenti a base di soda caustica, risciacquo con soluzione di acido

Tabella 3 Analisi cariche microbiche su alcune vasche e rubinetteria dopo la procedura di lavaggio aziendale.

data	contenitore	conta totale microrganismi 30°C ufc/dm <sup>2</sup>	lieviti ufc/dm <sup>2</sup>	muffe ufc/dm <sup>2</sup>
06-set	interno vasca 111 (cella)	1,8E+02	<10	< 10
06-set	interno vasca 111 (rubinetto)	9,6E+06	3,6E+04	8,2E+02
10-set	interno vasca 151 flottazione	3,6E+02	3,6E+02	< 10

citrico, sanitizzazione con acido peracetico) questo per verificare l'efficienza delle operazioni e per verificare l'eventuale carica di tali lieviti criotolleranti.

Dai dati delle analisi microbiologiche riportate in Tabella 3 sono emerse ridotte o modeste concentrazioni di lieviti (fino a  $10^4$  ufc/dm<sup>2</sup>) in funzione della zona di saggio del tampone. Nel caso dei due saggi all'interno della vasca 111, è possibile osservare che nel rubinetto si è registrata una concentrazione di 4 unità logaritmiche in più di lieviti, in quanto la zona presentava una modesta quantità di gocce d'acqua sulla superficie rimasta dal precedente lavaggio. Questa condizione di umidità potrebbe aver influenzato positivamente la proliferazione e la conservazione dei lieviti. Dalle analisi di identificazione molecolare, è emerso che i lieviti presenti appartengono ai generi *Candida spp.* e *Rhodotorula spp.*

Visti questi risultati è possibile affermare che una maggiore attenzione nell'allontanamento dell'acqua di lavaggio può mantenere più efficace e duraturo il processo di pulizia e sanitizzazione.

## 6.4 Prove di flottazione

Tabella 4 prove di flottazione rilevando la % di feccia in seguito alla flottazione, Torbidità e Stabilità proteica utilizzando differenti coadiuvanti espressi in g/hl di mosto pressato

ENZIMA	BENT						SOL						
	GEL			PHYTO			GEL			PHYTO			
	30	50	70	30	50	70	40	60	80	40	60	80	
	7,5	10	12,5	10	15	20	7,5	10	12,5	10	15	20	
% feccia	14,5	19,2	19,2	17,1	15,7	15,1	16,9	18,6	15,7	17,4	15,1	17,1	15,1
torbidità [NTU]	139,0	75,5	48,2	38,4	102,0	97,7	70,9	87,2	60,0	69,2	145,5	197,5	190,0
stabilità proteica	42,2	24,1	23,2	11,4	23	11,9	2,17	37	52,4	36,3	47,8	39	38,2

Sono stati svolti dei test per migliorare la flottazione, ottenendo i dati riportati in Tabella 4. La dose utilizzata per ogni singolo coadiuvante è stata scelta seguendo il quantitativo consigliato dalla casa produttrice proposto per la chiarifica dei mosti. Come è possibile osservare, i migliori risultati ottenuti per quanto riguarda la quantità di feccia formatasi in seguito alla flottazione sono stati registrati mediante l'utilizzo di BENT- GEL (bentonite e gelatina) e SOL-GEL (sol di silice e gelatina), osservando un

aumento del volume di feccia all'incirca del 21% per i primi e del 19 % per i secondi; entrambe le prove sono state confrontate con il campione solamente enzimato. Per quanto concerne la torbidità, i test più performanti sono stati sempre quelli con aggiunta di BENT e GEL, soprattutto quelli che presentavano la concentrazione di coadiuvanti maggiori (BENT50-GEL10 e BENT70-GEL12.5 rispettivamente 48.2 e 38.4 NTU). Si è voluto anche valutare la stabilità proteica ottenuta sui mosti subito dopo la flottazione, e si è osservata una ottima prestazione stabilizzante da parte della BENT, sia in associazione con la GEL, sia con PHYTO (proteine vegetali).

Oltre ai test sulla flottazione, si è provveduto a valutare l'attitudine alla filtrazione dei diversi campioni flottati in laboratorio. Questo è stato fatto per cercare di ottenere la miscela migliore di coadiuvanti per ottenere un mosto da filtrare senza incorrere in problemi di intasamento delle membrane con successi problemi gestionali e di efficienza della filtrazione (cfr. par. 6.4)

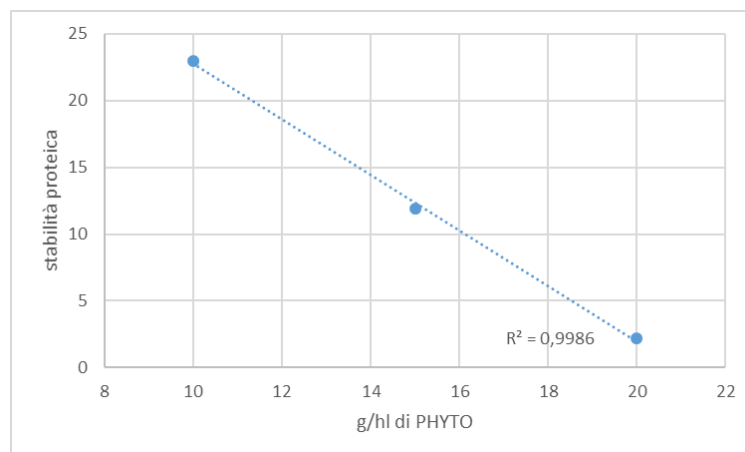


Figura 19 Analisi della correlazione tra la quantità di proteina vegetale PHYTO e la stabilità proteica osservata

Avendo potuto osservare i primi risultati riportati in Tabella 4 con la BENT associata a GEL e PHYTO, si è provato a variare alcune dosi e a testare le due componenti proteiche assieme. Questo perché come è possibile osservare dalla Figura 19, abbiamo registrato una correlazione abbastanza stretta tra la dose di PHYTO e la stabilità proteica apportata al mezzo in queste condizioni lavorative. Mentre tale correlazione non vi è con la rispettiva dose di BENT associata alla GEL e neanche con tra SOL e PHYTO. Per questo si è voluto testare altre possibili combinazioni di coadiuvanti, per cercare di ottenere la combinazione più performante.

Nella Tabella 5 sono riportati i risultati ottenuti utilizzando le combinazioni migliori, per quanto concerne la torbidità; i migliori risultati sono stati riscontrati utilizzando come unico componente proteico GEL. Osservando i valori indicati per la stabilità proteica, si possono notare valori negativi nelle combinazioni con le PHYTO; tali risultati sono di difficile interpretazione. L'analisi nello specifico si basa su una doppia misurazione della torbidità prima e dopo l'aggiunta del reagente BentoCheck. La torbidità dopo l'aggiunta del reattivo, normalmente, è maggiore rispetto alla torbidità registrata prima dell'aggiunta del reagente. Nel caso specifico, i valori dopo l'aggiunta del reagente sono risultati meno torbidi; questo comportamento potrebbe esser dovuto interazioni sconosciute, non ancora approfondite di tali proteine vegetali

Tabella 5 Risultati delle prove di flottazione utilizzando differenti dosi di BENT-GEL e BENT-PHYTO e l'associazione BENT-GEL-PHYTO

	BENT					
	50		60		60	
	GEL		PHYTO		GEL + PHYTO	
	10	12	20	25	5	10
torbidità	47,9	42,1	134	298	69,5	
stabilità proteica	2,44	4,13	0	-25	-4,1	

utilizzate in enologia sia con il reagente specifico, sia il comportamento di tale coadiuvante con le proteine del mosto. Per quanto riguarda la flottazione la migliore miscela di coadiuvanti è stata quella mediante l'uso di 50 g/hl di BENT e 10 g/hl di GEL che presenta anche in questo ultimo test la migliore performance.

Come indicato da Ferrarini *et al.* (1991) e Gerbi *et al.* (1995) la flottazione è possibile effettuarla mediante azoto o aria atmosferica, infatti si è voluto testare la dose ottimale di BENT 50 e GEL 10 con le due tipologie di gas.

Tabella 6 Analisi effettuate su prove di flottazione mediante l'utilizzo di due gas per la flottazione: azoto e ossigeno

gas flottazione	torbidità	stabilità proteica	Catechine mg/l	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	IC	T
azoto	47,86	2,44	0,65	0,628	0,218	0,845	2,89
aria atmosferica	39,4	6,6	0,45	0,546	0,185	0,731	2,95

Dai dati in Tabella 6 è possibile osservare che, mediante l'uso di azoto si ha una maggiore torbidità, ma d'altro canto una stabilità proteica migliore. Per quanto riguarda le catechine, si hanno in entrambe le prove valori modesti, e un quantitativo leggermente superiore come indicato in letteratura nel campione flottato con azoto, ma all'opposto da quanto indicato in letteratura, con le seguenti prove di flottazione si sono ottenuti mosti più colorati, cioè con valori di Intensità Colorante maggiori mediante l'uso di gas inerte. Bisogna far notare che le differenze non sono state valutate con test statistici e che i valori riportati sono abbastanza simili tra i due campioni. Detto questo si potrebbe concludere che per quanto riguarda l'utilizzo dei due gas per la flottazione, non si evidenziano sostanziali differenze, e che l'utilizzo di aria atmosferica presenta un vantaggio dal punto vista della sostenibilità ambientale. Dalla letteratura, si evince che l'uso di aria atmosferica non incide particolarmente sul quantitativo dei terpeni, in quanto il moscato bianco presenta una notevole quantità di terpeni glicosidati come riserva. L'unico aspetto da sottoporre a ulteriore analisi sono i quantitativi di tioli che con l'utilizzo di aria atmosferica potrebbero ridursi e quindi ridurre la complessità aromatica del prodotto finale.



### 6.3 Prove di filtrazione

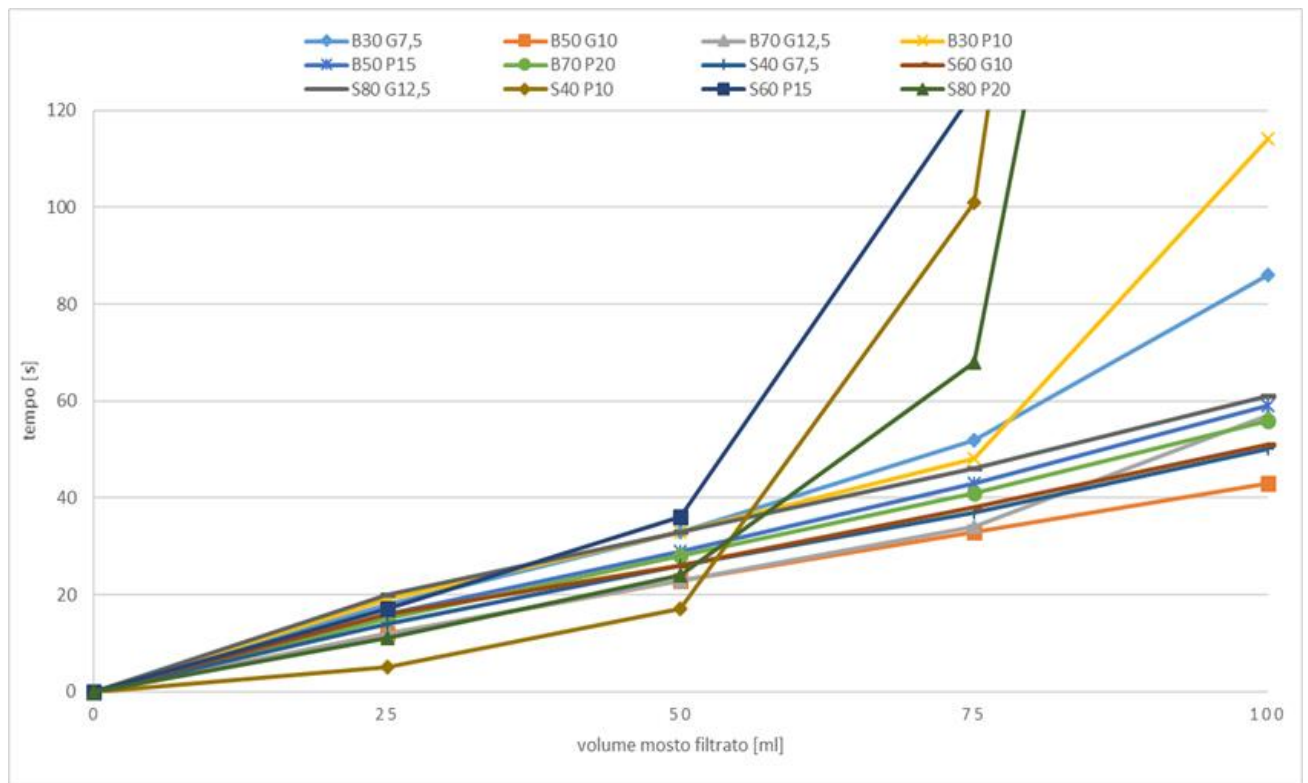


Figura 20 Tempo impiegato per la filtrazione del mosto Scarpona flottato sperimentalmente. Figura che rappresenta come varia il tempo nel filtrare 100ml di mosto.

Sono state svolte prove di filtrazione perché durante la vendemmia 2018 si sono riscontrati problemi in tale fase di lavorazione. Le problematiche riguardavano nella fattispecie eventi di ostruzione delle fibre cave del filtro tangenziale, con successive rotture delle fibre e quindi filtrazioni non efficaci; inoltre, avendo problemi di intasamento si deve ridurre la portata del filtro avendo così una diminuzione dell'efficienza di lavoro. Per ovviare a tali difficoltà, sui medesimi campioni indicati nel paragrafo cfr par.6.4 si è effettuato il test di filtrazione.

Dalla Figura 20 è possibile osservare l'andamento della filtrazione in laboratorio (come spiegato nel paragrafo 5.8) in cui la maggior parte dei mosti presenta un andamento simile con l'aliquota di mosto saggiato. I campioni che si sono discostati molto dal resto dei campioni sono stati quelli con il minore quantitativo di BENT (BENT30-GEL7,5 e BENT30-PHYTO10) e tutta la classe di campioni addizionati in flottazione con SOL e PHYTO.

Considerazioni simili possono essere effettuate visualizzando la Figura 21, in cui si evidenzia una grande differenza con i campioni SOL-PHYTO rispetto al resto dei test

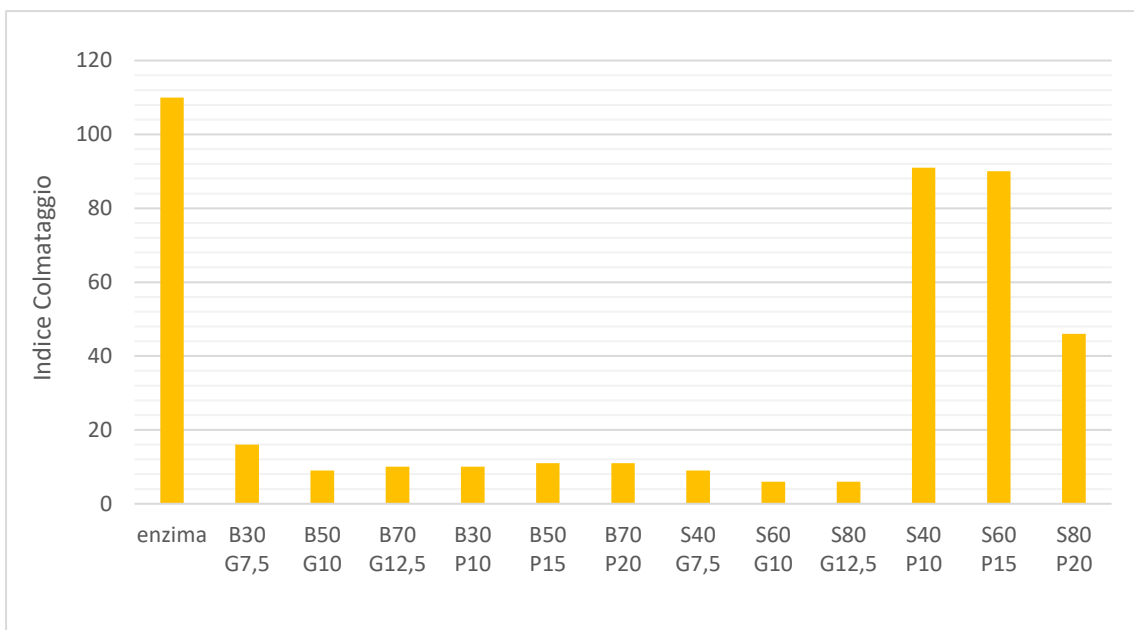


Figura 21 Indice di Colmataggio dei campioni flottati.

per quanto concerne l'Indice di Colmataggio. Mentre per gli altri campioni non si è riusciti ad ottenere una diversificazione efficace dei risultati.

Dalla Figura 22 i campioni con BENT e PHYTO presentano una maggiore torbidità, e associato a questo valore, si registra un incremento notevole di Indice di Colmataggio; mentre per il resto dei campioni non si sono osservate differenze nell'utilizzare i diversi dosaggi per quanto riguarda la filtrazione. È possibile notare una leggera differenza tra i due campioni trattati con differenti gas di flottazione, dove quello flottato con ossigeno presenta un valore leggermente inferiore.

Considerando le prove illustrate nel Paragrafo 6.2 e in questo, si è scelto di effettuare la flottazione della *Scrapona 2019* con BENT 50 e GEL 10 in quanto si è voluto evitare un eccessivo dosaggio di BENT con il rischio di compromettere le caratteristiche qualitative del prodotto finale (Guillou *et al.*, 1998 e Moio *et al.*, 2004). Poiché i risultati sulla filtrazione, non ci hanno fornito uno parametro di scelta ulteriore si è deciso inoltre di utilizzare il gas azoto, dato che l'uso di aria atmosferica non ha apportato migliorie influenti sul prodotto finale.

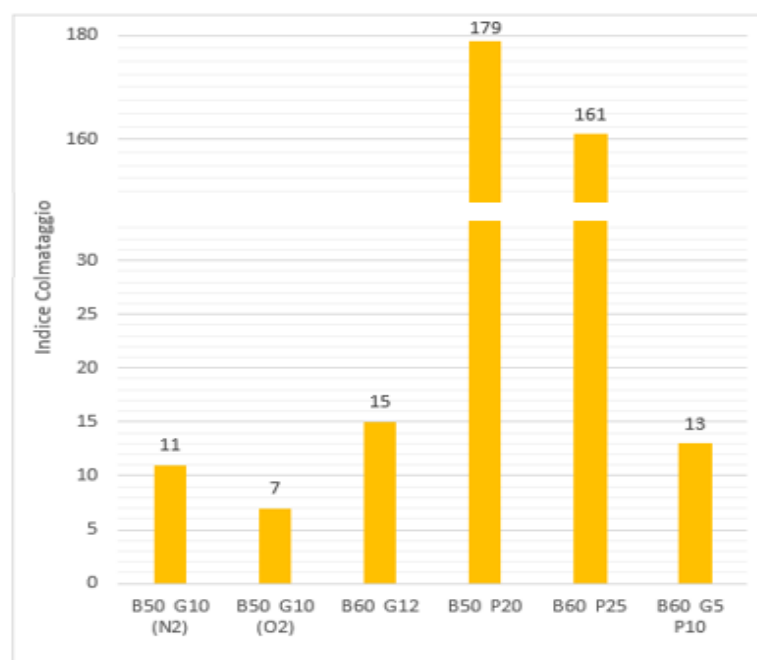


Figura 22 Indice di colmataggio dei test effettuati dopo le prime prove di flottazione, in questo caso si sono utilizzate differenti dosi e combinazione di BENT-GEL e BENT-PHYTO e l'associazione BENT-GEL-PHYTO

### 6.3 Flottazione e filtrazione in cantina

Come si è potuto osservare dai dati esposti nei paragrafi precedenti, si è scelto di flottare il mosto di moscato *Scrapona* 2019 con 50 g/hl di BENT e 10 g/hl. Questo connubio di coadiuvanti si è rilevato il migliore per questa annata, ma che potrebbe richiedere modifiche nei prossimi anni, in quanto il profilo polisaccaridico e proteico varia di anno in anno (Lambri *et al.* 2012). La massa è stata flottata con azoto e successivamente filtrata mediante l'utilizzo di filtro a farina a pannelli verticali e successivamente si è filtrato con il filtro tangenziale con *cut-off* di 100.000 Da (circa 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ ). Il passaggio intermedio utilizzando il filtro a farina è stato effettuato per

Tabella 7 risultati dei test di torbidità e stabilità proteica sulla massa di *Scrapona* durante la lavorazione del mosto utilizzando in flottazione 50 g/hl di BENT e 10 g/hl di GEL

	Scrapona Diradata		
	post flottazione	uscita filtro farina	uscita filtro tangenziale
torbidità [NTU]	15,4	1,68	1,47
stabilità proteica	13,4	9,82	15,43

proteggere in parte le membrane in polisulfone del filtro tangenziale avendo registrato diversi problemi di intasamento e rottura delle fibre durante l'anno precedente.

Come dimostra la Tabella 7, la torbidità in uscita dalla vasca dopo la flottazione risulta migliore rispetto a quella registrata durante le prove, dove piccoli errori possono avere un impatto sulle misurazioni finali e dove i tempi di flottazione e attesa del galleggiamento delle particelle inglobate dai gas sono differenti (5 minuti e 6-8 ore rispettivamente per la flottazione in laboratorio e in cantina). Per quanto concerne la stabilità proteica la filtrazione non porta a sostanziali cambiamenti tra la flottazione e il vino filtrato; ma anzi la filtrazione tangenziale potrebbe eliminare molti colloidali che porterebbero ad un incremento della instabilità proteica.

Essendo a conoscenza di problemi registrati in precedenza durante la filtrazione, si è voluto monitorare la carica microbica durante queste prime fasi di lavoro. Infatti come dimostra la Tabella 8, dopo la flottazione il mosto presenta una quantità modesta di lieviti. Il filtro a farina ha abbattuto relativamente poco la carica di lieviti (non ci si aspettava maggiore potere abbattente da tale tipologia di filtro) ma anche il filtro tangenziale è riuscito a diminuire la carica lieviforme di solo una unità logaritmica. Normalmente, un filtro tangenziale con membrane cave in polisulfone per la microfiltrazione è in grado di ridurre dal mezzo circa 3 unità logaritmiche.

Tabella 8 Cariche microbiche in 3 fasi durante la lavorazione del mosto

campione	post flottazione	post filtrazione farina	post filtrazione tangenziale	
	cellule / ml	cellule / ml	UFC / ml	
Scarpona	diradata	1,0E+04	< 1,0E+04	1,7E+03
	non diadata	1,5E+05	< 1,0E+04	1,3E+03

Per valutare l'efficacia del filtro ed escludere eventuali problemi delle fibre, si sono effettuate analisi di conta microbica per valutare la presenza di un problema generico del filtro, o se ci fossero stati problemi specifici in qualche cartuccia in particolare. La prima analisi è stata svolta al momento della seconda filtrazione della massa per cercare di comprendere come mai si fossero registrate le concentrazioni microbiche riportate in Tabella 8. Da quanto si può osservare nella Tabella 9, al 24 ottobre non si sono registrate anomalie nella filtrazione, con un ottimo abbattimento della carica

microbica, con differenza di carica tra l'entrata e l'uscita del filtro di 5 unità logaritmiche.

Tabella 9 Conte microbiche sul mosto in entrata ed uscita, e in uscita da ogni singola cartuccia filtrante per valutare eventuali problemi

campione		24-ott-19	20-feb-20
		UFC/ml	UFC/ml
m o s t o	ENTRATA	1,7E+05	2,3E+05
	uscita cartuccia 1	< 1,0E+01	< 1,0E+01
	uscita cartuccia 2	< 1,0E+01	< 1,0E+01
	uscita cartuccia 3	< 1,0E+01	< 1,0E+01
	uscita cartuccia 4	< 1,0E+01	6,8E+03
	uscita cartuccia 5	< 1,0E+01	6,0E+01
	uscita cartuccia 6	< 1,0E+01	2,0E+01
	USCITA	< 1,0E+01	4,2E+02

La filtrazione del 20 febbraio 2020 è stata effettuata sulla massa alla quarta filtrazione, e si nota che la cartuccia 4 presenta un notevole danneggiamento rispetto alle altre. Nonostante questo problema il mosto in uscita dal filtro presentava una carica ridotta di circa 3 unità logaritmiche. Questi valori non ci permettono di capire la causa del danneggiamento, ma fanno pensare a probabili usure delle fibre in seguito a possibili innalzamenti repentini della pressione verso le ultime fasi della filtrazione dove si filtra un mosto maggiormente inquinato da lieviti e torbido. Un altro probabile motivo di mal funzionamento potrebbe essere dovuto alla tipologia del filtro che non risulta adatto a tale mosto. Osservando i dati sopra riportati e le problematiche riscontrate è possibile valutare un cambio di filtro tangenziale utilizzando le cartucce con setto filtrante in ceramica, in cui è possibile raggiungere pressione di esercizio maggiori dato che il mosto (per caratteristica varietale del moscato bianco) risulta molto difficile da filtrare e poiché presenta colloidali che interferiscono notevolmente con tale processo tecnologico.

Per sottolineare l'importanza cruciale di una buona filtrazione per ritardare la crescita cellulare ed evitare ripartenze fermentative frequenti nella fase di frigoconservazione, si è monitorata la crescita lieviforme dopo una filtrazione. Dai dati ottenuti la carica lieviforme rimane relativamente bassa nel primo mese dopo la filtrazione, mentre dopo tale lasso di tempo, la moltiplicazione cellulare procede con ritmi elevati. Come si può osservare dalla Figura 23 la crescita microbica segue un andamento esponenziale anche a temperature di 0°C. Quindi effettuando filtrazioni mantenendo la carica microbica del mosto in uscita nell'ordine delle 10<sup>1</sup> -10<sup>2</sup> CFU/ml si riescono a limitare gli interventi di filtrazione, poiché il tempo necessario ai lieviti di raggiungere

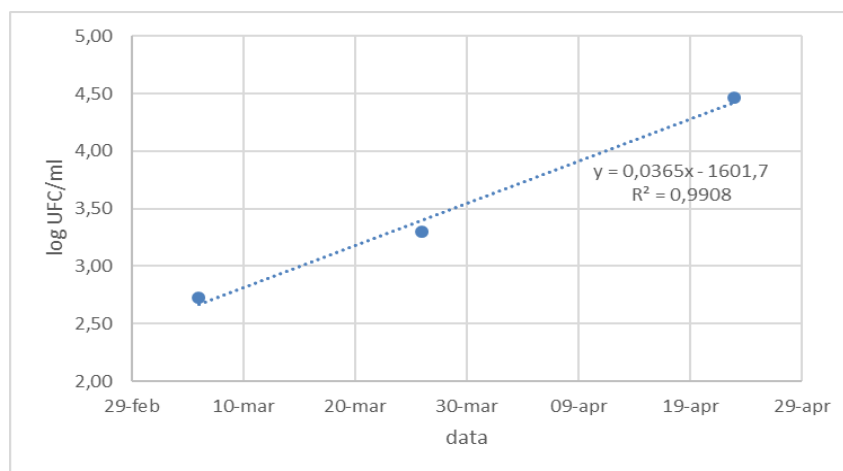


Figura 23 Crescita microbica monitorata dopo una filtrazione tangenziale.

concentrazioni elevate è minore.

Dai dati esposti nella Tabella 1 Tabella 10, nei primi 20 giorni dopo la filtrazione la

Tabella 10 Conte microbiche svolte in doppio, espresse in CFU/ml

data	ripetizione	carica CFU/ml	media carica CFU/ml
06-mar	A	3,50E+02	5,30E+02
	B	7,10E+02	
26-mar	A	1,70E+03	2,00E+03
	B	2,30E+03	
23-apr	A	2,50E+04	2,90E+04
	B	3,30E+04	

crescita della carica microbica è stata compresa tra 2,4 e 6,5 volte, mentre nel successivo mese la crescita è stata tra 10,9 e 19,4 volte.

## 6.4 Conservazione e fermentazione alcolica del mosto

Durante la conservazione del mosto, sono stati monitorati diversi parametri per evitare il depauperamento del mosto. Un punto cruciale del lavoro di valorizzazione del prodotto finale e miglioramento della qualità verte sulla riduzione del contenuto in acetaldeide che si può formare durante lo stoccaggio del mosto in cella frigo in seguito a piccoli avvii di fermentazione alcolica causati dai lieviti presenti. Il monitoraggio di questo composto è stato svolto già a partire dalla vendemmia durante le prime fasi di lavorazione e controllato anche durante lo stoccaggio. Infatti da analisi svolte su altri mosti di Moscato d'Asti e Cortese in cui si è svolto il medesimo processo produttivo del Moscato d'Asti *Scrapona*, si evince che già subito dopo le prime

Tabella 11 Monitoraggio acetaldeide ad inizio lavorazione delle uve e mosti nel periodo vendemmiale su uve dell'azienda Marengo.

MOSCATO GUARINE		acetaldeide mg/l
18-set-19	pressato	15
18-set-19	flottato	19
CORTESE		
21-set-19	pigiato	2
21-set-19	vasca accumolo dopo pressatura	5
21-set-19	dopo flottazione	8

lavorazioni (pigiatura, flottazione e filtrazione) si riscontrano 5-10 mg/l di acetaldeide, con un incremento maggiore nei mosti in cui la vendemmia è stata svolta con la vendemmiatrice rispetto a quei lotti in cui si effettua la vendemmia manuale. La sanità delle uve di partenza gioca anche un ruolo fondamentale per mantenere la concentrazione di tale composto a valori relativamente bassi (Tabella 11).

Sul Moscato d'Asti *Scrapona* 2019 il monitoraggio dell'etanale durante la conservazione del mosto ha messo in evidenza i valori riportati nella Tabella 12. La

Tabella 12 Monitoraggio acetaldeide sulla massa in cella frigo del mosto *Scrapona* 2019

cella frigo Moscato d'Asti Scrapona	data	acetaldeide mg/l	Ac. Volatile g/l	pH	TAV %
	25-set-19	7	0,00	3,30	0,00
	8-ott-19	18	0,05	3,27	0,09
	11-dic-19	23	0,09	3,27	0,05
	12-feb-20	33	0,06	3,25	0,32

concentrazione dell'acetaldeide è aumentata durante tutto questo periodo di stoccaggio, raggiungendo valori abbastanza elevati (circa 30 mg/l) dopo alcuni mesi di conservazione. L'incremento di questo composto dai valori registrati è stato circa di 7 mg/l ogni 30 giorni. Questi dati sono importanti da monitorare, poiché con l'aumentare di questo composto nel vino, è indispensabile aumentare la concentrazione di anidride solforosa da aggiungere durante la conservazione e l'imbottigliamento per poter conservare al meglio il mosto parzialmente fermentato e permettere una shelf-life più lunga nel tempo. I composti di addizione tra etanale e anidride solforosa sono relativamente stabili, ma con il passare del tempo possono portare alla liberazione dell'acetaldeide. Tale composto aldeidico può partecipare a reazioni chimiche, in cui si ha la formazione di sotolone (3-idrossi-4,5-dimetil-2(5H)furanone). Tale composto è un lattone che si forma dall'unione dell'acetaldeide con l'acido  $\alpha$ -chetobutirrico (prodotto di fermentazione alcolica o chimica) e formazione del sotolone. Questo composto presenta basse soglie olfattive (ng/L) in funzione dell'isomero che si forma con sensazioni odore di rancido, nocciola, curry (Kobayashi A., 1989). Quindi è indispensabile cercare di evitare la formazione di etanale nel mosto per contingentare le reazioni che portano alla formazione di sotolone, inoltre questo può portare ad un ridotto utilizzo di anidride solforosa. Nonostante i primi quantitativi di acetaldeide durante le operazioni vendemmiali a causa di fenomeni poco chiari, gli incrementi di etanale durante la conservazione in cella frigo è presumibile sia dovuto ad avvii stentati e ripetuti di fermentazione alcoliche causati da lieviti criofili *Saccharomyces uvarum*, che sono stati identificati già in anni precedenti.

Quindi per prima cosa sono state identificate e monitorate le specie di lieviti presenti nel mosto in cella frigo, per valutare come queste variano nel tempo e se avvengono processi di selezione di alcune specie in funzione delle temperature di conservazione. Osservando la Figura 24 è possibile affermare che già in poco tempo, circa 45 gg dopo la trasformazione dell'uva in mosto, la popolazione microbica si seleziona all'interno della vasca di stoccaggio. Si presume che questa selezione sia dovuta alla bassa temperatura di conservazione del mosto e che quindi porti a selezionare solo i lieviti con una maggiore resistenza alle basse temperature, nello specifico *S.uvarum*. Entrambi i campionamenti sono stati effettuati a valle del filtro tangenziale con una



carica microbica rispettivamente di  $1,7E+03$  e  $2,17E+03$  CFU/ml per il campione del 12-09-19 e del 22-10-19.

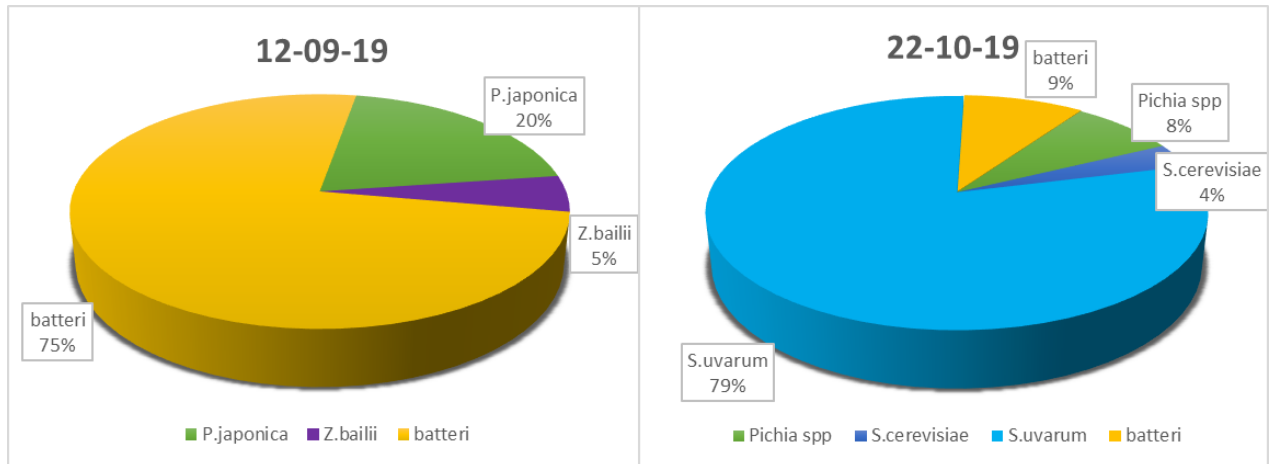


Figura 24 Popolazioni microbiche analizzate sul mosto Scrapona 2019 alla pigiatura e dopo 40 giorni.

Subito dopo le prime fasi di trasformazione dell'uva, la carica di lieviti è rappresentata totalmente da lieviti non-Saccharomyces e batteri (Figura 24). Questi lieviti possono produrre elevate quantità di acetaldeide se il mosto viene mantenuto a temperature superiori a  $10^{\circ}\text{C}$ . Per evitare al minimo l'insorgere del problema durante questa vendemmia, si è utilizzato uno scambiatore di calore per effettuare le operazioni di raffreddamento. Lo scambiatore di calore ha permesso di accelerare le operazioni di raffreddamento, portando in tempi brevi (circa 5 h) il mosto a  $0^{\circ}\text{C}$  evitando così che i lieviti non-Saccharomyces presenti nel mosto, potessero produrre elevate quantità di etanale. Dalla Figura 24 e dalla Tabella 12 si osserva che si sono formate elevate quantità di etanale durante lo stoccaggio in cella frigo in seguito alla selezione rapida di lieviti *S.uvarum* e quindi è stato necessario effettuare continue filtrazioni per mantenere una concentrazione dei lieviti tale da non poter avviare in modo vigoroso le fermentazioni spontanee non desiderate.

Lo scambiatore di calore è stato anche utilizzato per raffreddare il mosto parzialmente fermentato al momento dell'interruzione della fermentazione alcolica per evitare che ci sia una eccessiva produzione di aldeide acetica da parte dei lieviti presenti nella massa durante il raffreddamento della massa. Quest'anno si è provveduto a lasciare il mosto parzialmente fermentato sulle fecce in agitazione giornaliera dopo la fermentazione alcolica. Questa sosta di 15-30 giorni è stata utile per avere una riduzione dell'acetaldeide accumulata in fermentazione alcolica e parte di quella che si è formata durante lo stoccaggio in cella frigo Tabella 13. A dicembre 2019 è stata

Tabella 13 Monitoraggio del primo lotto di fermentazione del moscato Scrapona 2019

data	campione	acetaldeide mg/l	Ac. Totale g/L	Ac. Volatile g/l	acido tartarico g/l	TAV %	Zr g/l
25-set-19	V 103	6	5,43	0,05	4,43	0,01	210,67
27-set-19	V 103 2gg fermentazione	38	6,30	0,10	3,56	2,50	167,39
30-set-19	V 103 fine fermentazione	63	6,40	0,16	3,33	4,85	119,31
14-ott-19	V 104 dopo centrifugazione	30	5,77	0,13	2,39	4,85	115,2

avviata la fermentazione alcolica di un secondo lotto di Scrapona, appartenente alla stessa massa di mosto della massa fermentata indicata in Tabella 13, e anche in questo caso, la conservazione *sur lies* subito dopo l'interruzione della fermentazione alcolica, non ha consentito all'incremento dell'acetaldeide in seguito alla fermentazione alcolica. Le fecce di lievito (*lies*) perdono vitalità in circa due settimane (Patynowski et al. 2002), con intervento di enzimi che inizia a degradare le membrane e pareti cellulari con rilascio di peptidi (enzimi), proteine, polisaccaridi (mannoproteine), acidi nucleici, etc. (Ferrari e Feuillat, 1988; Escot et al., 2001) Questa riduzione dell'acetaldeide durante la stasi delle *sur lies* si potrebbe giustificare con una lisi cellulare che porta ad un rilascio di enzimi, come aldeide deidrogenasi riscontrati in alcuni ceppi di *S.cerevisiae* portando ad una riduzione di tale composto aldeidico. Oppure la riduzione di tale composto potrebbe avvenire grazie all'alcol deidrogenasi attive ancora dopo la riduzione della temperatura con formazione di alcol etilico a partire dall'acetaldeide presente nel mosto dopo il blocco della fermentazione alcolica. Inoltre, la stasi sulle *lies* porta ad un incremento di glutatione con effetto positivo al vino, in quanto aiuta la conservazione riducendo l'ossidabilità del vino stesso, la formazione di composti ossidati come chinoni e preservando la componente aromatica (Webber et al. 2017; Wegmann-Herr et al., 2016).

## 6.5 Aromi

Tutti i vini a base moscato bianco, tra cui il Moscato d'Asti DOCG, sono caratterizzati da una rilevante quantità di composti volatili che ne caratterizzano l'aroma, i monoterpeni, ma nello specifico il linalolo ed i suoi derivati. Sono state anche valutate non solo le componenti monoterpeniche, ma anche i composti tiolici e un marker

dell'intervento di *S.uvarum* il 2-fenil etanolo ed il suo acetato (Giudici *et al.*, 1995; González Flores *et al.*, 2017).

Tabella 14 Analisi aromi liberi di uva diradata, mosto e MPF del Lotto 1 Moscato Scrapona DOCG (\* Guth, 1997; - Ribéreau-Gayon *et al.*, 2007b; + Ruiz *et al.* 2019; x Tominaga *et al.*, 1998)

COMPOSTO	soglia offattiva	unità di misura	12-set-19	14-set-19	25-set-19	14-ott-19	18-ott-19	10-dic-19	25-mag-20	OAV (MOSCATO 20/05/20)
			UVA INTERA	PRE FLOTTAZIONE	POST TANGENZIALE	FINE FERMENTAZIONE	PRE IMBOTTIGLIAMENTO	MOSCATO CONGELATO	MOSCATO dopo 7 mesi	
<b>ALCOL SUPERIORE</b>										
2 Fenil Etanolo (µg/l)	10000	µg/l *	141	107	225	9073	6094	5968	8843	0,9
2 Fenil Etil Acetato (µg/l)	250	µg/l *	1	0	0	1		1	2	-
<b>COMPOSTI TIOLICI</b>										
1-Esanolo (µg/l)	8000	µg/l *	181	1023	467	431	535	531	804	0,1
3-Mercaptoesan-1-olo (ng/l)	60	ng/l +	18,2	103,9	84,9	193,4	234,3	66,2	127,5	2,1
3-Mercaptoetil acetato (ng/l)	4	ng/l +	2,2	11,8	8,6	8,3	9	3,5	5,3	1,3
3-Mercapto-3-Metilbutan-1-olo (ng/l)	1500	ng/l x	8,2	12,3	11,1	18,9	15,3	10,2	16,4	0,0
4-Mercapto-4-Metilpentan-2-olo (ng/l)	55	ng/l x	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-
4-Mercapto-4-Metilpentan-2-one (ng/l)	0,8	ng/l +	0,9	1,7	1,4	2,6	5,4	1,2	2,9	3,6
<b>MONOTERPENI</b>										
Alfa-Terpineolo (µg/l)	400	µg/l -	16	11	13	24	20	34	119	0,3
Citronellolo (µg/l)	18	µg/l -	9	8	7	10	7	3	5	0,3
Diolo 1 (µg/l)			363	270	763	1559	974	915	1217	
Diolo 2 (µg/l)			499	272	263	301	155	154	247	
Endiolo (µg/l)			8	9	4	21	15	32	205	
Geraniil Acetato (µg/l)			5	1	6	9	2	6	1	
Geraniolo (µg/l)	130	µg/l -	160	72	61	62	32	31	63	0,5
Linalolo (µg/l)	50	µg/l -	408	345	246	223	156	156	187	3,7
Nerolo (µg/l)	400	µg/l -	70	27	37	19	16	9	11	0,03
Ossido A (µg/l)			37	21	24	35	20	38	198	
Ossido B (µg/l)			51	26	26	28	18	34	127	
Ossido C (µg/l)			338	229	230	331	204	198	307	
Ossido D (µg/l)			150	83	97	123	79	80	144	

Da quanto è possibile osservare dalla Tabella 14 si osserva che il 2-fenil etanolo ed il suo acetato presentano un lieve aumento già nelle prime fasi precedenti la fermentazione alcolica (presa di spuma), presumibilmente a causa dei piccoli avvii di fermentazione causati da *S.uvarum* che si è insediando già dalle prime fasi di stoccaggio. Però con la fermentazione alcolica si osserva un incremento sostanziale del 2-fenil etanolo dovuto forse per l'intervento di *S.uvarum* durante l'intervallo di tempo necessario (circa 8 ore) per il riscaldamento del mosto stoccato a 0°C per raggiungere la temperatura di inizio fermentazione a 17°C. Inoltre *S.uvarum* avrebbe la possibilità di intervenire e produrre tale alcol superiore anche nelle prime fasi in cui il *pied de cuve* inoculato si trova ancora nella fase *lag*, prima della fase esponenziale di crescita. Questo composto secondo Guth (1997), presenta un aroma di rosa o sensazioni floreali, quindi la formazione di questo composto a concentrazioni prossime alla soglia olfattiva, non porta ad effetti sensoriali negativi al vino finito, ma incrementa la complessità sensoriale del vino stesso.

Analizzando sensorialmente il vino *Scrapona*, si sono percepite sensazioni floreali e agrumate molto complesse, per questo motivo si è voluto valutare se anche la componente volatile tiolica potesse partecipare alla complessità di questo vino. I composti tiolici sono già stati rilevati e reputati importanti anche in altre varietà aromatiche come il Gewurztraminer (Román *et al.*, 2017). Dalle sole analisi dei composti liberi, si può osservare che la componente tiolica ha una importanza rilevante nell'espressione delle sensazioni olfattive del Moscato d'Asti *Scrapona*. Infatti dalla Figura 25 si può percepire maggiormente che il 3-mercaptoesan-1-olo (3-MH) e il suo acetato (3-MHA) sono presenti a concentrazione maggiore rispetto alla soglia olfattiva indicata da Ruiz *et al.* (2019), quindi possono partecipare in modo rilevante all'aroma del vino fornendo sensazione di pompelmo, bosso e frutto della passione. Un altro composto con concentrazione più di tre volte al di sopra della soglia olfattiva è il 4-mercapto-4-metilpentan-2-one (4-MMP) con sensazione di fiori di bosso e germoglio di ribes nero. Come è possibile osservare dalla Figura 25 il 3-MH e il 4-MMP raggiungono concentrazioni elevate in seguito alla fermentazione, poiché questi composti vengono liberati dalle frazioni coniugate (cisteinil e glutationil derivati) grazie all'intervento delle  $\beta$ -liasi di *S.cerevisiae* durante le prime fasi della fermentazione alcolica in cui il lievito ha la massima capacità di assimilare

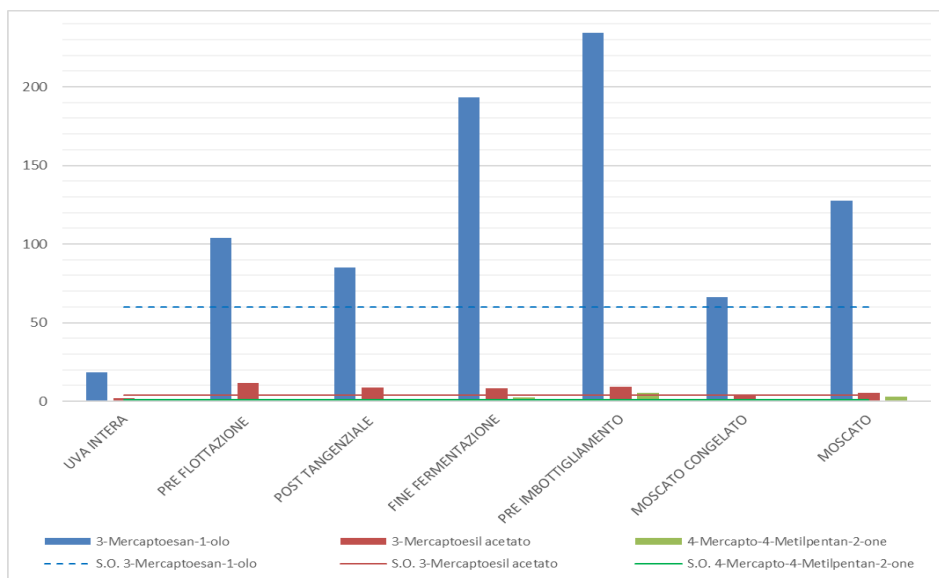


Figura 25 Rappresentazione delle concentrazioni dei principali composti tiolici (3-MH, 3-MHA, 4-MMP) e le relative soglie olfattive

amminoacidi e composti azotati (Ruiz *et al.* 2019). Inoltre il 3-MH può derivare da reazioni di addizione nucleofila tra il t-2-esenale ed il glutatione presente nel mosto (Belda *et al.* 2017 e Pinu *et al.* 2012), e da come indicato in Tabella 14 1-esanolo ha un picco di formazione durante le prime fasi di trasformazione dell'uva in mosto, in seguito all'intervento delle lipossigenasi che formano composti aldeidici e alcolici con struttura carboniosa satura o insatura a sei carboni (1-esanolo, t-2-esenale, etc.). Essendoci un picco di formazione sia del 1-esanolo che del 3-MH sul campione prelevato dopo la flottazione, porta a pensare che ci sia in parte la formazione di questo composto tiolico anche non solo dalla liberazione delle frazioni coniugate, ma anche da reazioni chimiche di neoformazione. Per incrementare i composti tiolici potrebbe essere interessante valutare l'aggiunta di tannini con un elevato contenuto in tioli (Larcher *et al.*, 2015), ma anche utilizzare lieviti che hanno una maggiore attività di acetilazione per incrementare la formazione di 3-MHA che presenta una soglia olfattiva minore del 3-MH.

Sono stati rilevati e considerati anche i monoterpeni, composti di primaria importanza per l'aroma dei vini a base moscato bianco. Dalla Figura 26 è possibile rilevare e confermare che i composti terpenici glicosilati nei mosti e nei vini moscato presentano concentrazioni elevate, soprattutto per quei composti di elevata importanza per questi vini come linalolo e sui derivati: diolo 1 (2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diolo), e 8-idrossi linalolo (2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diolo), ma anche geraniolo, nerolo e i 4 ossidi. La Figura 26 ci permette di notare che durante la fermentazione alcolica non

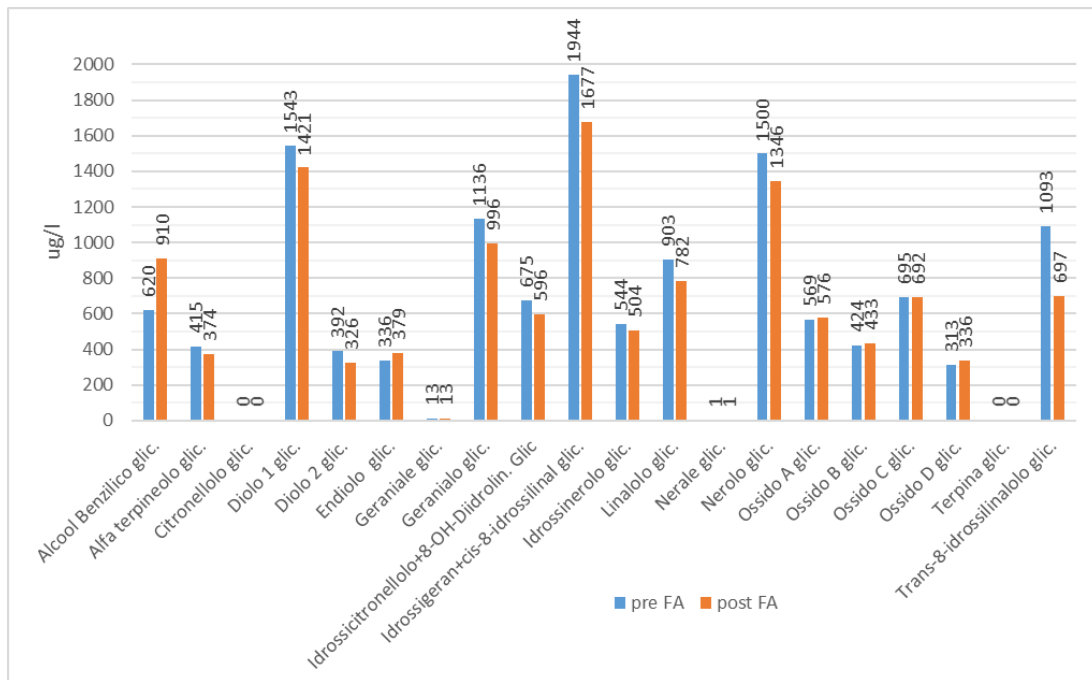


Figura 26 Composti monoterpenici glicosilati prima e dopo la fermentazione alcolica del Lotto 1 Scrapona 2019

si ha un importante decremento delle riserve glicosilate, questo può essere utile per mantenere una rilevante quantità di composti aromatici che possono essere liberati dall'idrolisi acida (Cordonnier e Bayonove, 1974) potendo così avere una maggiore shelf-life del prodotto in bottiglia. La liberazione maggiore dei glicosidi è di linalolo, geraniolo, gli isomeri dell'8-idrossi linalolo e del diolo 1. Non bisogna dimenticare che la reazione principale a cui sono soggetti i glicosidi degli alcoli terpenici al pH enologico (3-3,5) è quella di idrolisi del legame disaccaridico con formazione della miscela di linalolo, nerolo, geraniolo,  $\alpha$ -terpineolo. Può anche essere di importanza rilevante la reazione di idratazione dei glicosidi degli alcoli monoidrossilati (linalolo, geraniolo, nerolo, etc) con formazione dei glicosidi dei dioli, quindi i glicosidi possono trasformarsi senza liberare i rispettivi composti terpenici, ma trasformarsi in altri composti terpenici rimanendo glicosidati.

Spostandoci sui composti terpenici liberi, anche i composti liberi sono soggetti a modificazioni acido catalizzate, idratazione e ciclizzazione, e secondo Baxter *et al.* (1978) i prodotti principali dell'attacco protonico al linalolo sono l' $\alpha$ -terpineolo ed endiolo. Secondo Di Stefano (1989) dal diolo 1, che può essere presente in tenori che raggiungono 2 mg/l (nel nostro caso circa 1 mg/l di composto libero) durante la conservazione del vino si originerebbero l'ho-trienolo ed il nerol ossido. Quindi durante la conservazione si hanno trasformazioni mediate dal pH e anche dalla

temperatura di conservazione, molto importante per la velocità delle reazioni come indicato anche da Gerbi *et al.* (2007).

Come è possibile osservare dalla Figura 27, i composti liberi, non sono stati soggetti ad un grande cambiamento e liberazione in seguito alla fermentazione alcolica, comunque i soli composti che sono incrementati sono stati quelli di trasformazione dei terpeni monoidrossilati come l' $\alpha$ -terpineolo, Endiolo, Diolo 1, e Ossidi A e B. Ma come si può osservare, il linalolo, geranio e nerolo tendono a diminuire, presumibilmente a causa di reazioni acido catalizzate.

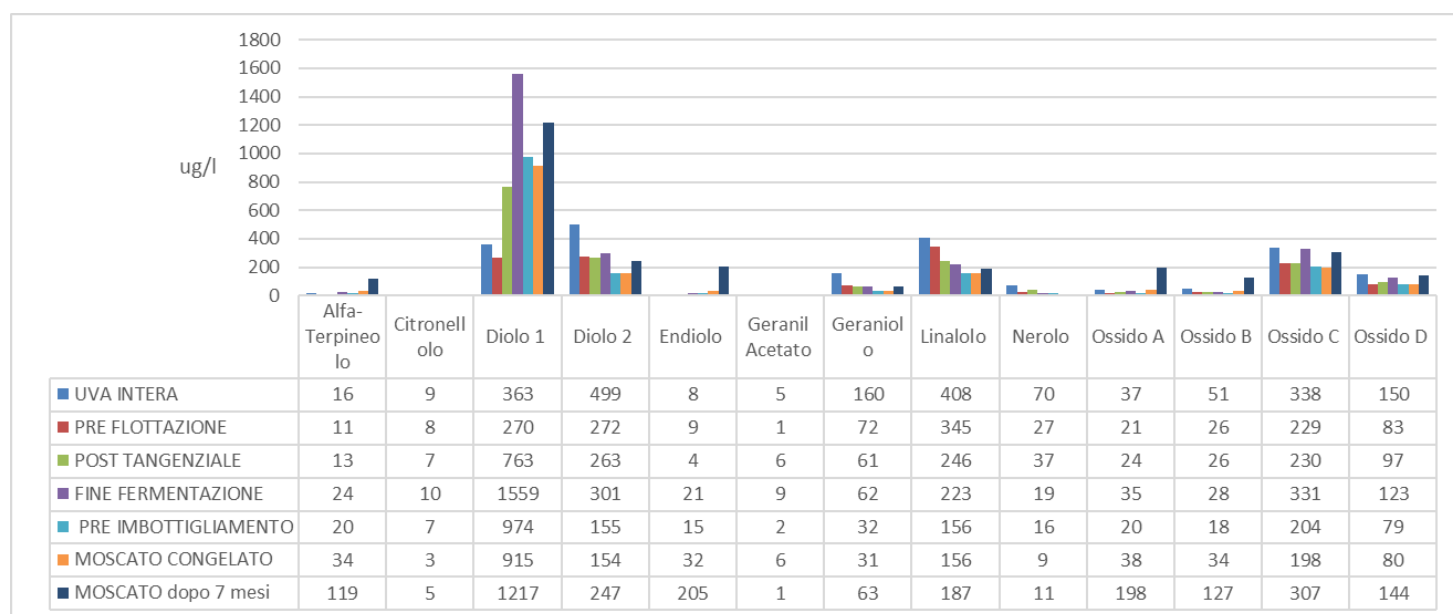


Figura 27 Composti monoterpenici liberi valutati di uva diradata, mosto e MPF del Lotto 1 Moscato Scrapona DOCG

nonostante questa tendenza al diminuire dei principali composti monoterpenici, come è osservabile dalla Tabella 14, il linalolo rimane il principale monoterpene, con un elevato impatto olfattivo fornendo sensazioni di rosa e floreali principali al vino finito. Potendo riassumere i concetti inerenti ai composti aromatici l'intervento di *S.uvarum* porta ad una formazione rilevante di 2-fenil etanolo ce conferisce sensazioni olfattive gradevoli. Bisogna affermare che il Moscato d'Asti Scrapona presenta quantità importanti sia di composti tiolici, sia di composti terpenici, ed entrambi portano ad una complessità e longevità alle sensazioni floreali ed agrumate del vino finito. Si potrebbero apportare eventuali correzioni durante a lavorazione dell'uva e del mosto per incrementare i composti liberi e glicosidati (monotepreni) e coniugati (tioli). Ad esempio, si potrebbe proteggere con ghiaccio secco (anidride carbonica solida) per proteggere il più possibile il mosto dalle ossidazioni che potrebbero portare ad una

formazione elevata di composti chinonici che vanno poi legarsi al glutatione libero presente nel succo. Tale glutatione sarebbe utile per la formazione per via chimica di composti tiolici. Inoltre si potrebbe effettuare una macerazione pellicolare (previo raffreddamento del pigiato con lo scambiatore di calore) di breve durata per massimizzare la solubilizzazione di composti tiolici coniugati e l'attività delle LOX con formazione di t-2-esenale con formazione del glutationil-esanolo con liberazione in fermentazione di 3-MH. Inoltre tale macerazione potrebbe favorire la cessione di composti terpenici dalle bucce al mosto. Non va però dimenticato che una macerazione pellicolare porta ad avere una maggiore diminuzione del pH a causa di una maggiore cessione di  $K^+$ .



## 8. CONCLUSIONI

Le esperienze effettuate hanno evidenziato che per mantenere elevata la qualità del prodotto di partenza, sono necessari monitoraggi e controlli in differenti momenti della produzione.

Dalle prove eseguite si sottolinea l'importanza di scegliere i coadiuvanti ottimali per il prodotto da sottoporre a flottazione, per poter ottenere il risultato migliore. Nel nostro caso 50 g/hl di bentonite e 10 g/hl di gelatina animale hanno permesso di ottenere tale obiettivo. Inoltre questi due prodotti a queste dosi, hanno permesso la maggiore stabilità proteica del mosto, il migliore indice di filtrabilità riducendo così i problemi nelle successive operazioni sul mosto.

Un punto critico che va tenuto sotto continua osservazione è la filtrazione tangenziale, che ha dimostrato di svolgere un lavoro ottimale. In alcuni casi però non è stato possibile individuare eventuali anomalie e problematiche ed ha fatto registrare cariche lieviformi in uscita dal filtro con valori superiori a  $10^3$  CFU/ml, con problemi poi nella conservazione del mosto in cella frigo. Infatti partendo con cariche microbiche intorno a tali valori, sono state necessarie filtrazioni frequenti a causa di avvii rapidi di fermentazioni indesiderate. La causa principale di questi avvii rapidi di fermentazione è da attribuire a *S.uvarum*, poiché dopo poche settimane (circa 3) è stato in grado di rappresentare l'80% della popolazione di lieviti presenti nel mosto in cella frigo.

Filtrazioni non ottimali e la presenza di *S.uvarum* nel mosto portano alla formazione nel tempo di acetaldeide, con incrementi mensili di circa 7 mg/l. Inoltre tale molecola viene prodotta da *S.cerevisiae* durante la presa di spuma. Con il soggiorno del mosto fermentato sulle *lies* per almeno 15 gg, è stato possibile ridurre la concentrazione di questo composto a vino imbottigliato entro valori accettabili (35-40 mg/l).

In aggiunta, dalle analisi sui composti volatili (2-fenil etanolo, composti tiolici e terpeni) si può affermare che questi composti partecipano in misura differente, ma tutti apportando sentori di rosa, agrumi, frutti tropicali e sensazioni floreali al vino finito. Infatti alla sensazione olfattiva del Moscato d'Asti *Scrapona* non partecipano in modo rilevante (superando la soglia olfattiva di riferimento) solo i composti come linalolo, dioli 1 e altri aromi monoterpenici derivati del linalolo, ma anche composti tiolici (3-MH, 3-MHA e 4-MMP) che superano notevolmente la soglia olfattiva.



## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Alessandria V., Marengo F., Englezos V., Gerbi V., Rantsiou K., Cocolin L.; (2015). Mycobiota of Barbera Grapes from the Piedmont Region from a Single Vintage Year. *Am. J. Enol. Vitic.* 66:2, 244-250.
2. Armada L., Fernández E., Falqué E.; (2010). Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (10), 1517-1525.
3. Aryan A.P., Wilson B., Strauss C., Williams P.J.; (1987). The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible application in enology. *Am J Enol Vitic* 38, 182–188.
4. Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V.; (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 243-259.
5. Belda I., Ruiz J., Beisert B., Navascués E., Marquina D., Calderón F., Rauhut D., Benito S., Santos A.; (2017). Influence of *Torulasporea delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int J Food Microbiol* 257, 183-191.
6. Bellon, J.R., Schmid, F., Capone, D.L., Dunn, B.L. and Chambers, P.J. (2013) Introducing a new breed of wine yeast: interspecific hybridisation between a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS ONE*, 8 (4) e62053.
7. Bertolini L., Zambonelli C., Giudici P., Castellari L.; (1996). Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 343-345.
8. Bisotto, A., Julien, A., Rigou, P., Schneider, R., & Salmon, J. M.; (2015). Evaluation of the inherent capacity of commercial yeast strains to release glycosidic aroma precursors from Muscat grape must. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(2), 194–199.
9. Blade W.H., Boulton R.; (1988). Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 193-199.

10. Blouin J. e E. Peynaud; 2008. *Scienza ed elaborazione del vino*. Ed. Eno-one, Reggio Emilia.
11. Boccaccio G.; (2016). Tesi di laurea magistrale: Prospettive di valorizzazione qualitativa del Moscato d'Asti DOCG mediante tecniche agronomiche e enologiche, Progetto Marengo "Scrapona".
12. Bowles D., Lim E.K., Poppenberger B., Vaistij F.E.; (2006). Glycosyl transferases of lipophilic small molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.* (57) 567-597.
13. Cabaroglu T., Canbas A.; (2002). The effect of skin contacts on the aromatic composition of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat Of Alexandria grown in Southern Anatolia. *Acta Alimentaria*, 31 (1), 45-55.
14. Capone D.L., Ristic R., Pardon K.H., Jeffery D.W.; (2015). Simple quantitative determination of potent thiols at ultratrace levels in wine by derivatization and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis. *Anal. Chem.*, 87 (2), 1226-1231.
15. Chapman M.D., Matthews M.A., Guinard J.X.; (2004). Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different crop yields. *Am J Enol Vitic* 55, 325–334.
16. Charoenchai C., Fleet G.H., Henschke P.; (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 283-288.
17. Clemente Tarantola (1972). *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia*. Vol III (1) 17-28.
18. Cocolin L., Bisson L.F, and Mills D.A.; (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *Fems Microbiol. Lett.* 189, 81-87.
19. Colangelo D., Torchio F., Rolle L., Gerbi V., De Faveri D.M., Lambri M.; (2019). Using Response Surface Methodology to Model the Clarifying Process of Muscat blanc Must for the Production of a Sweet Sparkling Wine. *Am J Enol Vitic.* 70, 42-49.
20. Constantí M., Poblet M., Arola L., Mas A., Guillamón J.M.; (1997). Analysis of yeasts populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 339 – 344.

21. Cordente A.G., Curtin C.D., Varela C., Pretorius I.S.; (2012). Flavour active wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 601–618.
22. Cordero-Otero R.R., Ubeda-Iranzo J.F., Briones-Perez A.I., Potgieter N., Villena M.A., Pretorius I.S., Van Rensburg P.; (2003). Characterization of the  $\beta$ -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Food Science* 68, 2564–2569.
23. Cordonnier R., Bayonove C.; (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 278 (D), 3387-3390.
24. Crespan M., Milani N.; (2001). The Muscats: A molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. *Vitis*, 40 (1) 23-30.
25. D'Onofrio C.; (2011). Caratterizzazione funzionale della biosintesi degli aromi delle uve durante lo sviluppo dell'acino e controllo della qualità aromatica delle uve. *Review n. 14 – Italus Hortus* 18 (2) 39-61.
26. Dalmasso G., Dell'Olio G., Cosmo I., Del Gaudio S., Ciasca L., Mazzei A., Zappalà A. e Bruni B.; (1964). "Moscato bianco", in *Principali vitigni da vino coltivati in Italia - Volume III*.
27. Darriet P., Boidron J.N., Dubourdieu D.; (1988). L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du Muscat a petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*. *Conn Vigne Vin* 22, 89-195.
28. De Vita P., De Vita G; (2003). *Corso di meccanica enologica*. Ed. Hoepli.
29. Demuyter C., Lollier M., Legras J.L., Le Jeune, C.; (2004). Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J Appl Microbiol*, 97:1140-1148.
30. Di Stefano R.; (1982). Presenza di precursori del linalolo nel Moscato bianco del Piemonte. *Vignevini IX*, 45-47.
31. Di Stefano R.; (1989). Evoluzione dei composti terpenici liberi e glucosidici e degli actinidioli durante la conservazione dei mosti e dei vini in funzione del pH. *Riv Vitic Enol*, 2, 11-23.

32. Di Stefano, R. (1991). Proposition d'une methode de preparation del'échantillon pour la determination des terpenes libres et glycosides des raisins et des vins , Bull. O.I.V.; 64 (721–722), 219–223.
33. Di Stefano, R.; Maggiorotto, G.; Giannotti, S.; (1992). Trasformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. Riv. Vitic. Enol., 45, 43–49.
34. Di Stefano R. (2013). Gli aromi dei Moscati con particolare riferimento a quelli del Moscato Giallo. Atti Accademia Italiana della Vite e del Vino. ([https://www.aivv.it/Archivio/Atti/R053\\_1309\\_1055\\_DiStefano.pdf](https://www.aivv.it/Archivio/Atti/R053_1309_1055_DiStefano.pdf)).
35. Diago M.P., Vilalonga M., Blanco J.A.; (2010). Effect of mechanical thinning on wine composition and sensory attributes of Grenache and Tempranillo varieties (*Vitis vinifera* L). Aust J Grape Wine Res 16, 314–326.
36. Dugelay, I.; Gunata, Y. Z.; Sapis, J. C.; Baumes, R.; Bayonove, C. (1992) Etude de l'origine du citronellol dans les vins. J. Int. Sci. Vigne Vin, 26, 177–184.
37. Dunlevy J.D., Kalua C.M., Keyzers R.A. and Boss P.K.; (2009). The production of flavour & aroma compounds in grape berries. Grapevine molecular physiology & biotechnology, 2nd edn. Springer. 293-340.
38. Duradeva N., Pichrsky E., Gershenzon J.; (2004). Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiol. 135: 1893-1902.
39. Englezos V., Rantsiou K., Cravero F., Torchio F., Pollon M., Fracassetti D., Ortiz-Julien A., Gerbi V., Rolle L., Cocolin L.; (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem 12, 350–360.
40. Escot S., Feuillat M., Dulau L., Charpentier C.; (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency, Austr. J. Wine Research, 7, 153-159.
41. Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol. A.; (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 329-337.
42. Failla O., Forni G.; (2014). Tutto ebbe inizio con il Moscato Bianco. Origini 12-15.

43. Ferrari G., Feuillat M., (1988). L'élevage sur lie de vins blancs des Bourgogne. I- étude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis*, 27, 183-197.
44. Ferrarini R., Zironi R., Buiatti S., Celotti E.; (1991). Studio delle applicazioni della flottazione nella chiarifica e stabilizzazione dei mosti d'uva e vini. Nota I. Effetti sulla composizione dei mosti e dei vini. *Vignevini*, 18 (11), 63-67.
45. Ferrarini R., Celotti E.; (1995). Recent advances in the process of flotation applied to the clarification of grape musts. *Journal of Wine Research*, 6 (1) 19-33.
46. Fleet G.H.; (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11-22.
47. Furlini G. (2018). Tesi di laurea: Prospettive di valorizzazione qualitativa del Moscato d'Asti DOCG mediante tecniche agronomiche e enologiche, Progetto Marengo "Scrapona".
48. García-Carpintero EG, Sánchez-Palomo E, Gallego M, Gómez A, González-Viñas MA (2011) Caratterizzazione volatile e sensoriale dei vini rossi del cv. Vitigno minoritario Moravia Agraria coltivato nella regione della Mancia per cinque annate consecutive. *Food Res Int* 44, 1549-1560.
49. Gerbi V., Minati J.L., Zeppa G., Tortia C.; (1995). Aspetti tecnologici, qualitativi e microbiologici dell'applicazione della microfiltrazione tangenziale e della flottazione nella vinificazione del Moscato. Atti Convegno Nuove tecnologie per il Moscato: flottazione e microfiltrazione tangenziale, Mango (CN), 25 maggio, 21-39.
50. Gerbi V., Torchio F. e Rolle L.; (2007). Shelf life dell'Asti Influenza della temperatura di conservazione e della gradazione alcolica. *Riv. Moscato d'Asti*, 29-30.
51. Giudici P., Zambonelli C., Passarelli P., Castellari L.; (1995). Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 143-147.
52. González Flores M., Rodriguez M.E., Oteiza J.M., Barbagelata R., Lopes C.A.; (2017). Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and

- Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 9-17.
53. González S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A.; (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res* 6, 1221–1234.
  54. Granchi L., Bosco M., Messini A., Vincenzini M.; (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87, 949-956.
  55. Guillamón J.M., Sabaté J., Barrio E., Cano J., Querol A.; (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
  56. Guillou C., Alexandre J.L., García Ma.J., Lizama V.; (1998). Clarification influence upon sensorial and analytical characteristics of Muscat dry wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 32 (2), 111-119.
  57. Günata Z., Dugelay I., Sapis J.C., Baumes R., Bayonove C.; (1990). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: Libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 24 (3), 133-144.
  58. Günata, Z., Dugelay, I., Sapis, J., Baumes, R., Bayonove, C. (1993). Role of enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. In *Progress in Flavour Precursor Studies*. P. Schreier and P. Winterhalter (eds.), 219-234.
  59. Guth H.; (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3027–3032.
  60. Hashizume, K. & Samuta, T.; (1997). Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor. *J. Agr. Food Chem.* 45, 1333-1337.
  61. Kizildeniz T., Pascual I., Irigoyen J.J., Morales F.; (2018). Using fruit-bearing cuttings of grapevine and temperature gradient greenhouses to evaluate effects of climate change (elevated CO<sub>2</sub> and temperature, and water deficit) on the cv. red and white Tempranillo. Yield and must quality in three consecutive growing seasons(2013–2015). *Agricultural Water Management* 202, 299-310.



62. Kobayashi A; (1989). Sotolon, identification, formation, and effect on flavor. *Flavor Chemistry Trends and Development; ACS Symposium Series 388*.
63. Kok D.; (2011). Influences of pre- and post-veraison cluster thinning treatments on grape composition variables and monoterpene levels of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J Food Agric Environ* 9, 22–26.
64. Kurtzman C.P., Robnett C.J.; (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1216-1223.
65. Lambri M., Dordoni R., Silva A., De Faveri D.M.; (2012). Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 1-12.
66. Larcher R., Tonidandel L., Villegas T.R., Nardin T., Fedrizzi B., Nicolini G.; (2015) Pre-fermentation addition of grape tannin increases the varietal thiols content in wine. *Food Chem* 166:56–61.
67. Martin D.M., Chiang A., Lund S.T., Bholmann J.; (2012). Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpenol glycoside accumulation in Gewurztraminer grapes. *Planta* 236, 919–929.
68. Moio L., Ugliano M., Gambuti A., Genovese A., Piombino P.; (2004). Influence of Clarification Treatment on Concentrations of Selected Free Varietal Aroma Compounds and Glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) Must and Wine. *Am J Enol Vitic.* 55, 7-12.
69. Moreno J. e Peinado R.; (2012). *Enological Chemistry*. Elsevier Inc.
70. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C.; (2011). *Wine chemistry and biochemistry*, Chapter 1 Biochemistry of Alcoholic Fermentation. Springer.
71. Naumov G.I.; (1996). Identificazione genetica di specie biologiche nel complesso *Saccharomyces sensu stricto*. *Journal of Industrial Microbiology* , 17 ( 1996 ) , pp. 295 – 302.
72. Neuberg C.; (1946). The Biochemistry of Yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, 15, 435-472.

73. O'Neill, M.A. and York, W.S. (2003) The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The plant cell wall*. Ed. J.K.C. Rose, pp. 1–54.
74. Patynowski R.J., Jiranek V., Markides A.J.; (2002). Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. *Aust J Grape Wine Res*, 8 62–69.
75. Pinu F.R., Jouanneau S., Nicolau L., Gardner G.C., Villas-Boas S.G.; (2012). Concentrazioni del tiolo 3-mercaptoesano volatile nei vini bianchi del Sauvignon: nessuna correlazione con i precursori del succo. *Am J Enol Vitic* 63, 107-412.
76. Pretorius I.S., Van der Westhuizen T.J., O.P.H. Augustyn O.P.H.; (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review *S. Afr. Enol. Vitic.*, 20 (2), 61-74.
77. Puig-Deu M., López-Tamames E., Buxaderas S., Torre-Boronat M.C.; (1999). Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation. *Food Chemistry*, 66, 35-42.
78. REGOLAMENTO (CE) N. 606/2009 DELLA COMMISSIONE del 10 luglio 2009.
79. Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A; (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 316-327.
80. Ribéreau-Gayon P., Boidron J.N., Terrier A.; (1975). Aroma of Muscat Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23 (6) 1042-1047.
81. Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A.; (2007a) - *Trattato di Enologia*. Volume 1.
82. Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A.; (2007b) - *Trattato di Enologia*. Volume 2.
83. Roland A., Schneider R., Razungles A., Cavelier F.; (2011). Varietal thiols in wine: Discovery, analysis and applications. *Chem Rev* 111, 7355–7376.
84. Román T., Tonidandel T., Larcher R., Celotti E, Nicolini G.; (2017). Importance of polyfunctional thiols on semi-industrial Gewürztraminer wines and the correlation to technological treatments. *Eur Food Res Technol* 244, 379–386.

85. Romano P. e Suzzi G.; (1992). In wine Microbiology and Biotechnology, G.H. Fleet Ed. Hardwood Accademy Publishers.
86. Roncoroni M., Santiago M., Hooks D.O., Moroney S., Harsch M.J., Lee S.A., Richards K.D., Nicolau L., Gardner R.C.; (2011). The yeast IRC7 gene encodes a  $\beta$ -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol*, 28, 926–935.
87. Rosi I., Vinnella M., Domizio P.; (1994). Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeast of enological origin. *J App Bacteriol*, 77, 519–527.
88. Ruiz J., Kiene F., Belda I., Fracassetti D., Marquina D., Navascués E., Calderón F., Benito A., Rauhut D., Santos A., Benito S.; (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 7425–7450.
89. Sabate J., Cano J., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J.M.; (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157, 267-274.
90. Serra A., Strehaiano P., Taillandier P.; (2005). Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 257-265.
91. Sipiczki M.; (2002). Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. In *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts* ed. Ciani, M., 53-69.
92. Stevens K.L., Bomben J., Lee A., McFadden W.H. (1966) Volatile from grapes. Muscat of Alexandria. *J. Agric. Food Chem.*, 14:3, 249-252
93. Suzzi G., Tofalo R.; (2018). *Microbiologia enologica*, II ed. Edagricole Università e Formazione.
94. Tablino L.; (2017); Asti e Moscato d’Asti: la lunga storia. *MilleVigne* 2/2017.
95. Terrier A. (1972) Thèse Université de Bordeaux n° 162.
96. Tofalo R., Schirone M., Telera G.C., Manetta A.C., Corsetti A., Suzzi G.; (2011). Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. *Annals of Microbiology* 61, 57–66.

97. Tominaga T., Furrer A., Henry R., Dubourdieu D.; (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis Vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *FlaVour Fragr. J.*, 13, 159-162.
98. Tominaga T., Masneuf I., Dubourdieu D.; (1995). A S-cysteine conjugate precursor of aroma of white sauvignon. *J Int Sci Vigne Vin* 29, 227–232.
99. Ugliano M., Bartowsky E.J., McCarthy J., Moio L., Henschke P.A.; (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J Agric Food Chem*, 54 6322–633.
100. Wajsfelner R.; (1989). Application de la flottation a la clarification des moût. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 23, 53-57.
101. Webber V., Dutra S.V., Spinelli F.R., Carnieli G.J., Cardozo A., Vanderlinde A; (2017). Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chemistry*, 216, 254-259.
102. Wegmann-Herr P., Ullrich S., Schmarr H.-G., Durner D.; (2016). Use of glutathione during white wine production – Impact on S-off-flavors and sensory production. *BIO Web of Conferences*, 7, 02031.
103. Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R.A.; (1982). Novel monoterpene disaccharide of glycosides of *Vitis Vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* (21) 2013-2020.
104. Zironi R., Ferrarini R., Celotti E. e Cotin L.; (1993). Studio delle applicazioni della flottazione nella chiarifica e nella stabilizzazione dei mosti d'uva e dei vini. Nota II: Effetti in combinazione con altre tecniche. *Vignevini*, 20, 49-55.
105. Zott K., Thibon C., Bely M., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., Masneuf-Pomarede I.; (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *Int J Food Microbiol* 151, 210-215.