



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria

*Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse
naturali e Ambiente*

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

Elaborato finale di Laurea

Aceti balsamici IGP: confronti analitici GC-IMS e sensoriali

Relatrice: Prof.ssa Lomolino Giovanna

Laureando: Quaglia Tommaso

Matricola: 2023313

Anno Accademico 2022-2023

Riassunto

La complessità del profilo volatile degli aceti balsamici è stata certificata da diverse indagini analitiche di carattere sensoriale e strumentale. Lo scopo del presente studio è quello di individuare una correlazione tra l'analisi strumentale standardizzata e l'analisi sensoriale, attribuendo ai diversi composti i principali descrittori dell'aceto balsamico riscontrati da test sensoriali. Tramite l'utilizzo di tecniche gascromatografiche accoppiate a separazioni per mobilità ionica (GM-IMS) sono stati studiati i profili volatili di aceti balsamici IGP appartenenti a diverse categorie merceologiche prodotti dall'azienda Ponti. All'interno dei vari profili cromatografici sono stati evidenziati i composti maggiormente presenti nello spazio di testa dei campioni, quali responsabili del profilo aromatico degli aceti balsamici analizzati. Successivamente sono state condotte prove sensoriali sugli stessi campioni precedentemente analizzati, per ottenere risultati che combaciassero con le distinzioni rilevate dallo strumento, allo scopo di rendere le analisi strumentali un appoggio affidabile e standardizzato per futuri confronti sensoriali.

Abstract

The complexity of the volatile profile of balsamic vinegars has been certified by several sensory and instrumental analytical investigations. The purpose of this study is to identify a correlation between standardized instrumental analysis and sensory analysis, attributing to the different compounds the main balsamic vinegar descriptors found by sensory tests. Thanks to gas chromatographic techniques coupled with ion mobility separations (GM-IMS) the volatile profiles of balsamic vinegars PGI, belonging to different product categories produced by the company Ponti, have been studied. Within the various chromatographic profiles, the compounds most present in the overhead space of the samples were highlighted, as responsible for the aromatic profile of the balsamic vinegars analyzed. Sensory tests were then carried out on the same samples previously analyzed, to obtain results that could match the distinctions detected by the instrument, in order to make instrumental analysis a reliable and standardized support for future sensory comparisons.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. Aceto di vino	1
1.1. Produzione dell'aceto di vino	2
1.2. Batteri acetici	6
1.3. Fermentazione alcolica	7
1.4. Fermentazione acetica	8
1.5. Difetti dell'aceto	9
1.6. Tipologie di aceto	10
2. Aceto balsamico	11
2.1. Produzione dell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena	11
2.2. Produzione dell'Aceto Balsamico di Modena IGP	13
3. Ponti	15
4. Metodi di analisi delle sostanze volatili	16
4.1. GC-IMS	17
5. Analisi sensoriale	18
5.1. Codice olfattivo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP	20
5.2. Valutazione sensoriale dell'aceto balsamico	22
SCOPO DEL LAVORO	25
MATERIALI E METODI	27
6. Flavourspec	27
6.1. Preparazione campioni e metodo	30
6.2. Campioni	33
6.3. Software	34
7. Formazione del panel	39
RISULTATI E DISCUSSIONI	43
8. Caratterizzazione del profilo volatile di aceti balsamici	43
8.1. Distinzione di aceti balsamici tramite GC-IMS	46
8.2. Confronti strumentali sull'aroma fruttato	54
9. Confronti sensoriali	57
9.1. Test triangolare	57
9.2. Test di ordinamento	59

CONCLUSIONI	65
BIBLIOGRAFIA	67
SITOGRAFIA	71

INTRODUZIONE

1. Aceto di vino

Chiamato in francese *vinagre*, ovvero “vino agro”, l’aceto è un prodotto ottenuto per azione dei batteri acetici su una soluzione idroalcolica: è possibile, quindi, ricavarlo da qualsiasi materia prima che contenga alcol per fermentazione, come riso, mele, ciliegie e naturalmente uva e vino. Secondo la Legge n. 238 del 2016, per “aceto di vino” si intende il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione acetica di vino, che può essere vino rosso, bianco o rosée, avente un tenore di acidità totale espressa in acido acetico non inferiore a 60 g/l e una quantità di alcol etilico non superiore a 1,5% in volume. Il limite massimo di anidride solforosa presente nella materia prima è di 100 mg/l, al fine di non contrastare la crescita di batteri acetici [1].

È possibile distinguere due tipologie di aceti di vino in funzione dell’acidità totale, espressa in grammi di acido acetico su 100 ml di prodotto:

- aceto comune, la cui acidità totale minima è del 6%. Per questo prodotto la quantità di etanolo è nulla o presente in tracce e il vino da cui deriva ha una concentrazione alcolica di 7-10°;
- aceto di qualità, la cui acidità totale minima è del 7%. La quantità di etanolo massima è dell’1,5% e i vini da cui deriva presentano una concentrazione alcolica superiore a 10°. In acetificio la materia prima viene quindi diluita in acqua per raggiungere un titolo alcolico ottimale per l’avvio della fermentazione. Infine, è previsto un periodo di invecchiamento che può protrarsi per qualche mese fino a tre anni.

È consentito per l’aceto di vino aggiungere acqua, purché effettuato in acetificio, decolorare con carbone, aggiungere aromatizzanti o aromi naturali per un massimo di 5% in volume, purché venga posto in commercio con la denominazione di “aceto di vino aromatizzato”. I divieti riguardano l’aggiunta di alcol etilico, acido acetico sintetico, liquidi acetici distillati, miscelazione di materie prime o taglio di aceti provenienti da materie prime diverse, distillazione dell’aceto e l’aggiunta di caramello [1].

1.1. Produzione dell'aceto di vino

I diversi sistemi di produzione di aceto di vino possono essere suddivisi in tre tipologie principali:

- il sistema tradizionale statico (o di Orleans),
- il sistema a percolamento,
- il sistema a coltura sommersa.

Per avviare l'acetificazione possono essere sfruttate colture pure o più comunemente aliquote di vini freschi aggiunte ad aceti già in fase di fermentazione, ottenendo una miscela avente un grado alcolico di 3-4°, che rappresenta un ambiente ideale per garantire il processo fermentativo. Il contenuto residuo di alcol determina la fine dell'acetificazione e varia in base al prodotto che si desidera ottenere: per l'aceto comune l'acetificazione si blocca ad un contenuto di alcol residuo di 0,2-0,3%, mentre per l'aceto di qualità il processo si arresta al raggiungimento di 0,6-1,5% di alcol [2].

Sistema statico tradizionale

Nato in Francia nel 1670, il sistema statico tradizionale, chiamato anche metodo Orleans, si basa sull'utilizzo di botti in legno con un foro coperto nella parte superiore: ciò permette un contatto permanente con l'aria esterna, garantendo un continuo apporto di ossigeno ai batteri acetici. Questi ultimi, se presenti nella zona superficiale del liquido, possono portare alla formazione di uno strato polisaccaridico formato principalmente da cellulosa, chiamato madre dell'aceto: questa non è altro che una cuticola superficiale formata dagli stessi batteri acetici e cellulosa, generatasi grazie alla elevata concentrazione di ossigeno in superficie e alla lentezza del processo fermentativo. La produzione di aceto tramite questo metodo richiede, infatti, diverse settimane, durante le quali è previsto un prelievo parziale di aceto dalle botti di fermentazione, seguito dal conseguente apporto di vino per sostituire il prodotto prelevato (figura 1).

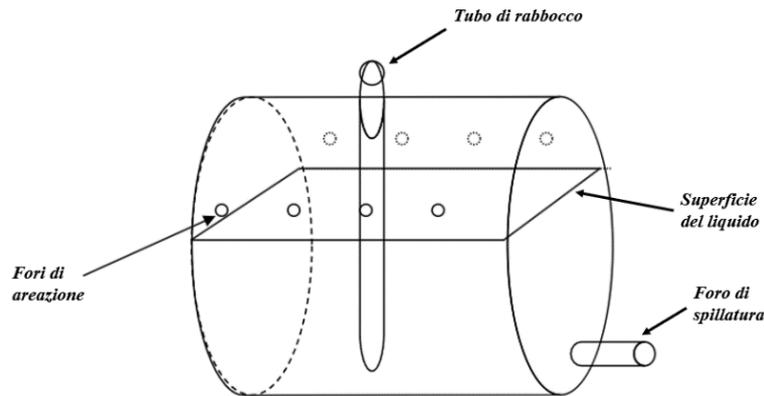


Figura 1. Produzione di aceto tramite metodo Orleans.

L'aceto tradizionale di alta qualità ottenuto con questo processo risulta dunque più complesso dal punto di vista sensoriale, grazie alla produzione di sottoprodotti metabolici da parte dei batteri acetici. La lentezza del processo richiede, però, tempi di attesa maggiori e un aumento dei costi di produzione e gestione [2]. Inoltre, una difficoltà che può presentarsi nel corso della produzione riguarda l'aggiunta di nuovo vino in botte, che può influire sulla stabilità della madre dell'aceto in superficie. Per ovviare a questo problema è possibile aggiungere il liquido tramite un tubo in vetro che raggiunge il fondo della botte, permettendo un adeguato sviluppo dei batteri acetici superficiali.

Sistema a percolamento

Il sistema a percolamento (o "a truciolo") si avvale di vasche di legno o acciaio al cui interno sono presenti più ripiani a griglia su cui sono posti trucioli di legno di faggio, chiamati "fascette": queste fungono da polmone di supporto per i batteri acetici. I fori per il passaggio dell'aria sono posizionati nella parte inferiore della vasca, garantendo un adeguato apporto di ossigeno a pressione atmosferica per l'ossidazione batterica. Inizialmente il vino viene prelevato dall'esterno per essere rilasciato a pioggia dall'alto (figura 2). Il contatto con il legno permette una parziale acetificazione del vino, che, una volta raggiunto il fondo dell'acetificatore, viene nuovamente prelevato per essere introdotto dall'alto; i cicli proseguono fino a che l'intera miscela non si sia trasformata in aceto, per poi essere prelevata dal fondo della botte [2]. Se presenta un elevato contenuto di acido acetico, il prodotto finito può essere successivamente diluito con acqua. Il processo ossidativo dei batteri acetici può provocare un innalzamento della temperatura, che richiede l'utilizzo di un sistema di raffreddamento a serpentine per

mantenere la temperatura intorno a 25-30 °C. La durata del processo produttivo è di circa 7 giorni e le rese sono basse a causa di perdite per evaporazione.

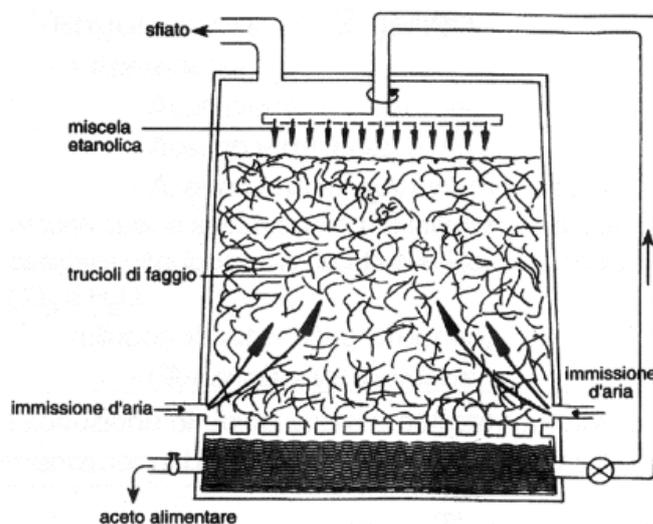


Figura 2. Produzione di aceto con sistema a percolamento.

Sistema a coltura sommersa

Il metodo maggiormente utilizzato in ambito industriale è il sistema a coltura sommersa. Sfrutta l'utilizzo di grandi serbatoi in acciaio inossidabile del volume di 10.000 – 40.000 L al cui interno è presente un sistema di aerazione forzata basato su turbine per l'immissione di aria micronizzata poste alla base del tank. I batteri acetici sono così in sospensione nel vino, accelerando il processo di acetificazione e garantendo rese maggiori in minor tempo. Il loro galleggiamento e l'agitazione, inoltre, non consentono la formazione di madre dell'aceto. Al termine della produzione l'aceto ottenuto viene spillato, lasciando solitamente circa un terzo della massa nel serbatoio, che fungerà da starter per le successive fermentazioni (figura 3).

Il processo può essere di tre tipologie diverse:

- discontinuo, nel quale vi è il completo svuotamento del serbatoio che viene riempito nuovamente;
- semicontinuo, nel quale una parte di aceto ottenuto viene tenuto e sfruttato come starter per le successive fermentazioni;
- continuo, nel quale il carico e scarico di liquidi avvengono contemporaneamente. È un sistema caratterizzato da una produzione costante e un'elevata automazione, che garantisce una crescita persistente dei batteri acetici, mantenuta sempre in una fase esponenziale: questo permette l'ottenimento di aceto di vino ad alto contenuto

di acido acetico e una riduzione dei tempi di produzione, che può limitarsi anche a 24 ore.

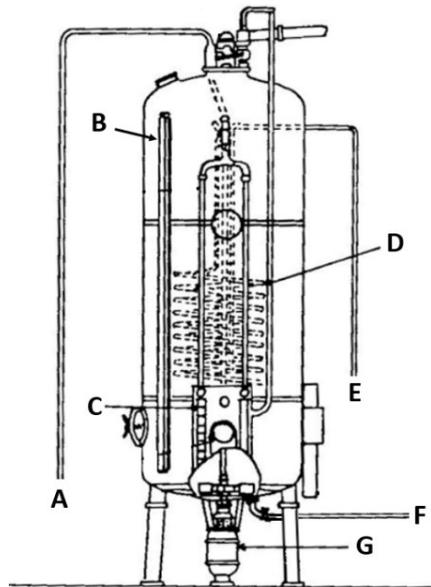


Figura 3. Impianto di produzione di aceto con metodo a coltura sommersa con relative componenti: tubo di immissione di acqua di raffreddamento (A), sistema di controllo del livello di liquido (B), pannello di controllo (C), serpentina di raffreddamento (D), tubo per immissione di vino (E), tubo per immissione di aria (F), motore dell'agitatore (G).

Sono presenti diversi sistemi per il controllo dei parametri di processo: un sistema di raffreddamento sottoforma di serpentina interna all'acetificatore e termometri per il mantenimento della temperatura tra i 27 e i 38 °C, un agitatore per garantire uniformità nelle dimensioni delle bolle d'aria, un sistema per il controllo del livello del liquido e un alcolometro per il controllo di etanolo. È possibile anche prevedere un sistema per il controllo della schiuma.

Come già detto, le rese sono elevate e il contenuto di acido acetico nel prodotto finito può raggiungere l'11%. Il processo, però, presenta anche aspetti negativi: data la velocità del processo produttivo, gli enzimi batterici permangono per breve tempo a contatto con i rispettivi substrati, con conseguente minore formazione di molecole volatili. Inoltre, rispetto agli aceti ottenuti con metodo Orleans, il prodotto ottenuto risulta più torbido, e necessita quindi di successive filtrazioni. Infine i costi di produzione sono più elevati a causa del consumo energetico per il mantenimento del sistema di raffreddamento [3].

1.2. Batteri acetici

Vengono chiamati acetici quei batteri che dispongono di un intenso metabolismo ossidativo, tramite il quale ossidano zuccheri ed etanolo con produzione di acido acetico. Si tratta di batteri Gram negativi strettamente aerobi, aventi un optimum di pH tra 5 e 6,5, ma capaci di replicarsi anche a pH bassi come quello del vino, tra 2,8 e 3,8. Sono microrganismi mesofili, la cui temperatura ottimale si aggira tra i 25 e i 30 °C con un massimo di 35 °C: sopra questo livello i batteri incorrono in inattivazioni enzimatiche e danneggiamenti cellulari, con conseguente aumento di suscettibilità ad elevate concentrazioni di etanolo e acido acetico. In generale si può affermare che la concentrazione di etanolo che consente lo sviluppo di batteri acetici è di 10-14%, con variazioni sulla base della specie, ceppo, concentrazione di ossigeno, pH e temperatura. Concentrazioni di etanolo troppo elevate o minime causano un arresto del processo ossidativo, occorre quindi caricare la giusta quantità di substrato nell'acetificatore e sfruttare sistemi di controllo per garantire un andamento ottimale del processo produttivo.

Un altro fattore ambientale da considerare è la concentrazione di ossigeno, la cui presenza in soluzione è essenziale per consentire il mantenimento del metabolismo aerobico dei batteri acetici. La concentrazione ottimale è pari a 1-3 ppm, con una massima di 8 ppm. Sono incapaci di moltiplicarsi a valori di ossigeno di 0,4-0,5 ppm, ma comunque in grado di ossidare l'etanolo [4].

Ovviamente anche la concentrazione di acido acetico è un fattore limitante per la crescita dei batteri acetici. È una molecola altamente tossica per i microrganismi, capace di inibirne la crescita a concentrazioni superiori a 5 g/l: è in grado di attraversare liberamente la membrana plasmatica cellulare, entrare nella cellula, alterarne l'equilibrio e danneggiare la membrana stessa. Tuttavia, grazie a diverse strategie metaboliche i batteri acetici risultano molto più tolleranti alla presenza di acido acetico rispetto ad altri microrganismi di interesse enologico. Possiedono una diversa struttura cellulare ed enzimi capaci di convertire l'acido acetico in composti innocui, inoltre, sono in grado di formare biofilm per aumentare la resistenza agli acidi. Metabolizzano una molecola tossica come l'etanolo con il conseguente accumulo di acido acetico, che limita la crescita di altri microrganismi competitori. Grazie a queste capacità, i batteri acetici si pongono in condizioni di estremo vantaggio rispetto ad altri gruppi microbici [5].

Vi sono diversi generi di batteri acetici rilevanti dal punto di vista enologico, in particolare per la produzione di aceto si considerano quattro generi principali:

- *Acetobacter*, un genere riscontrabile in tutte le nicchie ecologiche in cui ci sia stata una fermentazione di zuccheri, è il principale responsabile del deterioramento del vino. Tollera concentrazioni di acido acetico fino al 7-8%, salendo al 10% nel caso di alcuni ceppi di *A. pasteurianus* [6]. È in grado di produrre biofilm sulla superficie del liquido, incapace di metabolizzare zuccheri come mannitolo, glicerolo e sorbitolo per produrre acido acetico, ed è inibito da concentrazioni di anidride solforosa superiori a 0,8 mg/l.
- *Gluconobacter* è considerato un microrganismo alterante per prodotti vegetali, birra, sidro e vino, portando a sentori di muffa e odori fenolici. È presente in fermentazioni acetiche tradizionali, con una modesta tolleranza all'acido acetico e al calore [7].
- *Gluconacetobacter*, presente in ambienti ricchi di zuccheri, è un ottimo produttore di acido acetico dall'etanolo, in grado di sintetizzare anche acido ascorbico. È sensibile a temperature superiori a 30 °C [4].
- *Komagateibacter* deriva dalla riclassificazione di alcune specie precedentemente appartenenti al genere *Gluconacetobacter*. Tra i batteri acetici è il genere più resistente all'acido acetico, capace di sopravvivere a concentrazioni del 15-20%. Viene largamente sfruttato per ottenere aceto di frutta e di alcol. Può produrre elevate quantità di cellulosa ed è altamente sensibile all'anidride solforosa [4].

1.3. Fermentazione alcolica

È la prima fase necessaria per l'ottenimento di aceto, condotta da lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, che in condizioni aerobiche fermentano gli zuccheri del mosto d'uva producendo alcol etilico e anidride carbonica. Il processo metabolico parte dalla degradazione di glucosio per glicolisi con produzione di piruvato, che in assenza di ossigeno subisce una decarbossilazione con eliminazione di una molecola di CO₂ e formazione di acetaldeide. La seconda reazione coinvolge l'acetaldeide, che viene ridotta a etanolo per mezzo dell'enzima alcol deidrogenasi NADH-dipendente (figura 4). Il tutto avviene a una temperatura ottimale di 25-30 °C, un pH tra 2,9 e 4 e una concentrazione di ossigeno tra i 5 e i 10 mg/l [8].

Assieme ai batteri acetici, i lieviti sono responsabili del profilo aromatico-olfattivo dei vini e quindi degli aceti, oltre che del contenuto di alcol e quindi di acido acetico. Tra le sostanze prodotte dai lieviti citiamo l'acido acetico, acetoino [9], acetaldeide, diacetile, alcuni esteri etilici e alcoli superiori [10]. La loro azione fermentativa è essenziale per la produzione di aceto balsamico tradizionale: sono responsabili della parziale fermentazione del mosto cotto, in particolare i generi *Zygosaccharomyces* osmotolleranti e *Saccharomyces* resistenti all'acido acetico, a cui segue l'acidificazione per opera di batteri acetici, come *Gluconobacter* e *Acetobacter*.

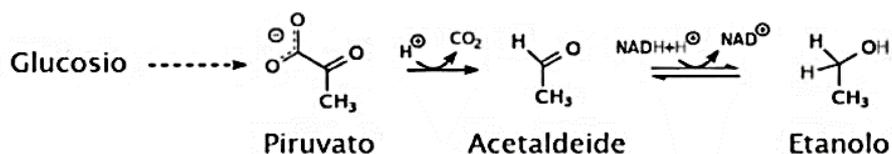


Figura 4. Reazioni di conversione di glucosio in etanolo.

1.4. Fermentazione acetica

Erroneamente definita come una fermentazione, il processo che porta alla formazione di acido acetico non è altro che un'ossidazione condotta da batteri dell'acido acetico in condizioni aerobiche. Si tratta di una delle biotrasformazioni più rilevanti dal punto di vista enologico, poiché causa la conversione di etanolo in acido acetico. Il primo substrato da cui parte il processo ossidativo è appunto l'etanolo, che sotto l'effetto dell'enzima alcol deidrogenasi (ADH) viene convertito in acetaldeide con produzione di NADH; successivamente un secondo enzima NAD-dipendente, acetaldeide deidrogenasi (ALDH), trasforma l'acetaldeide in acido acetico.

Entrambe le deidrogenasi sono enzimi ossidoriduttivi che sfruttano un cofattore chiamato pirrolochinolina chinone (PQQ), o metoxantina, un ortochinone eterociclico aromatico che svolge una funzione simile al NAD: all'interno dei mitocondri vi è la riconversione di PQQ-H₂ in PQQ, reazione che, mediante gli enzimi della catena respiratoria, viene utilizzata per formare ATP [11]. Il complesso enzimatico è infatti strettamente legato alla catena respiratoria, nella quale l'ossigeno funge da accettore finale degli elettroni (figura 5).

Le principali condizioni ambientali che garantiscono un corretto svolgimento della fermentazione acetica sono le seguenti:

- temperatura compresa tra 20 e 30 °C;
- concentrazione di etanolo non superiore a 10% v/v;
- presenza di ossigeno.

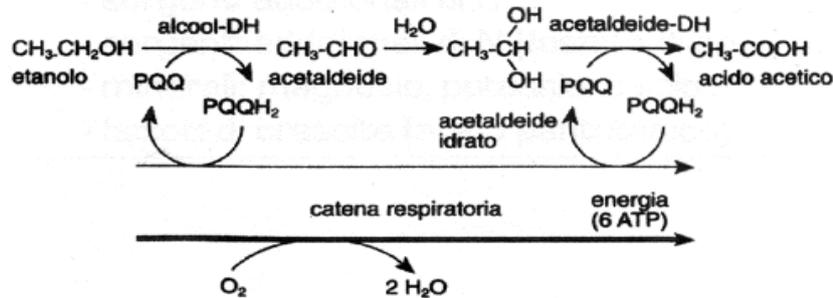


Figura 5. Reazioni di conversione di etanolo in acido acetico.

1.5. Difetti dell'aceto

Nel corso dei vari processi produttivi l'aceto può subire modifiche dovute a fattori interni, ad opera degli stessi batteri acetici, o fattori esterni, come contaminazioni. Nella maggior parte dei casi, l'insorgenza di queste problematiche è causata dalla mancanza di adeguati sistemi di controllo sul processo, o dalla tipologia stessa del sistema produttivo.

I batteri acetici possono essere responsabili di eventi indesiderati, come la riduzione di acido acetico o l'accumulo di cellulosa. Generi come *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*, in mancanza di etanolo e con un'elevata presenza di ossigeno, possono provocare la "surossidazione" dell'aceto, un processo che consiste nel consumo dello stesso acido acetico da parte dei batteri che si ritrovano in assenza della loro fonte di nutrimento principale, con conseguente produzione di acqua e CO_2 [12]. L'accumulo di polisaccaridi extracellulari è dovuto, più in particolare, dalla specie *Gluconacetobacter xylinus*, in grado di sfruttare zuccheri come glucosio, saccarosio e mannitolo per sintetizzare elevate dosi di cellulosa, destrani e levani, con conseguente formazione di veli superficiali che possono dare problemi nelle fasi di filtrazione [13].

Dall'esterno possono incombere, invece, infezioni batteriche. Queste sono più probabili in sistemi a coltura sommersa, nei quali la diversità dei ceppi batterici è limitata e quindi più suscettibile a contaminazioni: i fagi causano la lisi delle cellule dei batteri acetici e l'arresto del processo fermentativo. Per ovviare al problema occorre pastorizzare preventivamente i substrati, usare adeguati filtri per l'aria ed

evitare sedimenti di aceto negli acetificatori [2]. Oltre alle infezioni batteriche, l'aceto può subire lo sviluppo di *Turbatrix aceti*, chiamato comunemente “anguillola dell'aceto”. Si tratta di nematodi che crescono a livelli di acidità inferiori al 6%, non sono parassiti e sono completamente innocui per l'uomo: risultano però un problema dal momento che si nutrono di batteri acetici e competono con loro per l'ossigeno disciolto [3]. Inoltre, aceti che presentano al loro interno anguillole non possono essere immessi in commercio.

1.6. Tipologie di aceto

Per una migliore comprensione, è opportuno fare distinzione tra le varie tipologie di aceto che possono essere trovate in commercio, oltre all'aceto di vino, derivanti da diverse materie prime e metodi di produzione:

- aceto balsamico: è ottenuto a partire da mosto cotto e/o concentrato di uva bianca e rossa fermentato e successivamente ossidato, che permane in botti di legno per diversi mesi o anni, a seconda della tipologia. L'invecchiamento e affinamento in botte garantiscono al prodotto caratteristiche note aromatiche, che lo differenziano dal classico aceto di vino.
- aceto d'alcol: chiamato anche aceto bianco o “aceto di cristallo”, è una soluzione di acqua e acido acetico, derivante dall'ossidazione batterica di soluzioni alcoliche, a loro volta ottenute per fermentazione di malto, riso, o barbabietola da zucchero, successivamente concentrate per distillazione. È adatto all'uso alimentare, ma le sue proprietà lo rendono utile anche per la sanitizzazione domestica e la rimozione di odori sgradevoli.
- aceto di frutta: la materia prima è frutta, diversa da uva, come mele, lamponi, cachi o ribes nero. Il prodotto ottenuto non necessita dell'aggiunta di aromi perché già presenti naturalmente nelle materie prime. L'aceto di frutta più presente in commercio è l'aceto di mele, chiamato anche aceto di sidro, prodotto dalla doppia fermentazione di succo di mela.
- aceto di riso: originario del continente asiatico, è un prodotto ottenuto dalla fermentazione di zuccheri derivati dal riso, presente in commercio in varie tipologie (rosso, bianco o nero) e comunemente utilizzato come condimento per

riso in preparazione a base di sushi. Presenta un livello di acidità minore rispetto all'aceto di vino comune, tipicamente del 5%, e può sottostare a un periodo di invecchiamento.

- aceto di birra, o aceto di malto, deriva dalla fermentazione alcolica di mosto simile a quello base per la birrificazione, esente dall'aggiunta di luppolo, e consumato principalmente in Inghilterra [3].

2. Aceto balsamico

I primi utilizzi dell'espressione "aceto balsamico" risalgono ai primi del '700, per indicare un prodotto che al tempo si differenziava dal comune "aceto forte" di vino, con una accezione storico-tradizionale legata al territorio delle province di Modena e Reggio Emilia [14]. Infatti, il termine "balsamico" non ha mai avuto uno scopo descrittivo delle caratteristiche organolettiche dell'aceto, e a oggi viene sfruttato come elemento identificativo del nome di prodotti riconosciuti prima a livello nazionale e successivamente sul piano comunitario [15]. Dopo anni di dibattiti e modifiche giuridiche, l'Unione Europea ha assegnato l'indicazione geografica a tre prodotti che godono di questa terminologia, quali unicamente l'Aceto Balsamico di Modena IGP, l'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP, l'Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia DOP.

Sono prodotti che derivano da processi che coinvolgono la fermentazione (parziale o totale) di mosto d'uva cotto e/o concentrato, seguita da un periodo di invecchiamento in botte notevolmente lungo per i due Tradizionali e più limitato per l'Aceto Balsamico di Modena IGP. A differenza degli aceti balsamici tradizionali, per gli aceti balsamici IGP è consentita l'aggiunta di una parte di aceto di vino al mosto.

2.1. Produzione dell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena

La materia prima da cui deriva l'aceto balsamico tradizionale è unicamente mosto proveniente da vitigni delle province di Modena e Reggio Emilia, quali Lambrusco, Sauvignon, Sgavetta, Trebbiano, Ancellotta, Berzemino e Occhio di Gatta. Si parte da una lenta cottura del mosto in caldaie a temperature che variano tra i 70 e i 95 °C. Il mosto viene poi trasferito alle cosiddette "batterie", una sequenza di botti di volumi sempre minori in cui il mosto viene lasciato invecchiare. L'aceto potrà godere di

sentori particolari derivanti dal contatto con i diversi tipi di legno di cui sono costituite le botti, come rovere, castagno, gelso, ciliegio e acacia.

Il mosto viene inizialmente posto all'interno della "botte madre", nella quale viene miscelato con una parte del prodotto degli anni precedenti, sfruttato come innesto di batteri acetici e lieviti selezionati naturalmente all'interno dell'acetaia di produzione, e dove vi permane per almeno un anno. Successivamente, partendo dalla botte più piccola fino alla "botte madre", una serie di travasi e rinalzi permettono di compensare la perdita di volume dovuta all'evaporazione e prelievo del liquido (figura 6). Dopo 12 anni dall'inizio dell'attività della batteria, è possibile estrarre piccole quantità di aceto dalla botte più piccola. Nel caso l'invecchiamento si protragga per almeno 25 anni, il prodotto ottenuto potrà godere della dicitura "Extravecchio".

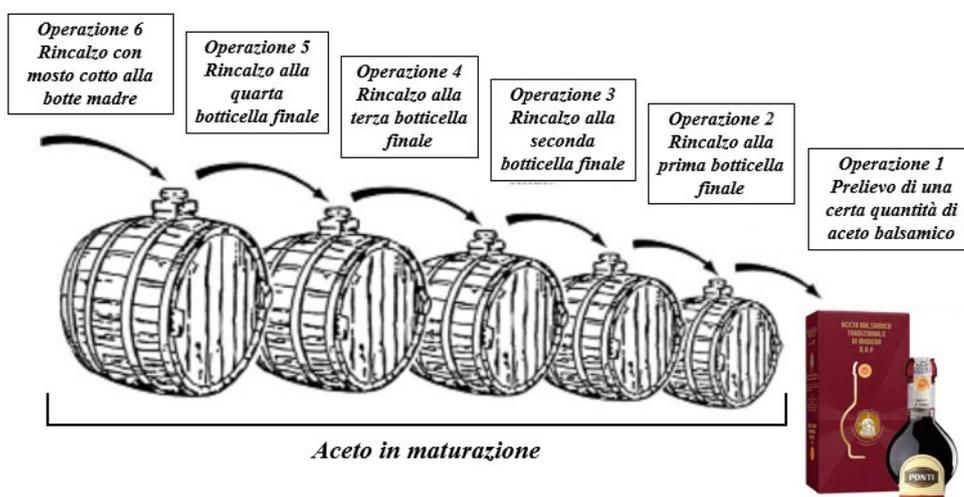


Figura 6. Processo di maturazione, prelievi e rinalzi dell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena.

Ai sensi del disciplinare di produzione dell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena, il prodotto deve rispettare determinati parametri analitici, quali un'acidità totale non inferiore a 4,5 gradi (espressa in grammi di acido acetico/100 grammi di prodotto) e una densità non inferiore a 1,240 g/l alla temperatura di 20 °C. L'accertamento delle caratteristiche analitiche è effettuato direttamente dal Consorzio di Tutela dell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena.

Inoltre, per consentirne la commercializzazione, l'aceto necessita di una valutazione sensoriale ad opera di una commissione di assaggiatori esperti indicati dal Consorzio di Tutela. Questi esaminano il prodotto verificando le seguenti caratteristiche:

- colore: bruno, scuro, lucente
- densità: scorrevole, sciropposa
- odore: caratteristico del balsamico, complesso ma equilibrato, intenso, persistente con gradevole acidità percepibile
- sapore: caratteristico del balsamico, dolce, agro, intenso, persistente, equilibrato con apprezzabile acidità e aromaticità derivante dal contatto con i legni

Infine, è prevista la fase di imbottigliamento dell'aceto, che ha luogo unicamente nel territorio amministrativo della provincia di Modena, sempre ad opera del Consorzio di Tutela. I contenitori in vetro utilizzati, caratteristici e rappresentativi del prestigio del prodotto stesso, devono rispondere a determinati requisiti, quali una forma sferica a base rettangolare, colore bianco cristallino e capacità di 100, 200 o 400 ml [16].

2.2. Produzione dell'Aceto Balsamico di Modena IGP

La produzione dell'Aceto Balsamico di Modena IGP è regolamentata dal Regolamento (CE) 583/2009, che lo definisce come prodotto ottenuto dalla miscelazione di mosti d'uva, parzialmente fermentati e/o cotti e/o concentrati con l'aggiunta di una percentuale di aceto di vino vecchio di almeno 10 anni e con l'aggiunta di aceto ottenuto per acetificazione di solo vino nella misura minima del 10%. La percentuale di mosto d'uva cotto e/o concentrato non deve essere inferiore al 20% della massa totale da avviare all'elaborazione, è obbligatoria un'acidità totale minima di 8g/kg e un estratto secco netto minimo di 55 g/kg. La concentrazione è poi protratta fino a che la massa iniziale di mosto abbia raggiunto una densità non inferiore a 1,240 g/l alla temperatura di 20 °C. Secondo il disciplinare di produzione, il mosto necessario alla produzione può essere ottenuto da soli vitigni di Lambrusco, Sangiovese, Trebbiano, Albana, Ancellotta, Fortana e Montuni. A differenza di aceti balsamici tradizionali DOP, per la produzione dell'aceto balsamico di Modena IGP è consentita l'aggiunta di caramello fino a un massimo del 2% del volume del prodotto finito al fine di stabilizzarne il colore: non influisce sulle caratteristiche organolettiche come densità o dolcezza. È vietata l'aggiunta di qualsiasi altra sostanza.

Il processo produttivo parte dalla miscelazione delle materie prime, quali aceto di vino, mosto e caramello. Segue una filtrazione tangenziale con lo scopo di ridurre la torbidità e la carica batterica nel prodotto sfruttando filtri con porosità di 0,70 µm. Il prodotto passa poi alla fase di maturazione: la miscela viene posta in tini, botti o barrique di diversi legni (rovere, castagno e ciliegio) in cui permane per un periodo compreso tra

2 mesi e 3 anni a seconda della ricetta. Il prodotto che subisce una maturazione non inferiore a 3 anni può godere della qualifica e dicitura “Invecchiato” [17]. Al termine della maturazione il prodotto subisce una seconda filtrazione a cartuccia, che precede l’imbottigliamento finale.

Il prodotto finito deve rispondere a diversi requisiti analitici, quali:

- densità a 20 °C non inferiore a 1,06 g/l
- titolo alcolometrico non superiore a 1,5% in volume
- acidità totale minima: 6%
- anidride solforosa totale: massimo di 100 mg/l
- quantitativo di ceneri: minimo 2,5 per mille
- estratto secco minimo: 30 g/l
- zuccheri riducenti: minimo 110 g/l

Le analisi chimico-fisiche sul prodotto finito sono garantite dall’ente certificatore CSQA, che si affida ai laboratori certificati dell’Unione Italiana Vini (UIV). Inoltre, al termine dell’affinamento, il prodotto ottenuto viene sottoposto a un esame analitico sensoriale a opera dei laboratori dell’UIV tramite un gruppo di tecnici e assaggiatori esperti, secondo la norma UNI EN ISO 13299:2016. Per essere certificato come Aceto Balsamico di Modena, il prodotto deve rispettare le seguenti caratteristiche sensoriali:

- limpidezza: limpido e brillante
- colore: bruno intenso
- odore: persistente, delicato e leggermente acetico, con eventuali note legnose
- sapore: agrodolce, equilibrato

Con la recente emanazione del Regolamento (UE) 512/2023 vengono apportate modifiche al disciplinare di produzione dell’Aceto Balsamico di Modena IGP [18]. Le principali novità riguardano:

- modifiche dei parametri analitici per Aceto Balsamico di Modena IGP invecchiato, quali una densità minima di 1,15 g/l e un’acidità totale minima di 5,5%;
- introduzione di nuove misure per le bottiglie e contenitori dell’Aceto Balsamico di Modena IGP;

- ampliamento del sistema di controllo della filiera ai produttori vinicoli, con introduzione di analisi isotopiche per l'accurata verifica dell'autenticità delle materie prime.

3. Ponti

Operante da nove generazioni nel settore della produzione di aceti, l'azienda Ponti vanta di una posizione leader nel mercato nazionale dell'aceto di vino e aceto balsamico. Il cuore produttivo e sede storica dell'azienda è rappresentato dallo stabilimento di Ghemme, nella provincia di Novara, affiancato dagli altri tre stabilimenti di Dosson di Casier (Treviso), Anagni (Frosinone) e Vignola (Modena), quest'ultima specializzata nella produzione di Aceto Balsamico di Modena Tradizionale DOP e IGP. Possiede sedi a Parigi e New York, ed esporta in oltre 70 Paesi.

Nata storicamente nel 1787 a Sizzano (NO) da una primordiale "fabbrica dell'aceto" gestita da Giovanni Battista del Ponte, Ponti è cresciuta e si è sviluppata con il passare dei secoli. Dalla semplice produzione di aceto di vino, l'azienda ha ampliato e diversificato la sua gamma di prodotti: si è specializzata nella produzione di Aceti Balsamici di Modena a marchio IGP, aceti di mele, glasse all'aceto, conserve sott'olio e sott'aceto. Di particolare rilevanza sono i prodotti Peperlizia®, un marchio registrato Ponti sviluppato nel 1983 a indicare la linea di conserve di verdure in agrodolce. Dal 2000 l'azienda ha introdotto all'interno della propria gamma di prodotti l'Aceto Balsamico di Modena IGP BIO, perfezionando successivamente la propria competenza nella produzione biologica, fornendo il marchio BIO ad aceti di mele, glasse, conserve e più recentemente ad aceti di vino.

Negli anni raggiunge diversi traguardi: nel 2021 diventa la prima Società Benefit nel mercato degli aceti e delle conserve di verdure e recentemente ha ottenuto la certificazione B Corp in merito alla performance sociale e ambientale dell'azienda. Ponti gode, inoltre, di un Sistema di Sostenibilità e un Sistema Qualità sulla sicurezza alimentare, tracciabilità e rintracciabilità esteso a tutti gli stabilimenti del gruppo [37].

Dispone delle più avanzate apparecchiature di controllo, ricerca e di moderni impianti produttivi. È inoltre stata la prima azienda a implementare l'ultrafiltrazione nel processo di produzione dell'aceto di vino.

I campioni di aceti balsamici IGP oggetto di studio sono stati analizzati presso il laboratorio di Controllo Qualità dello stabilimento produttivo di Ghemme (NO), che ha messo a disposizione della ricerca di tesi le strumentazioni GC-IMS. In collaborazione con l'Università di Padova, l'azienda ha successivamente organizzato le sessioni di valutazione sensoriale sui campioni di aceti balsamici, i cui risultati sono stati messi a confronto con quelli strumentali.

4. Metodi di analisi delle sostanze volatili

In campo alimentare lo studio di composti organici volatili, conosciuti come VOCs, è sempre stato di grande interesse per la caratterizzazione del profilo aromatico di vari prodotti, al fine di individuare i composti più importanti che ne definiscono le caratteristiche organolettiche. Lo screening rapido dei VOCs mediante analisi dirette presenta, infatti, diverse applicazioni nel settore alimentare e degli aromi, come la rilevazione di adulterazioni, l'identificazione di sostanze responsabili di off-flavours o lo studio di processi produttivi che determinano la formazione di composti volatili.

Con il tempo sono stati sviluppati diversi metodi per l'analisi dei VOCs presenti in matrici alimentari. La tecnica strumentale attualmente più sfruttata è la GC-MS, gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa, nella quale si ha una prima separazione cromatografica degli analiti seguita da una rilevazione ad opera dello spettrometro di massa. Tuttavia, i tempi richiesti per le singole corse cromatografiche e la necessità di derivatizzare molecole con gruppi funzionali reattivi, come acidi carbossilici e ammine, hanno portato all'adozione di nuove tecniche per l'analisi diretta di composti volatili.

Un esempio è la SIFT-MS, Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry, una forma di spettrometria di massa per la rilevazione e quantificazione diretta di composti volatili estremamente sensibile e monitorabile in tempo reale. Sfrutta una ionizzazione chimica del campione che elimina qualsiasi preparazione, pre-concentrazione, cromatografia e calibrazione con miscele standard. Il processo di analisi parte dalla generazione di ioni reagenti, la ionizzazione dell'analita e la successiva quantificazione degli ioni formati tramite la misurazione del rapporto m/z .

Un'altra tecnica non invasiva è la PTR-MS, spettrometria di massa con reazione a trasferimento di protoni, anch'essa basata sulla ionizzazione diretta dell'analita, che non richiede una preparazione o distruzione del campione. Viene sviluppata in origine

per l'analisi dell'aria ambientale e, come la SIFT-MS, appartiene alle tecnologie DIMS, Direct-Injection Spectrometric Mass. Recentemente questa tecnica si è evoluta tramite l'incorporazione di analizzatori a tempo di volo: la nuova versione, chiamata PTR-ToF-MS (Proton Transfer Reaction - Time of Flight - Mass Spectrometry), garantisce un aumento della risoluzione temporale e di massa [19].

Nel settore alimentare, così come in campo ambientale e biomedico, ha preso piede l'utilizzo del cosiddetto "naso elettronico", uno strumento in grado riconoscere l'impronta olfattiva di campioni semplici o complessi. È una tecnica che imita il sistema olfattivo umano sfruttando un complesso insieme di sensori, che rilevano le varie sostanze volatili nello stesso modo in cui agiscono i chemiorecettori olfattivi. Così come il naso umano, anche il naso elettronico non è in grado di effettuare l'identificazione delle singole molecole che compongono l'aroma analizzato, ma può stabilire un fingerprint del profilo volatile dell'oggetto di studio, distinguendo diversi campioni in base all'insieme dei sensori percepiti. Viene utilizzato soprattutto per la distinzione di alimenti di diversa provenienza, studi di shelf-life e controlli sulla freschezza dei prodotti [20].

Nel settore alimentare queste tecniche strumentali possono essere associate all'analisi sensoriale, talvolta con la possibilità di sostituirla: l'analisi sensoriale, infatti, presenta alcuni svantaggi, tra cui i costi elevati richiesti dalla valutazione di giudici esperti e la difficoltà di lavorare per tempi prolungati. L'accoppiamento delle analisi strumentali con le valutazioni sensoriali può portare a risultati che soddisfano al tempo stesso la percezione umana e la rilevazione analitica.

4.1. GC-IMS

La gascromatografia è una tecnica di separazione di sostanze volatili, che, per mezzo di una colonna cromatografica, sfrutta una fase mobile costituita da un gas di trasporto inerte come elio, azoto o idrogeno, e una fase stazionaria solida o liquida. La separazione si basa sull'interazione tra i composti volatili e la fase stazionaria, maggiore è l'affinità tra analita e fase stazionaria, maggiore sarà il suo tempo di ritenzione. È necessario quindi che l'analita sia in fase gassosa o comunque volatilizzabile, quindi a basso peso molecolare. Inoltre, occorre che goda di una certa termostabilità, evitando la sua decomposizione a temperature elevate, che nel caso della gascromatografia possono raggiungere i 300 °C.

La strumentazione si compone di un iniettore, una colonna cromatografica posta all'interno di un forno termostato, un sistema di alimentazione del gas carrier e un detector per la rilevazione dei segnali corrispondenti agli analiti.

Nel caso della GC-IMS, Gas Cromatografia con Spettrometria a Mobilità Ionica, il detector è rappresentato da uno spettrometro di massa accoppiato al gas cromatografo. La tecnica di spettrometria di massa studia il rapporto massa/carica di molecole ionizzate in forma gassosa [21]. In questo caso la strumentazione è costituita da un sistema di introduzione del campione, direttamente collegato all'uscita della colonna cromatografica, una regione sorgente per la ionizzazione degli analiti, un selettore di massa e un detector (figura 7).

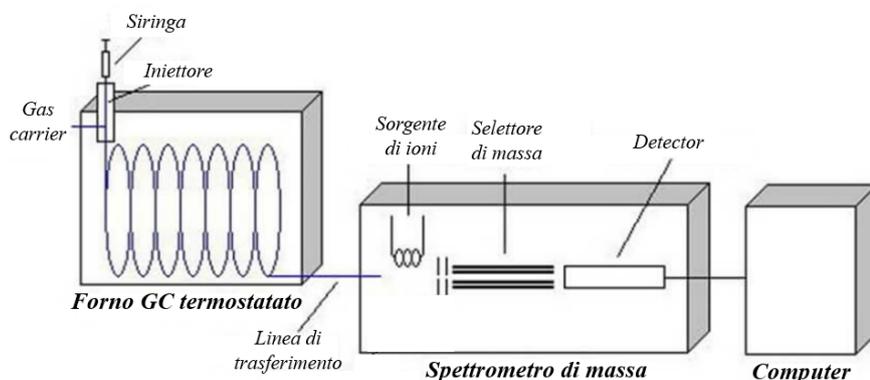


Figura 7. Rappresentazione schematica di un sistema GC-IMS.

5. Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale è una disciplina ampiamente sfruttata nel settore alimentare per la valutazione della qualità e sicurezza degli alimenti. Assieme alle convenzionali analisi chimiche, fisiche, microbiologiche e nutrizionali dei prodotti alimentari, l'analisi sensoriale rappresenta un affidabile strumento scientifico e oggettivo per la valutazione delle caratteristiche organolettiche, quali aroma, sapore, texture e colore.

In campo alimentare, lo scopo dell'analisi sensoriale è quello di studiare la relazione che vi è tra le caratteristiche sensoriali e le sensazioni che queste suscitano sotto il profilo quantitativo (intensità della sensazione percepita) e qualitativo (definizione della sensazione percepita). Serve, inoltre, a delineare un profilo sensoriale in grado di descrivere in modo univoco ed obiettivo il prodotto studiato. Le industrie alimentari fanno sempre più affidamento a un gruppo di assaggiatori selezionati abili a descrivere oggettivamente le caratteristiche organolettiche di un alimento e di valutarne l'intensità, sia in termini assoluti che nei confronti di altri prodotti simili.

Le applicazioni dell'analisi sensoriale nell'industria alimentare sono molteplici: può essere sfruttata per l'analisi di qualità delle materie prime e prodotti finiti per individuare eventuali difetti, viene impiegata per lo sviluppo di nuovi prodotti, la modifica di ricette o trattamenti di prodotti già esistenti, è utile per la valutazione della conservabilità e per ottenere dei confronti con prodotti della concorrenza. Inoltre, è essenziale per lo studio dell'accettabilità e preferenza da parte dei consumatori.

Gli obiettivi dell'analisi sensoriale sono determinanti nella scelta del metodo e dei giudici che andranno a comporre il gruppo di valutazione. Questi ultimi possono appartenere a tre categorie principali:

- i giudici specializzati, esperti e formati anche dal punto di vista tecnologico su una particolare tipologia di prodotto (vino, olio, aceto balsamico, caffè), che dispongono di competenze avanzate in grado di permettere la rilevazione di difetti o qualità con estrema abilità;
- i giudici esperti, che hanno ricevuto una formazione e istruzione per lo sviluppo di un'adeguata capacità e memoria sensoriale e l'apprendimento delle metodologie per poter analizzare prodotti diversi e fornire dati affidabili e riproducibili;
- i giudici selezionati, con una limitata esperienza nell'analisi sensoriale, ma che dispongono di un'ottima conoscenza del prodotto oggetto di studio e di una minima formazione sulla valutazione sensoriale;
- i giudici occasionali, identificabili come comuni consumatori, che non possiedono esperienza o formazione, adatti solamente allo svolgimento dei test più semplici.

Per quanto riguarda il metodo di valutazione, questo può appartenere a due macrocategorie: i test analitici e i test affettivi. I primi possono a loro volta essere suddivisi in tre gruppi:

- test discriminanti qualitativi, per stabilire se esiste una differenza sensoriale statisticamente significativa tra campioni;
- test discriminanti quali-quantitativi, che sfruttano scale e categorie per stimare l'ordine o l'importanza delle differenze, le categorie o classi nella quali i campioni devono essere riportati;
- test descrittivi, che definiscono o quantificano l'intensità di specifici attributi (descrittori), in grado di fornire un profilo sensoriale di un prodotto.

I test discriminanti sono più adatti a un gruppo di giudici selezionati, essendo test relativamente semplici per i quali occorre una minima formazione preliminare. Differenti sono i test descrittivi, più complicati e articolati, dal momento che è necessaria una profonda preparazione sul metodo e l'alimento oggetto di studio: risultano quindi più idonei a un gruppo di assaggiatori esperti.

I test affettivi, invece, sono destinati a un gruppo cospicuo di consumatori, il cui compito è fornire pareri personali soggettivi sul prodotto, che si traducono in accettabilità e preferenze sulla base delle sensazioni percepite. Sono test fondamentali per lo sviluppo di un nuovo alimento, per prevedere la reazione del mercato all'inserimento del nuovo prodotto, trovare vie di miglioramento dello stesso e per l'ottimizzazione [22].

5.1. Codice olfattivo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP

L'olfatto è un organo di senso ampiamente sfruttato per la valutazione organolettica di prodotti alimentari. Si basa sull'interazione di molecole volatili con i chemiorecettori situati sulla mucosa dell'epitelio olfattivo, raggiungibile attraverso tre vie: ortonasale, retronasale e sanguigna. La prima è la più diretta, che riguarda il passaggio di molecole odorose attraverso le cavità nasali. La via retronasale, invece, parte dalla faringe e comunica direttamente con la via ortonasale: la temperatura più elevata all'interno della bocca permette un aumento della volatilità di alcune sostanze e di conseguenza una percezione olfattiva anche durante le fasi di assaggio.

L'Aceto Balsamico di Modena IGP è un prodotto caratterizzato da un complesso profilo aromatico. I principali responsabili sono gli aromi derivanti dai processi di cottura e concentrazione della materia prima, così come dalle fermentazioni batteriche e dal contatto con il legno delle botti di affinamento. I principali descrittori del profilo volatile sono i seguenti:

- *Fruttato:*

rappresenta la misura delle note odorose riconducibili a frutti, nel caso dell'aceto balsamico si percepisce soprattutto frutta cotta. Il sentore deriva dalle fasi di cottura del mosto e le conseguenti reazioni di Maillard, ma anche dalle fasi di affinamento ossidativo a contatto con i legni. I composti responsabili sono numerosi e possono appartenere alle materie prime (composti terpenici, esteri), possono originarsi dalle reazioni di Maillard, partendo da zuccheri e composti

azotati, possono essere ceduti dal contatto con i legni delle botti (fenoli e polifenoli), e infine possono generarsi dalle fasi di affinamento (chetoni ed esteri).

- *Speziato:*

è un sentore complesso, che può spaziare dalla percezione di spezie specifiche, a note legnose e tostate, fino alla pasticceria, con percezione di vaniglia, caramello o burro. Sono certamente derivanti dall'affinamento in legno, ma anche dalle fasi di cottura, che possono generare un numero vastissimo di composti, come furfurale e vanillina.

- *Vegetale:*

esprime l'intensità con la quale sono percepiti sentori vegetali, che possono essere relativi a vegetali freschi (verdure, erba falciata) e vegetali secchi (tabacco, fieno). Il vitigno e lo stato di maturazione delle uve possono essere responsabili di tali aromi, così come le fasi fermentative e di cottura, soprattutto se le reazioni di Maillard coinvolgono composti solforati. Le molecole ottenute possono essere pirazine, esteri, fenoli e composti solforati.

- *Floresale:*

riguarda le note odorose riconducibili al profumo di fiori come rosa, viola e miele, che si originano durante le fermentazioni e le trasformazioni ossidative in affinamento. Si ottengono composti derivanti dall'ossidazione di caroteni e polialcoli, come α e β ionone, assieme a fenoli e terpeni, che forniscono il sentore di rosa o, più in generale, di floresale.

- *Mosto cotto:*

è una sottocategoria del sentore *fruttato*, riconducibile a sentori di frutta cotta, che tendono a diminuire di intensità con l'avanzamento dell'affinamento. Le reazioni di Maillard in cottura sono le dirette responsabili di questi aromi, simili alla frutta e mosto cotto, frutta sciroppata e marmellata. Tra i composti prodotti, un esempio è l'idrossimetilfurfurale (HMF), derivato dal fruttosio.

È importante, inoltre, fare distinzione tra il concetto di intensità aromatica e complessità/ricchezza olfattiva. La prima esprime la misura della quantità della percezione olfattiva, cioè del volume totale di odori percepiti direttamente, positivi o

negativi. La complessità olfattiva, invece, riguarda la numerosità di percezione di aromi, generalmente positivi, che caratterizzano il prodotto. È possibile quindi ottenere un prodotto contraddistinto da un'elevata intensità olfattiva, ma una scarsa complessità aromatica, e viceversa.

Oltre ai sentori positivi, è possibile riscontrare odori anomali nella frazione aromatica di aceti balsamici. Questi possono derivare da vari fattori, quali una scarsa qualità di materie prime, una cottura del mosto non corretta o presenza di difetti nel legno in affinamento. Tra le varie anomalie aromatiche citiamo:

- odori di putrido o ossidato, derivanti da fermentazioni anomale che generano, principalmente da proteine, composti solforati responsabili di odori di marciumi, uova marce o cipolla. Alcuni dei composti responsabili sono il 2,6-dimetiltiofenolo, il dimetil trisulfide e l'etilmercaptano.
- odori microbiologici, originati dalla presenza di muffa o batteri sul legno delle botti, con produzione di molecole come metil etil acetaldeide, isopropil fenilacetato, geosmina e composti solforati.
- odori di fumo e bruciato, dovuti a un'eccessiva cottura e il protrarsi delle reazioni di Maillard, che portano alla formazione di etil maltolo, fenolo e acido pirolinico.
- odori chimici riconducibili a plastica e sostanze sintetiche, come il TDN (1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene), derivato da idrolisi acide nel corso delle fasi di affinamento [23].

5.2. Valutazione sensoriale dell'aceto balsamico

Come già anticipato, per l'analisi sensoriale di specifici prodotti alimentari è imprescindibile una valutazione svolta da giudici esperti specializzati. L'Aceto Balsamico di Modena IGP ne è un chiaro esempio, dal momento che per garantire la sua commercializzazione è richiesta una valutazione sensoriale da parte di un gruppo di giudici esperti dell'UIV, al fine di valutarne nel modo più oggettivo possibile le caratteristiche organolettiche, quali colore, limpidezza, odore e sapore.

L'aceto balsamico, quindi, è sempre stato oggetto di studi e analisi sensoriali, per garantire una valorizzazione e una migliore standardizzazione del prodotto. Nel corso degli anni sono stati pubblicati diversi lavori scientifici riguardanti la caratterizzazione sensoriale di aceti balsamici, i cui obiettivi spaziano dai confronti con prodotti

concorrenti, all'identificazione di nuovi descrittori, allo sviluppo di nuovi prodotti e le relative valutazioni organolettiche.

Lalou et all. hanno sfruttato l'analisi sensoriale per differenziare Aceti Balsamici di Modena da aceti balsamici di produzione greca, utilizzando vari descrittori gustativi e olfattivi: dai risultati è emersa una maggiore variabilità nella percezione sensoriale degli aceti balsamici greci rispetto ad Aceti Balsamici di Modena, contraddistinti da una maggiore standardizzazione [24]. È stata, inoltre, dimostrata una carenza di dolcezza gustativa percepita in aceti balsamici greci rispetto alle produzioni italiane (figura 8).

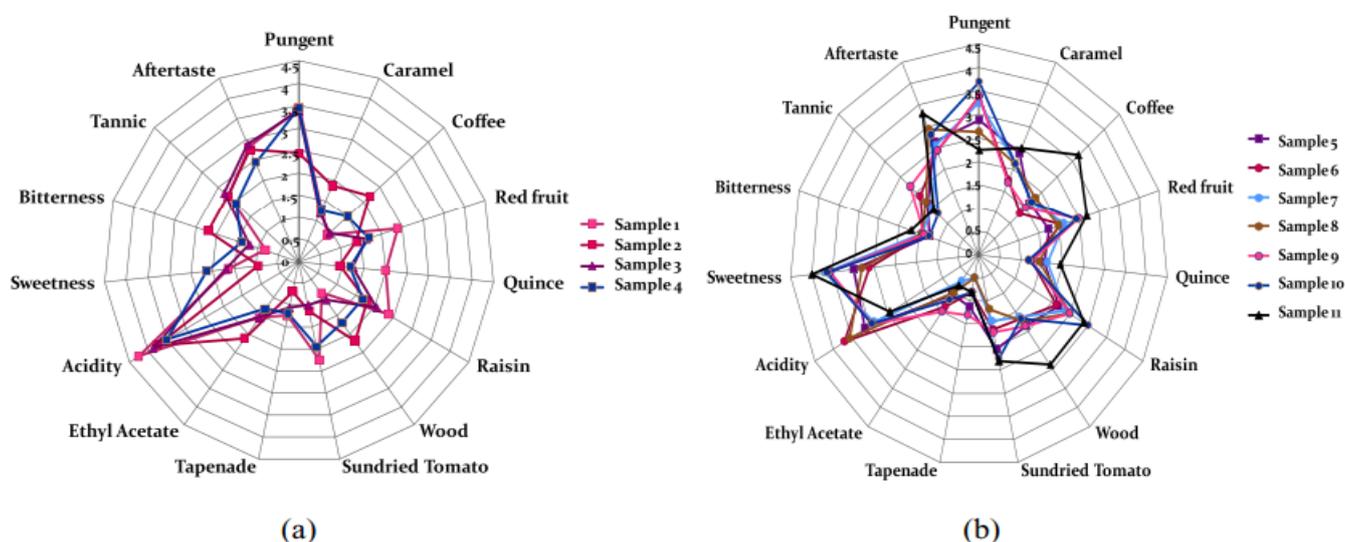


Figura 8. Profili sensoriali di (a) aceti balsamici di produzione greca e (b) ABM e ABTM basati su valori medi di vari descrittori [24].

Nel lavoro di Chirife et all. sono stati studiati condimenti all'aceto balsamico ottenuti tramite concentrazioni per evaporazione, caratterizzati da diverse concentrazioni zuccherine. Lo studio sensoriale di questi prodotti ha evidenziato una maggiore percezione della dolcezza, aroma di caramello e viscosità visiva corrispondente all'assaggio di campioni caratterizzati da °Brix elevati, con una conseguente diminuzione nella percezione dell'acidità [25].

Un altro esempio è rappresentato dallo studio di Hillmann et all., che ha permesso l'individuazione e identificazione di un nuovo composto non volatile responsabile del gusto dolce in Aceti Balsamici Tradizionali. La molecola studiata (5-acetossimetil-2-furaldeide) influisce positivamente sulla persistenza gustativa della dolcezza e si

suppone derivi dall'esterificazione di prodotti delle reazioni di Maillard, conseguenti alle fasi di cottura del processo produttivo [26].

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo della ricerca è stato inizialmente quello di sfruttare al meglio le tecnologie GC-IMS per la caratterizzazione di diversi prodotti realizzati dall'azienda Ponti, quali aceti di vino, condimenti vari e aceti balsamici. Questi ultimi si sono rivelati il principale oggetto di studio, data la loro complessità aromatica riscontrata sia a livello strumentale che sensoriale.

Tramite il metodo di analisi sviluppato e ottimizzato dal reparto Controllo Qualità e Ricerca e Sviluppo dello stabilimento Ponti di Ghemme (NO), in collaborazione con l'Università del Piemonte Orientale, è stato possibile analizzare numerosi campioni di aceto balsamico derivanti da diversi lotti di produzione. È stata creata, così, una libreria di dati, corrispondenti ai profili volatili di ogni campione analizzato.

All'interno dei vari cromatogrammi sono stati individuati gli spot corrispondenti a molecole caratteristiche e discriminanti del profilo aromatico dei prodotti analizzati, identificate tramite i database NIST e di GAS Dortmund disponibili nel software di elaborazione VOCal.

Successivamente, tramite le varie funzioni del software di analisi, si è ricercata una correlazione tra i vari campioni di aceto balsamico che li raggruppasse secondo le varie categorie merceologiche di appartenenza, in funzione delle diverse concentrazioni dei composti rilevati. Il principale strumento statistico utilizzato per l'elaborazione dei dati è stata la PCA, condotta tramite la rispettiva funzione del software.

La seconda parte dello studio ha avuto come finalità la ricerca di corrispondenze tra i risultati strumentali e le percezioni sensoriali dei profili aromatici di aceti balsamici, sulla base delle diverse concentrazioni di molecole volatili identificate, responsabili di caratteristici sentori a livello olfattivo e gustativo. I risultati delle analisi sono stati messi a confronto con valutazioni sensoriali, condotte da un panel di giudici selezionati all'interno dell'organigramma aziendale, tramite test sensoriali discriminanti qualitativi e quantitativi.

MATERIALI E METODI

6. Flavourspec

Lo strumento sfruttato per la caratterizzazione volatile degli aceti balsamici è *Flavourspec*®, prodotto dall'azienda G.A.S. (Gesellschaft für Analytische Sensorsysteme, Dortmund, Germania). Consta di un gascromatografo con colonna capillare accoppiato a un piccolo spettrometro di massa a mobilità ionica. Il tutto a sua volta collegato ad un autocampionatore per GC-MS prodotto da HTA (figura 9).



Figura 9. Impianto GC-IMS (Flavourspec®) e autocampionatore HTA utilizzati presso il laboratorio Ponti.

Lo scopo della strumentazione è ricavare una fotografia delle sostanze volatili, fornendo una documentazione imparziale sull'aspetto aromatico del prodotto analizzato. È costituita da una colonna cromatografica capillare MTX-5 di 15 m, con diametro interno di 0,53 mm e spessore del film interno di 1 μm (5% bifenile, 95% polidimetilsilossano), che sfrutta gas di azoto come carrier; al termine della sua corsa, e quindi di una prima separazione, trasferisce gli analiti all'interno di uno spettrometro in cui subiscono una ionizzazione e una conseguente seconda separazione. Il gas di trasporto è ancora azoto, dentro il tubo di volo è posizionata una sorgente di trizio per l'emissione di radiazioni β a bassa intensità, con conseguente produzione di azoto positivo. Una reazione articolata coinvolge il gas carrier e le tracce di acqua presenti nel campione, fino a creare "agglomerati" di acqua caricati positivamente.

La carica positiva delle molecole di acqua può essere così trasferita alle molecole volatili, sia sottoforma di monomeri che di dimeri, a seconda della concentrazione in cui le sostanze volatili si trovano nel gas di trasporto. All'aumentare della concentrazione dell'analita diminuisce il RIP, il picco dello ione reagente, ovvero le molecole di acqua protonata, conseguentemente alla cessione di ioni H^+ dall'acqua agli analiti. Al contempo tenderà ad aumentare il picco relativo ai dimeri, la cui formazione è direttamente collegata all'aumento della concentrazione del relativo composto (figura 10).

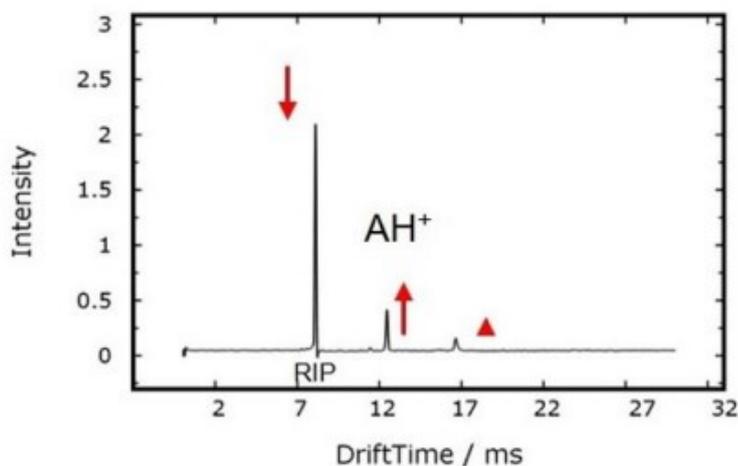


Figura 10. Relazione tra l'aumento di concentrazione dell'analita (picco centrale), la diminuzione del segnale del RIP (picco di sinistra) e la formazione di dimeri (picco di destra).

Dopo una prima separazione all'interno della colonna cromatografica le sostanze volatili raggiungono lo spettrometro di massa: all'interno del tubo di volo si caricano positivamente e volano verso l'estremità opposta, attratte da un elettrodo caricato negativamente posto nella parte terminale del tubo. Un gas di azoto (drift gas) si muove in direzione opposta rispetto agli analiti (figura 11). Il tempo di volo è dell'ordine di millisecondi, a differenza della separazione gascromatografica che può durare diversi minuti, ed è dipendente dalla massa delle molecole, dall'impedimento sterico dei diversi composti, dalla temperatura, dalla forza del campo elettrico e dalla lunghezza del tubo.

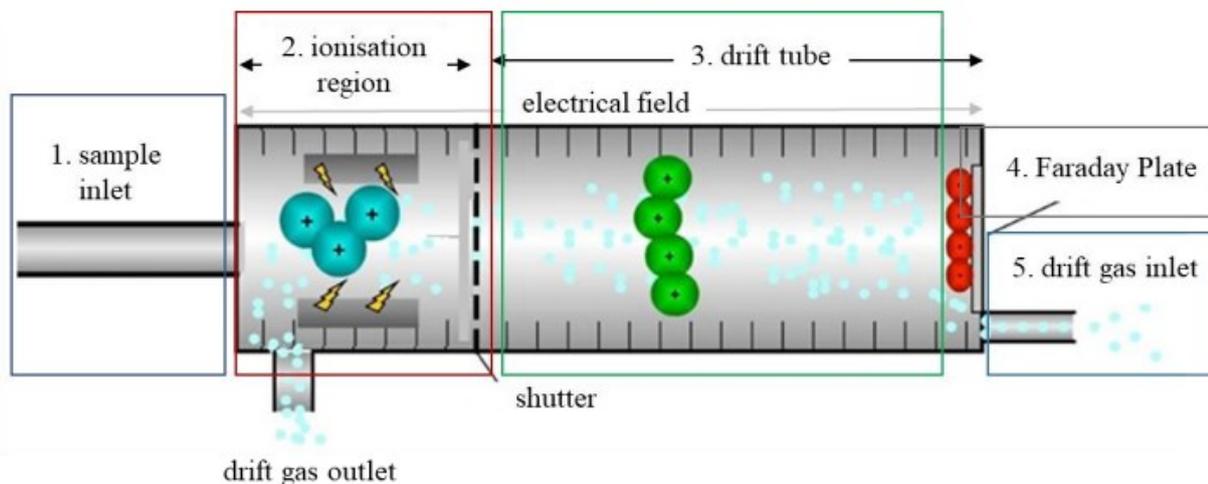


Figura 11. Schema rappresentativo del tubo di volo dello spettrometro di massa con rispettive regioni.

Per essere analizzati, i campioni vengono inseriti in apposite fiale di vetro del volume di 20 ml con chiusure in alluminio e setto in silicone. Le fiale vanno poi posizionate all'interno dell'autocampionatore, dove subiscono un riscaldamento e il successivo prelievo. Il volume prelevato è inserito all'interno della colonna cromatografica tramite iniezione splitless per la prima separazione e successivamente nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa. Tra i vari parametri modificabili vi è la temperatura di esercizio, il cui massimo raggiungibile è 80 °C, rendendo il metodo adatto alla rilevazione di molecole bassobollenti; è possibile, inoltre, regolare la pressione del gas di trasporto all'interno del tubo di volo (EPC1) e all'interno della colonna (EPC2), i cui valori massimi sono rispettivamente 500 ml/min e 150 ml/min (figura 12).

Oltre all'elevata sensibilità, uno dei vantaggi dello strumento è la possibilità di analizzare campioni alimentari senza la necessità di effettuare particolari pretrattamenti. La semplicità di utilizzo e i brevi tempi di risposta (20 minuti circa per campione) rendono lo strumento particolarmente versatile in vari settori. Tra le varie applicazioni dello strumento in campo alimentare, rientrano lo studio di shelf-life, l'identificazione di composti responsabili di off-smells, la rilevazione di composti indici di frodi e i confronti con analisi sensoriali [27].

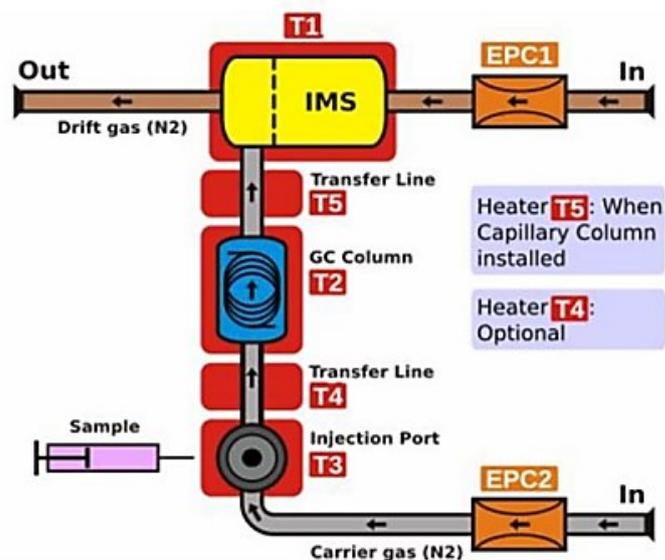


Figura 12. Rappresentazione schematica della struttura interna del GC-IMS: EPC2 ed EPC1 rappresentano i sistemi di controllo elettronico della pressione rispettivamente del gas carrier del GC e del drift gas dell'IMS; T1, T2, T3, T4, T5 indicano i sistemi di controllo della temperatura rispettivamente dell'IMS, della colonna cromatografica, della porta di iniezione del GC, della prima e seconda linea di trasferimento.

6.1. Preparazione campioni e metodo

Il metodo di analisi tramite HS-GC-IMS (Headspace - Gas Chromatography – Ion Mobility Spectrometry) è stato precedentemente sviluppato e ottimizzato dal reparto di Controllo Qualità e Ricerca di Ponti in collaborazione con l'Università del Piemonte Orientale (UPO), al fine di ottenere un sistema adatto all'analisi di aceti di vino e aceti balsamici, i cui cromatogrammi ne rappresentassero al meglio il profilo volatile [28].

Per la preparazione dei campioni di aceto balsamico ci si è avvalsi delle seguenti apparecchiature (figura 13):

- fiale in vetro da 20 ml
- chiusure in alluminio da 20 mm con setto in silicone/PTFE
- piegatore da 20 mm per la chiusura delle fiale
- baker di volume variabile
- micropipette da 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- puntali da 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l



Figura 13. Strumentazione utilizzata in laboratorio per la preparazione dei campioni di ABM.

Il metodo utilizzato prevede la preparazione dei campioni di aceto balsamico a due distinte diluizioni: una prima diluizione 1:100 e una seconda 1:50, per permettere la rilevazione anche dei composti meno concentrati. La prima diluizione viene preparata prelevando 10 μl di aceto balsamico e portando a 1000 μl di volume in una fiala, aggiungendo 990 μl di acqua deionizzata prelevata da un baker. La seconda diluizione prevede 20 μl di campione con l'aggiunta di 980 μl di acqua deionizzata.

Ogni serie di campioni viene sempre preceduta da due bianchi: un primo per l'aria ambientale, tramite una fiala in vetro vuota, e un secondo per l'acqua deionizzata utilizzata per le diluizioni, prelevando 1000 μl di acqua e introducendoli in una seconda fiala.

Le fiale vengono quindi inserite all'interno dell'autocampionatore, dove subiscono un breve riscaldamento e agitazione prima che lo spazio di testa venga prelevato dalla siringa per l'iniezione in colonna. Di seguito sono esposti i parametri secondo cui è stato impostato l'autocampionatore per la preparazione dei campioni e il GC-IMS:

- **Condizioni autocampionatore HTA**
- Generali

Syringe Volume [ml]: 2.5
Analysis Time [min]: 20
Method Type: Constant Mode
Preparation Time: 00:01:52

- Preparazione

Syringe Temperature [°C]: 60
Oven Temperature [°C]: 50
Incubation [min]: 1
Shaker On [min]: 0.2
Shaker off [min]: 0.1

- Campione

Sample Volume [ml]: 0.5
Fill Volume [ml]: 1.0
Pull Up Strokes: 2
Equilibration Delay [s]: 1
DHS time [min]: 0.0
Sample Speed [ml/min]: 6.0
Syringe Prefill: No

- Iniezione

Injection Speed [ml/min]: 30.0
Pre Injection Dwell [s]: 1
Post Injection Dwell [s]: 3
Flush Time [min]: 3

- ***Condizioni cromatografiche Flavourspec®***

EPC1 Drift [ml/min]: 150.0
EPC2 Carrier [ml/min]: 2.0
T1 IMS [°C]: 45
T2 GC [°C]: 40
T3 Injector [°C]: 80
T4 Transfer [°C]: 80
T5 Transfer [°C]: 45
T6 [°C]: off

6.2. Campioni

I campioni scelti come oggetto di studio appartengono alla linea di Aceti Balsamici di Modena (ABM) IGP di Ponti, composta da diverse categorie merceologiche, che si distinguono in funzione dei seguenti parametri:

- periodo di invecchiamento
- quantità di mosto
- densità
- estratto secco
- presenza di caramello

In tabella 1 sono elencate le categorie merceologiche oggetto di studio e i relativi parametri caratterizzanti:

Tipologia interna ABM	Invecchiamento [gg]	% peso di mosto d'uva cotto e/o concentrato	Densità a 20 °C [g/ml]	Estratto secco [g/l]	Presenza di caramello
A2	≥ 72 - 356	≥ 40 - 49	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	SÌ
A	≥ 366 - 1095	≥ 40 - 49	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	SÌ
A+	≥ 1096	≥ 50	≥ 1,160	≥ 400	SÌ
D+	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	1,095 - 1,129	210 - 309	SÌ
D+N	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	1,095 - 1,129	210 - 309	NO
BIO 260	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	1,095 - 1,129	210 - 309	NO
BIO 320	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	NO
BIO 420	≥ 72 - 365	≥ 40 - 49	≥ 1,160	≥ 400	NO

Tabella 1. Classi merceologiche di ABM analizzati con relativi parametri distintivi.

I campioni di aceto balsamico sono stati scelti sulla base dei risultati cromatografici ottenuti tramite GC-IMS, in particolare sono stati ricercati campioni caratterizzati da significative differenze nella frazione volatile, al fine di ottenere una distinzione che rispecchiasse al meglio quella merceologica. Campioni significativamente diversi dal punto di vista analitico sono stati successivamente impiegati come oggetto di valutazione in test sensoriali, per verificare la presenza di relazioni tra la rilevazione strumentale e la percezione sensoriale. È possibile che aceti balsamici adoperati nei test sensoriali appartengano alla stessa categoria merceologica, ma possiedano profili volatili distinti percepibili come tali dal punto di vista organolettico.

6.3. Software

Per la preparazione dei campioni e l'elaborazione dei dati ci si è avvalsi del software Sequence Designer v1.2 e del software VOCal v0.1.3. Il primo software è stato utilizzato per la definizione delle sequenze dei campioni inseriti e del programma di analisi impiegato. Tramite VOCal, invece, è possibile visualizzare i singoli cromatogrammi ottenuti, così da ottenere una prima distinzione e quantificazione visiva dei risultati. In figura 14 è esposto un cromatogramma esemplificativo ottenuto dall'analisi di un campione di aceto balsamico.

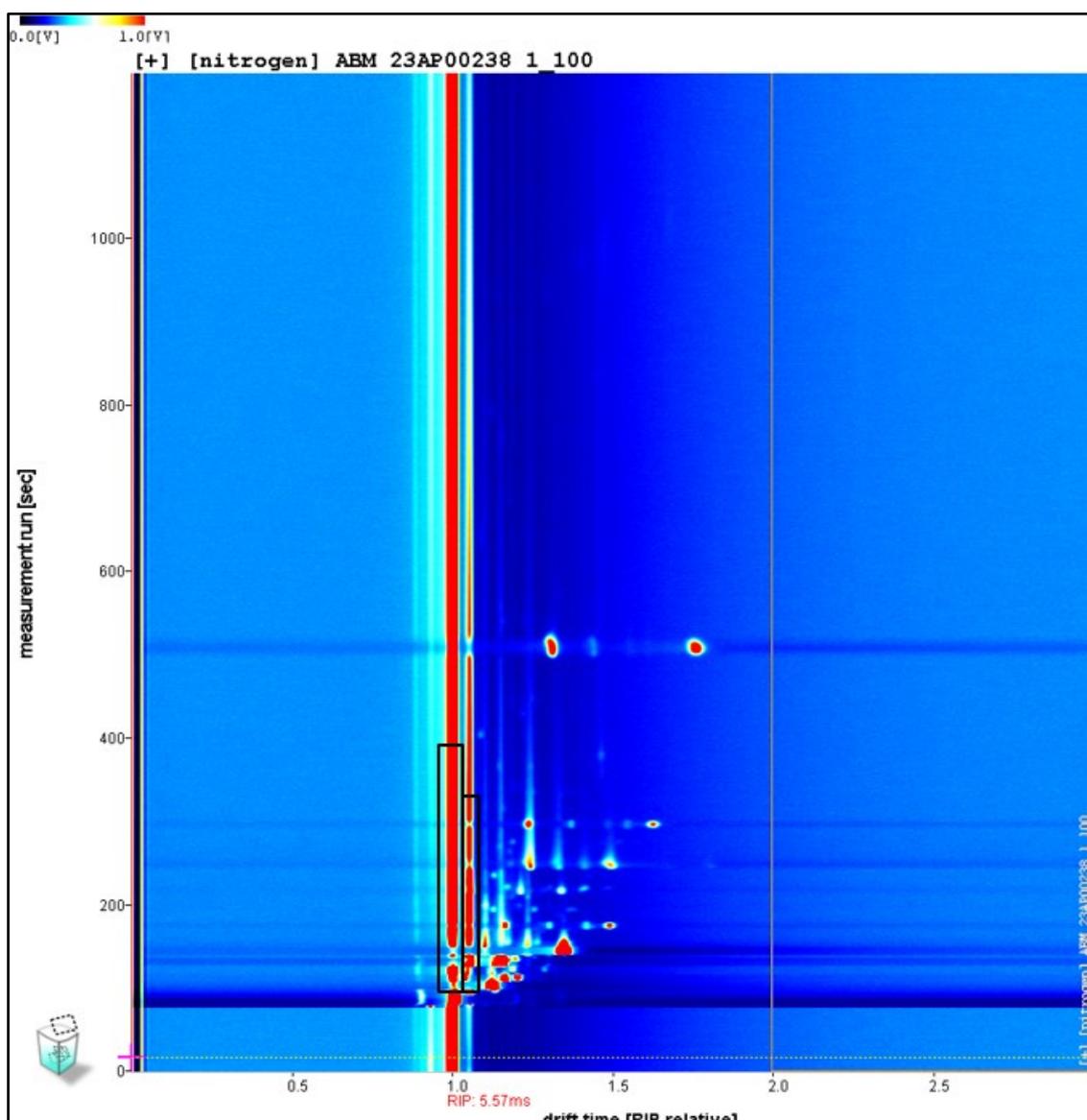


Figura 14. Cromatogramma rappresentativo di un aceto balsamico ottenuto tramite analisi con GC-IMS: i due riquadri neri evidenziano rispettivamente il segnale del RIP (a sinistra) e il segnale dell'acido acetico (a destra).

Il grafico si compone di tre unità di misura quali il tempo di eluizione [s] sulle ordinate, il tempo di drift [ms] sulle ascisse, ovvero il tempo in cui le molecole permangono all'interno del tubo di volo, e il segnale del detector [mV], corrispondente alla quantità del singolo composto e riscontrabile dall'intensità di colore rosso del relativo spot. Il segnale del RIP, ovvero dell'acqua protonata residua nel campione, corrisponde alla linea rossa evidenziata in figura, caratterizzata da un tempo di volo di 5,57 ms. Accanto ad essa è presente il segnale relativo all'acido acetico, anch'esso particolarmente visibile data la sua elevata concentrazione all'interno del campione.

Come precedentemente descritto, all'aumentare della concentrazione di una determinata molecola, sarà conseguente la formazione del relativo dimero. All'interno del cromatogramma gli spot di monomeri e dimeri dello stesso composto possiedono lo stesso tempo di eluizione [s] e differiscono per il tempo di volo [ms], proprio perché la formazione di dimeri avviene all'interno del tubo di volo, conseguentemente alla cessione di protoni H^+ da parte delle molecole d'acqua residue. I monomeri sono caratterizzati da un tempo di volo minore rispetto ai relativi dimeri, il cui spot si posiziona sulla destra del monomero, poiché il tempo di volo è direttamente dipendente dalla massa della molecola. In alcuni casi, per la rilevazione e quantificazione dei composti, è preferibile affidarsi allo spot del relativo dimero, come nel caso dell'acetoino, il cui spot del monomero è sovrapposto e oscurato dal segnale dell'acido acetico (figura 15).

È osservabile, inoltre, come elevate concentrazioni di un analita causino l'interruzione del segnale del RIP. Un esempio è dato dall'acetato di etile, uno dei composti volatili maggiormente presenti in aceti balsamici: l'elevata presenza di questa molecola provoca il trasferimento totale di protoni dalle molecole d'acqua all'acetato di etile. L'acqua, non più protonata, non è quindi rilevabile dal detector, portando a una sospensione temporanea del segnale del RIP.

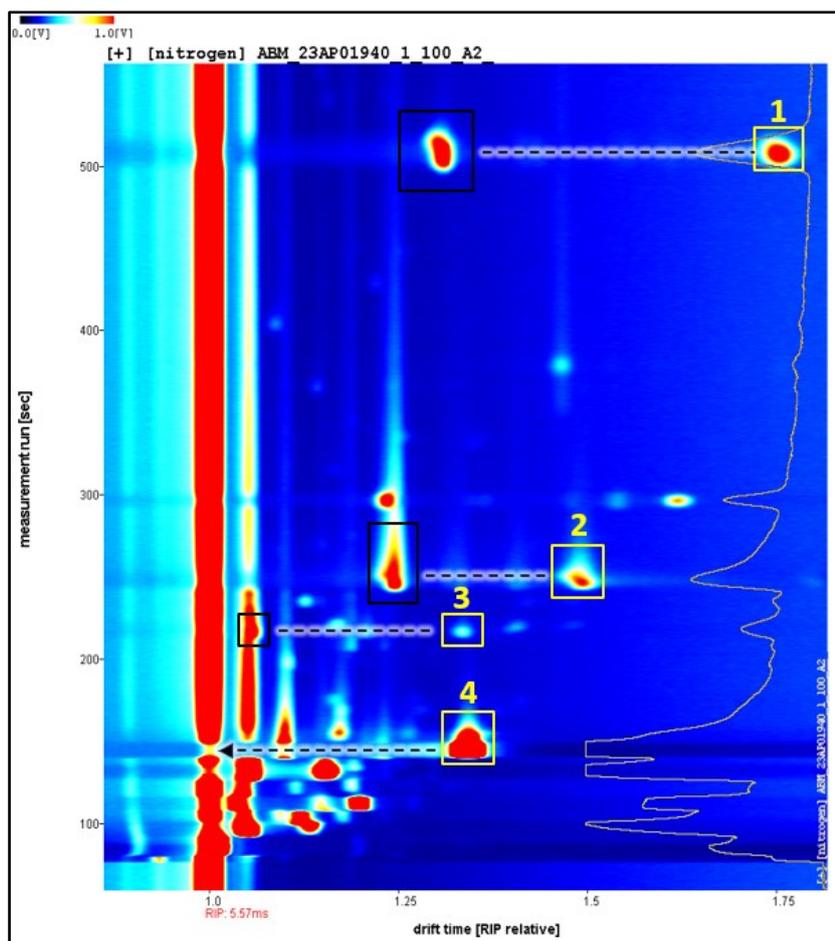


Figura 15. Cromatogramma rappresentativo della corrispondenza tra monomeri (riquadri neri) e rispettivi dimeri (riquadri gialli) di alcune molecole identificate quali: acetato di isoamile (spot 1), isoprenolo (spot 2), acetoino (spot 3). Lo spot 4 corrisponde all'acetato di etile, la cui concentrazione causa l'interruzione del RIP.

Il software dispone inoltre di vari moduli, ovvero funzioni per la visualizzazione, confronto e analisi dei dati, tra cui:

- *Reporter plot*, che permette all'operatore di visualizzare e distinguere diversi cromatogrammi sulla base dell'intensità degli spot: impostando come riferimento un singolo cromatogramma è possibile confrontarlo con diversi campioni, i cui cromatogrammi mostreranno zone di colore rosso intenso se il segnale dello spot è maggiore rispetto al riferimento, o zone di colore blu se gli spot sono meno intensi rispetto al riferimento. Questo modulo può essere sfruttato per il confronto dei campioni analizzati con i rispettivi bianchi, per individuare le sostanze derivanti dall'aria ambientale o dall'acqua di diluizione. Impostando come riferimento un bianco, è possibile visualizzare nel cromatogramma del campione di aceto balsamico alcune zone di colore blu, corrispondenti agli spot presenti nel

cromatogramma di acqua o aria, quindi non appartenenti al campione di aceto analizzato (figura 16). Non è presente, purtroppo, una funzione per la sottrazione automatica dei segnali derivanti dai bianchi, è possibile, quindi, effettuare unicamente confronti visivi.

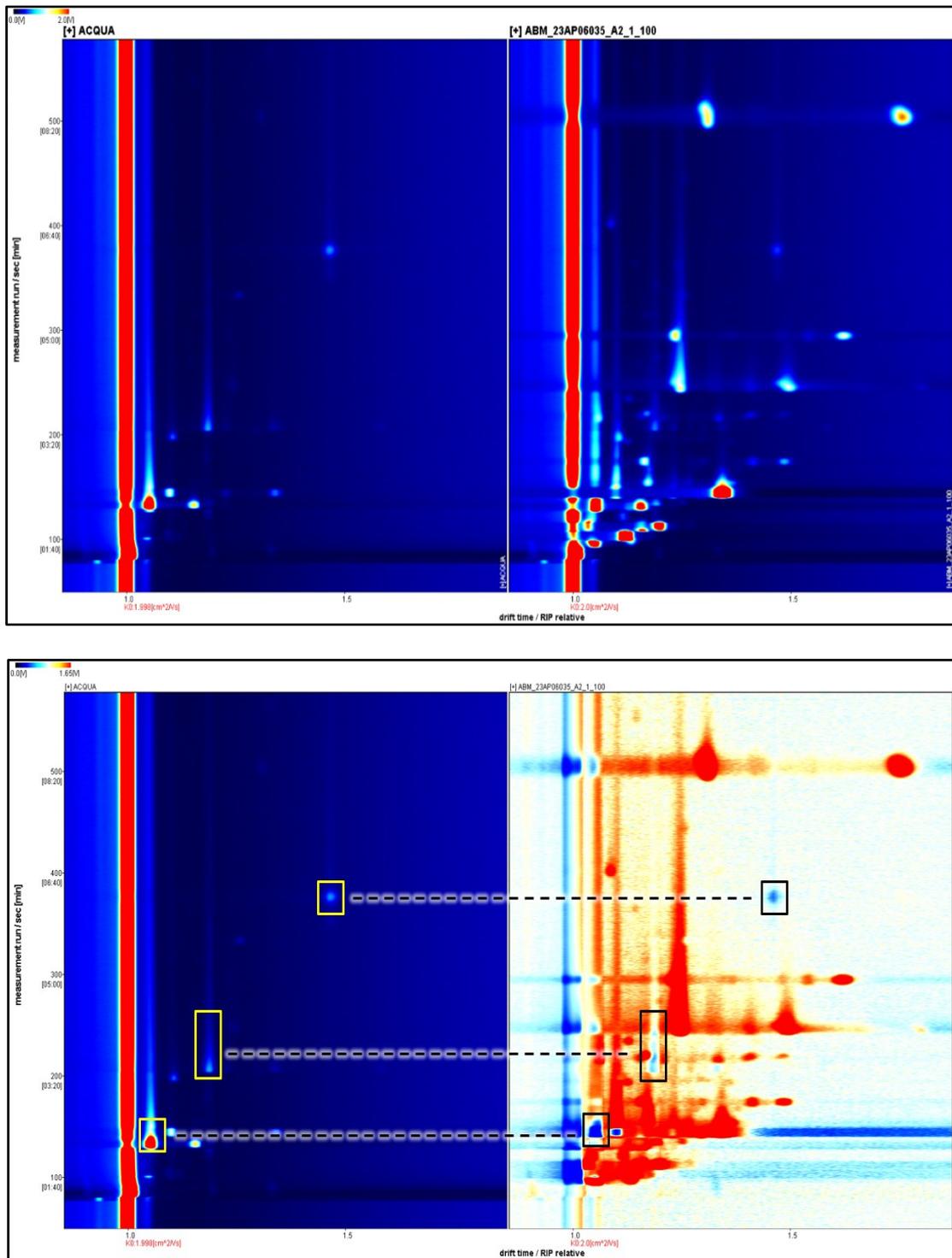


Figura 16. Confronto tra cromatogrammi di acqua (a sinistra) e aceto balsamico (a destra) senza riferimenti impostati (sopra) e con riferimento impostato sull'acqua (sotto).

- *Gallery plot*, utilizzato per confrontare diversi cromatogrammi sulla base di determinate aree individuate dall'operatore. Il modulo permette di creare tabelle per la visualizzazione di aree, corrispondenti a determinati spot, appartenenti a ciascun cromatogramma scelto per il confronto: questo può essere effettuato visivamente visualizzando le sequenze degli spot e le loro diverse intensità, oppure sfruttando l'indice di similarità tra campioni automaticamente calcolato dal software.

- *Dynamic PCA*, tramite il quale è possibile ottenere un'analisi e un confronto elaborato su un elevato numero di campioni caratterizzati da numerose variabili, sfruttando un approccio statistico multivariato, quale l'analisi delle componenti principali (PCA). Tramite questo strumento è stato possibile effettuare confronti su diversi campioni di aceti sulla base di molteplici composti individuati e presenti in quantità più o meno rilevanti: i risultati ottenuti consistono in un grafico in cui i campioni sono rappresentati in forma dispersa se significativamente diversi, o raggruppati se presentano similarità.

- *Plugin-Variance*, che consente di ottenere un cromatogramma rappresentativo delle differenze presenti tra più campioni considerati. Se selezionato un singolo campione, invece, il modulo genererà una copia del relativo cromatogramma accentuando i segnali rilevati: gli spot risulteranno quindi più visibili, permettendo la visualizzazione di composti poco concentrati (figura 17). Questa funzione può essere utilizzata in sostituzione alla preparazione e analisi di campioni con diluizione 1:50.

L'identificazione dei composti corrispondenti ai diversi spot è stata possibile sfruttando la libreria NIST 2014 degli indici di ritenzione accoppiata alla libreria sviluppata da Dortmund GAS sulle mobilità ioniche. È stata necessaria, inoltre, la normalizzazione della colonna cromatografica tramite una calibrazione con una miscela di chetoni diversi, come suggerito nelle istruzioni fornite da GAS Dortmund.

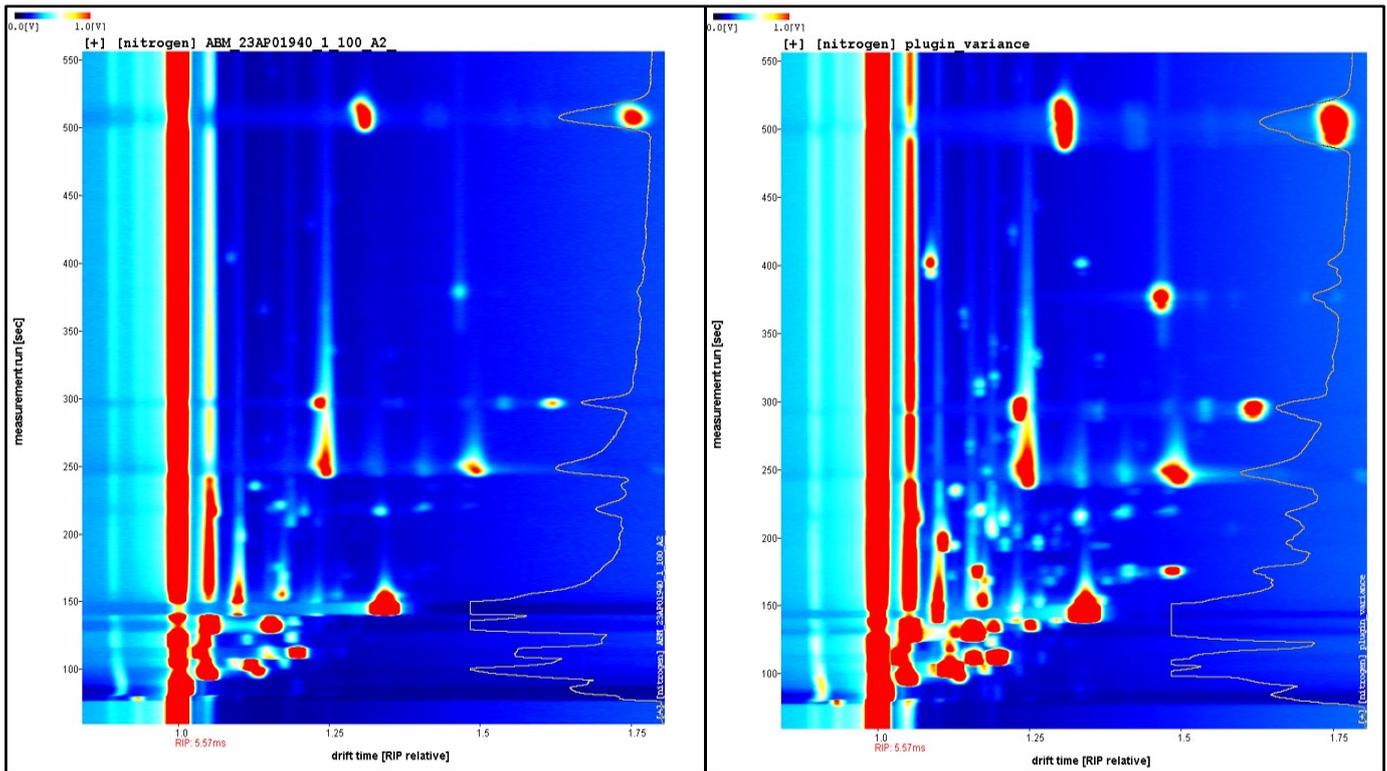


Figura 17. Confronto tra cromatogramma di aceto balsamico e relativa copia con segnali intensificati ottenuta tramite funzione Plugin-Variance.

7. Formazione del panel

I test di valutazione sensoriale su campioni di aceto balsamico sono stati preceduti da sessioni di addestramento e formazione, al fine di assicurare una preliminare istruzione teorica e pratica al gruppo di assaggiatori. I giudici sono stati selezionati all'interno del personale aziendale: le aree di competenza e professione potevano non riguardare l'ambito tecnico-produttivo, dunque alcuni disponevano di conoscenze limitate riguardo la produzione e analisi sensoriale del prodotto. La breve preparazione affrontata è stata necessaria per garantire al panel una conoscenza tecnica del prodotto oggetto di valutazione e dimestichezza nell'analisi sensoriale, per ottenere un gruppo di assaggiatori omogeneo e affidabile.

Assieme a una formazione tecnico-teorica, le giornate di addestramento comprendevano, dunque, semplici e brevi test sensoriali di ordinamento e comparazione a coppie. I primi avevano lo scopo di "tarare" gli assaggiatori sulla percezione dell'intensità di determinati descrittori. A ogni giudice sono stati forniti inizialmente quattro campioni di una soluzione di acqua e sale a diverse concentrazioni ed è stato richiesto di ordinare i campioni sulla base dell'intensità di sapidità percepita. Successivamente è stato condotto un secondo test a ordinamento su campioni di aceto

di vino a diverse concentrazioni di acido acetico, da ordinare in funzione dell'intensità di acidità percepita. Quest'ultimo test ha permesso ai giudici di allineare la propria percezione olfattiva e gustativa al livello di acidità effettivamente presente all'interno dell'aceto balsamico. L'elevata presenza di acido acetico (6%) è una componente limitante per una corretta valutazione organolettica del prodotto, che condiziona la percezione gustativa e olfattiva sopprimendo o accentuando la percezione di altri descrittori. Nel corso dei test i giudici hanno così potuto sviluppare dimestichezza nell'assaggio di aceti di vino e balsamici, con la capacità di escludere la sensazione di acidità per favorire una migliore percezione delle altre caratteristiche aromatiche.

I successivi test sono stati svolti su campioni di aceto balsamico, in alcuni casi appartenenti anche alla stessa classe merceologica, ma che si distinguevano per significative differenze rilevate strumentalmente e a livello sensoriale. Sono stati condotti due test discriminativi per comparazione a coppie: il primo trattava due campioni di ABM della categoria A2, che differivano per livello di intensità aromatica, mentre il secondo aveva come oggetto di valutazione un campione di ABM A2, rilevato più intenso e pungente, e un ABM D+, con un profilo aromatico più piatto e meno intenso. In figura 18 sono riportati i relativi confronti strumentali condotti tramite il *Gallery plot*.

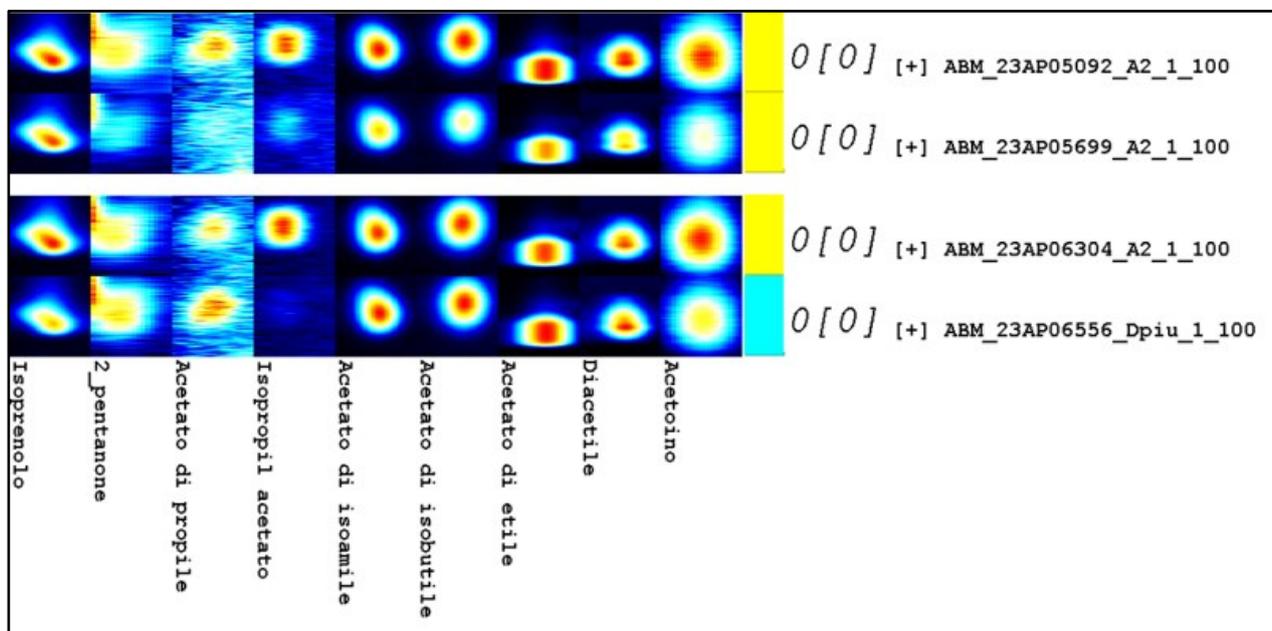


Figura 18. Confronti strumentali di ABM utilizzati in test sensoriali sulla base della concentrazione delle principali molecole identificate.

Infine, per garantire un'adeguata formazione in preparazione alle ultime valutazioni sensoriali, sono stati presentati ai giudici diversi campioni di aceti balsamici che differivano per intensità di aroma fruttato: la distinzione strumentale si basava sulle differenti concentrazioni di esteri acetici e chetoni volatili, principali responsabili di sentori dolci e fruttati (figura 19).

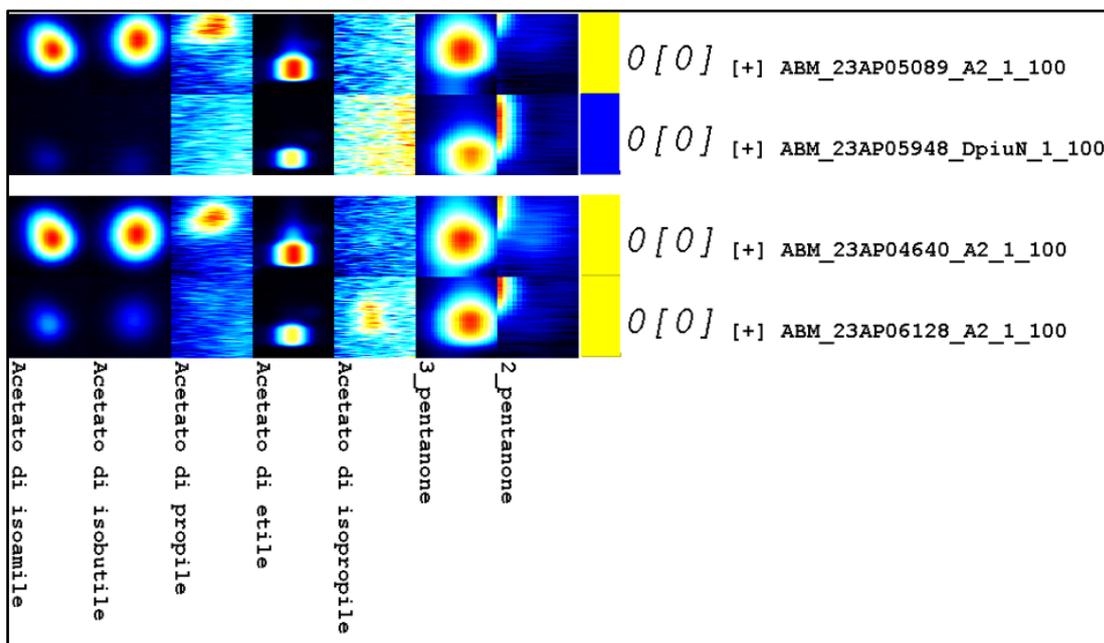


Figura 19. Confronti strumentali di ABM utilizzati in test sensoriali sulla base della concentrazione di esteri e chetoni con proprietà aromatiche.

Lo scopo di tali confronti sensoriali è stato quello di addestrare il panel all'individuazione di differenze all'interno del profilo volatile dei vari prodotti, che potevano riguardare una diversa intensità aromatica, complessità generale o più nello specifico la presenza di determinati descrittori, come sentori di fruttato o mosto cotto. Tramite questa formazione è stato possibile ottenere un panel competente nell'analisi sensoriale di aceti balsamici, in grado di riconoscere e distinguere le caratteristiche del prodotto trattato.

RISULTATI E DISCUSSIONI

8. Caratterizzazione del profilo volatile di aceti balsamici

Tramite il metodo di analisi cromatografica precedentemente descritto, è stato possibile ottenere distinti profili aromatici degli aceti balsamici analizzati. Le diverse molecole volatili individuate sono state identificate per mezzo del software VOCal utilizzando la funzione *Search*, che rende possibile l'identificazione dei vari composti corrispondenti a ciascuno spot in due modi: cliccando sullo spot desiderato o indicando nella barra di ricerca il numero CAS del composto che si intende rilevare. Tuttavia, l'identificazione è possibile solo nel caso in cui il composto sia presente contemporaneamente nella libreria NIST e nella libreria di Dortmund GAS, che combinate identificano le diverse molecole in funzione dell'indice di ritenzione e la mobilità ionica. Per questo motivo non è stato possibile correlare tutti gli spot a specifici composti, data la mancanza di questi in una o entrambe le librerie.

In figura 20 è esposto un cromatogramma rappresentativo appartenente a un aceto balsamico della categoria BIO 260, nel quale sono indicate le principali molecole identificate, sulla base delle quali si è deciso di caratterizzare i vari prodotti. La tabella 2 elenca i composti rispettivi a ciascuno spot, con il relativo indice di ritenzione (RI), tempo di ritenzione (Rt) e tempo di volo (Dt). La presenza di alcune delle seguenti molecole all'interno della frazione volatile di aceti balsamici è stata attestata da diversi lavori scientifici.

Numero spot	Composto	Numero CAS	RI	Rt [sec]	Dt [a.u]	Fonte
1	Acetato di isoamile	123-92-2	874.7	498.828	1.75095	[29]
2	Furfurale	98-01-1	833.1	407.478	1.07922	[29]
3	Acetato di isobutile	110-19-0	769.7	298.173	1.60249	[30]
4	Isoprenolo	763-32-6	729.3	242.306	1.49524	-
5	1,1-dietossietano	105-57-7	725.7	237.832	1.12926	-
6	Acetato di propile	109-60-4	709.8	219.216	1.47348	[30]
7	Acetoino	513-86-0	711.2	220.784	1.33245	[29]
8	Pentanale	100-62-3	702.2	210.854	1.18087	[31]
9	3-pentanone	96-22-0	690.8	198.833	1.10792	-

10	2-pentanone	107-87-9	690.0	198.049	1.12575	-
11	Acetato di isopropile	108-21-4	655.1	175.315	1.48402	[30]
12	Acetato di etile	141-78-6	609.9	150.178	1.33747	[32]
13	Acido acetico	64-19-7	616.0	153.377	1.05467	[29]
14	Diacetile	431-03-8	586.4	138.586	1.16181	[29]

Tabella 2. Composti identificati con relativi numeri CAS, indici di ritenzione (RI), tempi di ritenzione (Rt), tempi di volo (Dt) e fonti di riferimento.

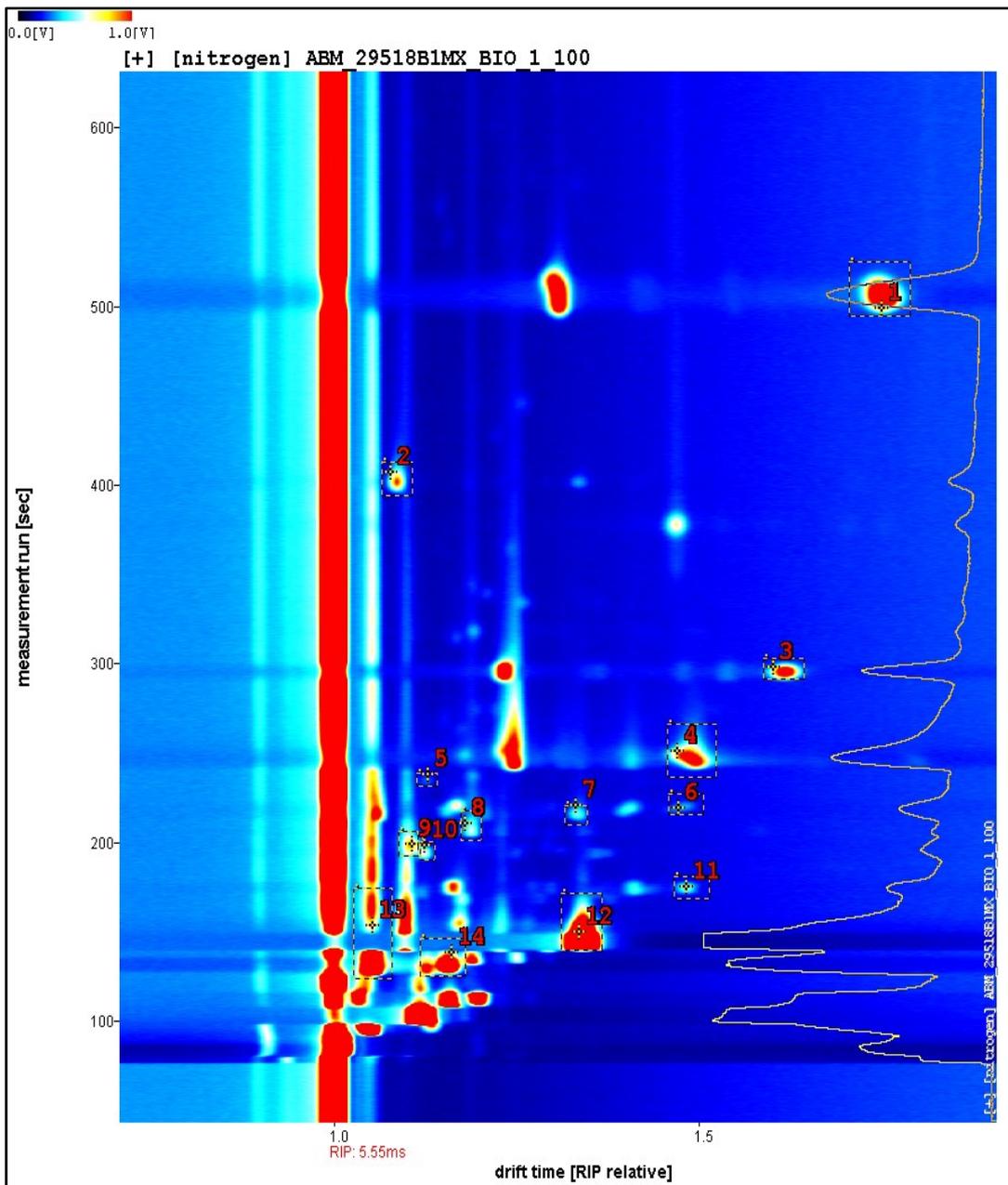


Figura 20. Cromatogramma rappresentativo di 14 spot corrispondenti a composti identificati.

Successivamente, allo scopo di ottenere una più completa distinzione dei vari campioni di aceti balsamici, sono state selezionate manualmente tutte le aree degli spot individuati, compresi monomeri e dimeri della stessa molecola, escludendo gli spot derivanti dai bianchi (figura 21). A tal fine non è necessaria l'identificazione di ogni composto: i risultati sulle distinzioni delle classi merceologiche di aceti balsamici sono stati presentati tramite PCA, prima sulla base dei 14 composti identificati e successivamente sulla base di 55 spot rilevati.

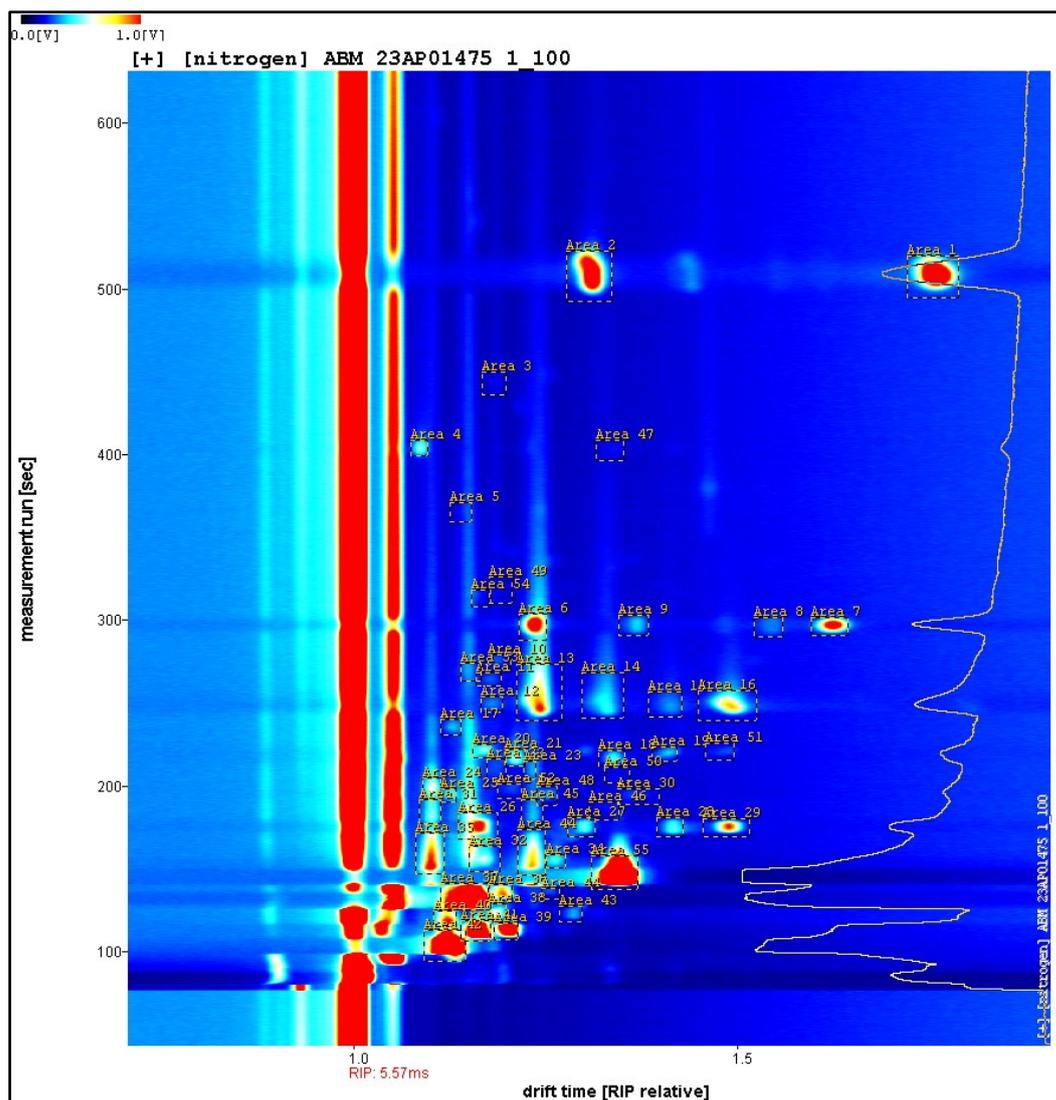


Figura 21. Cromatogramma rappresentativo di 55 spot individuati.

Si incorre, in queste fasi preliminari, nella prima difficoltà riscontrata, riguardante la mancanza di una funzione che permetta il confronto automatico di cromatogrammi completi, senza la necessità di selezionare manualmente i singoli spot. Campioni con corredi aromatici complessi possono presentare centinaia di molecole volatili diverse, a cui corrisponderanno altrettanti spot rilevati: la selezione manuale dei singoli spot

può risultare, quindi, molto laboriosa, ma necessaria per indicare al programma di analisi un oggetto di studio, sulla base del quale effettuare i vari confronti.

L'implementazione di una funzione per la rilevazione automatica delle differenze sull'intero cromatogramma può rappresentare un risparmio di tempo a favore dell'operatore, che potrebbe non essere in grado di individuare visivamente piccoli spot corrispondenti a composti poco concentrati, ma la cui presenza è rilevante per una valutazione analitica.

8.1. Distinzione di aceti balsamici tramite GC-IMS

La caratterizzazione dei campioni di aceti balsamici analizzati è stata effettuata sfruttando inizialmente i 14 composti identificati precedentemente citati. Lo scopo è stato quello di riscontrare una distinzione dei vari campioni di aceti balsamici che rispecchiasse le varie classi merceologiche di appartenenza. I confronti sono stati effettuati su classi merceologiche di aceti balsamici per le quali vi fosse una quantità significativa e rappresentativa di campioni. In figura 22 è esposta una PCA ottenuta dal confronto di 36 campioni di ABM A2 (spot gialli), 19 campioni di ABM D+ (spot azzurri), 15 campioni di ABM D+N (spot blu) e 6 campioni ABM BIO 260 (spot verdi), sfruttando l'apposito modulo del software VOCal.

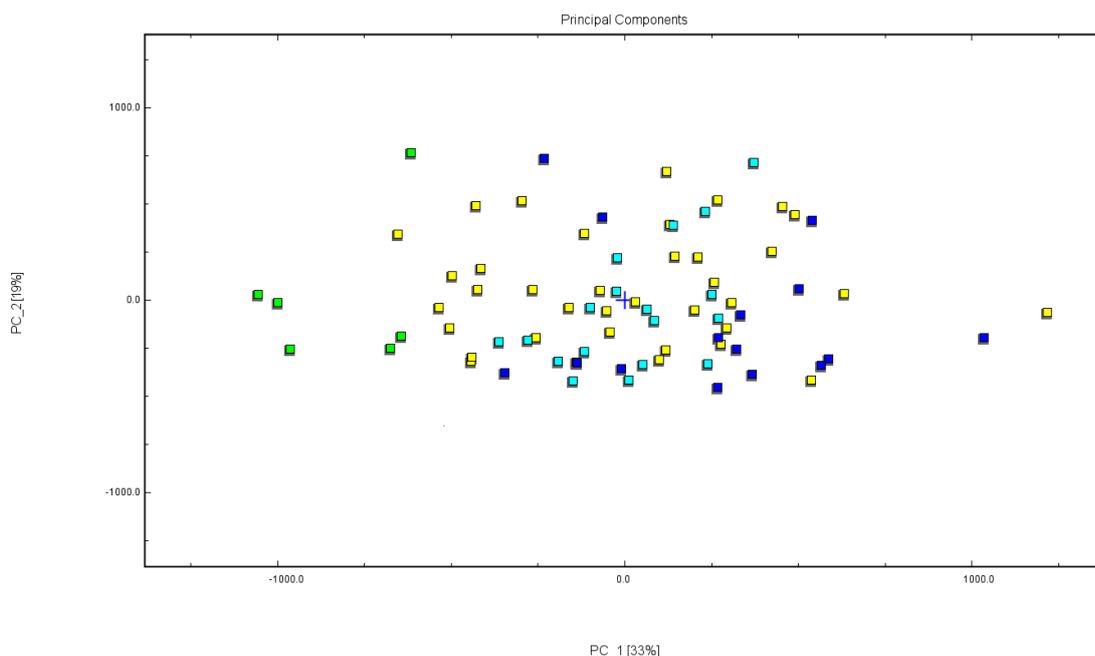


Figura 22. Confronto tramite PCA di campioni di ABM A2 (spot gialli), ABM D+ (spot azzurri), ABM D+N (spot blu) e ABM BIO 260 (spot verdi) sulla base della concentrazione di 14 spot identificati.

I risultati del confronto evidenziano una dispersione dei campioni di aceti balsamici all'interno della PCA, che rende impossibile raggruppare le varie classi merceologiche sulla base dei 14 composti volatili precedentemente identificati. Inoltre, è possibile osservare come alcuni campioni appartenenti alla stessa classe merceologica siano significativamente diversi tra di loro. Fanno eccezione i campioni di ABM BIO 260, che si posizionano sul lato sinistro del grafico: la quantità di campioni relativi a questa classe è, però, ridotta, quindi non abbastanza rappresentativa per poter confermare una distinzione dalle altre categorie merceologiche.

Successivamente è stata condotta una PCA confrontando gli stessi campioni sulla base di 55 spot individuati, seppur non tutti identificati (figura 23).

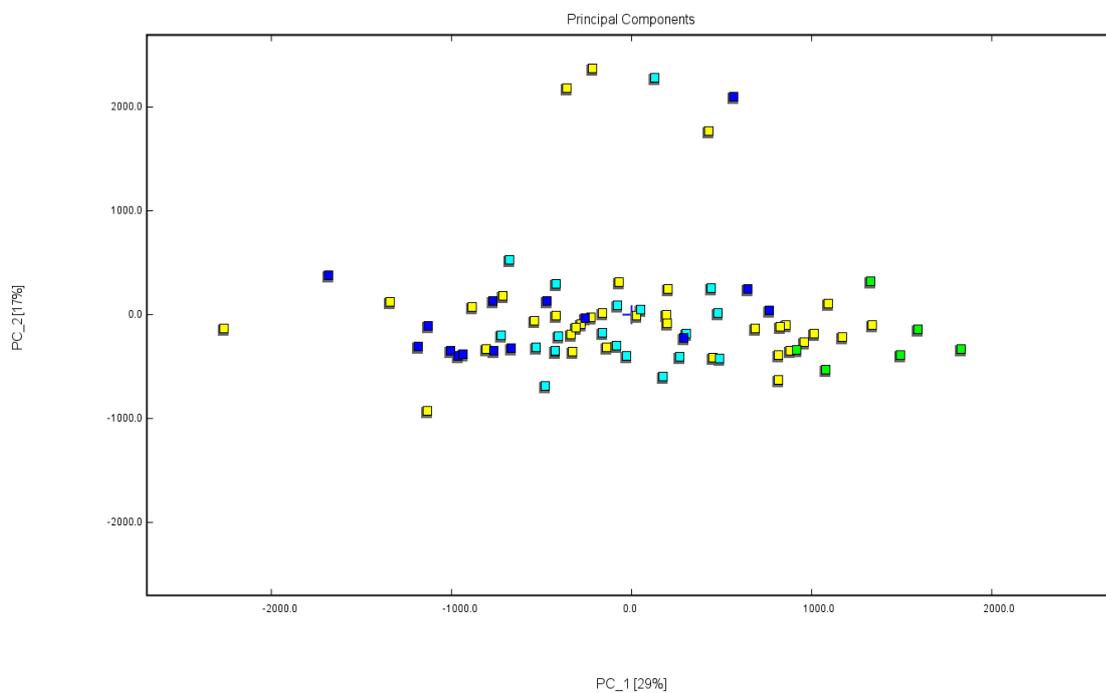


Figura 23. Confronto tramite PCA di campioni di ABM A2 (spot gialli), ABM D+ (spot azzurri), ABM D+N (spot blu) e ABM BIO 260 (spot verdi) sulla base della concentrazione di 55 spot individuati.

Anche in questo caso non è stato possibile distinguere gli aceti balsamici sulla base delle varie classi merceologiche. È possibile nuovamente osservare un minimo raggruppamento dei campioni di ABM BIO 260 sul lato destro del grafico.

Ulteriore conferma della mancanza di significative differenze tra le categorie di ABM sotto il profilo volatile è stato un confronto tramite PCA, nel quale sono stati presi in

considerazione gli spot relativi a composti responsabili dell'aroma di fruttato (figura 24). Le molecole caratterizzanti identificate sono:

- acetato di isoamile
- acetato di isobutile
- acetato di propile
- acetato di isopropile
- acetato di etile
- 3-pentanone
- 2-pentanone

Questi composti caratterizzanti saranno alla base dei confronti sensoriali successivamente condotti su diversi aceti balsamici, appartenenti in alcuni casi alla stessa categoria merceologica.

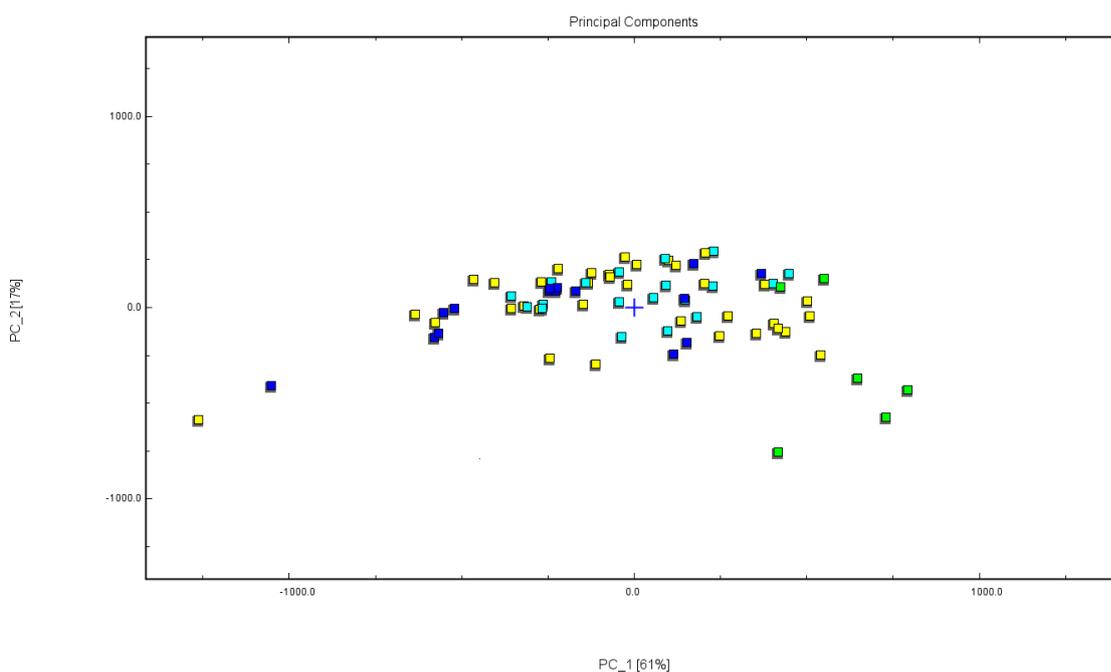


Figura 24. Confronto tramite PCA di campioni di ABM A2 (spot gialli), ABM D+ (spot azzurri), ABM D+N (spot blu) e ABM BIO 260 (spot verdi) sulla base della concentrazione di molecole responsabili dell'aroma fruttato.

Nell'intento di individuare singoli composti caratterizzanti e distintivi per le varie classi merceologiche di aceti balsamici, è stato preso in considerazione lo spot relativo all'acetato di isopropile. I campioni di aceti balsamici oggetti di confronto sono appartenenti alle categorie A2, D+ e D+N. Per una più attendibile misura della concentrazione della molecola, occorrerebbe effettuare una calibrazione con apposito

standard, sfruttando la sezione *Run Calibration / Quantification* del software VOCal: questa permette di correlare il segnale dell'IMS, espresso in mV, alla concentrazione nota dello standard analizzato. Non essendo disponibile una soluzione pura di acetato di isopropile, per la misurazione della concentrazione del composto si è fatto affidamento alla intensità di segnale ottenuto dallo spettrometro di massa. Di seguito è riportato graficamente il confronto dei vari ABM in funzione della concentrazione di acetato di isopropile (figura 25), il cui valore per ogni campione è esposto in tabella 3.

Intensità segnale acetato di isopropile		Intensità segnale acetato di isopropile		Intensità segnale acetato di isopropile	
Campioni	Volt	Campioni	Volt	Campioni	Volt
ABM_A2_23AP01940	0.022	ABM_A2_23AP06033	0.555	ABM_D+_23AP04343	0.021
ABM_A2_23AP01937	0.192	ABM_A2_23AP06304	0.181	ABM_D+_23AP04148	0.027
ABM_A2_23AP02286	0.232	ABM_A2_23AP05597	0.174	ABM_D+_23AP04942	0.022
ABM_A2_23AP02079	0.028	ABM_A2_23AP05092	0.114	ABM_D+_23AP03905	0.027
ABM_A2_23AP02081	0.021	ABM_A2_23AP05699	0.039	ABM_D+_23AP06556	0.028
ABM_A2_23AP01938	0.087	ABM_A2_23AP05089	0.021	ABM_D+_23AP06539	0.033
ABM_A2_23AP02804	0.024	ABM_A2_23AP05093	0.348	ABM_D+_23AP06257	0.028
ABM_A2_23AP02805	0.027	ABM_A2_23AP06529	1.315	ABM_D+_23AP06293	0.018
ABM_A2_23AP02345	0.026	ABM_A2_23AP06035	0.536	ABM_D+N_23AP01939	0.026
ABM_A2_23AP02362	0.028	ABM_A2_23AP05595	0.026	ABM_D+N_23AP02254	0.071
ABM_A2_23AP02540	0.026	ABM_A2_23AP05349	0.116	ABM_D+N_23AP02342	0.022
ABM_A2_23AP05428	0.126	ABM_A2_23AP05365	0.443	ABM_D+N_23AP03694	0.021
ABM_A2_23AP03606	0.132	ABM_D+_23AP02096	0.018	ABM_D+N_23AP03873	0.015
ABM_A2_23AP04640	0.018	ABM_D+_23AP02093	0.098	ABM_D+N_23AP03039	0.022
ABM_A2_23AP04638	0.025	ABM_D+_23AP02543	0.023	ABM_D+N_23AP03612	0.018
ABM_A2_23AP04804	0.02	ABM_D+_23AP02797	0.022	ABM_D+N_23AP02995	0.027
ABM_A2_23AP04915	0.664	ABM_D+_23AP02707	0.022	ABM_D+N_23AP04641	0.022
ABM_A2_23AP04454	0.021	ABM_D+_22AP06797	0.018	ABM_D+N_23AP04411	0.021
ABM_A2_23AP04807	0.025	ABM_D+_23AP03738	0.106	ABM_D+N_23AP04199	0.023
ABM_A2_23AP04298	0.017	ABM_D+_23AP03624	0.018	ABM_D+N_23AP01687	0.021
ABM_A2_23AP04410	0.021	ABM_D+_23AP03095	0.022	ABM_D+N_23AP05596	0.017
ABM_A2_23AP04805	0.018	ABM_D+_23AP03782	0.018	ABM_D+N_23AP06125	0.022
ABM_A2_23AP04293	0.016	ABM_D+_23AP04458	0.023	ABM_D+N_23AP05948	0.021
ABM_A2_23AP04916	0.669				

Tabella 3. Intensità di segnale relativa all'acetato di isopropile in campioni di ABM A2, D+, D+N.

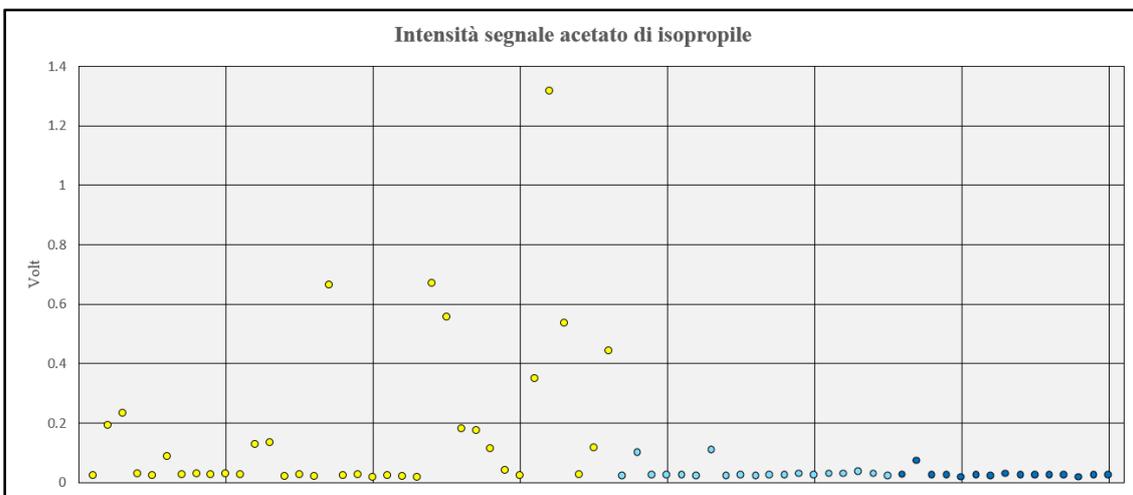


Figura 25. Intensità di segnale relativa all'acetato di isopropile in campioni di ABM A2 (spot gialli), D+ (spot azzurri), D+N (spot blu).

Il grafico evidenzia una maggiore presenza di acetato di isopropile in campioni di ABM A2, diversamente dalle classi merceologiche D+ e DN, nelle quali la molecola risulta quasi assente. Sulla base di questi dati, si può affermare che l'acetato di isopropile può essere adottato come composto caratterizzante del profilo volatile di ABM A2, al fine di distinguerli da aceti balsamici della categoria D+ e D+N.

I restanti 13 composti identificati, se considerati singolarmente, non sono risultati efficaci nella distinzione di aceti balsamici sulla base delle relative classi merceologiche.

Un'altra funzione disponibile all'interno del software VOCal è la *Nearest Neighbour / Fingerprint*, che permette di effettuare ricerche di similarità all'interno del gruppo di campioni analizzati sulla base delle diverse aree selezionate. Sono state considerate le precedenti 55 aree corrispondenti agli spot rilevati e utilizzate per la comparazione di aceti balsamici della categoria A2, D+, D+N e BIO 260. Tramite questa funzione ogni campione di aceto balsamico viene associato al campione maggiormente simile ad esso, presente nello stesso gruppo di studio. In figura 26 sono esposti i risultati dei confronti effettuati: la colonna di sinistra presenta i campioni oggetto di confronto, alla cui destra vengono associati i campioni che, all'interno della popolazione analizzata, risultano maggiormente simili. Più i campioni sono ravvicinati, maggiore è la loro similarità.

Come è osservabile, la maggior parte dei campioni di ABM A2 risulta più simile ad altri campioni appartenenti alla stessa categoria, diversamente dalle classi D+ e D+N, la cui similarità tra campioni non è uniforme. Sotto questo punto di vista, quindi, si può attestare una maggiore standardizzazione e omogeneità all'interno della categoria A2 rispetto alle categorie D+ e D+N. Anche la categoria BIO 260 risulta omogenea, ma, come precedentemente affermato, la ridotta quantità di campioni presi in considerazione non è abbastanza rappresentativa.

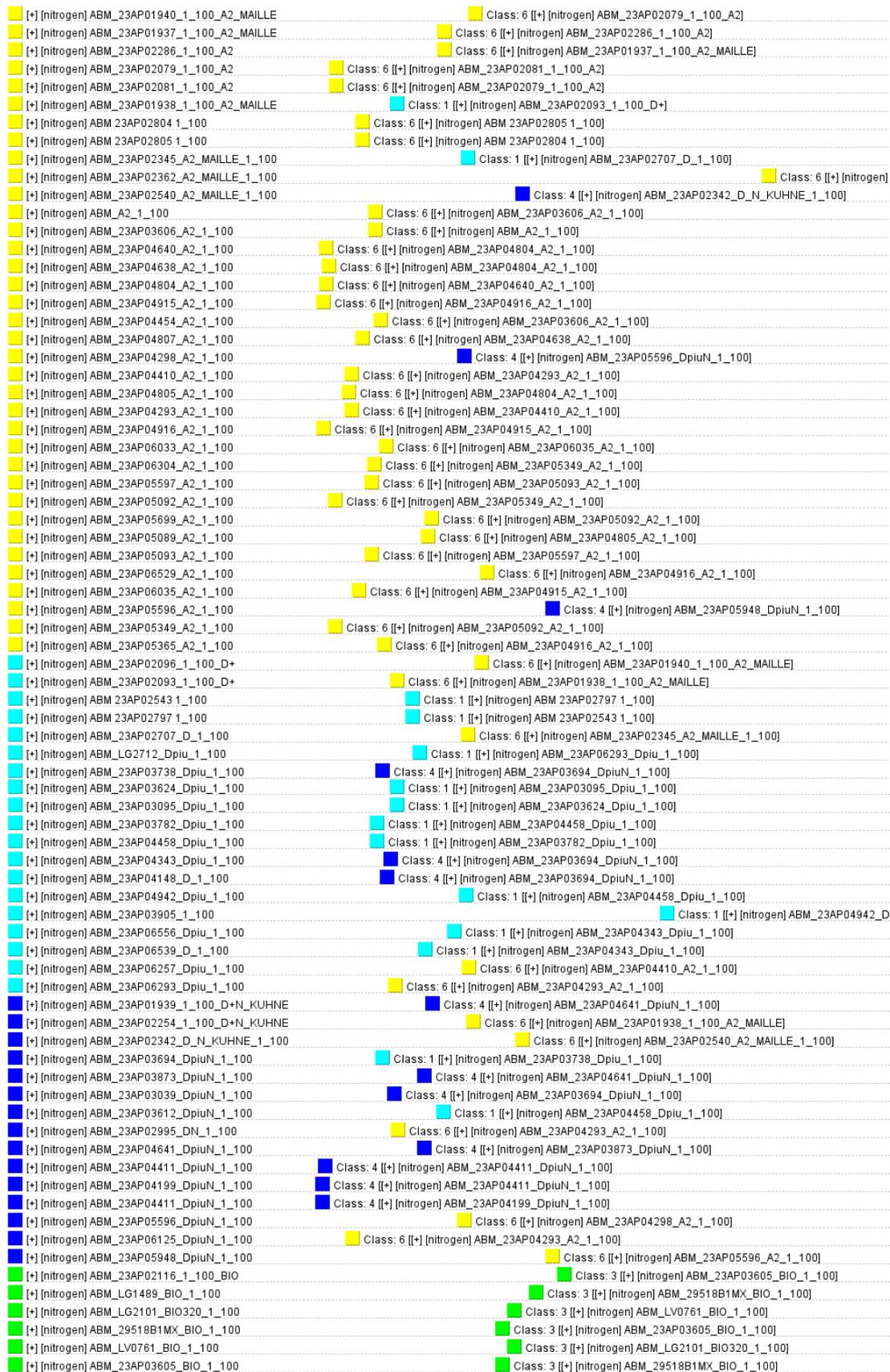


Figura 26. Confronti di similarità condotti tramite funzione Nearest Neighbour/Fingerprint tra campioni di ABM A2 (gialli), ABM D+ (azzurri), D+N (blu) e BIO 260 (verdi) sulla base di 55 spot individuati.

La presenza di significative differenze nella frazione volatile di ABM appartenenti alla stessa categoria può essere imputabile a diversi fattori. In primo luogo, ciò può essere dovuto alla variabilità delle materie prime: il mosto utilizzato per la produzione di balsamico deriva, infatti, da diversi vitigni, a loro volta provenienti da diversi fornitori, così come vi è variabilità nelle tipologie di vini da cui deriva l'aceto, anch'esso componente principale dell'aceto balsamico IGP. La produzione avviene all'interno di botti che non presentano sistemi di controllo della temperatura: le trasformazioni chimico-microbiologiche all'interno del prodotto risultano, quindi, dipendenti dalle variazioni delle condizioni ambientali. Un'altra possibile causa delle differenze riscontrate può essere rappresentata dalla permanenza del prodotto in bottiglia: all'interno del proprio contenitore, infatti, l'aceto può ancora subire evoluzioni per via di reazioni chimiche interne spontanee.

La categoria merceologica di appartenenza, quindi, non è da considerare come causa della variabilità individuata nei campioni di ABM D+ e D+N, poiché le differenze possono derivare da fattori esterni.

La caratterizzazione aromatica strumentale risulta utile anche per una prima visualizzazione della complessità del profilo volatile del prodotto. Un chiaro esempio è dato dal confronto di due campioni di ABM, appartenenti alla classe A2 e D+N. Come è osservabile in figura 27, il campione di aceto balsamico A2 presenta una maggiore complessità aromatica, data dalla elevata varietà di composti volatili presenti nello spazio di testa. Questo può essere attribuibile al maggior contenuto di mosto presente come materia prima, rispetto alla tipologia D+N.

Ancora più evidente è un confronto tra un ABM D+N e un ABM A+ (figura 28): quest'ultimo, infatti, presenta una complessità aromatica notevole, data dalla maggiore quantità di mosto utilizzato, ma soprattutto dal lungo periodo di affinamento in barrique che contraddistingue questa categoria, e che permette un maggiore sviluppo di composti aromatici. Inoltre, rispetto ad aceti con un periodo di invecchiamento inferiore a tre anni, per i quali è prevista una sosta in botti di legno di solo rovere, gli ABM A+ possono trascorrere le maturazioni all'interno di barrique costituite da legni diversi, come ciliegio e castagno, successivamente miscelati ad aceti della stessa tipologia prelevati da barrique in rovere: il contatto con i diversi legni consente il rilascio da parte delle barrique di una varietà di composti che determineranno, quindi, la complessità aromatica finale dell'aceto.

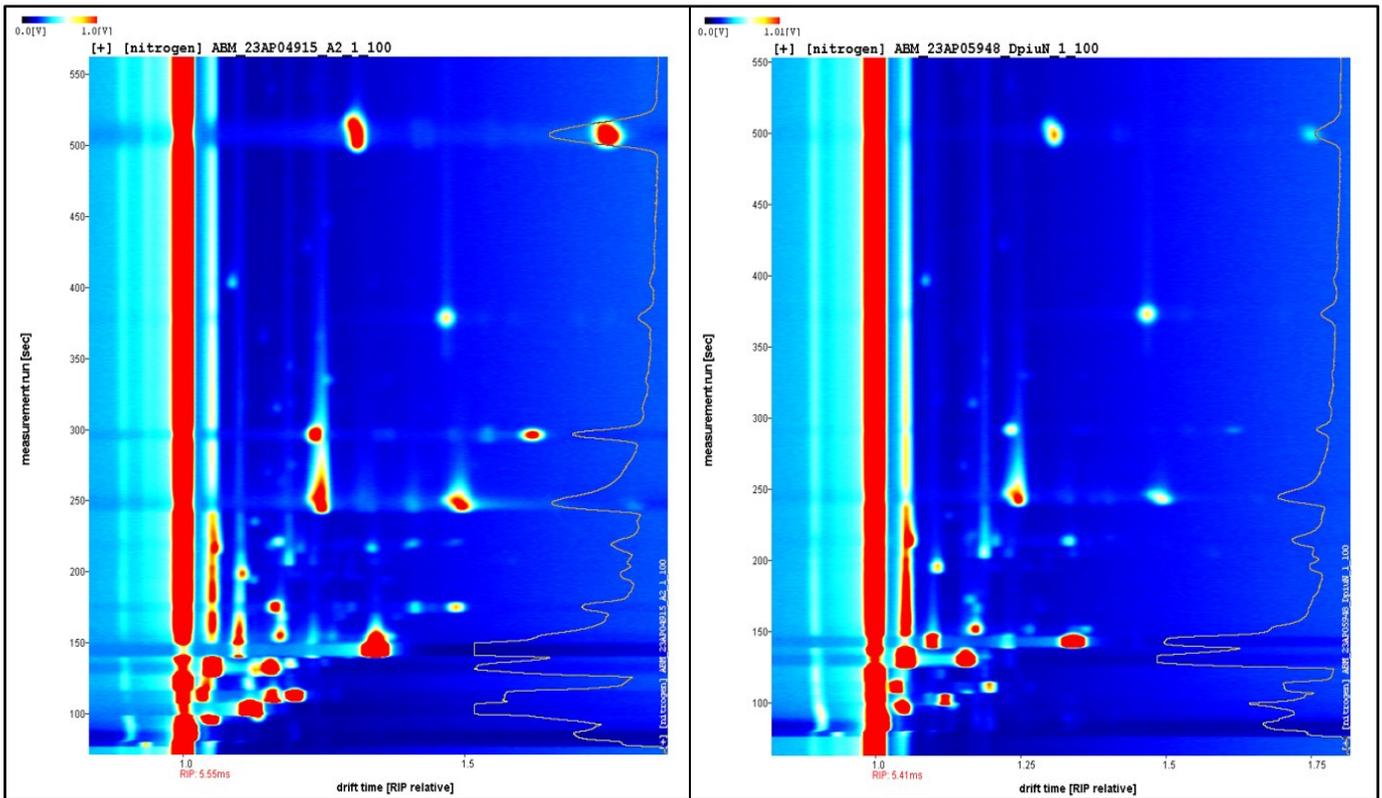


Figura 27. Confronto tra campione di ABM A2 (a sinistra) e ABM D+N (a destra) sulla base della complessità del profilo volatile.

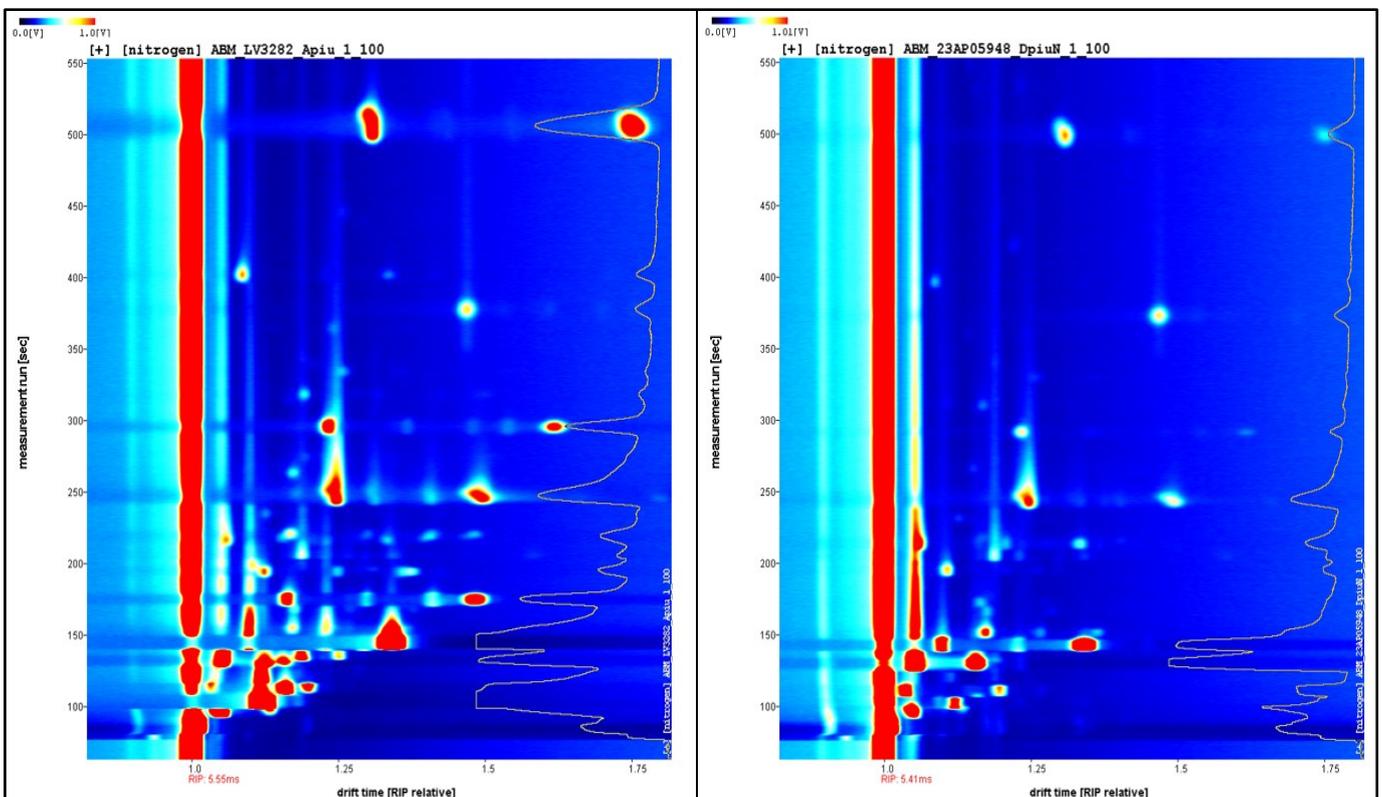


Figura 28. Confronto tra campione di ABM A+ (a sinistra) e ABM D+N (a destra) sulla base della complessità del profilo volatile.

8.2. Confronti strumentali sull'aroma fruttato

Come accennato nel capitolo precedente, alcune delle sostanze individuate e identificate possono appartenere al gruppo di composti responsabili del sentore fruttato, una macrocategoria aromatica caratteristica del profilo sensoriale degli aceti balsamici. La maggior parte delle molecole identificate appartiene al gruppo degli esteri, in particolare composti derivanti da processi di esterificazione tra acido acetico e alcoli, contraddistinti da un caratteristico odore fruttato [33]. La presenza di questi composti a diverse concentrazioni all'interno di aceti balsamici può essere efficace per una prima distinzione sotto l'aspetto sensoriale. Di seguito sono elencati i vari composti presi in considerazione (figura 29):

- *Acetato di isoamile*, è uno dei composti maggiormente rilevati dalle analisi cromatografiche effettuate su aceti di vino e balsamici; è l'estere dell'acido acetico e del 3-metil-1-butanololo, sintetizzato da lieviti nei processi di produzione di vini [34]. È caratterizzato da un intenso odore di banana e pera ed è ampiamente sfruttato in campo alimentare come aromatizzante [35], con una soglia olfattiva estremamente bassa, rilevabile anche a 0,0034 ppm;
- *Acetato di isobutile*, è l'estere dell'acido acetico e dell'1-butanololo, è responsabile di un odore fruttato che ricorda vagamente la banana e deriva anch'esso dalla sintesi di lieviti impiegati in vinificazione [36]. Si può trovare naturalmente in frutti come lamponi e pere e possiede una soglia olfattiva di 1,1 ppm;
- *Acetato di propile*, deriva dall'esterificazione dell'acido acetico e dell'1-propanolo, è un composto dal caratteristico odore di pera con soglia olfattiva di 0,88 ppm, anch'esso trova impiego come additivo alimentare [35];
- *Acetato di etile*, come l'isoamilacetato è prodotto da lieviti enologici e presente ad elevate concentrazioni in aceti balsamici [34]. È l'estere più semplice, formato dall'acido acetico ed etanolo, presenta un odore dolce e fruttato caratteristico degli esteri a basso peso molecolare, talvolta associato a sentori di vino acetoso. Ha una soglia olfattiva di 18 ppm;

- *Acetato di isopropile*, ottenuto dall'esterificazione di acido acetico e alcol isopropilico ha un leggero odore fruttato [38], con una soglia olfattiva intorno ai 4 ppm;
- *3-pentanone* e *2-pentanone*, sono semplici chetoni dall'odore pungente simile all'acetone e frutta matura, con rispettive soglie di percezione di 2 ppm e 11 ppm. Anch'essi possono essere utilizzati come aromatizzanti alimentari [35].

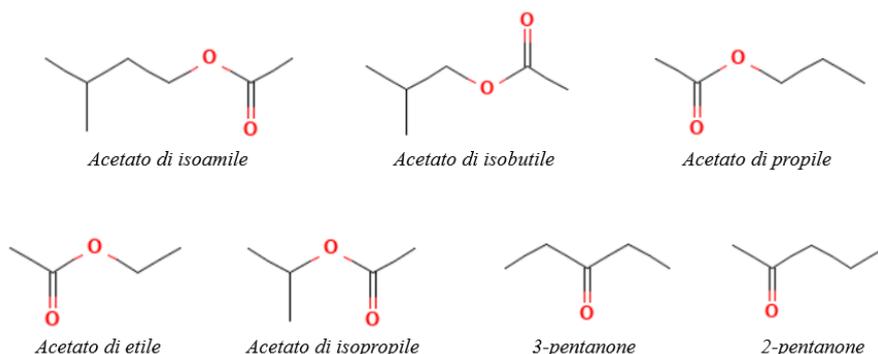


Figura 29. Struttura di esteri e chetoni identificati.

In funzione della concentrazione di questi composti è possibile differenziare i diversi campioni di aceto balsamico. La visualizzazione delle differenze può essere effettuata tramite il modulo *Gallery plot*, selezionando le aree corrispondenti agli spot analizzati. In figura 30 è rappresentato un confronto condotto su due campioni di ABM A2, un campione di ABM D+ e un campione di ABM D+N, classificati in ordine di concentrazioni crescenti. La tabella 4 elenca i segnali ottenuti dallo spettrometro di massa relativi ad ogni spot, come misura relativa della concentrazione.

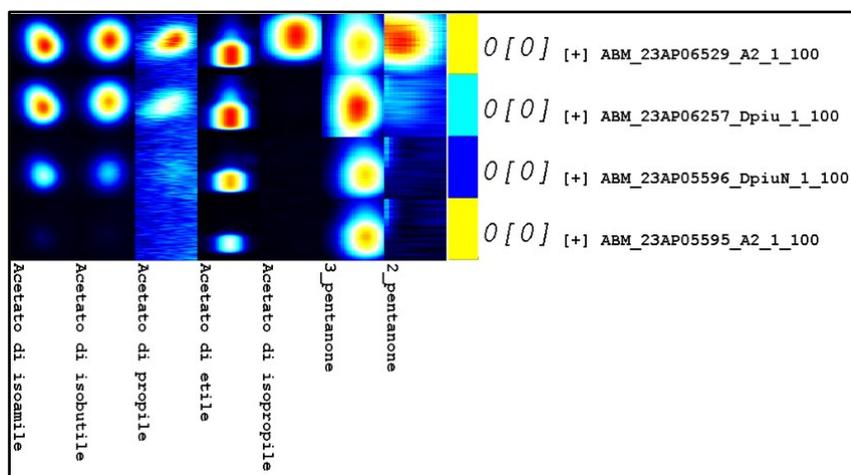


Figura 30. Confronti strumentali di ABM sulla base della concentrazione di composti responsabili dell'aroma fruttato.

Campioni	Intensità segnale spot [V]						
	Acetato di isoamile	Acetato di isobutile	Acetato di propile	Acetato di etile	Acetato di isopropile	3-pentanone	2-pentanone
ABM A2 23AP06529	1,672	1,224	0,115	5,022	1,326	0,673	0,188
ABM D+ 23AP06257	1,594	1,085	0,077	5,027	0,037	0,818	0,078
ABM D+N 23AP05596	0,920	0,465	0,038	4,363	0,034	0,708	0,101
ABM A2 23AP05595	0,129	0,048	0,033	2,957	0,033	0,736	0,101

Tabella 4. Intensità di segnali derivanti da composti responsabili dell'aroma fruttato, relativi a quattro campioni di ABM.

Come è possibile osservare, i quattro campioni risultano significativamente diversi sulla base delle concentrazioni delle sostanze aromatiche considerate. È interessante notare, inoltre, come campioni appartenenti alla stessa categoria A2 si posizionino agli estremi della classifica. La differenza è tale da indurre a considerare il campione ABM A2 23AP05595 un lotto anomalo, la cui frazione volatile si discosta nettamente dal profilo tipico degli aceti balsamici analizzati. La ricerca della causa può essere condotta sulle materie prime, sul processo produttivo stesso, sul metodo di stoccaggio, così come può derivare dal campionamento in sede di produzione. Le variabili in gioco sono numerose e dunque risulta difficile risalire all'origine dell'anomalia.

In ogni caso, si può certificare la potenzialità dello strumento nella rilevazione di irregolarità e differenze all'interno della componente volatile di aceti balsamici.

Dalle differenze analitiche individuate si può prevedere, dunque, una differenza percepibile anche a livello sensoriale: ci si attende una maggiore percezione di aroma fruttato nel campione ABM A2 23AP06529, rispetto al campione ABM A2 23AP05595. Le successive indagini sensoriali sono state necessarie per verificare la presenza di correlazioni tra l'analisi strumentale e la percezione aromatica, al fine di riconoscere i composti volatili identificati come variabili discriminanti del profilo aromatico di aceti balsamici.

9. Confronti sensoriali

Una volta ottenuti risultati soddisfacenti dai test preliminari di formazione del panel, si è proseguito con le analisi sensoriali su campioni di aceto balsamico selezionati.

9.1. Test triangolare

Il primo test svolto ha avuto come oggetto di confronto due campioni di ABM appartenenti alla categoria A2 e D+N, il cui profilo volatile risultava significativamente diverso sulla base dei risultati strumentali. In particolare il campione di ABM A2 si differenziava per una maggiore complessità e una maggiore intensità aromatica generale (figura 31).

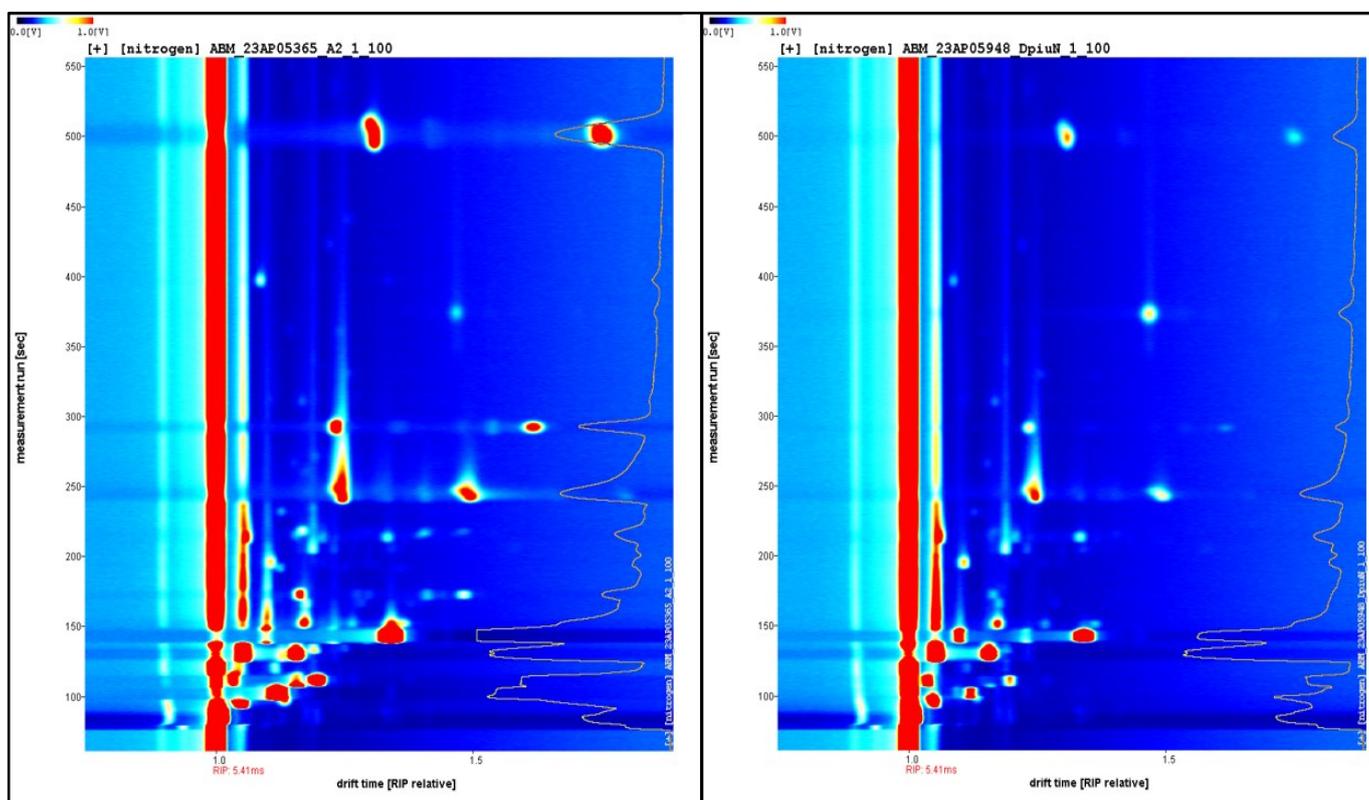


Figura 31. Confronto tra campioni di ABM A2 (a sinistra) e D+N (a destra).

Per verificare la presenza di distinzioni anche dal punto di vista sensoriale, è stato effettuato un test discriminativo triangolare (UNI U590A2520, 2001). Si tratta di uno dei test discriminanti più utilizzati per la rilevazione di differenze, che non prevede una loro quantificazione o caratterizzazione. Inoltre, è particolarmente adatto quando si dispone di un numero limitato di assaggiatori: ci si è avvalsi, quindi, di 30 giudici selezionati e formati.

A ogni membro del panel sono stati distribuiti tre campioni codificati diversamente, di cui due identici e uno diverso, e ogni assaggiatore aveva il compito di identificare il campione differente. Le triplete di campioni sono state presentate secondo ogni combinazione possibile, espressa dal blocco fattoriale, che in questo caso è pari a 6 (AAB, ABB, ABA, BBA, BAA, BAB). Per garantire un test bilanciato, è necessario che il numero totale di giudici sia un multiplo del blocco fattoriale.

I tre campioni sono stati presentati accompagnati da una scheda, nella quale venivano fornite le istruzioni per l'esecuzione del test e venivano indicati i codici dei campioni da esaminare, secondo la sequenza di assaggio prestabilita. I dati sono stati poi raccolti in una scheda generale, dove venivano riportati, accanto al numero di set, il corrispondente ordine di presentazione dei campioni, i relativi codici, la risposta fornita da ogni giudice e il totale di risposte esatte ottenute.

I parametri per la scelta del grado di sensibilità e i risultati ottenuti sono i seguenti:

- $\alpha = 0,001$: errore statistico di I specie, esprime la probabilità di concludere che esista una differenza percepibile, quando in realtà non è presente;
- $\beta = 0,3$: errore statistico di II specie, esprime la probabilità di concludere che non esista una differenza percepibile, quando in realtà è presente;
- $pd = 50\%$: indica la porzione dell'intera popolazione di assaggiatori che distingue i due prodotti;
- numero minimo di risposte esatte per concludere che esista una differenza significativa, sulla base dei gradi di sensibilità = 19;
- numero di risposte esatte ottenute = 19.

Dagli esiti ottenuti si conferma la presenza di differenze significative nel profilo aromatico degli aceti balsamici analizzati, riscontrabile sia dal punto di vista sensoriale che strumentale. Questo primo risultato attesta, quindi, la potenzialità dello strumento nella rilevazione di differenze analitiche generali, che rispecchiano quelle percepibili a livello organolettico.

9.2. Test di ordinamento

La maggior parte dei composti identificati nel profilo volatile di aceti balsamici è associabile a specifici sentori, come l'aroma fruttato attribuibile a esteri e chetoni, o l'odore di burro e mandorle caratteristico di molecole come acetoino e diacetile. Essendo presente una maggiore varietà di composti appartenenti alla macrocategoria aromatica del fruttato, si è deciso di sfruttare la loro diversa concentrazione per caratterizzare e differenziare i vari campioni di aceti balsamici, sulla base della relativa percezione sensoriale.

Lo scopo del test successivo è stato, dunque, la ricerca di correlazioni tra la quantificazione aromatica rilevata strumentalmente e quella sensoriale. Gli oggetti di valutazione sono stati quattro campioni di ABM, precedentemente descritti nel capitolo 8.2, che si prevede differiscano per una diversa intensità di aroma fruttato. Per valutare la diversa percezione olfattiva, è stato sfruttato un test di ordinamento (ISO/WD 8587, 2001), che permette di fornire indicazioni sull'ordine crescente o decrescente di intensità di un determinato attributo sensoriale, senza però quantificare l'ampiezza delle differenze tra i diversi campioni.

Il test è stato condotto servendo a 11 giudici i quattro campioni di ABM, codificati e serviti in ordine casuale, diverso per ogni membro del panel, che ha avuto il compito di ordinarli in funzione dell'intensità crescente del sentore fruttato percepito.

Dai relativi risultati strumentali, si prevede che l'ordine crescente secondo cui si dispongono i campioni, sulla base dell'intensità del descrittore fruttato, sia il seguente:

1. ABM A2 23AP05595
2. ABM D+N 23AP05596
3. ABM D+ 23AP06257
4. ABM A2 23AP06529

I punteggi ottenuti da ogni campione, secondo la posizione attribuitagli dai singoli giudici, sono stati sommati, ottenendo un valore quantitativo della relativa intensità aromatica percepita. In figura 32 sono esposte le medie e deviazioni standard dei punteggi attribuiti ai quattro campioni di ABM.

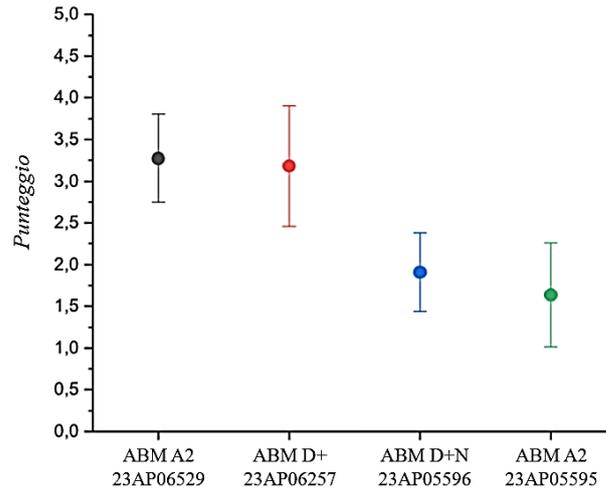


Figura 32. Media dei punteggi ottenuti dai quattro campioni di ABM con relative deviazioni standard (IC = 95%).

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti e i valori tabulati di riferimento con cui vanno confrontati:

- somma dei punteggi ABM A2 23AP05595: 18
- somma dei punteggi ABM D+N 23AP05596: 21
- somma dei punteggi ABM D+ 23AP06257: 35
- somma dei punteggi ABM A2 23AP06529: 36
- grado di sensibilità α : 0,05
- valore T del test di Friedman calcolato tramite la seguente formula:

$$T = \left[\frac{12}{n \times k(k + 1)} \sum_{i=1}^k R_i^2 \right] - 3xn(k + 1)$$

dove n = numero di giudici; k = numero campioni; R = somma dei punteggi di ogni campione; T = 14,236

- valore tabulato di riferimento sulla base dei gradi di libertà e gradi di sensibilità: 7,815

Il valore ottenuto è maggiore rispetto al valore tabulato, ciò conferma la presenza di differenze significative tra i campioni, rappresentate dall'ordine indicato dal panel.

I risultati del test a ordinamento hanno confermato la relazione tra i dati analitici ottenuti tramite GC-IMS e le percezioni sensoriali. L'intensità aromatica dei campioni individuata e discriminata dai giudici corrisponde alle diverse concentrazioni delle sostanze volatili rilevate dallo strumento: sulla base dell'intensità percepita, il campione di ABM A2 23AP06529 ha ottenuto punteggi maggiori, mentre il campione di ABM A2 23AP05595 si posiziona in fondo alla classifica, rispecchiando le quantificazioni ottenute strumentalmente.

La diversa percezione del sentore fruttato all'interno dei campioni di aceto balsamico analizzati può, però, essere riconducibile a una maggiore intensità aromatica generale. Come evidenziato dalle analisi strumentali, l'aumento della concentrazione dei composti responsabili del sentore fruttato è, nella maggior parte dei casi, direttamente proporzionale all'aumento generale della concentrazione delle varie molecole aromatiche.

Un secondo test a ordinamento è stato condotto su quattro campioni di aceto balsamico, che presentavano simili quantità di acetato di isoamile e acetato di etile, e differivano per le concentrazioni dei restanti composti responsabili del sentore fruttato. Questa ultima indagine è stata necessaria per verificare l'influenza delle due molecole nella determinazione dell'aroma dell'aceto. L'acetato di isoamile e l'acetato di etile sono, infatti, gli esteri acetici più presenti all'interno della frazione volatile del prodotto: si suppone, quindi, che siano i principali responsabili delle caratteristiche fruttate dell'aceto balsamico.

Il test è stato svolto allo stesso modo del precedente, in questo caso condotto da 22 giudici selezionati. Sono stati presi in considerazione due campioni di ABM A2, un campione di ABM D+N e un campione di ABM della categoria D+. Di seguito sono presentati i confronti strumentali degli aceti balsamici condotti tramite *Gallery plot* (figura 33) e i valori di intensità rilevata per ciascuno spot considerato (tabella 5).

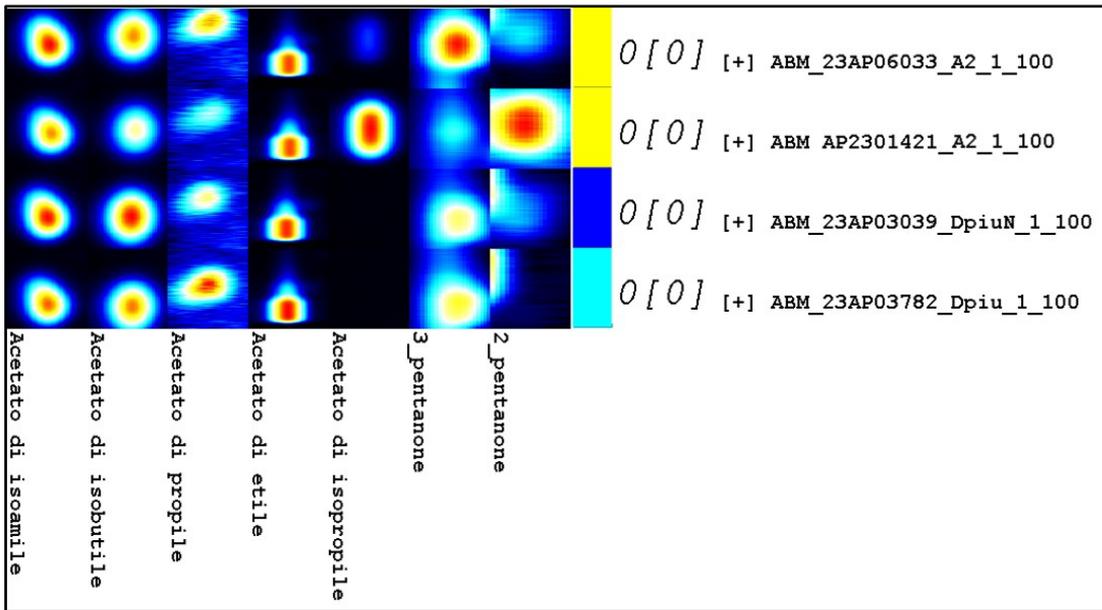


Figura 33. Confronti strumentali di ABM sulla base della concentrazione di composti responsabili dell'aroma fruttato.

Campioni	Intensità segnale spot [V]						
	Acetato di isoamile	Acetato di isobuttile	Acetato di propile	Acetato di etile	Acetato di isopropile	3-pentanone	2-pentanone
ABM A2 23AP06033	1,647	1,184	0,119	4,979	0,575	0,985	0,183
ABM A2 23AP01421	1,567	0,903	0,084	4,956	2,387	0,423	0,361
ABM D+N 23AP03039	1,647	1,343	0,103	5,093	0,038	0,693	0,222
ABM D+ 23AP03782	1,583	1,204	0,142	5,118	0,029	0,758	0,092

Tabella 5. Intensità di segnali derivanti da composti responsabili dell'aroma fruttato, relativi a quattro campioni di ABM.

Per l'elaborazione dei dati è stato utilizzato nuovamente il test di Friedman: di seguito sono riportati i risultati ottenuti e i valori tabulati di riferimento con cui vanno confrontati:

- somma dei punteggi ABM A2 23AP06033: 58
- somma dei punteggi ABM A2 23AP01421: 54
- somma dei punteggi ABM D+N 23AP03039: 54
- somma dei punteggi ABM D+ 23AP03782: 54
- grado di sensibilità α : 0,05
- valore T del test di Friedman calcolato: 0,32
- valore tabulato di riferimento sulla base dei gradi di libertà e gradi di sensibilità: 7,815

Il valore ottenuto è minore del valore tabulato, ciò indica la mancanza di differenze significative percepibili tra i campioni.

Quest'ultimo test ha evidenziato, quindi, la difficoltà nel discriminare campioni di aceto balsamico aventi simili concentrazioni di acetato di etile e acetato di isoamile, ordinandoli sulla base dell'intensità aromatica percepita. A pari concentrazioni di acetato di etile e acetato di isoamile, corrisponde una percezione quantitativa dell'aroma fruttato altrettanto simile. I due esteri, dunque, possono essere considerati come principali responsabili del sentore fruttato all'interno del profilo volatile di aceti balsamici. Infatti, a parità di concentrazioni di tali composti, la variazione nella quantità di altre molecole aromatiche, come chetoni, acetato di isobutile o acetato di isopropile, non influisce significativamente sulla percezione sensoriale.

L'acetato di etile e l'acetato di isoamile sono composti derivanti principalmente dalle materie prime, originati dalla sintesi microbica a opera di lieviti nei processi di vinificazione. Si può affermare, quindi, che le caratteristiche aromatiche del mosto d'uva di partenza o del vino utilizzato per la produzione di aceto incidano notevolmente sull'aroma fruttato del prodotto finito, più di quanto non influisca la quantità di mosto utilizzato, unica discriminante tra le categorie di ABM confrontate.

CONCLUSIONI

In campo alimentare l'analisi dei profili volatili di diversi prodotti ha sempre presentato numerose applicazioni e vantaggi. Negli anni le metodologie e strumentazioni utilizzate si sono evolute, garantendo migliori prestazioni ed elevate sensibilità: la tecnologia GC-IMS ne è un esempio.

Questa si è rivelata efficace nello studio della frazione volatile di Aceti Balsamici di Modena IGP, contraddistinti da un complesso e caratteristico profilo aromatico. Grazie alla sua elevata sensibilità, lo strumento *Flavourspec*® ha permesso la rilevazione e identificazione di molecole volatili caratterizzanti, quali principalmente esteri acetici e chetoni.

Sfruttando le varie funzioni fornite dal software di analisi annesso, è stato possibile effettuare confronti tra campioni di aceti balsamici nell'intento di caratterizzarli e raggrupparli nelle varie classi merceologiche di appartenenza, quali A2, D+ e D+N, sulla base del relativo profilo volatile. Lo studio tramite PCA ha evidenziato la presenza di significative differenze tra campioni appartenenti alle stesse categorie di ABM, che hanno reso impossibile una chiara discriminazione dei prodotti, i cui profili aromatici non rispecchiavano le distinzioni merceologiche. La presenza di tali differenze è attribuibile a diversi fattori, quali la varietà di materie prime o lo stesso metodo produttivo. Nella sua interezza, quindi, la frazione volatile non è risultata un parametro sufficientemente discriminante per tali categorie di prodotti.

Risultati più apprezzabili sono stati ottenuti da confronti tra aceti balsamici caratterizzati da periodi di invecchiamento significativamente diversi: sono stati rilevati profili volatili più complessi appartenenti a prodotti che hanno subito una maturazione di almeno tre anni, quali ABM A+, che si distinguevano da aceti più "giovani", contraddistinti da profili aromatici più semplici e piatti.

I successivi test sensoriali sono stati fondamentali per l'individuazione di correlazioni tra le rilevazioni strumentali e le percezioni sensoriali. Semplici test triangolari e di ordinamento hanno permesso la discriminazione di aceti balsamici, che presentavano nette differenze dal punto di vista strumentale. Affidandosi a un panel di giudici selezionati, i prodotti sono stati distinti e ordinati sulla base dell'intensità di specifici sentori, rispecchiando i risultati ottenuti tramite la strumentazione GC-IMS.

Inoltre, grazie all'identificazione delle singole sostanze, è stato possibile attribuire la percezione dell'aroma fruttato, caratteristico descrittore aromatico dell'aceto balsamico, alla presenza di specifiche molecole, quali acetato di etile e acetato di isoamile, riconosciute come principali responsabili di tale sentore.

È possibile, quindi, attestare la potenzialità dello strumento *Flavourspec*® nella caratterizzazione aromatica di aceti balsamici, capace di distinguerli sulla base della relativa frazione volatile, le cui differenze possono essere individuate anche a livello sensoriale, ottenendo risultati corrispondenti a quelli strumentali.

Agendo sui parametri di pretrattamento e separazione cromatografica, è possibile sviluppare nuovi metodi di analisi su aceti balsamici, con la possibilità di ottenere una migliore caratterizzazione e risultati più soddisfacenti. Si auspica, infine, lo sviluppo di sistemi per ovviare ai difetti riscontrati nello strumento, quali la mancanza di una funzione per il confronto automatico di cromatogrammi completi tramite PCA, e una funzione per la sottrazione automatica di segnali derivanti dai bianchi. Sono necessari, quindi, ulteriori studi per sfruttare al meglio le potenzialità dello strumento.

BIBLIOGRAFIA

- [1] LEGGE 12 dicembre 2016, n. 238, Disciplina organica della coltivazione della vite e della produzione e del commercio del vino;
- [2] Hailu Simon, S. Admassu, K. Jha, "Vinegar production technology—An overview", *Beverage Food World* 2: 29-32, 2012;
- [3] Nickol G.B., "Vinegar", *Microbial Technology*: 155-172, 1979;
- [4] Sengun Ilkin Yucel, *Acetic acid bacteria: Fundamentals and food applications*, CRC Press, 2017;
- [5] Trček Janja, Nuno Pereira Mira, Laura R. Jarboe, "Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid", *Applied microbiology and biotechnology* 99: 6215-6229, 2015;
- [6] Wu Xuefeng et al., "Producing acetic acid of *Acetobacter pasteurianus* by fermentation characteristics and metabolic flux analysis", *Applied biochemistry and biotechnology* 186: 217-232, 2018;
- [7] Dwivedi Mitesh, "*Gluconobacter*", *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*: 521-544, 2020;
- [8] Zamora Fernando, "Biochemistry of alcoholic fermentation", *Wine chemistry and biochemistry*, New York, Springer New York: 3-26, 2009;
- [9] Romano Patrizia and Giovanna Suzzi, "Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts", *Journal of Applied Bacteriology* 75(6): 541-545, 1993;
- [10] Rosca Irina et al., "An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation", *Brazilian journal of microbiology* 47: 949-954, 2016;
- [11] Mamlouk Dhouha and Maria Gullo, "Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation", *Indian journal of microbiology* 53: 377-384, 2013;

- [12] Gomes Rodrigo José et al, "Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications", *Food technology and biotechnology* 56(2): 139-151, 2018;
- [13] Pokalwar S.U., M.K. Mishra, A.V. Manwar, "Production of Cellulose by *Gluconacetobacter* sp.", *Recent research in science and technology* 2(7): 14-19, 2010;
- [14] Giudici Paolo, Federico Lemmetti, Stefano Mazza, *Balsamic Vinegars*, Springer Cham, 2015;
- [15] REGOLAMENTO (CE) n. 813/2000 del Consiglio del 17 aprile 2000, relativo alla registrazione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine nel quadro della procedura di cui all'articolo 17 del regolamento (CEE) n. 2081/92;
- [16] PROVVEDIMENTO 15 maggio 2000, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta "Aceto balsamico tradizionale di Modena";
- [17] REGOLAMENTO (CE) n. 583/2009 della Commissione del 3 luglio 2009, recante iscrizione di una denominazione nel registro delle denominazioni d'origine protette e delle indicazioni geografiche protette [Aceto Balsamico di Modena (IGP)];
- [18] PROVVEDIMENTO 13 aprile 2023, Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste, Modifica non minore del disciplinare di produzione della IGP «Aceto Balsamico di Modena»;
- [19] Perez-Hurtado P. et al., "Direct analysis of volatile organic compounds in foods by headspace extraction atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 31(22): 1947-1956, 2017;
- [20] Wilson Alphus D., Manuela Baietto, "Applications and advances in electronic-nose technologies", *sensors* 9(7): 5099-5148, 2009;
- [21] Sparkman O. David, Zelda Penton, Fulton G. Kitson, *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*, Academic press, 2011;
- [22] Piggott John R., Stephanie J. Simpson, Simon A.R. Williams, "Sensory analysis", *International journal of food science & technology* 33(1): 7-12, 1998;

- [23] Bagna Novella, Braceschi Gian Paolo, Desimoni Federico, Odello Luigi, *Il Codice Sensoriale Aceto Balsamico di Modena*, Centro Studi Assaggiatori, 2020;
- [24] Lalou Sofia et al., "Beyond traditional balsamic vinegar: Compositional and sensorial characteristics of industrial balsamic vinegars and regulatory requirements", *Journal of Food Composition and Analysis* 43: 175-184, 2015;
- [25] Chirife Jorge et al., "Physicochemical changes and sensory characterization of a balsamic vinegar dressing at different Brix", *Food and bioprocess technology* 4: 1505-1511, 2011;
- [26] Hillmann Hedda et al., "Sensomics analysis of taste compounds in balsamic vinegar and discovery of 5-acetoxymethyl-2-furaldehyde as a novel sweet taste modulator", *Journal of agricultural and food chemistry* 60(40): 9974-9990, 2012;
- [27] Gu Shuang et al., "Recent development of HS-GC-IMS technology in rapid and non-destructive detection of quality and contamination in agri-food products", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 144: 116435, 2011;
- [28] Tondini Francesca, HS-GC-IMS as rapid analytical tool for vinegar flavor fingerprinting, Università del Piemonte Orientale, UPO, 2023;
- [29] Corsini Lara et al., "Characterization by gas chromatography-olfactometry of the most odour-active compounds in Italian balsamic vinegars with geographical indication", *Food chemistry* 272: 702-708, 2019;
- [30] Del Signore Antonella, "Chemometric analysis and volatile compounds of traditional balsamic vinegars from Modena", *Journal of Food Engineering* 50(2): 77-90, 2001;
- [31] Durán-Guerrero Enrique et al., "Evaluation of volatile aldehydes as discriminating parameters in quality vinegars with protected European geographical indication", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(12): 2395-2403, 2015;
- [32] Cirlini Martina et al., "HS-SPME/GC-MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing", *Food chemistry* 124(4): 1678-1683, 2011;

[33] Renault Philippe et al., "Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement", *International Journal of Food Microbiology* 207: 40-48, 2015;

[34] Plata C. et al., "Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts", *Food Microbiology* 20(2): 217-224, 2003;

[35] REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 872/2012 della commissione del 1° ottobre 2012, che adotta l'elenco di sostanze aromatizzanti;

[36] Rojas Virginia et al., "Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts", *International journal of food microbiology* 70(3): 283-289, 2001.

SITOGRAFIA

[37] Ponti, Ponti: dal 1787 il gusto della natura, <https://www.ponti.com/> [Consultato: 18-10-2023];

[38] International Labour Organization, ICSC 0907 – ISOPROPYL ACETATE, https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=0907&p_version=2 [Consultato: 18-10-2023].