



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

TITOLO DELLA TESI

La chimica nel bicchiere.  
Vini ossidati o ossidativi? Quando un "difetto" diventa eccellenza.

Relatore: Prof. Saverio Santi

Laureando: Simone Businello  
Matricola: 2000347

Anno Accademico 2022/2023



# Sommario

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>Capitolo 1 PRINCIPALI TIPOLOGIE DI VINI OTTENUTI CON METODI OSSIDATIVI .....</b>	<b>9</b>
1.1 Vini ottenuti con metodi ossidativi non fortificati .....	9
1.1.1 Vin Jaune .....	9
1.1.2 Vernaccia di Oristano e Malvasia di Bosa .....	10
1.2 Vini in stile ossidativo fortificati .....	11
1.2.1 Sherry .....	11
1.2.2 Marsala .....	14
1.2.3 Madeira .....	16
1.2.4 Porto .....	17
<b>Capitolo 2 I VINI FLOR.....</b>	<b>18</b>
2.1 I lieviti .....	19
2.1.1 Potere filmogeno.....	19
2.2 Meccanismi di formazione del biofilm .....	20
2.2.1 Modello di Ilmura.....	20
2.2.2 Modello di Martinez .....	22
2.2.3 Modello di Zara .....	22
2.3 Effetto della concentrazione di etanolo.....	23
<b>Capitolo 3 L’OSSIGENO.....</b>	<b>26</b>
3.1 Microorganismi e aria.....	26
3.1.1 Ossigeno e lieviti flor.....	27
3.2 Acetaldeide.....	28
<b>Capitolo 4 INVECCHIAMENTO .....</b>	<b>31</b>
4.1 Composti fenolici .....	31
4.1.1 Acidi fenolici.....	31
4.1.2 Flavonoli e Flavanoli .....	32
4.1.3 Antociani .....	32
4.1.4 Tannini .....	33
4.2 Legno, perché? .....	33
4.2.1 Composti fenolici nel legno .....	33
4.3 Reazioni dei tannini.....	34
4.4 Meccanismo ossidativo.....	34
4.5 Trasferimento di ossigeno nelle botti.....	35
4.6 Effetto dell’ossigeno sulle proprietà organolettiche.....	39
4.6.1 Variazione del colore.....	40

4.6.2	Variazione del profilo aromatico .....	40
4.7	Il sotolone .....	42
4.7.1	Ruolo dell'acido chetobutirrico .....	42
<b>CONCLUSIONI</b> .....		<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....		<b>47</b>

## INTRODUZIONE

Osservare l'effetto dello scorrere del tempo sui beni deperibili si riduce spesso all'osservazione dell'azione inesorabile dell'ossigeno. Nel mondo enologico, ad esempio, l'ossigeno è da sempre considerato uno dei peggiori nemici durante la fase di vinificazione poiché l'esposizione prolungata dei vini all'aria comporta spesso alterazioni indesiderate delle proprietà organolettiche. *Ossidativo* e *riduttivo* sono termini usati per descrivere due stili di vinificazione contrastanti. I processi sono ideologicamente e scientificamente opposti e ognuno ha un profondo impatto sugli aromi, i sapori e la consistenza del vino. Entrambi i termini si riferiscono alla maggiore o minore presenza di ossigeno durante la vinificazione. La vinificazione ossidativa mira a una maggiore, ma controllata, presenza di ossigeno, mentre la vinificazione riduttiva mira a completare la vinificazione con la minore influenza possibile dell'ossigeno.

I due aggettivi, “ossidato” ed “ossidativo” sono entrambi riconducibili al verbo “ossidare” e al processo di ossidazione. Tuttavia, in ambito enologico, vi è un'enorme differenza tra vino ossidato e vino ottenuto con metodo ossidativo. Per quasi tutti i vini, il primo caso è un difetto indesiderato, nel secondo caso, e sono pochissimi gli esempi, è un metodo desiderato, complesso e prezioso: il naturale processo chimico che accade ai principali costituenti del vino quando vengono a contatto con l'ossigeno, sia prima dell'imbottigliamento sia durante il periodo in cui il vino rimane in bottiglia. Affrontare questo processo naturale diventa una sfida affascinante e dagli esiti non scontati, soprattutto nei vini che devono durare negli anni. Gaspare Buscemi, un padre dell'enologia italiana, socio fondatore e tessera n° 7 degli Assoenologi, lo ha affrontato tra i primi sin dagli anni '50. La sintesi del pensiero di Gaspare è: *“Quando il vino è cultura, il tempo è la misura della qualità”* . La sua “ossidazione estrema” da uve di verduzzo 1988 “è una lenta ossidazione, che dura da allora dovuta allo scambio gassoso attraverso un tappo di sughero meno ermetico perché non bagnato dal vino”.



Il verduzzo sembra aver cambiato la sua natura in uno sherry o in un marsala, dei quali possiede tutta la gamma olfattiva: mallo di noce, fiori secchi, caramello bruciato, dattero, liquirizia, frutta secca, erbe medicinali. In bocca è ancora fresco e sapido, avvolgente e di una persistenza senza fine, ma soprattutto è un vino da soli 10,5% **(1)**.

Alcuni metodi di vinificazione tentano di aggirare il problema, lavorando “in riduzione” con accorgimenti tecnologici finalizzati a ridurre la presenza di ossigeno nelle varie fasi di lavorazione delle uve e dei liquidi. Oltre alla normale attenzione e pulizia nel processo, si utilizzano antiossidanti, come ad esempio l’anidride solforosa, da cui la dicitura “contiene solfiti” in etichetta. Tuttavia, per pochissime tipologie di vino, la sfida contro l’ossidazione è combattuta per “ossidazione estrema”, enfatizzandola e portandola al limite; in questi casi il successo è ottenuto in modo sorprendente **(2)**. Esistono straordinarie eccezioni, vini che fanno dell’esposizione controllata all’ossigeno il loro punto di forza acquisendo proprietà uniche e un grado di invecchiamento fuori dal comune, vini che derivano il loro nome proprio da quello che viene storicamente etichettato come il loro peggior nemico: è il caso dei vini ottenuti con metodo ossidativo o *vins de voile* in francese o *vino de flor* in spagnolo.

Si tratta di vini che rappresentano una nicchia estrema nel panorama enologico e permettono ad un vitigno di esprimere le sue potenzialità in modo inedito sviluppando sapori e profumi complessi, da apprezzare concedendosi un momento di profonda meditazione. Questi vini rappresentano, infatti, la realizzazione ultima del desiderio umano di avere il controllo sullo scorrere del tempo, da sempre prerogativa divina ma da ora riservata a chimici ed enologi, abili manipolatori, *récoltant manipulant*, dell’essenza ultima dello scorrere del tempo: l’ossigeno.

La storia e la cultura dei vini ottenuti con metodo ossidativo è avvincente. A seconda della tradizione enologica, una prima distinzione è quella fra vini ottenuti con metodi ossidativi, fortificati e non fortificati.

Per fortificazione si intende l’aggiunta di alcol, acquavite o mistella (un prodotto che si ottiene dalla miscela di mosto d’uva fermentato parzialmente o non fermentato, e acquavite di vino o alcol puro, di gradazione alcolica di 16-22 gradi) al mosto in fermentazione o al vino base già completamente fermentato: il liquido così ottenuto avrà un titolo alcolico elevato e, soprattutto, beneficerà di una stabilità molto maggiore con prospettive di maturazione e conservazione altrimenti inaccessibili. A questa categoria appartengono il Marsala, lo spagnolo Sherry, i portoghesi Porto e Madeira, i francesi Maury e Banyuls.

Oppure, questi vini possono svolgere l'intera vinificazione senza alcuna aggiunta di alcol, come il francese Vin Jaune, alcuni Sherry, la Malvasia di Bosa e la Vernaccia di Oristano tradizionali, che quindi non sottoposti ad alcun processo di fortificazione.

Caratteristica comune di Madeira, Porto e Sherry, e per alcuni aspetti del Marsala, è l'originaria destinazione al trasporto via mare. I Veneziani lo chiamassero *vin da viajo* (vino da viaggio) in quanto poteva conservarsi bene per molto tempo nelle loro navi.

Le origini del Madeira risalgono ai tempi dei grandi viaggi di scoperta nei quali le navi portoghesi solcavano gli oceani e utilizzavano le botti piene come zavorra: tornando dalle Indie, dopo aver subito il caldo dell'Equatore, il vino in stiva era migliore di quello di partenza; il Madeira non fa più il giro del mondo (*ronda*), oggi affina nelle *bodegas* dell'isola ma è comunque "torturato" da forte esposizione al calore che distruggerebbero qualsiasi vino.

Un altro vino "da viaggio" è lo Sherry, da una piccola porzione dell'Andalusia che da Jerez de la Frontera si affaccia sull'oceano. Già abbastanza forte per natura, per renderlo capace di "viaggiare" venivano fortificato con un distillato dello stesso vino, evolvendo poi a seconda della quantità di alcol aggiunto nelle diverse varietà. Alcune davvero particolari, che hanno qualcosa in comune con gli ossidativi non fortificati, ma ne parleremo meglio più sotto.

La storia del Porto è una storia influenzata dall'antico dominio inglese dei mercati del vino della valle del Douro, in Portogallo, fortificato perché potesse poi giungere indenne l'Inghilterra.

Legata ai mercanti inglesi è anche la storia del Marsala. Una tempesta del 1773 costrinse la nave di John Woodhouse ad attraccare nel porto della città dove intuì il potenziale del vino locale. Dopo averlo fortificato in alcune botti lo portò in Inghilterra, dove il successo fu tale che in pochi anni divenne un ricchissimo e primo importatore di Marsala. I primi Marsala assaggiati da Woodhouse erano molto probabilmente dei *perpetui*, prodotti a partire da una frazione vecchia di vino a cui si aggiungeva, man mano che se ne spillava dalle grandi botti, vino nuovo fino a colmare il contenitore. Un processo simile al metodo *soleras* spagnolo, che accese in Woodhouse la speranza di competere nel mercato dello Sherry e del Madeira. Tuttavia, l'approccio quasi industriale del processo di produzione del Marsala fortificato, ne svilì qualità e prestigio. Oggi, oltre all'eccellenza di alcuni Marsala Classici, si sta diffondendo la riscoperta del Marsala *pre-british*, un vino non fortificato, già di per sé piuttosto alcolico, maturato secondo lo stile del *perpetuo* (2).

La tecnica di "ossidazione controllata" è usata anche nei vini non fortificati. La patria di questi vini è senza dubbio lo Jura, regione francese i vini tipicamente di vitigno *savagnin* sono affinati in botti scolme (*fûts non ouillè*), ossia che non vengono colmate. Detti *Vin Jaune*, il più noto è senza dubbio l'AOC Chateau-Chalon. La storia risale al Medioevo quando i viticoltori della regione francese dello Jura scoprirono che l'esposizione prolungata all'aria conferiva al vino un sapore leggermente ossidato

ed un aroma intenso e complesso. I vini riposti ad invecchiare in *botti scolme*, infatti, sviluppavano un velo di lieviti sulla superficie, la cosiddetta *voile*, che permetteva un contatto controllato tra vino ed ossigeno, quindi di controllare l'acidità volatile e di far acquisire al vino caratteristiche organolettiche molto complesse, dovute in parte anche alla concentrazione per evaporazione (2).

Sebbene la regione dello Jura possa essere considerata la patria di questa tipologia di vini, essi vengono prodotti storicamente con successo in Spagna, dove i vini *rancio* sono autentiche testimonianze della tradizione spagnola e in Sardegna, con due delle pochissime tipologie di vini di *flor*, la Malvasia di Bosa e la Vernaccia di Oristano.

Recenti scoperte archeologiche hanno dimostrato che in Sardegna la vinificazione era diffusa anche prima dell'arrivo dei Fenici: una tradizione di tre millenni di storia. Inoltre, è stato associato il termine latino *vinum mirratum* (vino addizionato di mirra) e il termine sardo usato per definire il particolare sapore dei due vini in stile ossidativo, *murruai*. Un vino antichissimo, dall'affinamento favorito da microorganismi e non da fortificazioni e aggiunte, ma ancora non molto conosciuto dal grande mercato (2).

Oltre alla riscoperta del Marsala Perpetuo *pre-british*, oggi sempre più produttori si sono avvicinati a questa tecnica produttiva, ad esempio in Spagna i vini chiamati *rancio* (De Sol a Sol Airén Rancio di Esencia Rural), in Liguria (Un Bianco de La Felce), in Piemonte (Bianchdudui di Bera) (3).

Il processo di produzione di questi vini è particolarmente difficile poiché richiede una grande attenzione e cura durante tutte le fasi di lavorazione a partire dalla selezione delle uve fino alla gestione del velo di lieviti che non deve essere disturbato o contaminato poiché ciò causerebbe un deterioramento incontrollato del prodotto.

Nell'ambito di questa tesi, dopo un breve *excursus* sulle tipologie di vini ottenuti con metodo ossidativo in commercio e sui rispettivi metodi di produzione andremo ad approfondire il ruolo della *voile*, il meccanismo di formazione e la sua dipendenza dalla concentrazione di etanolo in soluzione. Approfondiremo poi il ruolo dell'ossigeno, il meccanismo di scambio dello stesso tra l'atmosfera e la soluzione idroalcolica attraverso la *voile* e le più moderne tecniche di micro-ossigenazione.

Ci soffermeremo ultimamente sulle caratteristiche organolettiche principali in particolar modo sul ruolo del sotolone (3-idrossi-4,5-dimetilfuran-2(5H)-one) e sul suo impatto sensoriale (4)(5).



# Capitolo 1

## PRINCIPALI TIPOLOGIE DI VINI OTTENUTI CON METODI OSSIDATIVI

### 1.1 Vini ottenuti con metodi ossidativi non fortificati

#### 1.1.1 Vin Jaune

Probabilmente il vino principe tra tutti i vini prodotti per esposizione controllata all'ossigeno. Viene prodotto nella regione francese dello Jura al confine con la svizzera, che vanta una grande tradizione vitivinicola. Gli ettari dedicati alle vigne sono circa 2000 e in larga parte situati a un'altitudine tra i 200 e i 400 metri sopra il livello del mare con terreni composti per lo più da una varietà argilla e calcare, che conferiscono alle uve delle forti note saline.

La produzione di questo vino prevede l'utilizzo delle sole uve dei vigneti Savagnin vitigno originario della regione Tirolese che mostra importanti similitudini con il Traminer.

Il processo di lavorazione risale al medioevo e prevede l'utilizzo di botti in legno da 228 litri che vengono mantenute scolme permettendo il contatto tra l'aria e la soluzione idroalcolica la cui superficie si ricopre di uno strato di lieviti aerobici che protegge il vino dall'ossidazione incontrollata moderando lo scambio di ossigeno (*Figura 1*).

La permanenza in botte spazia dai 6 ai 10 anni al termine dei quali avviene l'imbottigliamento nelle tradizionali bottiglie clavelin da 0,62 litri (la scelta volumetrica richiama simbolicamente il vino che resta alla fine della maturazione dopo l'evaporazione di quasi un terzo della quantità iniziale).

Il vino così ottenuto risulta estremamente secco, con un intenso color oro (da cui il nome). Presenta un gusto deciso con sentori di scorza di arancio, di frutta secca, di mandorla, di noce e di nocciola, con i quali si mescolano aromi di curry, di vaniglia, di zafferano.



*Figura 1: botte dimostrativa che consente di apprezzare la formazione del biofilm superficiale*

### 1.1.2 Vernaccia di Oristano e Malvasia di Bosa

Sebbene molto meno conosciuto rispetto ai vini presentati in precedenza, la Vernaccia di Oristano e la Malvasia di Bosa rappresentano due rari e straordinari esempi di vino ossidativo prodotto in Italia. Si tratta di un vino non fortificato simile allo sherry prodotto in Sardegna e raramente reperibile al di fuori dei confini nazionali.

La Vernaccia di Oristano DOC impiega uve di vitigno, per l'appunto, di vernaccia che viene coltivato in un comprensorio di circa venti comuni nei dintorni della città di Oristano, nella parte occidentale dell'isola.

Le uve vengono raccolte e pigiate in modo tradizionale e successivamente vengono fatte maturare in botti scolme in condizioni ossidative per tre o quattro anni sviluppando l'ormai noto *flor*.

Si ottiene un vino dallo spiccato aroma di nocciola e caramello con lievi sentori di muffa, sapore che ha una denominazione specifica in dialetto sardo ovvero "murrari".

Sebbene si tratti di un prodotto unico nel panorama enologico italiano la sua produzione è ai minimi storici: l'invecchiamento rappresenta infatti un'immobilizzazione di capitale importante tant'è che i produttori preferiscono convertire la produzione orientandola verso vini non invecchiati. Si tratta quindi di un prodotto sempre più raro e ricercato.

La Malvasia di Bosa DOC Riserva è un vino ossidativo da uve di vitigni a bacca bianca della storica regione della Planargia, in Sardegna. La Malvasia DOC di Bosa viene prodotta in maniera tradizionale, dalle note sensoriali raffinate e allo stesso tempo intense di nocciole e mandorle tostate

che si uniscono tra loro in maniera armonica ed equilibrata. Anche la tonalità giallo paglierino con riflessi dorati è un elemento importante e piacevole che completa la particolarità di questo vino.

L'origine del nome è da attribuirsi ad un vino che era prodotto a Malta, un prodotto di pregio commercializzato da Venezia. Dopo la conquista da parte degli Arabi dell'isola nell'870 i commerci si interruppero. I veneziani, quindi, contribuirono alla diffusione di questo vino, detenendo la licenza in esclusiva per il suo commercio nel 1248. Molti vitigni denominati Malvasia hanno spesso in comune soltanto il nome, derivante da una città greca del Peloponneso, Monembasia. La Malvasia nel tardo Medioevo divenne uno dei vini più famosi e rinomati, prodotti principalmente a Creta ed a Rodi. Fu già nel periodo bizantino che la Malvasia venne prodotta in Sardegna, ma solo in aree circoscritte alle colline della Planargia e alla zona campidanese di Cagliari. La versione Alvarega conferma le origini greche del vitigno poiché significa letteralmente “bianca greca”.

## **1.2 Vini in stile ossidativo fortificati**

### 1.2.1 Sherry

Lo *sherry* (Jerez in Spagna) è un vino piuttosto complesso, non solo nella produzione ma anche nella sua classificazione che va ben oltre la semplice definizione di vino fortificato, ovvero addizionato di distillati ad alta gradazione alcolica, prodotto originariamente nella città di Jerez della Frontera nel sud ovest della Spagna. A differenza del Vin Jaune francese le cui origini risalgono al medioevo, la storia dello sherry affonda le proprie radici in epoche ben più antiche: furono infatti i romani ad iniziare questa zona della Spagna alla produzione di un vino ad alta gradazione alcolica che potesse essere conservato per lungo tempo e trasportato fino alla capitale dell'impero dov'era molto apprezzato. Successivamente gli arabi introdussero i produttori locali all'utilizzo degli alambicchi da distillazione ponendo le basi per la fortificazione.

Per la produzione vengono impiegati prevalentemente tre vitigni, Palomino, Pedro Ximénez, e Muscatel, dei quali il primo ricopre il ruolo più importante essendo caratterizzato da una bassa acidità che favorisce la formazione dello strato di lieviti superficiale durante la fase di invecchiamento (*flor* in spagnolo).

La produzione dello sherry parte da uve raccolte tardivamente così da permettere una concentrazione naturale degli zuccheri negli acini per progressiva evaporazione dell'acqua qui contenuta e successivamente vinificate in bianco.

Gli sherry sono classificati in due principali categorie: *fino* e *oloroso*: i *fino* sono più delicati e con colore chiaro, secchi e con apprezzabile acidità, mentre gli *oloroso* sono più robusti, con colori più scuri, e sono disponibili sia secchi sia dolci.

In queste due grandi categorie sono raggruppati sette tipi diversi di sherry il cui grado di dolcezza è una scelta di ogni produttore. Gli sherry appartenenti alla categoria *fino* sono Manzanilla, Fino e Amontillado, mentre nella categoria *oloroso* vi sono Oloroso, Cream e Pedro Ximénez.

A questi si aggiunge il Palo Cortado, da molti considerato un membro della famiglia dei *fino*, mentre per altri costituisce una categoria a parte proprio perché le sue caratteristiche ricordano sia i *fino* sia gli *oloroso*.

Il vino può essere interamente invecchiato sotto il *velo di flor*, producendo gli sherry Fino e Manzanilla, oppure fortificato con aggiunta di alcol (ottenendo quindi un vino liquoroso più alcolico), che limita la crescita della *flor* e produce un invecchiamento ossidativo che dà luogo agli sherry Amontillado, Oloroso, Cream e Pedro Ximénez.

- *Manzanilla.*

Questo stile di sherry non fortificato appartiene alla famiglia dei *fino* ed è prodotto a Sanlúcar de Barrameda sulla costa atlantica, molto ricercato per la sua eleganza e delicatezza. Grazie al forte influsso delle correnti d'aria umide provenienti dall'oceano Atlantico, il Manzanilla è secco, caratterizzato da un piacevole accenno sapido e un gusto che si potrebbe definire “marino”. Il Manzanilla dipende dallo sviluppo della *flor*. A causa della sua estrema fragilità, molti produttori lo imbottigliano solamente al momento dell'ordine. Il Manzanilla viene servito preferibilmente fresco e una bottiglia aperta raramente si conserva per più di due giorni.

- *Fino.*

Sherry non fortificato dagli aromi raffinati e complessi, il Fino ha un colore pallido, gusto secco e forte, è considerato il più tipico stile di sherry che dipende dallo sviluppo della *flor* ed è più robusto e potente del Manzanilla. Una bottiglia aperta va consumata entro due o tre giorni.

- *Amontillado.*

Si tratta di sherry fortificato che matura in botte; dopo essere stato prelevato dalla *solera*, viene fortificato e posto in un barile dove maturerà senza la protezione della *flor*. In questo modo il vino aumenta la sua ossidazione e il suo colore diventa più scuro, esaltando gli aromi tostati e di nocciola. Gli Amontillado hanno un gusto semi-secco a causa dell'aggiunta di una piccola percentuale di Pedro Ximénez e pochi sono coloro che lo producono nella versione secco.

- *Palo Cortado.*

Uno sherry piuttosto raro e ricercato, per le sue qualità è spesso considerato un vino intermedio fra i *fino* e gli *oloroso*. Si tratta di un particolare stile di Amontillado secco che dopo avere maturato a

lungo sviluppa le qualità tipiche degli oloroso, cioè maggiore struttura, cremosità e concentrazione. Il Palo Cortado ricorda negli aromi l'Amontillado, mentre al gusto si avvicina più agli oloroso.

- *Oloroso.*

Sherry prodotto senza lo sviluppo della *flor* e pertanto fortemente esposto agli effetti dell'ossidazione che conferisce un colore molto scuro, aromi tostati e di frutta secca. Gli *oloroso* hanno un grado alcolico più elevato rispetto ai *fino*, tipicamente 18-20°, struttura robusta e maggiore concentrazione. La tendenza è di produrre Oloroso dal gusto dolce o semi-dolce e quelli secchi sono considerati una rarità. La dolcezza negli Oloroso è ottenuta aggiungendo quantità variabili di Pedro Ximénez.

- *Cream.*

Questo stile di sherry fu inizialmente creato appositamente per il mercato inglese ed è caratterizzato da una dolcezza maggiore degli Oloroso. La dolcezza dei Cream è ottenuta aggiungendo quantità elevate di Pedro Ximénez, variabile da produttore a produttore. I Cream sono piuttosto densi con aromi di cioccolato, liquirizia, confetture e frutta secca.

- *Pedro Ximénez.*

È uno sherry prodotto esclusivamente con uva Pedro Ximénez, diversamente dagli altri stili dove è il Palomino a rappresentare l'uva principale. I Pedro Ximénez sono molto densi, sciroposi e dolci, struttura robusta e aromi complessi di frutta secca. Il Pedro Ximénez è generalmente utilizzato per addolcire gli altri stili di Oloroso, tuttavia, sono molto apprezzati e venduti anche in purezza, in particolare per essere abbinati ai dessert (6).

La presenza della *flor* abbassa drasticamente l'acidità del vino e fa dello sherry florizzato uno dei vini più ricchi di aldeidi nel mondo. Alcuni studi hanno mostrato che per favorire la *flor*, il vino deve avere un tenore alcolico compreso tra 14,5% e 16%. La *flor* sotto il 14,5%, non forma lo strato ceroso protettivo e il vino si ossida a tal punto da divenire aceto. Al di sopra del 16%, non può sopravvivere e il vino diventa un Oloroso.

I vini destinati alla produzione di *fino* vengono fortificati fino a raggiungere i 15° alcolici, mentre quelli che diventeranno *oloroso* fino a 18°. I vini sono poi trasferiti in botti mantenute scolme e lasciati maturare un primo anno, consentendo all'ossigeno di entrare in contatto con il vino. In questa fase si forma, esclusivamente nelle botti di sherry fino, il *velo della flor*, che rimane stabile tra i 18° e i 22°C e ad una gradazione alcolica non superiore ai 16°. Anche in questo caso, la *flor* si nutre degli zuccheri residui del vino cambiando la sua composizione e al tempo stesso isolandolo dall'azione dell'ossigeno. L'azione isolante della *flor* non è però perfetta, pertanto il vino si ossida lentamente e

sviluppa i suoi particolari caratteri organolettici. Gli sherry *oloroso* invece sono fortificati a 18° gradi in modo da prevenire la formazione della *flor*.

A differenza dei vini non fortificati prodotti nello Jura, che vengono invecchiati per anni nella stessa botte, lo sherry viene invecchiato seguendo il metodo *soleras* consistente in una *piramide* composta da vari strati, le *criaderas*, le cui botti rimangono scolme per circa un terzo. Lo strato più vicino al terreno è chiamato *solera*, mentre quello più in alto, dove viene immesso il prodotto più giovane, si chiama *sobretalpa*. Ogni anno una parte del vino contenuto nello strato più in basso viene prelevato per l’imbottigliamento e il livello viene ripristinato con vino proveniente dallo strato superiore, mantenendo vivo lo sviluppo della *flor* (Figura 2). Il ripristino dalle *criaderas* superiori avviene introducendo il vino nella botte delicatamente e sempre sotto il film di *flor*, senza danneggiarlo.

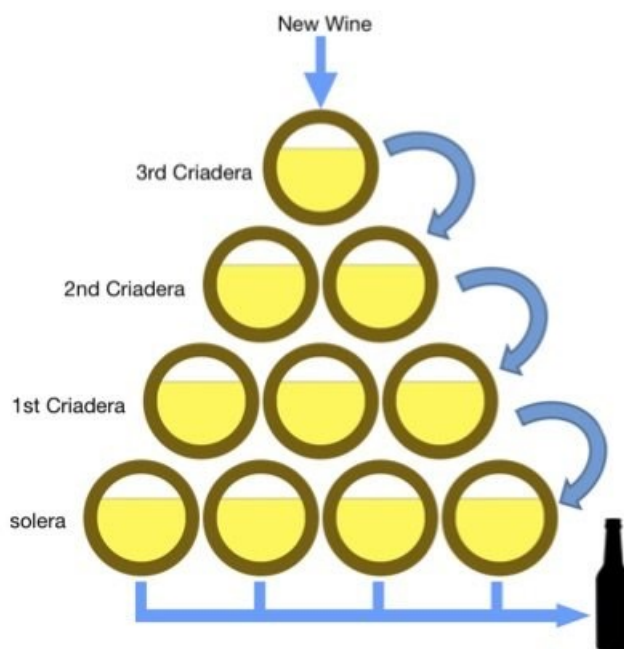


Figura 2: schema esemplificativo metodo soleras (<https://www.wineinbarrique.it/cose-il-metodo-solera/>).

### 1.2.2 Marsala

Il Marsala Vergine sistema “perpetuo” è prodotto con il tradizionale metodo *Soleras*, che consente di mantenere costanti nel tempo le caratteristiche dei Marsala, lasciando invecchiare insieme più annate della stessa tipologia di prodotto. Le tipologie vanno dal più giovane Fine al più vecchio Vergine passando per i Superiori Secco e Dolce.

Con il termine “perpetuo” si intende qualcosa che non ha fine. Prima dell’arrivo degli inglesi, sin dai tempi dei fenici, si produceva un vino naturale da uve provenienti da vigneti allevati ad alberello fenicio-punico, cioè senza guida, di Catarratto, Inzolia, Grillo e Catanese Bianca. La particolarità dei

suoli e del clima, assieme alle tecniche di coltivazione della vite e l'età dei vigneti (le vigne avevano in media molto più di 30 anni), determinavano l'eccellente maturazione delle uve facendo raggiungere ai vini gradazioni alcoliche tra 17 e 19°. La vinificazione con macerazione sulle bucce, energiche pressature e alte temperature, contribuivano ad ottenere mosti e vini ricchi di polifenoli ed estratti. La conservazione avveniva in botti di castagno e rovere. Al prelievo di una certa quantità di vino dalle botti, secondo la tradizione marsalese, corrispondeva un "rabbocco" con vini più giovani di vendemmie successive. Vino raro, era talmente sontuoso e alcolico che veniva conservato con cura e invecchiato nella "Riserva" di famiglia per le grandi occasioni.

Questa antichissima tecnica e tradizione fu messa in crisi dall'industrializzazione degli inglesi. Nonostante il difficile quadro, alcune famiglie marsalesi continuarono nella produzione di vino Perpetuo.

Le uve raccolte molto mature ma integre vengono macerate e pressate con forza al fine di estrarre dagli acini e dalle bucce almeno il 4-5% di polifenoli. Il mosto è poi vinificato senza le vinacce in contenitori di legno, la fermentazione alcolica parte con lieviti spontanei autoctoni. Il vino così ottenuto è inserito nel processo *perpetuo* esistente, oppure inizia un proprio percorso. Terminata la fermentazione, si presenta scomposto, ruvido, decisamente acido, alcolico e astringente. Le sostanze presenti, tuttavia, permettono al vino di durare nel tempo e proteggerlo. L'alcol è antimicrobico, i polifenoli sono antiossidanti ed antisettici per cui il vino non necessita di trattamenti di alcun tipo. Tra le sostanze presenti, le catechine, sono i polifenoli (tipici del vitigno) che creano l'imbrunimento del vino e ne facilitano la sua ossidazione controllata. Lo stesso vitigno a pochi chilometri di distanza da questa zona non sviluppa allo stesso modo questa peculiarità e non potrà dare vino perpetuo. Tutto concorre a fare partire da subito l'ossidazione, compresa l'attrezzatura in bronzo o rame, che ne è la caratteristica principale.

Le cantine si trovano quasi tutte al livello del suolo, non interrato, in quanto le escursioni termiche (da 15 a 26 C°) fanno parte del processo di affinamento. Generalmente sono abbastanza alte e orientate nord-sud per garantire la ventilazione attraverso grandi finestre tenute sempre aperte. I coperti sono realizzati con travi a vista, senza controsoffitto e con tetti in tegole di terracotta anch'esse a vista. I pavimenti, invece, sono generalmente in tufo per poter mantenere elevata l'umidità, se lunghi in leggera pendenza per favorire la circolazione d'aria anche in caso di assenza di vento.

Il Perpetuo non è previsto nella DOC Marsala, la denominazione riservata a vini fortificati. La sua tipologia non è oggi normata. È un vino alcolico ed estrattivo con colori accentuati, profumi terziari derivanti da macerazioni sulle bucce e sapori tipici di vini in stile ossidativi, un Marsala *pre-british*. Come per lo sherry, il mare con le sue brezze influenza la maturazione del vino e, sebbene non ci sia la *flor*, il sapore del Marsala Perpetuo è un misto di sapori speziati, maturi, erbacei e salati (8).

- *Marsala Fine.*

Grado alcolico 17 %, deve essere invecchiato minimo 1 anno nelle tre varianti Ambra (con l'obbligo di aggiungere almeno l'1% di mosto cotto), l'Oro e il Rubino (per i quali il mosto cotto è vietato). Secco, semisecco o dolce. Il vino è aromatico, speziato, ma non troppo elaborato.

- *Marsala Superiore.*

Grado alcolico 18 %, 24 mesi di affinamento in botte, disponibile in versione secco, semisecco e dolce. Bouquet di aromi ampio e complesso di agrumi canditi, anice, spezie.

- *Marsala Superiore Riserva.*

Un superiore particolarmente pregiato e strutturato che può avere un ulteriore affinamento in legno per esaltarne l'aromaticità: 48 mesi di affinamento in legno.

- *Marsala Vergine o Soleras.*

Il vino ha subito una decisa ossidazione, grazie al passaggio tra varie botti e altre annate sviluppa una elevata carica aromatica. 5 anni di affinamento, grado alcolico 18%, vietata l'aggiunta di mosto cotto, mosto concentrato o mistella. I profumi sono intensi, pungenti, floreali, con spezie, liquirizia e cannella. L'aroma fruttato è diventato caramellato, mieloso, ma mai dolce o stucchevole, con zucchero inferiore a 40 g/L. leggermente sapido.

- *Vergine Stravecchio/ Riserva o Soleras Stravecchio/Riserva.*

Come il precedente, 10 anni di invecchiamento.

### 1.2.3 Madeira

Il Madeira è il vino fortificato prodotto sull'isola di Madeira fin dal 1500, attraverso un processo di ossidazione in cui il vino viene letteralmente cotto. Il metodo di vinificazione consiste nel sottoporre il vino per almeno tre mesi a temperature di 45-50 °C, utilizzando contenitori di pietra costruiti per questo scopo chiamati *estufas* (stufe), divisi in compartimenti riscaldati con aria calda derivata da un sistema di stufe. Questo processo ha lo scopo di simulare gli effetti subiti dal vino contenuto nelle botti che venivano trasportate per lunghi viaggi in nave, attraversando anche zone a clima tropicale. Gran parte di aromi e sapori caratteristici del madeira è dovuto a questa pratica, che comporta una accelerazione del processo di maturazione del vino. Inoltre, il vino viene tenuto a contatto con l'aria, provocando un ulteriore processo di ossidazione.



#### 1.2.4 Porto

Il Porto è un vino complesso, prodotto in undici diversi stili. È un vino fortificato, con l'aggiunta di una certa quantità di acquavite durante la sua produzione. Tradizionalmente, le uve per la produzione del Porto venivano pigiate per diverse ore con i piedi in vasche di cemento dette *lagares*, un'operazione che consente di estrarre notevoli quantità di colore dalle bucce, evitando la rottura dei vinaccioli e delle bucce che possono macerare con il succo in modo da estrarre anche le loro sostanze aromatiche (tannini e polifenoli). Pochi produttori utilizzino ancora questo metodo per i loro Porto migliori; tuttavia, oggi questa procedura viene riprodotta mediante l'ausilio di macchine che prevedono la pigiatura in aspirazione e depressione, evitando così la rottura delle bucce e il riscaldamento del succo. Dopo circa 24 ore di macerazione delle bucce nel mosto, inizia la normale fermentazione. Quando circa la metà degli zuccheri è stato convertito in alcol, la fermentazione viene interrotta mediante l'aggiunta di acquavite d'uva fino a ottenere un grado alcolico di circa 20 %. L'aggiunta di alcol interrompe l'azione dei lieviti lasciando una considerevole quantità di zuccheri che conferiranno la tipica dolcezza al vino. Le fasi successive della produzione dipendono dallo stile di Porto da creare e in ognuna di queste si adotteranno le specifiche pratiche di maturazione previste per ogni stile.

I Porto maturati in grandi contenitori sono destinati ad un consumo più o meno immediato e non necessitano di ulteriore affinamento in bottiglia. I Porto maturati prevalentemente in bottiglia trascorrono solamente un breve periodo di tempo in botti di legno e quindi sono imbottigliati e fatti maturare per lunghi periodi, anche decine di anni. In bottiglia, negli anni tendono a formare notevoli quantità di sedimenti, pertanto è sempre necessaria un'opportuna decantazione. Il Porto più rappresentativo e più ricercato di questa categoria è il *Porto Vintage*, prodotto esclusivamente in annate eccezionali e in quantità piuttosto limitate. Le uve utilizzate per la loro produzione provengono dalle migliori zone del Douro, un fattore che aumenta anche la loro qualità. I *Porto Vintage* sono maturati in botte per due anni e poi imbottigliati; da questo momento inizia la loro vera evoluzione. I *Single Quinta Vintage Port* rappresentano lo stile qualitativo più elevato di tutti i Porto. Con il termine Quinta, il cui significato letterale è fattoria, si indica un solo vigneto o una sola tenuta; pertanto, questi Porto sono prodotti esclusivamente con le uve raccolte in vigneti di particolare pregio. I *Single Quinta Vintage Port* sono prodotti in quantità ancora più limitate dei vintage e sono più rari e costosi (7).

# Capitolo 2

## I VINI FLOR

Fra i molteplici inconvenienti di tipo microbiologico durante la vinificazione vi è una grave alterazione, la formazione della *fioretta*, o *fiore di vino*, una sorta di velo biancastro di aspetto polveroso costituito da colonie di lieviti fra cui la *Candida Mycoderma*, ma anche da altri lieviti del genere *Pichia* e *Hansenula*., La *fioretta* si forma in vini giovani di bassa gradazione alcolica, a contatto con l'aria, conservati in recipienti non colmati o tappati male e non adeguatamente solfitati. I batteri della *fioretta*, infatti, si riproducono grazie al contatto del vino con l'aria. Per evitare l'inconveniente, i contenitori devono essere sempre colmi, igienizzati e a una temperatura costante che non superi mai i 15°. Se sulla superficie si forma un sottile velo chiaro, col tempo tende a diventare più grigiastro, fino a frammentarsi in tanti piccoli "petali da cui il nome *fiore di vino*. Lo spunto e l'acescenza, due fasi progressive della presenza del forte e pungente odore di aceto è dovuto alla trasformazione dell'alcol etilico in acido acetico. Oltre a essere vietato per legge oltre una certa percentuale, rendono il vino imbevibile.

Al contrario, la vinificazione sotto *flor*, un biofilm composto da aggregazioni di ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae* del tipo *bayanus*, *rouxi* e altri, isola il vino dal contatto diretto con l'aria e lo protegge da un'ossidazione deleteria. Infatti, mentre la quasi totalità dei lieviti fermentativi rallenta la sua azione, il processo di trasformazione degli zuccheri contenuti nel mosto in etanolo, anidride carbonica e calore, fino a morire a causa dell'aumento del tenore alcolico del mosto che sta diventando vino. Muoiono sia perché si esaurisce la loro fonte di nutrimento sia perché l'alcol prodotto della loro sintesi diventa un contesto ostile e letale. Ci sono alcuni ceppi, invece, che hanno una "doppia vita" perché hanno subito una mutazione genetica e possiedono un gene, classificato FLO11. La prima è la normale attività fermentativa anaerobica, durante la quale essi trasformano gli zuccheri in alcol etilico e anidride carbonica. Al termine del processo, i lieviti muoiono a causa dell'alcol che loro stessi hanno prodotto, precipitando sul fondo. La modifica del metabolismo dei ceppi *flor* trasforma l'azione in ossidativa anaerobica: avviene dunque una sorta di "resurrezione" e di risalita, in cui i lieviti utilizzano l'ossigeno e si nutrono dello stesso alcol che avrebbe dovuto ucciderli: da anaerobici diventano aerobici, da consumatori di zucchero diventano capaci di metabolizzare l'alcol ed aggregarsi per formare un biofilm.

Consumando alcol, la *flor* ossida l'etanolo in acetaldeide, un precursore aromatico che legandosi ad altre molecole (tra cui il sotolone) produce aromi dai tipici sentori di noce, di mandorle o nocciole tostate, zafferano, genziana, mela al forno, eterei e di mirrato, di scorze d'arancia e di albicocche secche, di miele amaro, di spezie come la cannella e la vaniglia, e nelle annate più vecchie anche profumi di funghi secchi, di muschio e di sottobosco. Durante la fase di invecchiamento a botte scolma, la *flor* protegge la soluzione idroalcolica sottostante dall'azione incontrollata dell'ossigeno che porterebbe ad un vino eccessivamente ossidato.

## 2.1 I lieviti

I lieviti responsabili della formazione del biofilm superficiale appartengono alla famiglia *Saccharomyces*: si tratta di lieviti che rivestono da sempre un ruolo fondamentale nell'industria alimentare. Vengono, infatti, utilizzati per la panificazione dove sono responsabili della lievitazione, oltre che per la produzione di vini e birre ed altre bevande fermentate (9).

Si tratta in particolar modo di lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e il ben più raro *Saccharomyces beticus*, quest'ultimo isolato prevalentemente dai veli sviluppatisi su vini sherry, naturalmente presenti sulle bucce degli acini. Sebbene naturalmente presenti sulle uve, una versione selezionata di questi lieviti viene solitamente introdotta in maniera controllata durante le prime fasi della vinificazione, comunque prima dell'avvio della fermentazione, in modo tale da ottenere una popolazione di lieviti selezionati in grado di resistere alle condizioni ambientali in modo ottimale e prevalere su lieviti indigeni indesiderati come i ben noti *Brettanomyces* responsabili di deformazioni sensoriali indicate, nel complesso come "nota brett", e riconducibili a odori simili a cane bagnato, orina di topo, stalla, etc. (10).

La straordinaria peculiarità di questi lieviti risulta essere la loro capacità, in particolari condizioni ambientali, quali la carenza di nutrienti come fonti azotate e zuccheri, di formare aggregati cellulari, più o meno stabili nel tempo, con un solo scopo: consentire alla popolazione cellulare di superare lo stato di stress permettendo al lievito di tollerare condizioni colturali fortemente selettive come quelle riscontrabili al termine del processo di fermentazione.

### 2.1.1 Potere filmogeno

La capacità di sviluppare di sviluppare alla superficie dei mezzi liquidi con formazione di veli è prerogativa di lieviti dei generi *Pichia*, *Hansenula* e *Candida* che, nei vini sono i principali responsabili della fioretta (11). Allo stesso modo altri lieviti possiedono la medesima capacità, tra i quali lo stesso *Saccharomyces cerevisiae*, molti ceppi del quale danno origine ad una fase di sviluppo

in superficie al termine della fermentazione alcolica. I lieviti coinvolti nella formazione della *voile* sono pertanto lieviti dei ceppi *Saccharomyces* in grado sia di svolgere la fermentazione alcolica sia di risalire in superficie per dare luogo alla formazione del biofilm superficiale. Per assolvere a queste due importanti funzioni i lieviti *flor* devono essere in grado di adattarsi ai numerosi fattori di stress cui sono sottoposti sia in fermentazione che in fase di affinamento (12)(13).

Nella fase post-fermentativa l'alcol etilico viene prima ossidato ad acetaldeide ed in seguito ad acido acetico (14). Nel corso della fermentazione e del successivo affinamento, i lieviti *flor* passano da un mezzo colturale ricco di fonti carboniose fermentescibili, come il mosto, a un mezzo carente o privo di zuccheri ma ricco di etanolo, come il vino. L'adattamento a condizioni nutrizionali e ambientali così differenti è associato allo *shift diauxico*, ovvero al passaggio da un metabolismo di tipo anaerobio-fermentativo ad uno di tipo aerobio-ossidativo (9).

Nel corso dell'affinamento, i lieviti *flor* producono importanti quantità di acetaldeide in seguito all'ossidazione dell'etanolo via alcol deidrogenasi (9), (11). Diversi autori indicano la concentrazione di etanolo come fattore determinante per la formazione e mantenimento del biofilm argomentando, che verrà approfondito nelle sezioni successive.

## 2.2 Meccanismi di formazione del biofilm

Nel corso degli anni sono stati descritti diversi meccanismi per la formazione del velo sulla superficie dei vini durante l'affinamento in botte scolma. Le ipotesi più accreditate coinvolgono aspetti come la diminuzione del peso specifico delle cellule batteriche, l'aumento di idrofobicità di superficie e la diminuzione di densità cellulare dovuta all'inglobamento di biossido di carbonio.

### 2.2.1 Modello di Ilmura

Il modello seguente, proposto da Ilmura *et al.* (1980) identifica nell'aumento di idrofobicità di superficie, determinata da un incremento di acidi grassi insaturi sulla superficie cellulare, la causa della risalita delle cellule in superficie.

Partendo dall'osservazione di una più spiccata affinità con gocce d'olio presentata dai lieviti filmogeni rispetto ai lieviti non filmogeni, è stato dapprima individuato un metodo per la determinazione del grado di idrofobicità basato sul grado di ripartizione delle cellule dei vari lieviti in un sistema a due fasi (Figura 3) (15).

TABLE II. TRANSFERENCE OF YEAST CELLS  
IN A BUFFER SOLUTION-ORGANIC SOLVENT,  
TWO PHASE SYSTEM

Solvent	Degree of transference <sup>a</sup>	Solvent	Degree of transference <sup>a</sup>
<i>n</i> -Pentane	++	<i>n</i> -Butanol	+
<i>n</i> -Hexane	++	<i>n</i> -Amyl alcohol	+
<i>n</i> -Heptane	++	<i>n</i> -Hexanol	++
<i>n</i> -Octane	++	<i>n</i> -Heptanol	+++
<i>n</i> -Decane	++	<i>n</i> -Octanol	+++
<i>n</i> -Undecane	++	Benzene	+++
<i>n</i> -Dodecane	+++	Toluene	++++

<sup>a</sup> Transference of cells from McIlvaine buffer (pH 3.5) to the organic solvent in two phase system.

Symbols, +, show the degree of transference as follows; + little, ++ moderate, +++ much and ++++ very much.

Figura 3: tabella tratta da Ilmura et al. (1980) che mostra il grado di ripartizione delle cellule in un sistema a due fasi al variare della fase organica

Per la stima del grado di ripartizione è stata misurata la densità ottica iniziale e finale della soluzione acquosa ricorrendo alla seguente relazione  $H.D. (\%) = 100(I - \frac{I}{R})$  dove I ed R sono rispettivamente la densità ottica della soluzione buffer iniziale e residua. Il grado di idrofobicità misurato con il suddetto metodo è poi stato impiegato per mostrare la differenza tra i lieviti filmogeni e non (Figura 4).

TABLE III. EFFECT OF CARBON SOURCE ON PELLICLE FORMATION AND CELL PRECIPITATION AND HYDROPHOBICITY IN VARIOUS YEASTS

Strain	Carbon source					
	Glucose			Ethanol		
	Pell <sup>a</sup>	Sed <sup>b</sup>	H.D. <sup>c</sup> (%)	Pell <sup>a</sup>	Sed <sup>b</sup>	H.D. <sup>c</sup> (%)
<i>Sacch. bayanus</i> FY-3	++	++++	74.5	++++	+	93.4
<i>Sacch. oviformis</i> W-208	++	++++	74.3	++++	+	86.5
<i>Sacch. fermentati</i> WF-107	+	++++	71.2	+++	+	84.0
<i>Sacch. cerevisiae</i> IAM 4274	--	++++	58.0	--	+	58.5
<i>Sacch. cerevisiae</i> IAM 4175	--	++++	49.1	--	+	47.2
Sherry yeast Jerez No. 5	+.	+++	69.8	+++	+	89.1
<i>Tor. colliculosa</i> IFO 0663	+	+++	67.7	+++	+	86.5
<i>Han. anomala</i> I-2-1	++++	+	83.3	++++	++	82.4
<i>Pich. membranaefaciens</i> IV-5-1	++++	+	89.2	++++	++	94.3
<i>Can. mycoderma</i> IFO 0842	+++	++	72.3	++++	+	85.6

<sup>a</sup> Pellicle formation.

<sup>b</sup> Cell sediment.

Symbols, -- and +, show the degree of pellicle formation and cell sediment as Table I.

<sup>c</sup> Hydrophobic degree of cell surface.

Figura 4: tabella tratta da Ilmura et al. (1980) mostrante gli effetti dell'idrofobicità e della fonte carboniosa sulla formazione del biofilm

Dai risultati è infatti possibile apprezzare come i lieviti responsabili della formazione del film presentino un'idrofobicità maggiore rispetto ai lieviti che non danno luogo alla formazione del velo. È possibile anche notare la dipendenza della formazione della pellicola dalla variazione di idrofobicità causata dalla differente fonte carboniosa messa a disposizione dei lieviti.

Inoltre, la presenza di glucosio come sola fonte di carbonio inibisce il metabolismo ossidativo sfavorendo la formazione del velo come verrà in seguito approfondito da Martinez *et al.* (1997). Si riscontra la presenza di agenti di supporto che permettono alle cellule di fluttuare nel mezzo, necessaria per la formazione del biofilm. Se dovesse venire meno la presenza di fattori di supporto le cellule precipiterebbero sul fondo impossibilitando quindi la formazione del velo. Gli autori suggeriscono essere ancora una volta l'idrofobicità il principale fattore di supporto.

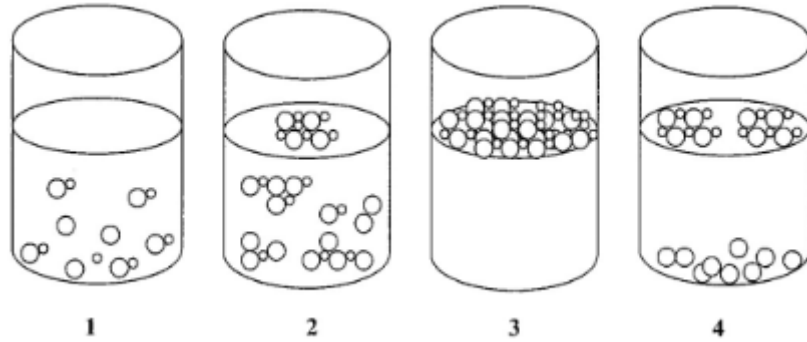
### 2.2.2 Modello di Martinez

Questo modello considera il ruolo del biossido di carbonio nella formazione del biofilm. Secondo gli autori, infatti, la causa della risalita superficiale delle cellule di lievito è da ricercarsi nel ruolo aggregante e di trasporto della CO<sub>2</sub> che, una volta inglobata in aggregati cellulari, ne causa una diminuzione della densità consentendo il passaggio degli stessi aggregati alla superficie del mezzo in cui sono immersi. La formazione di una pellicola a contatto con l'aria permette ai lieviti di avere un metabolismo ossidativo e di resistere in tali condizioni a gradazioni alcoliche elevate (16). Secondo Jimenez e Benitez (1988) il metabolismo ossidativo è una caratteristica essenziale poiché i lieviti incapaci di respirare non riescono a formare il velo (17).

### 2.2.3 Modello di Zara

Il modello proposto da Zara *et al.*, (2009) riprende in parte le ipotesi formulate da Ilmura *et al.* (1980) e Martinez *et al.* (1997) ed ha come protagonista il gene FLO11 che codifica per la glicoproteina di parete Flo11p. In accordo con gli autori, infatti, l'aumento di espressione di FLO11 comporta un aumento dell'idrofobicità della parete cellulare. Questa induce la formazione di aggregati cellulari che inglobando CO<sub>2</sub> risalgono in superficie dando luogo alla formazione del biofilm (18).

Nel genoma di *Saccharomyces cerevisiae* sono presenti cinque geni FLO (FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 e FLO11) ciascuno dei quali codifica per le rispettive proteine Flo in grado di determinare differenti caratteristiche adesive della cellula come, ad esempio, l'adesione ad agar o plastica. (FLO10) o l'adesione cellula-cellula con conseguente flocculazione (FLO1, FLO5, FLO9) (20). Il modello risultante si articola in quattro fasi successive rappresentate nella figura seguente (Figura 5).



*Figura 5: rappresentazione grafica delle quattro fasi di formazione del biofilm tratta da Zara et al. (2005). Le cellule rappresentate da due pallini adiacenti indicano lieviti in riproduzione, fase di massima vitalità cellulare.*

- (1) Nella fase iniziale le cellule di lievito fermentano gli zuccheri presenti nel mosto conducendo la normale fermentazione alcolica senza la formazione di biofilm superficiale
- (2) Quando la quantità di zuccheri residua raggiunge lo 0,2%, le cellule iniziano ad aggregarsi in flocculi a causa dell'aumento di idrofobicità inglobando così CO<sub>2</sub> con conseguente diminuzione della densità che causa la risalita superficiale degli stessi flocculi.
- (3) Sulla superficie del liquido si forma il biofilm
- (4) Rottura del biofilm e precipitazione dei frammenti a causa di carenze nutritive.

### **2.3 Effetto della concentrazione di etanolo**

Come accennato in precedenza, la concentrazione di etanolo risulta essere un fattore particolarmente influente sulla formazione del film di lievito e sull'idrofobicità della superficie cellulare.

Lo studio di Alexandre *et al.* (1999) si pone come obiettivo proprio la determinazione quantitativa dell'influenza dell'etanolo. Gli autori si sono occupati di isolare da un film di lievito uno specifico ceppo, e di valutare l'effetto della concentrazione volumetrica di alcol etilico sull'idrofobicità di superficie (HSC) (*Figura 6*) (21).

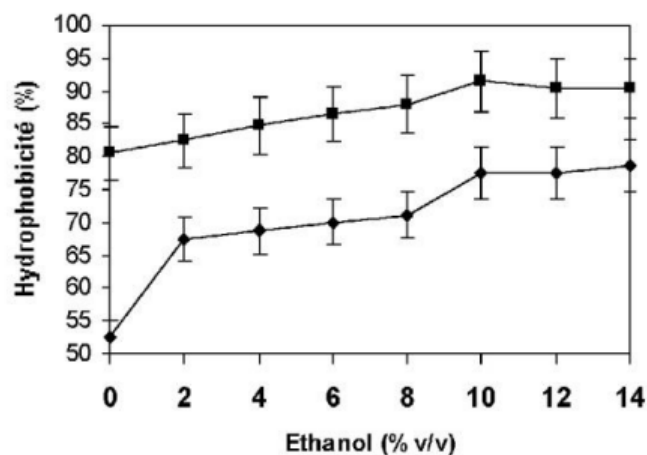


Figura 6: grafico tratto da Alexandre et al. (1999) correlante idrofobicità di superficie e concentrazione di etanolo

Si noti la presenza di due differenti interpolazioni grafiche, dovute all'utilizzo di due differenti metodi per la determinazione dell'idrofobicità. I risultati, sebbene diversi, mostrano comunque un andamento comparabile che mostra un apprezzabile aumento di HSC fino ad una concentrazione di etanolo pari a 15% v/v.

Successivamente, confrontando le percentuali di cellule presenti nel velo rispetto al totale di cellule presenti in soluzione, è stata determinata l'influenza dell'etanolo sulla formazione del velo (Figura 7).

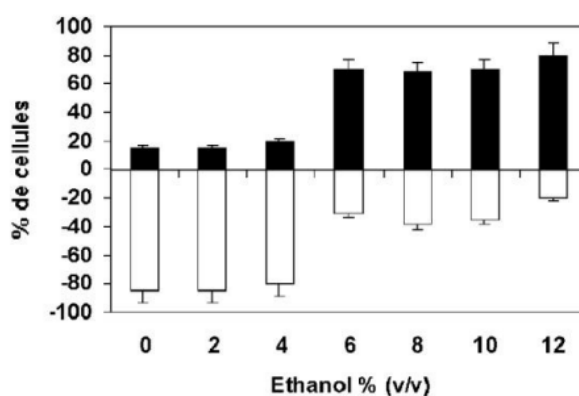


Figura 7: grafico tratto da Alexandre et al. (1999), il grafico rappresenta la percentuale di cellule presenti nel biofilm (in nero) rispetto al totale al variare della concentrazione di etanolo

Si nota infatti che per una concentrazione di alcol etilico da 0 a 4 % la percentuale di cellule presenti nel biofilm (in nero nel grafico) è solamente del 15-20%, per concentrazioni maggiori poi la percentuale sale fino a 65-80%.



Lo studio di Alexandre *et al.* (1999) si è infine occupato di identificare la natura dei costituenti parietali responsabili dell'idrofobicità. Trattando i lieviti con enzimi litici come la liticasi, si è osservata una drastica diminuzione di CSH evidenziando così la natura proteica o glicoproteica dei suddetti componenti **(21)**.

# Capitolo 3

## L'OSSIGENO

Come abbiamo potuto capire, la vinificazione è un processo complesso che coinvolge numerose reazioni chimiche e biochimiche che trasformano il mosto d'uva in vino, in cui l'ossigeno molecolare risulta essere uno degli elementi cruciali, sia per quanto riguarda la crescita e la proliferazione dei lieviti sia per la qualità stessa del vino prodotto. Se infatti il suo effetto è generalmente considerato positivo nelle prime fasi della vinificazione, dove promuove la proliferazione dei lieviti, è altrettanto vero che la sua interazione con la soluzione idroalcolica al termine dell'attività fermentativa è spesso considerata dannosa poiché può reagire con gli alcoli presenti nel vino, in particolare l'etanolo, formando acido acetico e acetaldeide composti che possono conferire al vino un sapore sgradevole e alterare la sua qualità. A onore del vero, sarebbe però corretto specificare come, durante l'affinamento, l'ossigeno risulti fondamentale in quanto determina, direttamente o indirettamente, fenomeni come la polimerizzazione di tannini ed antocianine e il consumo di anidride solforosa libera (22).

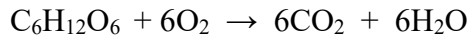
### 3.1 Microorganismi e aria

In rapporto con l'influenza dell'ossigeno atmosferico, i batteri sono suddivisi in tre gruppi:

- **Aerobi:** batteri il cui sviluppo è condizionato dalla presenza di ossigeno che consente a questi microorganismi di svolgere il processo di respirazione.
- **Anaerobi facoltativi:** si tratta di batteri che non necessitano direttamente della presenza dell'ossigeno ma che si possono sviluppare più o meno abbondantemente anche in sua presenza.
- **Anaerobi:** sono quei batteri che non solo non necessitano dell'ossigeno ma che, anzi, sono inibiti dalla sua presenza; in questi la respirazione è sostituita dalle fermentazioni (11).

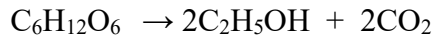
A differenza dei batteri, invece, i lieviti possono proliferare sia in condizioni aerobiche che anaerobiche essendo dotati di attività sia respiratoria che fermentativa.

Se l'ossigeno è largamente disponibile, i lieviti presenti "respirano" trasformando il glucosio secondo la reazione seguente.



*Reazione esemplificativa per la respirazione del glucosio*

In questa situazione, il glucosio non viene convertito in alcol etilico e i lieviti si moltiplicano attivamente. Al calare della disponibilità di ossigeno diminuisce la moltiplicazione dei lieviti che iniziano a fermentare gli zuccheri.



*Reazione esemplificativa per la fermentazione alcolica del glucosio*

L'intensità dello sviluppo e della produzione di alcol etilico è comunque dipendente dalla quantità di ossigeno disponibile.

È dunque chiaro come in cantina vi sia la necessità di regolare attentamente le condizioni di aerazione per individuare il giusto compromesso tra proliferazione dei lieviti e fermentazione. Pratiche come l'ossigenazione forzata dei mosti prima della fermentazione determinano sia una maggiore moltiplicazione cellulare ma anche una perdita di zucchero fermentescibile **(11)**.

### 3.1.1 Ossigeno e lieviti *flor*

Quanto elencato in precedenza costituisce una trattazione generica sul rapporto tra microorganismi ed ossigeno ed in particolar modo tra lieviti ed ossigeno. Ai fini dell'elaborato si rende però necessaria una disamina più approfondita inerente agli specifici lieviti responsabili della formazione del biofilm superficiale, lieviti *flor* per l'appunto.

I tempi normalmente necessari per lo sviluppo di un biofilm completo sono abbastanza lunghi e sono influenzati, tra le altre cose, dalla presenza di composti lipidici in soluzione. In mosti carenti di questa classe di molecole si riscontra infatti una scarsa vitalità ed attività fermentativa dei lieviti *flor*. **(18)**. I lipidi insaturi provenienti dalle uve giocano infatti un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità e della funzionalità della membrana plasmatica, fondamentali per la corretta vitalità ed attività fermentativa delle cellule **(23)**.

Zara *et al.* (2005) hanno infatti dimostrato come si riscontri un importante decremento di vitalità cellulare in mosti carenti di composti lipidici come conseguenza di una ridotta produzione di acidi grassi insaturi. La saturazione della soluzione con ossigeno ripristina però una corretta composizione lipidica cellulare suggerendo, dunque, come non si tratti di una problematica legata a difetti nella funzionalità della biosintesi lipidica **(19)**.

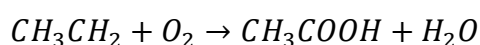
Nel corso dell'esperimento, due diverse colture cellulari (una di lieviti *flor* ed una di un ceppo enologico comune) sono state esaminate durante l'adattamento ad una progressiva deprivazione di ossigeno in succo sintetico ipossico (HSJ) e in condizioni aerobiche (OxSJ), verificando come la presenza di ossigeno abbia effetti positivi sulla crescita cellulare.

Dallo studio emerge inoltre che i lieviti *flor* necessitano di un'elevata quantità di ossigeno all'avvio della fermentazione così da completare i primi passaggi di ossigeno dipendenti nella biosintesi di lipidi, garantendo una attiva proliferazione dei lieviti stessi che comporterà quindi una rapida formazione del biofilm superficiale.

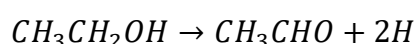
Quanto detto vale in particolar modo per i vini bianchi che durante la lavorazione sui mosti vanno incontro ad importanti chiarificazioni (e.g. flottazione, trattamenti con bentonite, etc.) che riducono drasticamente la concentrazione di composti lipidici in soluzione **(18)**.

### 3.2 Acetaldeide

A causa dei loro bassi valori di soglia sensoriale, le aldeidi rivestono un ruolo fondamentale per il profilo sensoriale del vino, tra le quali l'acetaldeide risulta senz'altro l'aldeide maggioritaria rappresentando circa il 90% dell'intero contenuto aldeidico. La sua presenza nei vini bianchi giovani è solitamente indesiderata poiché andrebbe ad inibire caratteristiche sensoriali come freschezza e sapidità, maggiormente ricercate, in favore di maggiore morbidezza. Di contro però, la presenza di acetaldeide, in quantità controllate, nei vini affinati biologicamente è particolarmente ricercata. **(24)**. La formazione di acetaldeide nei vini dipende da molteplici fattori come, ad esempio, le condizioni di aerazione e la composizione della soluzione idroalcolica. La percentuale presente aumenta durante l'invecchiamento in seguito alla progressiva ossidazione dell'alcol etilico presente e all'attività del biofilm di lieviti: durante la fase aerobica di crescita della *flor*, i lieviti ossidano infatti l'alcol etilico con conseguente accumulo di acetaldeide formatasi come intermedio **(25)**:



Reazione che ha come intermedio l'aldeide acetica:



Gli studi di Fornachon (1953) e Romano *et al.* (1944) si occupano entrambi di correlare lo sviluppo di acetaldeide nei vini alle particolari condizioni di aerazione, al ceppo batterico e alle specifiche caratteristiche della soluzione idroalcolica. In riferimento allo studio di Fornachon (1953) è di

particolare rilievo notare come i lieviti che maggiormente portano all'accumulo di acetaldeide siano proprio i lieviti *flor*, in particolar modo lieviti del ceppo *Saccharomyces beticus* (Figura 8) (24) (25).

ALDEHYDE ACCUMULATION BY SUSPENSIONS OF DIFFERENT YEASTS IN 10 PER CENT. ALCOHOL BY VOLUME

Yeast 200 mg.; pH 3.25; temperature 20°C.; atmosphere air; time 3 hr.; total volume of liquid 10 ml.

Yeast	Aldehyde (mg./bottle)
<i>S. beticus</i> .. .. .	4.62
<i>S. cerevisiae</i> .. .. .	2.54
<i>S. carlsbergensis</i> .. .. .	3.41
<i>S. ellipsoideus</i> (port strain) .. .. .	3.52
<i>S. ellipsoideus</i> (champagne strain) .. .. .	3.88

Figura 8: tabella tratta da Fornachon (1953) raffigurante i diversi livelli di accumulo di acetaldeide ad opera di differenti ceppi batterici

È altresì importante notare come la concentrazione di acetaldeide sia direttamente proporzionale alla disponibilità di ossigeno nella fase gassosa sovrastante la soluzione idroalcolica: la disponibilità di ossigeno dovuta all'affinamento in botte scolma consente infatti a questa tipologia di vini di sviluppare acetaldeide in modo consistente (Figura 9).

ALDEHYDE ACCUMULATION BY *S. BETICUS* UNDER DIFFERENT MIXTURES OF AIR AND NITROGEN

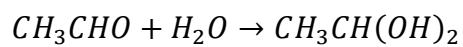
Yeast 200 mg.; pH 3.25; temperature 18°C.; alcohol concentration 14 vol. per cent.; time 3 hr.; total volume of liquid 10 ml.

Bottle No.	Treatment	Oxygen in Gas Phase (%) (calculated)	Aldehyde Formed (mg./bottle)
1	Atmospheric air	21	4.55
2			4.37
3	Evacuated to 250 mm. Hg and refilled with N <sub>2</sub> once	7	4.06
4			4.13
5	Evacuated to 125 mm. Hg and refilled with N <sub>2</sub> once	3.5	3.67
6			3.68
7	Evacuated to 125 mm. Hg and refilled with N <sub>2</sub> three times	0.1	1.20
8			1.34
9	Evacuated to 75 mm. Hg and refilled with N <sub>2</sub> five times	None	<0.1
10			<0.1

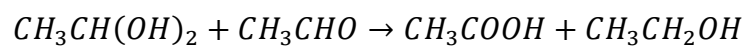
Figura 9: tabella tratta da Fornachon (1953) correlante disponibilità di ossigeno ed acetaldeide sviluppata

Dallo studio emerge inoltre che non solo l'atmosfera ricca di ossigeno è importante per favorire la formazione di acetaldeide ma che anzi risulta indispensabile per mantenere il controllo sull'acidità

volatile della soluzione: in condizioni anaerobiche, infatti, i lieviti metabolizzano l'acetaldeide disponibile dismutandola ad acido acetico ed alcol etilico secondo le reazioni seguenti:



*Idratazione dell'acetaldeide*



*Dismutazione ad acido acetico ed etanolo*

# Capitolo 4

## INVECCHIAMENTO

### 4.1 Composti fenolici

L'invecchiamento di un vino è un processo che coinvolge una moltitudine di reazioni chimiche complesse a carico di componenti fenolici già naturalmente presenti nelle uve, in particolar modo in vinacce e vinaccioli, dai quali passano in soluzione durante le prime fasi della fermentazione. È dunque evidente come il contenuto di questi componenti sia spiccatamente maggiore nei vini rossi che, più di consueto, vengono sottoposti ad un processo di macerazione sulle bucce. Non mancano però eccezioni di vini bianchi fermentati in presenza di parti solide del grappolo.

Come vedremo poi, molti componenti fenolici vengono ceduti al vino anche dal legno delle botti e pertanto riscontreremo la presenza di tali componenti anche in vini bianchi, vinificati secondo tradizionale vinificazione in bianco, lasciati poi ad affinare in botti in legno (*Figura 10*).

Phenolic compounds	Concentration level (mg/L)
Hydroxybenzoic acids	8-54
Hydroxycinnamic acids	11-164
Flavonols	4-114
Flavanols	436-3600
Anthocyanins	185-895

*Figura 10: tabella tratta da Li-Duan (2019) elencante i principali componenti fenolici e relativa concentrazione*

#### 4.1.1 Acidi fenolici

Si tratta principalmente di acidi idrossibenzoici (acido gallico) ed idrossicinnamici. I primi rimangono piuttosto stabili durante tutto il processo mentre gli acidi idrossicinnamici, presenti inizialmente come esteri tartarici ed in seguito idrolizzati, presentano una spiccata reattività ed influiscono in particolar modo sulla colorazione del vino dato il loro imbrunimento **(26) (27)**.

### 4.1.2 Flavonoli e Flavanoli

Sono i composti responsabili dell'astringenza del vino. Questi presentano una struttura simile e presentano due anelli benzenici collegati da un eterociclo ossigenato, i flavonoli kaempferolo, quercitina, miricetina, isoramnetina, laricitrina e siringetina; i flavanoli sottoforma di due differenti unità monomeriche: catechina ed epicatechina. Queste unità monomeriche esterificano con l'acido gallico polimerizzando. Se il grado di polimerizzazione non supera le 3 unità monomeriche si parla di proantocianidine, al contrario, si parla di tannini condensati **(28)** (Figura 11).

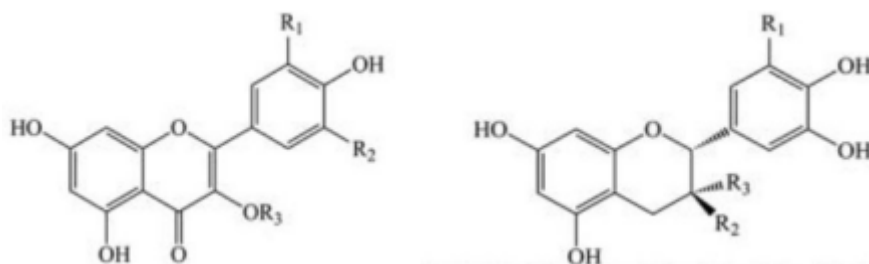


Figura 11: struttura di base dei flavonoli (destra) e dei flavanoli (sinistra).

### 4.1.3 Antociani

Gli antociani sono responsabili della colorazione rossa delle bacche, estremamente presenti nelle uve a bacca nera sono invece quasi completamente assenti nelle uve a bacca bianca. Sono caratterizzati da molecole formate da due anelli benzenici uniti da un eterociclo ossigenato ed insaturo sul quale viene a formarsi una carica positiva generando il così denominato catione flavilio **(27)** (Figura 12).

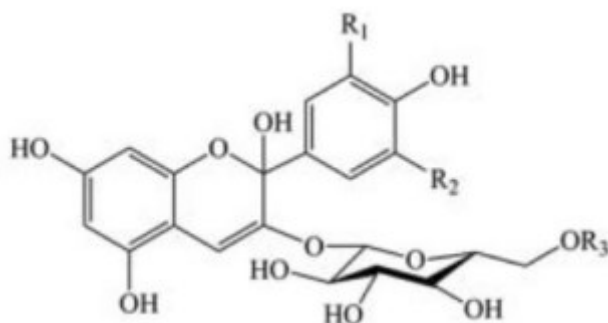


Figura 12: struttura di base degli antociani



#### 4.1.4 Tannini

Si tratta dei composti fenolici più voluminosi che si ottengono dalla polimerizzazione di più molecole contenenti gruppi fenolici che riescono a dare composti stabili con proteine e polisaccaridi a seconda della dimensione: se troppo piccoli, infatti, daranno origine a composti non molto stabili, se troppo voluminosi, invece, non riusciranno a legarsi propriamente a causa dell'ingombro sterico (27).

## **4.2 Legno, perché?**

In ambito enologico il legno riveste un ruolo di straordinaria importanza dal momento che si tratta dell'unico materiale di contenimento volutamente non inerte e viene sfruttato, pertanto, proprio per la sua capacità di cedere alla soluzione una serie di composti chimici a volte indispensabili per il profilo sensoriale, oltre a garantire l'apporto di ossigeno necessario in fase di affinamento.

Va necessariamente specificato che le sue proprietà non sono però universali. Infatti, dipendono molto dal tipo di legno utilizzato, dal suo spessore e dal processo di lavorazione a cui è stato sottoposto.

#### 4.2.1 Composti fenolici nel legno

I composti chimici d'interesse per la fase di affinamento in botte sono presenti, anche se in diverse concentrazioni, indipendentemente dal processo produttivo e dalla tipologia di legno (29). Anche in questo caso i composti più interessanti sono composti fenolici come il guaicolo ed il vinilguaicolo, responsabili rispettivamente di aromi affumicati e di aromi speziati di "chiodi di garofano" (29), o ancora il 4-vinilfenolo ed il 4-etilfenolo che, se presenti in concentrazione troppo elevata, conferiscono aromi sgradevoli di "sudore di cavallo" ma sono al contempo in grado di complessare gli antociani (soprattutto nei vini rossi) stabilizzandoli.

Vi è poi un'importante presenza di acidi fenolici, soprattutto idrossicinnamici ed idrossibenzoici come nelle uve, anche se in questo caso rivestono maggiore importanza le rispettive aldeidi come, ad esempio, le aldeidi idrossibenzoiche siringaldeide e vanillina responsabili di aromi di legno e vaniglia (27).

Si riscontra poi la presenza di composti formati per esterificazione intramolecolare tra la funzione acida e la funzione alcolica: i lattoni. Si tratta quindi di eterocicli ossigenati che partecipano in maniera attiva al profilo sensoriale del vino come il "lattone di quercia" ed il "whisky lattone" il quale, nella sua conformazione *cis*, conferisce sentori erbacei e di noce di cocco, mentre, nella sua conformazione *trans*, conferisce lievi sentori speziati (27).

### 4.3 Reazioni dei tannini

Durante la fase di affinamento avvengono in soluzione molteplici reazioni a carico soprattutto dei polifenoli presenti che reagendo con ossigeno, anidride solforosa ed altri composti interni subiscono importanti modificazioni (28).

- Reazioni con le proteine

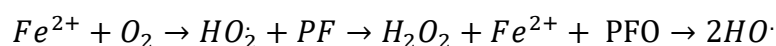
I tannini presenti in soluzione interagiscono con le proteine attraverso legami ad idrogeno ed interazioni idrofobiche. Se la concentrazione proteica è bassa, come nel caso di vini che nel corso del processo produttivo hanno subito importanti chiarifiche, i tannini ricoprono le proteine diminuendone l'idrofilia. Se invece la concentrazione proteica risulta elevata, oltre a quanto appena descritto, i tannini si comportano come leganti favorendo la formazione di importanti agglomerati tannino-proteici che, superato un certo peso, sedimenteranno (27).

- Reazioni con gli antociani

I tannini reagiscono con gli antociani attraverso reazioni di condensazione che può essere diretta o indiretta. Le reazioni di condensazione diretta portano alla formazione di composti incolore che possono però riassumere parte della colorazione in seguito ad ossidazione. Se infatti l'antociano si trova sotto forma di catione flavilio  $A^+$  può reagire con le procianidine (tannini condensati) originando un composto incolore A-T che può ricolorarsi una volta ossidato a dare  $A^+-T$  e AO-T in equilibrio tra loro (26). Le reazioni di condensazione indiretta prevedono la formazione di un carbocatione dall'etale che reagendo con catechine e procianidine forma un intermedio altamente reattivo in grado di reagire con gli antociani originando composti diversamente colorati a seconda delle condizioni di reazione dal malva all'arancione (26) (27).

### 4.4 Meccanismo ossidativo

Come anticipato, l'ossigeno svolge un ruolo fondamentale nella modificazione delle caratteristiche del vino soprattutto durante l'affinamento. Infatti, permeando all'interno delle botti, comincia la sua lenta e inesorabile azione ossidante. Il meccanismo osservato prevede, infatti, un'iniziale reazione con i cationi metallici presenti in soluzione con formazione di perossidi sempre più reattivi in grado di ossidare composti più inerti dei polifenoli (PF) (27).



L'ossidazione lenta e costante è fondamentale per un'evoluzione sensoriale positiva del prodotto finito e la sapiente manipolazione del processo consente di regolare secondo il proprio desiderio caratteristiche come l'astringenza. L'ossidazione eccessiva, tuttavia, comporta una perdita dei composti fenolici in soluzione: può accadere, infatti, che l'esposizione all'ossigeno promuova l'oligomerizzazione dei composti fenolici e, in caso di esposizione eccedentaria, la polimerizzazione incontrollata degli stessi. All'aumentare eccessivo del peso molecolare dei polimeri così prodotti si va incontro alla precipitazione degli stessi con conseguenti perdite di caratteristiche sensoriali apprezzabili. Inoltre, si promuove un ulteriore processo di polimerizzazione mediato dall'acetaldeide che oltre alla precipitazione dei polifenoli comporta un aumento di torbidità del vino (26).

#### 4.5 Trasferimento di ossigeno nelle botti

Nel corso degli anni sono state sviluppate differenti teorie su come l'ossigeno permei all'interno delle botti. Pascal Ribereau-Gayon (30) fu il primo, nel 1931, a confermare che l'ossigeno permeasse all'interno dei barili avvalendosi di una botte riempita con una soluzione acquosa di SO<sub>2</sub> ed osservando come si formasse SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Asserì poi che la via principale di ingresso dell'ossigeno nella soluzione fosse localizzata nella zona di contatto tra vino ed aria nella parte superiore dei barili.

Un successivo studio di Richard Peterson del 1976 (31) imputò la presenza dell'ossigeno all'interno delle botti alla fase di riempimento delle stesse, durante la quale, il vino ne ingloba cospicue quantità. Fu poi Vernon Singleton (32) ad ipotizzare che l'ossigeno permeasse anche attraverso il legno, esclusivamente quello asciutto (nell'ipotesi che nulla dovrebbe permeare attraverso il legno imbevuto di vino). In questo modo la soluzione idroalcolica dovrebbe ricevere ossigeno solamente attraverso l'aria presente nella sommità dei barili oltre a quella naturalmente inglobata durante il riempimento o le varie manipolazioni.

Si distingue perciò un apporto d'ossigeno lento e progressivo, attuato dall'affinamento in barrique, da un passaggio che può essere brutale nel corso delle operazioni di travaso. I livelli di ossigeno apportati da un travaso o da una colmatura sono molto variabili secondo l'attenzione posta in occasione di queste manipolazioni: la letteratura enologica indica tenori di ossigeno disciolto compresi tra 0,1 mg/L fino a oltre 5-6 mg/L in occasione di un travaso (34).

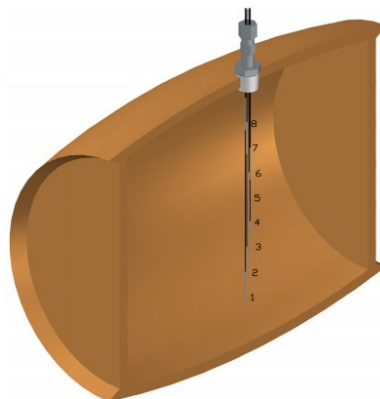
Un'altra teoria, proposta nel 2003 da Kelly e Wollan (33), indica invece che la botte funga sostanzialmente da membrana semipermeabile ai gas: secondo questa teoria il trasferimento è dunque influenzato dalla permeabilità del legno utilizzato, il suo spessore e la differenza di concentrazione di

ossigeno ai due lati. La velocità di diffusione del gas può dunque essere calcolata avvalendosi della ben nota legge di Fick:

$$\frac{\delta V}{\delta t} = \mu A \frac{\Delta P}{d}$$

dove  $V$  risulta essere il volume di ossigeno diffuso,  $t$  il tempo,  $\mu$  la permeabilità,  $d$  lo spessore del legno,  $\Delta P$  la differenza nelle pressioni parziali del gas ed  $A$  l'area.

Uno studio del 2014 condotto da Sanza e Nevares si è occupato per la prima volta di analizzare per un anno la permeabilità all'ossigeno di botti, al fine di determinare la cinetica del trasferimento di ossigeno. Lo studio ha coinvolto botti realizzate in legno di quercia francese ed americana, di grane differenti, che ad oggi risultano essere le due tipologie più utilizzate. Le botti sono state poi riempite con una soluzione idroalcolica atta a simulare il vino ed impedire il consumo di ossigeno ad opera di sostanze terze presenti nel vino naturale come, ad esempio, i polifenoli. Ogni botte è stata equipaggiata con 8 sensori a diversa profondità per la determinazione dell'ossigeno disciolto (*Figura 13*) (22).



*Figura 13: setup sperimentale a 8 sonde*

Dopo una misurazione di 200 h è emersa la presenza di un importante gradiente di concentrazione di ossigeno disponibile: la più alta concentrazione dello stesso è stata infatti identificata nella zona alta dei barili e si è rivelata decrescente con il progredire della distanza dalla sommità. (*Figura 14*)

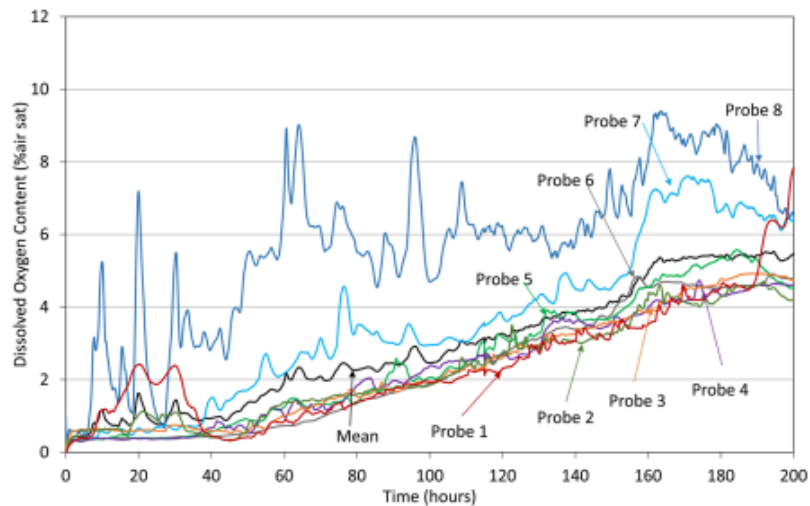


Figura 14: grafico tratto da Sanza Nevares (2014) rappresentante le concentrazioni di ossigeno misurate dalle singole sonde indicate con “probe” seguite dal numero identificativo

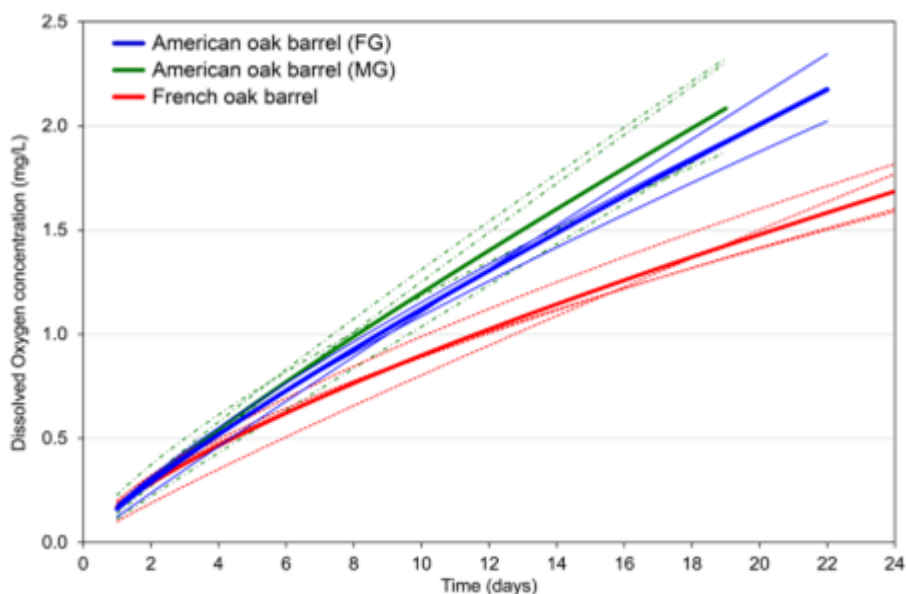
La media delle misure è stata poi sfruttata per realizzare il grafico che mostra l’andamento della concentrazione di ossigeno disponibile (Figura 15) e di come questo non dipenda significativamente dalla grana del legno quanto più da caratteristiche intrinseche dello stesso, dovute ad esempio alla zona di provenienza. In particolar modo è possibile notare come i vini affinati in botti di quercia americana ricevano tra il 10% ed il 30% di ossigeno in più rispetto a vini affinati in botti di quercia francese.

Dallo studio emerge che la cinetica di ingresso dell'ossigeno nel tempo segue l'andamento secondo la seguente equazione:

$$y = ax^b$$

dove  $a$  è una costante dipendente da grana e provenienza del legno mentre  $b$  rappresenta il tempo di invecchiamento ed assume valori dipendenti ancora una volta da grana e provenienza del legno.

Nel complesso l'ingresso di ossigeno segue un andamento inverso rispetto all'impregnazione del legno: come già dimostrato da Vivas et al. (2003) il legno asciutto risulta essere dalle 20 alle 100 volte più permeabile all'ossigeno rispetto al legno umido. Il legno può essere infatti assimilato ad un solido poroso con le cavità occupate dall'aria quando asciutto e dall'acqua quando umido. Ne risulta una differenza importante nella velocità di diffusione dell'ossigeno che, in acqua, è  $10^4$  volte inferiore a causa delle interazioni forti (legami a idrogeno) tra  $O_2$  e  $H_2O$  (35).



*Figura 15: andamento della concentrazione di ossigeno dissolto nel tempo: le curve più evidenti rappresentano la media delle rispettive curve tratteggiate e sono indicative per botti in quercia americana a grana fine (blu), quercia americana a grana media (verde) e quercia francese (rosso). (Sanza- Nevares, 2014).*

Valutando poi la velocità annuale di penetrazione dell'ossigeno si osserva, nell'ambito di questo studio, una costante diminuzione della velocità stessa durante tutto il primo mese salvo poi attestarsi su un valore più o meno costante.

L'equazione ottenuta in precedenza, studiando la cinetica di trasferimento per un breve tempo, deve essere modificata nei valori associabili alle costanti ottenendo così valori di gran lunga inferiori. Stando ai risultati dello studio l'apporto complessivo di ossigeno che un vino riceverebbe in botti di rovere americano si attesta su un valore di 11,62 mg/L annui.

Il valore ottenuto risulta inferiore a quello calcolato in tutti gli studi precedenti. Ad esempio, Riberau-Gayon osservò una velocità d'ingresso pari a 15-20 mg/L **(30)**. Nel suo studio, infatti, la determinazione del solfato è avvenuta dopo 6 mesi e, considerando la velocità di trasferimento costante, è stato estrapolato il valore annuale, senza pertanto prendere in considerazione l'aumento di umidità del legno con conseguente diminuzione della velocità di diffusione dell'ossigeno. Allo stesso modo, l'applicazione della legge di Fick, proposta da Kelly e Wollan **(33)** risulta inesatta dal momento che il legno si comporta sì da membrana semipermeabile, ma le sue proprietà variano con il progressivo aumento di umidità **(22) (27)**.

#### 4.6 Effetto dell'ossigeno sulle proprietà organolettiche

L'ossigeno penetrato all'interno della barrique è sia consumato dal vino, sia presente nello spazio di testa, al fine di equilibrare il sistema "evaporazione / depressione / vincoli meccanici". In generale, la cinetica di dissoluzione dell'ossigeno dipende dalla sua concentrazione in fase liquida e in quella gassosa, dalla superficie di scambio tra questi due fasi, dalla natura del liquido (livello di etanolo ad esempio) e dalla temperatura. Giocando su questi parametri, così come sul tempo di contatto tra il vino e l'ossigeno, si può influenzare la sua dissoluzione nel vino **(34)**.

Tenere sotto controllo la disponibilità di ossigeno in soluzione è uno degli aspetti fondamentali di un buon invecchiamento: infatti, se la costante micro-ossigenazione è indispensabile per l'adeguata evoluzione dei composti polifenolici, l'eccessiva presenza di ossigeno comporta, invece, un'eccessiva polimerizzazione polifenolica con conseguente precipitazione degli agglomerati e una grossa perdita dal punto di vista del profilo sensoriale **(26)**.

Anche le fecce di lievito presenti nel vino durante l'affinamento in legno svolgono un ruolo significativo nella cinetica di consumo dell'ossigeno. Queste fecce, costituite dai residui dei lieviti utilizzati durante la fermentazione, hanno dimostrato di consumare l'ossigeno più rapidamente rispetto agli altri costituenti del vino. Infatti, le fecce agiscono come una barriera protettiva contro l'ossigeno e svolgono una funzione antiossidante, impedendo che l'ossigeno reagisca direttamente con i composti aromatici sensibili all'ossidazione. L'agitazione periodica delle fecce, nota come *bâtonnage*, favorisce la loro azione protettiva. Questo processo consiste nel mescolare delicatamente le fecce con il vino, permettendo loro di entrare in contatto con una maggiore quantità di vino e di consumare l'ossigeno presente. Tuttavia, è importante eseguire il *bâtonnage* con attenzione per evitare l'ingresso eccessivo di ossigeno durante l'apertura delle botti. Oltre alle fecce di lievito, altri composti presenti nel vino, come i cationi metallici, l'anidride solforosa e l'etanolo, possono agire come catalizzatori di reazioni di ossidazione o come substrati coinvolti nei meccanismi di ossidazione **(34)**, **(36)**.

#### 4.6.1 Variazione del colore

Come visto in precedenza, gli antociani risultano responsabili della colorazione del vino e durante l'affinamento si registra una perdita di antociani liberi che nei vini rossi si configura in un viraggio dal rosso scuro ad un giallognolo più evidente. Anche nei vini bianchi l'ossigeno comporta l'ossidazione degli antociani con conseguente polimerizzazione e precipitazione degli agglomerati di maggior peso molecolare. Si registra pertanto un'importante diminuzione degli antociani liberi con conseguente aumento di pigmenti polimerici, molto più stabili, come le proantocianidine (Figura 16) (37).

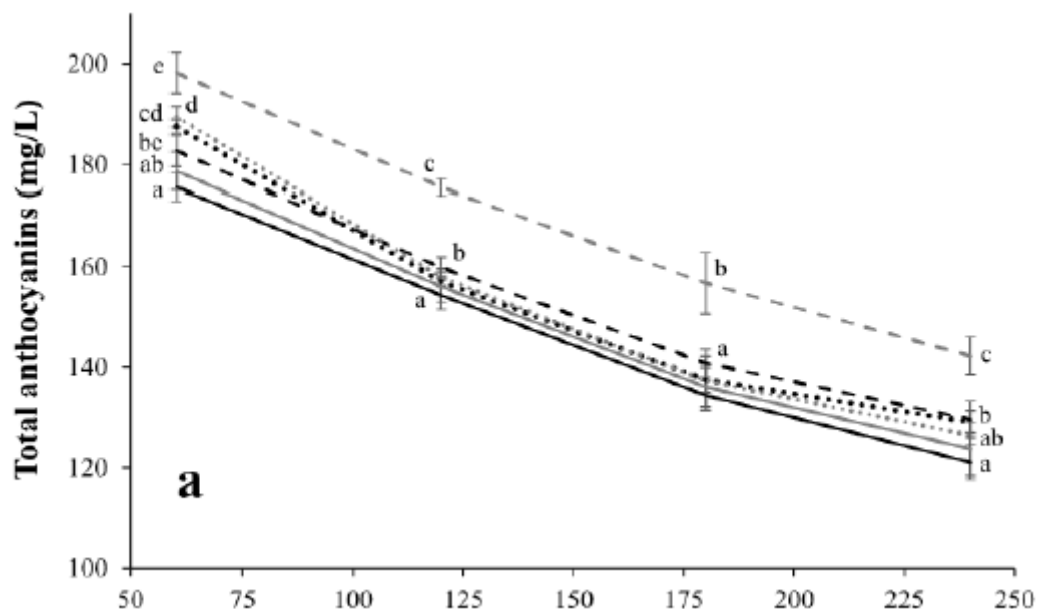


Figura 16: andamento della concentrazione di polifenoli durante l'invecchiamento misurata ogni 25 giorni (Del Fresno et al., 2020). Media  $\pm$  deviazione standard di 3 misurazioni.

#### 4.6.2 Variazione del profilo aromatico

Oltre alle variazioni di colore, il processo di affinamento comporta modificazioni dall'impatto maggiore, ovvero quelle legate a sapore e aroma. In generale, si nota una perdita di astringenza nei vini invecchiati dovuta alla graduale perdita di tannini. Nonostante ciò, si registra un graduale aumento dei polifenoli in soluzione dovuto alla graduale cessione da parte del legno.

Anche i fenoli volatili e i composti furanici aumentano per cessione da parte della botte nei primi mesi di affinamento, salvo poi diminuire nuovamente con il tempo. Ciò spiega perché determinati



sentori di affumicato siano percepibili solo in vini sottoposti ad un invecchiamento non eccessivamente lungo (36), (37).

Allo stesso modo, è stata osservato un aumento dell'estrazione e della presenza di lattoni come il Whiskey-lattone in maniera progressiva per i primi 3-4 mesi di invecchiamento, salvo poi diminuire (Figura 17a). Al contrario, la concentrazione di aldeidi fenoliche come vanillina e siringaldeide aumenta in maniera piuttosto lineare con l'affinamento (Figura 17b) (37).

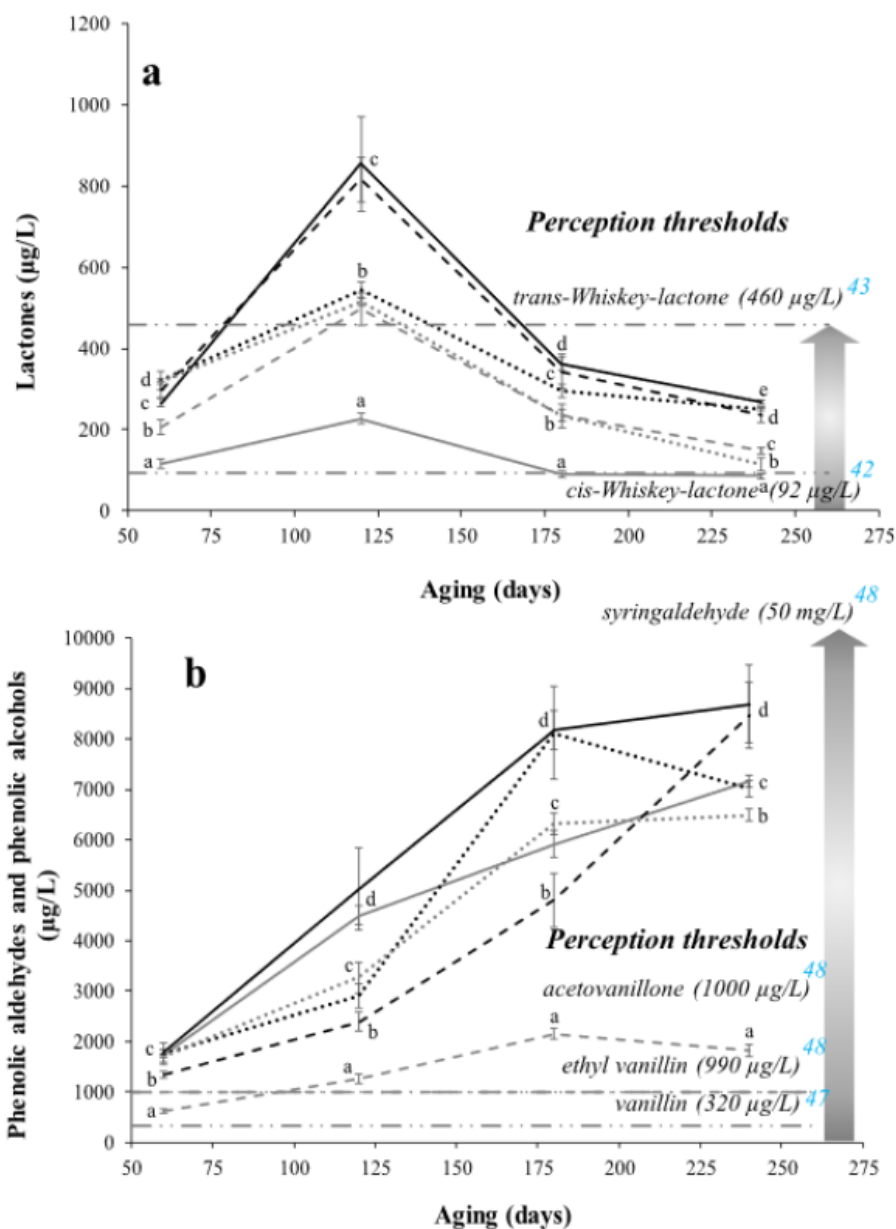


Figura 17: concentrazione di Whiskey-lattone (a) e aldeidi fenoliche (b) nel tempo.

## 4.7 Il sotolone

Il sotolone è un composto chimico presente in alcune varietà di vini bianchi, in particolar modo nei vini flor e in quelli fortificati, che può contribuire al loro aroma caratteristico. È un chetone ciclico aromatico, noto anche come  $\gamma$ -lattone, ed è responsabile di un'ampia gamma di profumi, tra cui il sentore di fieno, curry, zucchero bruciato, tabacco, spezie e noci. La presenza di questa molecola nei vini bianchi può variare notevolmente a seconda della varietà di uva, delle pratiche di vinificazione e dell'invecchiamento del vino. Alcune varietà di uva, come il Gewürztraminer e il Riesling, sono conosciute per contenere naturalmente livelli più elevati di sotolone. Inoltre, la sua concentrazione aumenta solitamente durante l'invecchiamento del vino, poiché prodotto da una serie di reazioni mediate dall'ossigeno disciolto in soluzione.

I meccanismi della sua formazione sono molteplici e le reazioni possono essere mediate da diversi costituenti del vino, ma nei vini bianchi questa avviene prevalentemente per condensazione dell'acido chetobutirrico a partire dall'acido ascorbico oppure dallo stesso acido chetobutirrico prodotto dal metabolismo dei lieviti.

Poiché il sotolone presenta un carbonio asimmetrico nel suo scheletro molecolare, esistono due enantiomeri del composto noti come R-sotolone e (S)-sotolone, entrambi d'interesse dal punto di vista aromatico. La presenza di uno specifico enantiomero può influenzare l'aroma percepito. Ad esempio, è stato riportato che (R)-sotolone presenta un aroma più intenso e persistente di fieno, mentre l'(S)-sotolone può essere associato a note di vaniglia e spezie dolci.

### 4.7.1 Ruolo dell'acido chetobutirrico

L'acido chetobutirrico (2-KBA) svolge un ruolo importante nella sintesi del sotolone. Questo composto, noto anche come acido 2-ossobutanoico, è un precursore essenziale nella formazione del sotolone attraverso una reazione di condensazione aldolica. Nel contesto specifico della formazione del sotolone, l'acido chetobutirrico può derivare da diverse fonti, tra cui l'ossidazione dell'acido ascorbico, la degradazione ossidativa dell'etanolo e la deaminazione enzimatica della L-treonina da parte dei lieviti.

L'acido chetobutirrico può reagire con altre molecole, come l'acetaldeide, per formare il sotolone attraverso una serie di reazioni. La reazione chiave coinvolge la condensazione aldolica tra l'acido chetobutirrico e l'acetaldeide. Durante questa reazione, una molecola di acetaldeide si combina con una molecola di acido chetobutirrico per formare il sotolone.

#### 4.7.1.1 Formazione del sotolone attraverso il metabolismo dei lieviti

La presenza del sotolone nei vini flor è riconducibile all'attività dei lieviti della "voile" durante il processo di invecchiamento. Durante questo affinamento biologico si osserva una riduzione del contenuto di aminoacidi, poiché essi costituiscono la principale fonte di azoto per i lieviti. Si ritiene che la deaminazione enzimatica della L-treonina da parte dei lieviti generi 2-KBA, il quale, seguito da una condensazione aldolica con l'acetaldeide, porta alla formazione di sotolone (Figura 18) (38). La formazione di 2-KBA può anche avvenire durante il processo di fermentazione primaria. Nello studio condotto da Pons *et al.* (2010), è stato riscontrato che il 2-KBA viene prodotto dai lieviti durante la fermentazione alcolica e il ceppo di lievito risulta avere un forte impatto sulla sua formazione. Secondo gli autori, questa variazione potrebbe essere attribuita all'attività della treonina deaminasi, un enzima responsabile della deaminazione della treonina attraverso la via di Ehrlich, in cui il 2-KBA è un intermedio noto (37).

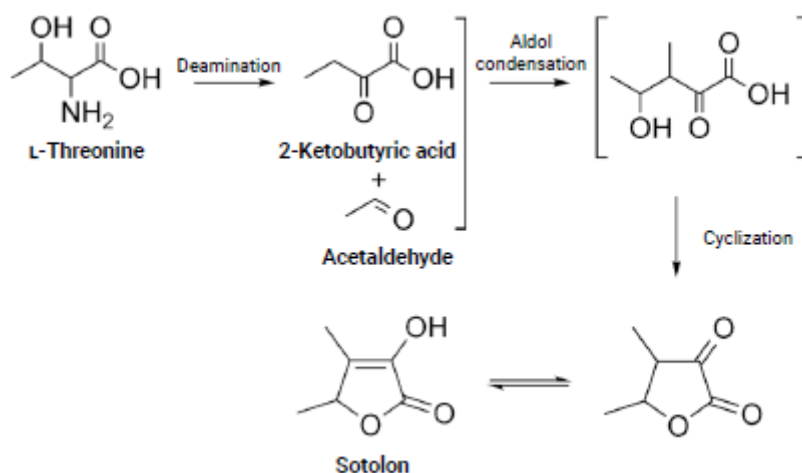


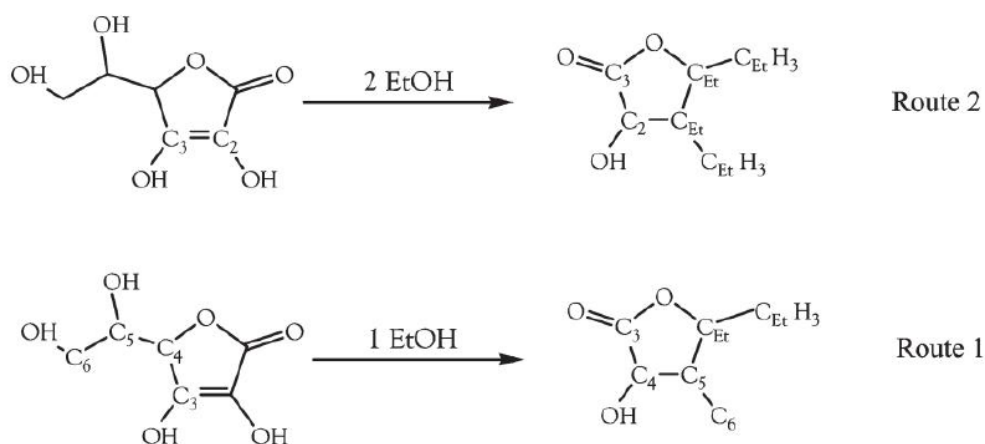
Figura 18

#### 4.7.1.2 Formazione dall'acetaldeide

L'acetaldeide che si forma sia durante il processo di fermentazione che a causa dell'ossidazione dell'etanolo è, come visto in precedenza, solitamente presente in concentrazione maggiore nei vini flor rispetto ai comuni vini da tavola. In questo tipo di vini, l'acetaldeide, proprio in virtù della sua concentrazione, svolge un ruolo chiave nella formazione del sotolone attraverso la condensazione aldolica con l'acido chetobutirrico (36).

#### 4.7.1.3 Formazione dall'acido ascorbico

Durante la conservazione delle bevande analcoliche a base di agrumi, possono svilupparsi off-flavor simili a bruciato e piccante associati alla presenza di sotolone. Schwab *et al.*, attraverso l'osservazione di sistemi modello, hanno ipotizzato che la formazione del sotolone possa avvenire attraverso due diversi percorsi che coinvolgono una o due molecole di etanolo (*Figura 19*) **(39)**. Inoltre, la saturazione delle soluzioni modello con azoto inibisce la formazione di sotolone, indicando l'importanza dell'ossigeno nella sua formazione. Scholtes *et al.* (2015) hanno recentemente suggerito che l'acido  $\alpha$ -idrossi- $\beta$ -chetobutirrico (o acido 2-idrossi-3-ossobutanoico) sia il risultato dell'ossidazione dell'acido ascorbico, generando sotolone tramite la reazione con una molecola di etanolo. Il secondo percorso proposto da König *et al.*, che coinvolge due molecole di etanolo, potrebbe basarsi sulla formazione di acido glicolico come intermedio **(36)**, **(40)**, **(41)**.



*Figura 19: percorsi di formazione del sotolone dall'acido ascorbico*

## CONCLUSIONI

I vini ottenuti con metodi ossidativi spiccano con prestigio in un panorama vinicolo in continua evoluzione. L'evoluzione delle preferenze dei consumatori e la ricerca di nuove dimensioni sensoriali delineano un futuro promettente per queste produzioni enologiche. È nella ricerca incessante e nella profonda comprensione dei processi di ossidazione che i vini di questa categoria potranno raggiungere la loro piena potenzialità, soddisfacendo le aspettative di un pubblico sempre più esigente e preservando la loro reputazione di prodotti affascinanti e unici nel vasto universo enologico.

Nel tempo il vino matura, lasciandosi permeare dalle influenze dell'ossidazione. È qui che i sapori si arricchiscono, che si creano le sfumature più suggestive. L'ossigeno diventa l'ingrediente che plasma il carattere del vino. Tuttavia, il confine tra l'arte enologica e l'insuccesso è molto esile: un'attesa troppo prolungata, una permeazione all'ossigeno eccessiva, trasformano l'ossidazione in un danno irreparabile che distrugge la qualità del vino.

L'equilibrio, dunque, diventa la chiave per svelare le potenzialità più autentiche delle uve e dare vita a una sinfonia armonica: lo stesso sotolone, responsabile dei più caratteristici profumi e aromi di questi vini, dev'essere sapientemente calibrato. La sua soglia di percezione bassissima (0,8 µg/L) lo rende infatti un'affilatissima lama a doppio taglio: se da un lato può valorizzare notevolmente il profilo aromatico di un vino, dall'altro può sovrastare ogni altra famiglia aromatica con conseguente perdita della tipicità varietale e del *terroir*.

Sul palcoscenico dell'enologia, i produttori assumono quindi il ruolo di veri artisti che con sapienza e maestria dirigono il processo di vinificazione, curando ogni dettaglio per ottenere l'equilibrio perfetto. E quando una di queste bottiglie viene stappata, questi vini rivelano tutta la loro grandiosità. Sono opere uniche, catturate in bottiglie che racchiudono un universo di sensazioni, tradizione, conoscenza e innovazione. I palati curiosi si lasciano sedurre dalle note di frutta secca, dalle spezie avvolgenti e dai richiami dolci del miele e della frutta matura o essicata. È un viaggio nell'inesplorato, un'esperienza che stimola i sensi e sfida le convenzioni. Così, i vini ottenuti con il metodo ossidativo, con la loro audacia e complessità, si elevano come testimoni di una tradizione millenaria, ma anche come esploratori dei confini del gusto attraverso la conoscenza e lo sviluppo di nuove tecnologie. Ci troviamo tuttavia di fronte ad un paradosso: uno tra i più straordinari rappresentanti italiani di questi vini, la Vernaccia di Oristano, sta lentamente scomparendo e la sua produzione è ai minimi storici. La fase di florizzazione rappresenta ormai una costosa immobilizzazione di capitale che spinge sempre più produttori a destinare le uve alla produzione di comuni vini da tavola. È necessario, pertanto, intervenire per favorire una riscoperta di prodotti locali di pregio che rischiano di scomparire a causa di quelle crudeli regole di mercato che poco si curano delle diversità e portano all'omologazione.



# BIBLIOGRAFIA

- (1) MUSCOLINO, Alberto. Intravino, 29 giugno 2018
- (2) VinoSapiens.it, 30 novembre 2020
- (3) TripleA.it, 25 settembre 2020
- (4) RIBEREAU-GAYON, Pascal, et al. *Traité d'œnologie. Chimie du vin. Stabilisation et traitements*, Dunod, Éditions La Vigne, coll. « Pratiques vitivinicoles », 2004, 624 p.
- (5) CUTZACH-BILLARD, Isabelle. *Étude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement*, Université de Bordeaux II, thèse de doctorat, option œnologie-ampélogie, 1999, 144 p
- (6) DiWineTaste, *Cultura e Informazione Enologica, Jerez (Sherry)*, 23, Ottobre 2004
- (7) DiWineTaste, *Cultura e Informazione Enologica, Jerez (Sherry)*, 28, Marzo 2005
- (8) Wine in Sicily, WIS Magazine, Francesco Pensovecchio, 17 ottobre 2002
- (9) BUDRONI, M., ZARA, G., ZARA, S., MANNAZZU, I., & FARRIS, G. A. Peculiarità dei lieviti flor, 2015.
- (10) ROSSINI, Riccardo (ed.). *Contaminazione da Brettanomyces: lo stato dell'arte*. Enologica Vason srl, 2003.
- (11) ZAMBONELLI, Carlo. *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole, 1988.
- (12) ESTEVE-ZARZOSO, Braulio, et al. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Applied and environmental microbiology*, 2001, 67.5: 2056-2061.
- (13) ARANDA, Agustín; QUEROL, Amparo; DEL OLMO, Marcel li. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Archives of microbiology*, 2002, 177: 304-312.
- (14) ARANDA, Agustín; DEL OLMO, Marcel li. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 2003, 20.8: 747-759.
- (15) IIMURA, Yuzuru; HARA, Shodo; OTSUKA, Ken-ichi. Fatty acids as hydrophobic substance on cell surface of film strain of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44.6: 1223-1229.
- (16) MARTÍNEZ, P.; RODRÍGUEZ, L. Pérez; BENÍTEZ, T. Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1997, 48.1: 55-62.

- (17) JIMENEZ, Juan; BENÍTEZ, Tahía. Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Current genetics*, 1988, 13: 461-469.
- (18) ZARA, Giacomo, et al. Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS yeast research*, 2009, 9.2: 217-225.
- (19) ZARA, Severino, et al. FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71.6: 2934-2939.
- (20) GUO, Bing, et al. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97.22: 12158-12163.
- (21) ALEXANDRE, Hervé; BERTRAND, Fanny; CHARPENTIER, Claudine. Effect of ethanol on yeast film formation. *OENO One*, 1999, 33.1: 25-29.
- (22) DEL ALAMO-SANZA, María; NEVARES, Ignacio. Recent advances in the evaluation of the oxygen transfer rate in oak barrels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014, 62.35: 8892-8899.
- (23) BISSON, Linda F. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1999, 50.1: 107-119.
- (24) ROMANO, Patrizia, et al. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 118.3: 213-218.
- (25) FORNACHON, Ji CM. The accumulation of acetaldehyde by suspensions of yeasts. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1953, 6.2: 222-233.
- (26) LI, Si-Yu; DUAN, Chang-Qing. Astringency, bitterness and color changes in dry red wines before and during oak barrel aging: An updated phenolic perspective review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59.12: 1840-1867.
- (27) RIBÉREAU-GAYON, Pascal, et al. *Handbook of Enology, volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons, 2021.
- (28) FOSCHI, GIORGIO. Evoluzione dei polifenoli in vini invecchiati in legno. Tesi di Laurea. Università Politecnica delle Marche, 2021-2022, Rel. Pacetti Deborah.
- (29) ZHANG, Bo, et al. A review of polyphenolics in oak woods. *International journal of molecular sciences*, 2015, 16.4: 6978-7014.
- (29a) RIBÉREAU-GAYON, J. *Contribution à l'étude des oxidations et réductions dans les vins. Application à l'étude de vieillissement et des casses*. 213 pp. 1933. PhD Thesis. Thèse, Delmas Bordeaux.
- (31) PETERSON, Richard G. Formation of reduced pressure in barrels during wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1976, 27.2: 80-81.



- (32) SINGLETON, Vernon L. Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995, 46.1: 98-115.
- (33) KELLY, Mark; WOLLAN, David. Micro-oxygenation of wine in barrels. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 2003, 29-32.
- (34) SEGUIN MOREAU, *L'apporto di ossigeno durante l'affinamento*. Settembre 2012.
- (35) VIVAS, N., et al. Mise en évidence du passage de l'oxygène au travers des douelles constituant les barriques par l'utilisation d'un dispositif original de mesure de la porosité du bois. Premiers résultats. *Sciences des aliments*, 2003, 23.5-6: 655-678.
- (36) GASPAR, João Marcelo Gontardo. *Sotolon in madeira Wine. New insights on the aroma impact and main formation pathways*. 2021. PhD Thesis.
- (37) DEL FRESNO, Juan Manuel, et al. Evolution of the phenolic fraction and aromatic profile of red wines aged in oak barrels. *ACS omega*, 2020, 5.13: 7235-7243.
- (38) PONS, Alexandre, et al. Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58.12: 7273-7279.
- (39) SCHWAB, W., et al. Formation Pathways of 3-Hydroxy-4, 5-dimethyl-2 [5H]-furanone (Sotolon) in Citrus Soft Drinks.
- (40) SCHOLTES, Caroline; NIZET, Sabrina; COLLIN, Sonia. How sotolon can impart a Madeira off-flavor to aged beers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63.11: 2886-2892.
- (41) KÖNIG, T., et al. 3-Hydroxy-4, 5-dimethyl-2 (5 H)-furanone (sotolon) causing an off-flavor: Elucidation of its formation pathways during storage of citrus soft drinks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1999, 47.8: 3288-3291.