



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biotechnologie Avanzate

Caratterizzazione della componente volatile di
tipologie di aceti diversi: il caso degli Aceti Balsamici
di Modena I.G.P. e i relativi mosti

Relatore:

Prof. Alessio Porta 

Correlatore:

Erik Uffredi

Tesi Sperimentale di

Michela Fornara

Anno Accademico 2023/2024

A chi mi è sempre stato accanto

*A chi non c'è più ma vorrebbe tanto esserci,
a Barbara*

INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1 Aceto	2
<i>1.1.2 Produzione dell'aceto</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3 Batteri acetici</i>	<i>8</i>
<i>1.1.4 Fermentazione alcolica</i>	<i>10</i>
<i>1.1.5 Fermentazione acetica</i>	<i>11</i>
<i>1.1.6 Tipologie di aceto</i>	<i>13</i>
<i>1.1.7 Composti volatili e acidi organici negli aceti: bioattività e benefici per la salute</i>	<i>15</i>
1.2 I mosti d'uva	18
<i>1.2.1 La reazione di Maillard</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2 Produzione di mosti per Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP</i>	<i>19</i>
<i>1.2.3 Produzione di mosti per Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	<i>19</i>
1.3 Aceto balsamico	21
<i>1.3.1 Produzione di Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2 Produzione di Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	<i>23</i>
1.4 Ponti	26
1.5 Analisi delle sostanze volatili	27
<i>1.5.1 Gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa a mobilità ionica</i>	<i>28</i>
1.6 Analisi sensoriale	31
<i>1.6.1 Codice visivo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	<i>32</i>
<i>1.6.2 Codice olfattivo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	<i>33</i>
<i>1.6.3 Codice gustativo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	<i>36</i>
<i>1.6.4 Valutazione sensoriale dell'aceto balsamico</i>	<i>37</i>
SCOPO DEL LAVORO	39
MATERIALI E METODI	41
3.1 FlavourSpec	42
<i>3.1.1 Preparazione dei campioni di Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	<i>47</i>
<i>3.1.2 Preparazione dei campioni di mosti d'uva</i>	<i>49</i>
<i>3.1.3 Software</i>	<i>51</i>

3.2 Formazione dei panel	56
<i>3.2.1 Sessioni di valutazione sensoriale</i>	56
RISULTATI E DISCUSSIONE	59
4.1 Ottimizzazione delle condizioni analitiche per la determinazione qualitativa dei composti volatili (VOCs) in Aceti Balsamici di Modena I.G.P.	60
<i>4.1.1 Ottimizzazione del metodo di analisi dell'Aceto Balsamico di Modena I.G.P.</i>	60
<i>4.1.2 Ottimizzazione delle condizioni di preparazione del campione di Aceto Balsamico di Modena IGP</i>	65
<i>4.1.3 Composti volatili caratterizzati in Aceti Balsamici di Modena IGP utilizzando il nuovo metodo di analisi</i>	67
4.2 Valutazione sensoriale	71
<i>4.2.1 Sessioni di valutazione sensoriale utilizzando campioni esempio ottenuti tramite confronto strumentale</i>	71
<i>4.2.2 Elaborazione statistica e registrazione dei dati</i>	78
<i>4.2.3 Confronto dei risultati del panel test con le immagini strumentali del FlavourSpec®</i>	80
4.3 Caratterizzazione del profilo volatile dell'Aceto Balsamico di Modena IGP: VOCs che danno il sentore legnoso	83
4.4 Valutazione delle condizioni analitiche per la determinazione qualitativa dei composti volatili (VOCs) in mosti d'uva	91
<i>4.4.2 Ottimizzazione del metodo di analisi del mosto d'uva: tempistiche e temperature di analisi</i>	93
<i>4.4.3 Composti volatili caratterizzati nei mosti</i>	96
4.5 Eterogeneità del profilo volatile dei mosti d'uva	99
4.6 Comparazione dei cromatogrammi di Aceti Balsamici di Modena I.G.P. con i relativi mosti	101
CONCLUSIONI	103
BIBLIOGRAFIA	106
RINGRAZIAMENTI	111

Introduzione

1.1 Aceto

Secondo l'Art. 49 disegno di legge n. 2535, la denominazione di «aceto di ...», seguita dall'indicazione della materia prima, intesa come liquido alcolico o zuccherino utilizzato come materia prima da cui deriva, è riservata al prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione acetica di liquidi alcolici o zuccherini di origine agricola, che presenta al momento dell'immissione al consumo umano diretto o indiretto un'acidità totale, espressa in acido acetico, compresa tra 5 e 12 grammi per 100 millilitri, una quantità di alcol etilico non superiore a 0,5 % in volume, che ha le caratteristiche o che contiene qualsiasi altra sostanza o elemento in quantità non superiore ai limiti riconosciuti normali e non pregiudizievoli per la salute, indicati nel decreto del Ministro della Salute.¹

In generale quindi l'aceto è una soluzione di acido acetico in acqua, generata da un processo di fermentazione in due fasi.

L'acido acetico (chiamato anche acido etanoico) è un composto chimico con la formula CH_3COOH ; questo composto caratterizza il sapore del prodotto, nonché il suo profilo chimico (Fig. 1).²

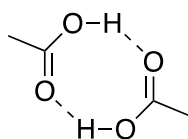


Figura 1: Struttura dimerica dell'acido acetico.

L'aceto viene utilizzato come conservante, condimento e additivo aromatizzante; inoltre, date le sue proprietà benefiche, veniva anche utilizzato nella medicina antica. Diversi studi, infatti, evidenziano i suoi potenziali effetti nutrizionali che possono direttamente influenzare la salute dei consumatori. Ciò è dovuto, in gran parte, alle proprietà salutari che l'acido acetico può esercitare sul fegato e sul tratto gastrointestinale; presenta inoltre una forte attività antiossidante, può ridurre il contenuto lipidico nel sangue e regolare la pressione sanguigna andando indirettamente a contribuire a una riduzione dell'insorgenza di malattie come l'obesità, il cancro, il diabete e l'ipertensione.²

1.1.2 Produzione dell'aceto

Per avviare il processo di acetificazione possono essere sfruttate colture pure oppure, più comunemente, aliquote di vini freschi aggiunte ad aceti già in fase di “fermentazione” ottenendo una miscela con un grado alcolico di 3-4° e che quindi rappresenta un ambiente ideale per garantire l'ossidazione. Il contenuto residuo di alcol determina la fine del processo di acetificazione e varia in base al prodotto che si vuole ottenere: per un aceto di qualità il processo si arresta una volta raggiunto lo 0,6-1,5% di alcol.⁴

Esistono varie tecniche per la produzione di aceto: la tecnica più antica e conosciuta è il **metodo tradizionale statico o metodo Orleans** dove il processo di produzione dell'aceto è lento e continuo e come coltura iniziale viene utilizzato aceto di alta qualità al quale viene aggiunto vino ad intervalli settimanali.⁴ Inizialmente l'aceto viene fatto fermentare in botti da 200 litri.³ Dopo circa un mese, l'aceto può essere prelevato dalla botte, circa 10/15 litri a settimana, aggiungendo man mano altro vino in modo da sostituire l'aceto; quando tutto l'alcool si è trasformato in acido acetico, l'aceto viene spillato attraverso un rubinetto e circa il 15% del liquido viene lasciato nella botte per miscelarsi al lotto successivo (Fig.2).⁴ Solitamente il vino viene aggiunto utilizzando un tubo di vetro che arriva fino al fondo della botte in modo da non interferire con la popolazione batterica in superficie⁴ che forma un biofilm noto come “la madre dell'aceto”²; questo perché durante il processo di “fermentazione acetica” è necessaria la presenza di ossigeno disciolto, assicurando così la conversione di alcol in acido acetico.³ Proprio per questo motivo le botti presentano un foro nella parte superiore, coperto con reti in modo da impedire l'ingresso di insetti, permettendo un contatto permanente con l'aria esterna.⁴ La produzione di aceto tramite questo metodo però richiede molto tempo comportando un aumento dei costi, ma permette di ottenere un prodotto di alta qualità, più complesso dal punto di vista sensoriale grazie alla presenza di sottoprodotti metabolici sintetizzati dai batteri acetici.²

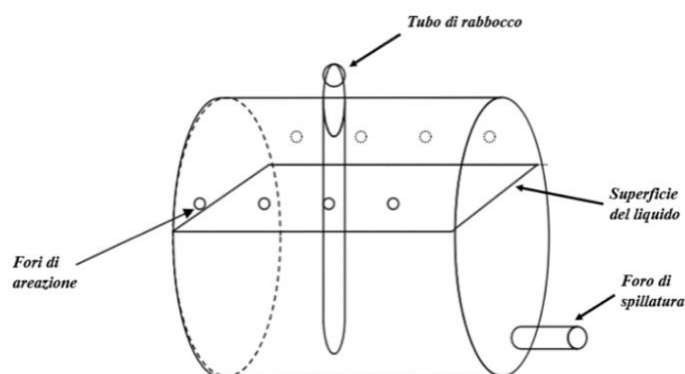


Figura 2: Struttura delle botti utilizzate nel metodo Orleans.

Un'altra tecnica è il **sistema a percolamento** che si avvale di grandi serbatoi in quercia o metallo dove all'interno sono presenti più ripiani e una griglia su cui sono posti trucioli di faggio al di sopra del quale vivono i batteri acetici; la soluzione alcolica viene versata nella parte superiore del serbatoio così che possa attraversare lentamente i trucioli (Fig.3). È inoltre presente un compressore che insuffla aria attraverso dei fori presenti ai lati o sul fondo del serbatoio e la presenza dei trucioli favorisce il flusso d'aria dal fondo verso l'alto. Il contatto della soluzione alcolica con il legno permette una parziale acetificazione, che una volta raggiunto il fondo del serbatoio viene prelevato per poi essere nuovamente versato nella parte superiore del serbatoio in modo da poter di nuovo attraversare i trucioli di faggio e di conseguenza essere acetificato dai batteri acetici; questi cicli continuano fino a che non si ottiene l'aceto che verrà poi versato in serbatoi di stoccaggio. Il processo ossidativo attuato dai batteri acetici durante la "fermentazione" può portare ad un innalzamento di temperatura potenzialmente pericoloso per la sopravvivenza batterica; è quindi necessario un sistema di raffreddamento a serpentine per mantenere la temperatura intorno a 25-30°C.

Utilizzando questo metodo l'aceto può essere prodotto entro un periodo di 10 giorni e se presenta un contenuto elevato di acido acetico, il prodotto finito può essere diluito con acqua.⁴ Tuttavia è lento e la resa finale è bassa in quanto bisogna tenere in considerazione che una percentuale di aceto viene perso a causa di perdite per evaporazione.³

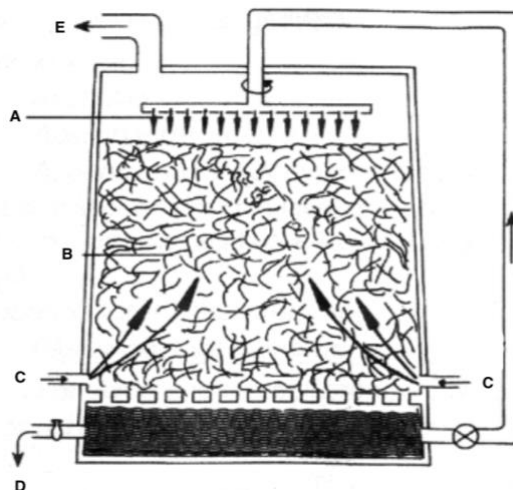


Figura 3: Esempio di struttura del serbatoio utilizzato nel sistema a percolamento (A) sistema meccanico di versamento della soluzione alcolica; (B) trucioli di faggio; (C) sistema d'immissione d'aria; (D) rubinetto da cui è possibile estrarre l'aceto; (E) sfogo dal quale uscirà l'aria insufflata dal basso.⁴

La tecnica più utilizzata a livello industriale, soprattutto per la produzione di aceto di vino, nota sin dagli anni 30 e portata in Italia nel 1936 dal Cav. Guido Ponti,⁴³ è il **metodo a fermentazione sommersa o rapida** dove la sostanziale differenza rispetto ai metodi precedenti è che i batteri acetici si trovano direttamente immersi nel liquido da fermentare, senza alcun supporto, e a stretto contatto con l'ossigeno presente nell'aria grazie ad un sistema di microssigenazione; la soluzione alcolica presente nel serbatoio viene quindi mantenuta in agitazione blanda così che i batteri non vadano a formare la "madre" ma rimangano in sospensione garantendo rese maggiori.^{3,4} In generale questo metodo consiste in tre fasi quali il carico di materie prime nel serbatoio che deve avvenire in maniera continua e lenta così che i batteri abbiano il tempo necessario per trasformarlo in acido acetico in quanto sono sensibili ad alte concentrazioni di etanolo, la "fermentazione" e lo scarico della soluzione fermentata dopo essersi assicurati dell'assenza di alcol fermentabile; in questo caso non verrà scaricato tutto il prodotto, ma in parte verrà lasciato nel serbatoio per il ciclo successivo.³

Utilizzando questa tecnica, quindi, la biotrasformazione avviene in brevi periodi di tempo, 24-48 ore, ottenendo prodotti ad alta acidità e questo è possibile grazie

- all'utilizzo del **bioreattore Frings**, commercializzato da Heinrich Frings GmbH and Co., Bonn, Germania, ovvero dei serbatoi in acciaio inossidabile (Fig.4) che possono funzionare con diversi volumi, da una scala pilota (8-10 L) a un volume su scala industriale (20.000-100.000 L). Sono dotati di un sistema di serpentine all'interno del quale scorre acqua con funzione di scambiatori di calore in modo da mantenere la soluzione alcolica ad una temperatura costante di 30-31 °C per non far evaporare l'etanolo e un efficiente sistema di recupero volatile utilizzando condensatori e depuratori di gas di scarico riducendo al minimo le perdite di composti volatili. Presentano inoltre sul fondo un sistema di aerazione costituito da una serie di turbine per l'immissione continua di microbolle di aria, generando così una miscela omogenea con il mezzo di coltura; questo permette di raggiungere una maggior efficienza di ossigenazione, ottenendo così rendimenti di "fermentazione" più elevati rispetto all'uso di metodi tradizionali.²

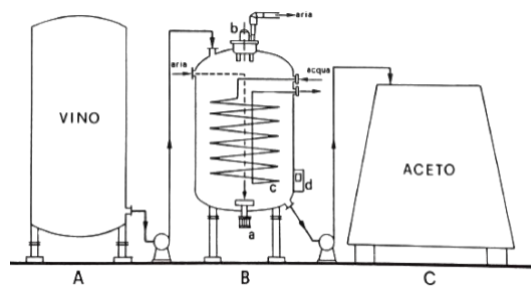


Figura 4: Schema esempio metodo a fermentazione sommersa.

(A) serbatoio contenente il vino; (B) bioreattore per la produzione di aceto; (C) tina di maturazione del prodotto; (a) aeratore; (b) dispositivo antischiuma; (c) serpentina di raffreddamento; (d) analizzatore automatico della gradazione alcolica.⁴⁴

- alla scelta della **modalità operative**, quali batch, fed-batch e continuo.

Generalmente per la produzione industriale di aceto viene utilizzata la modalità fed-batch, dove ogni ciclo viene avviato da una fase di carico che reintegra il bioreattore con un mezzo fresco al volume di lavoro senza superare una concentrazione di etanolo preimpostata. Infine, una frazione del volume nel bioreattore viene parzialmente scaricata e il volume rimanente viene utilizzato come inoculo per il ciclo successivo (Fig. 5). Sapendo che, come già accennato, i batteri sono sensibili sia all'etanolo che all'acido acetico, è necessario, per mantenere intervalli adeguati di concentrazioni sia del substrato che del prodotto, un controllo appropriato dei valori delle variabili operative che in questo caso sono la concentrazione iniziale di etanolo nel terreno di coltura, la concentrazione a cui l'etanolo deve essere esaurito per un ciclo per essere considerato finito, il volume di soluzione che viene scaricato e la velocità con cui il bioreattore viene caricato con mezzo fresco.²

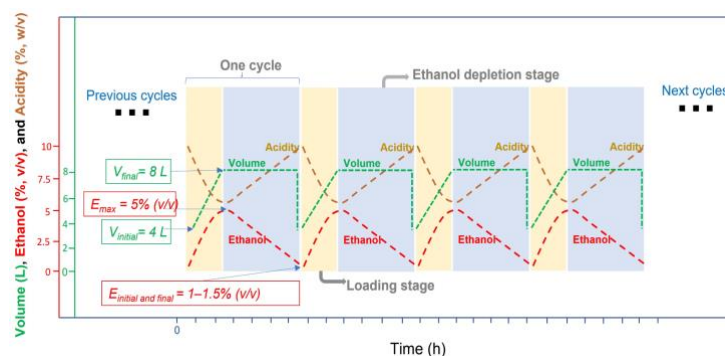


Figura 5: coltura sommersa per la produzione di aceto in modalità fed-batch.

Ogni ciclo di acetificazione inizia caricando il fermentatore al suo volume di lavoro (8 L) senza superare una concentrazione di etanolo preimpostata [5% (v/v)]. Quando la concentrazione di etanolo scende all'1,0–1,5% (v/v), il 50% del contenuto del bioreattore (4 L) viene scaricato. Questo sistema viene mantenuto per i cicli produttivi successivi.²

- ad un **sistema automatizzato di monitoraggio** consentendo di ottenere una registrazione costante dei dati delle principali variabili da misurare, compreso il volume del mezzo, la concentrazione di etanolo e di ossigeno disciolto e la temperatura. Questo è utile soprattutto per quanto riguarda la modalità fed-batch perché le condizioni di “fermentazione” possono variare nel corso dei cicli.² Il controllo di supervisione e l'acquisizione dei dati (**SCADA**) consiste in un software di monitoraggio che fornisce una serie di istruzioni per sensori specifici controllati da moduli di acquisizione del segnale (Fig.6).⁵



Figura 6: Esempio di un impianto pilota su scala di laboratorio dotato di un bioreattore Frings (8 L) che funziona in modalità fed-batch e di un sistema di automazione SCADA che controlla le principali variabili del sistema. Laboratorio di ingegneria biochimica, sezione di ingegneria chimica, Università di Córdoba, Spagna.²

Nonostante le rese siano elevate, questo processo presenta anche degli aspetti negativi in quanto, data la velocità del processo produttivo, gli enzimi batterici permangono per breve tempo a contatto con i rispettivi substrati, con una conseguente minore formazione di molecole volatili. Inoltre, rispetto agli aceti ottenuti con metodo Orleans, il prodotto risulta più torbido e necessita di successive filtrazioni.⁴

1.1.3 Batteri acetici

I batteri utili per la produzione dell'aceto sono Gram-negativi e il loro metabolismo è strettamente aerobico utilizzando l'ossigeno molecolare come ultimo accettore di elettroni. Ci sono però alcuni ceppi di *Acetobacter* e *Gluconobacter* che possono tollerare basse concentrazioni di ossigeno disciolto, come ad esempio durante la fermentazione alcolica in vinificazione. Questi batteri sono catalasi positivi e ossidasi negativi e la loro temperatura di crescita ottimale varia solitamente tra 25 e 30°C; se si dovesse superare questa soglia andremo incontro ad inattivazione enzimatica e danneggiamento della membrana batterica con conseguente aumento di suscettibilità all'etanolo e all'acido acetico che li condurrebbe alla morte. Crescono bene ad un pH compreso tra 5 e 6,5, sebbene molti non presentano difficoltà di crescita anche a livelli di pH molto più bassi, infatti la tolleranza al pH dipende dalle concentrazioni di etanolo e acido acetico e dalla disponibilità di ossigeno.²

In generale la concentrazione di etanolo che consente la sopravvivenza dei batteri acetici è del 10-14% in quanto concentrazioni minori o troppo elevate causano un arresto del processo ossidativo, mentre invece concentrazioni superiori a 5 g/l di acido acetico inibiscono la sopravvivenza batterica perché è in grado di attraversare liberamente la membrana plasmatica, danneggiarla, entrare nella cellula e alterarne l'equilibrio. I batteri acetici, però, riescono a sopravvivere a concentrazioni non elevate di acido acetico perché possiedono una diversa struttura cellulare ed enzimi in grado di convertire l'acido acetico in composti innocui e sono anche in grado di formare biofilm aumentando la resistenza agli acidi.⁸

La maggior parte dei batteri acetici presenta una forma ellissoidale o cilindrica e la loro dimensione varia tra 0,4 e 1 µm di larghezza e 0,8 e 4,5 µm di lunghezza e possono essere osservati al microscopio da soli, in coppia o come aggregati (Fig. 7).²

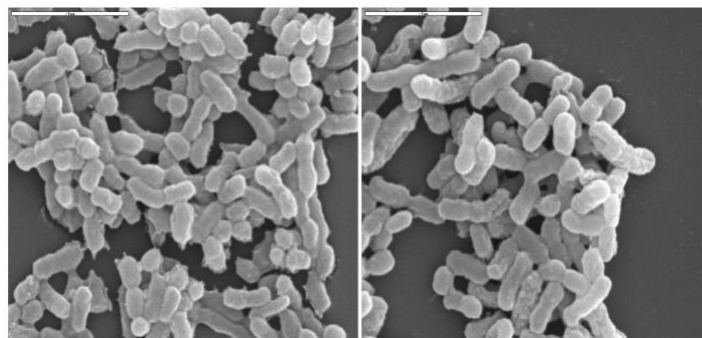


Figura 7: Immagini di batteri acetici ottenute da un campione di aceto mediante microscopia elettronica a scansione (SEM).²

In natura sono presenti in substrati contenenti zuccheri e alcoli come succhi di frutta, vino, sidro, birra e aceto che vengono ossidati in modo incompleto producendo acidi organici come l'acido acetico dall'etanolo, prodotto ad esempio dai generi *Acetobacter* e *Komagataeibacter* a causa delle loro elevate capacità ossidative, o l'acido gluconico dal glucosio, prodotto dal genere *Gluconobacter*. I batteri dell'acido acetico sono classificati nella famiglia delle *Acetobacteraceae* che è inclusa nell'ordine *Rhodospirillales* della classe *Alphaproteobacteria*. Le *Acetobacteraceae* sono costituite da due gruppi

- un gruppo acidofilo dove sono presenti batteri che hanno origini fisiologicamente e biochimicamente eterogenee
- un gruppo acetoso dove sono presenti i batteri acetici che comprendono un'ampia diversità di generi: *Acetobacter*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter* e *Komagataeibacter*.^{2,6}

L'attività dei batteri acetici è uno dei fattori principali per la produzione di diverse tipologie di aceto; analizzando nello specifico i generi sopra citati, possiamo quindi avere le *Acetobacter* spp. che si trovano ampiamente nell'aceto di vino, di cereali e balsamico prodotti con metodi tradizionali e nelle prime fasi di quelli prodotti da colture sommerse o in aceti a bassa acidità perché sono sensibili a livelli di acidità superiori all'8-10%. L'*A. pasteurianus* è una delle specie più diffuse.²

Dopodiché possiamo citare i *Gluconobacter*, microrganismi che potrebbero andare ad alterare vino, birra e sidro portando a sentori di muffa e odori fenolici; sono presenti in fermentazioni acetiche tradizionali, con una modesta tolleranza all'acido acetico e al calore.⁹

Ci sono anche i *Gluconacetobacter*, presenti in ambienti ricchi di zuccheri e ottimi produttori di acido acetico dall'etanolo, ma sensibili a temperature superiori a 30 °C.² *Komagataeibacter* spp. deriva dalla riclassificazione di alcune specie precedentemente appartenenti al genere *Gluconacetobacter*; possono resistere a livelli di acidità fino al 15-20% e quindi sono predominanti nelle colture sommerse tra cui quella per la produzione dell'aceto di alcol e nelle fasi finali della produzione di diversi aceti di vino. *K. europaeus* è uno dei principali batteri acetici per la produzione industriale di aceto.²

Attualmente sono stati identificati 47 generi e 207 specie appartenenti alla famiglia delle *Acetobacteraceae* secondo il database List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN);⁷ di questi, 20 generi e 108 specie sono batteri acetici.²

1.1.4 Fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica è la prima reazione necessaria per poter poi ottenere l'aceto, procede rapidamente e solitamente si esauriscono la maggior parte degli zuccheri nelle prime 3 settimane; avviene in condizioni anaerobiche dove gli zuccheri fermentabili vengono convertiti in etanolo dall'azione dei lieviti che sono solitamente ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* (Fig.8). Il processo metabolico inizia dal glucosio che può attraversare la membrana plasmatica tramite diffusione facilitata; una volta all'interno della cellula, il glucosio viene poi fosforilato sul C6 per poi essere ossidato, in condizioni aerobiche tramite glicolisi, ottenendo due molecole di piruvato e di ATP per ogni molecola di glucosio.³ A questo punto il piruvato, in condizioni anaerobiche, subisce una fermentazione alcolica dove inizialmente avviene una decarbossilazione da parte della piruvato decarbossilasi, con eliminazione di una molecola di CO₂ e la formazione di acetaldeide che poi viene ridotta a etanolo per mezzo dell'enzima alcol deidrogenasi NADH-dipendente. Il tutto avviene a una temperatura ottimale di 25-30°C, un pH tra 2,9 e 4 e una concentrazione di ossigeno tra i 5 e i 10 mg/l.¹⁰ Nell'idrolizzato sono presenti molte forme di carboidrati oltre al glucosio, come mannosio e fruttosio che sono due isomeri del glucosio e possono essere fermentati dai ceppi di *S. cerevisiae*.³

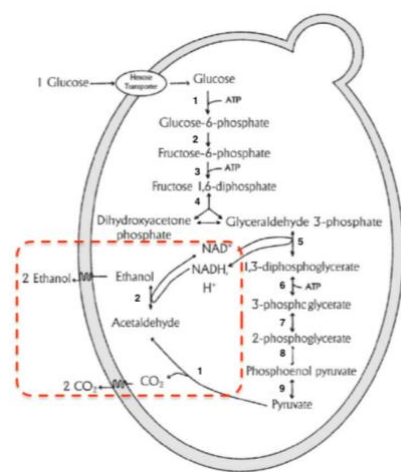


Figura 8: Fermentazione alcolica in *S. cerevisiae*. Glicolisi: (1) esochinasi, (2) fosfoesoso isomerasi, (3) fosfofruttochinasi, (4) fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi, (5) gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, (6) fosfoglicerato chinasi, (7) fosfoglicerato mutasi, (8) enolasi, (9) piruvato chinasi. Fermentazione alcolica: (1) piruvato decarbossilasi, (2) alcol deidrogenasi.

I lieviti, insieme ai batteri acetici, sono responsabili del profilo aromatico-olfattivo dei vini e di conseguenza degli aceti, oltre che del contenuto di etanolo e quindi di acido acetico. Tra le sostanze prodotte dai lieviti possiamo prendere in considerazione l'acido acetico, acetaldeide, diacetile, alcuni esteri etilici e alcoli superiori.¹¹

1.1.5 Fermentazione acetica

Definita erroneamente “fermentazione”, è il processo attraverso il quale avviene la biotrasformazione dell’etanolo in acido acetico da parte dei batteri acetici; pertanto questi vengono solitamente utilizzati come colture starter nella produzione di aceti.³

Questa biotrasformazione consiste in una reazione di ossidazione costituita da due fasi:

- nella prima fase l’enzima alcol deidrogenasi (ADH) si lega alla pirrolochinolina chinone (PQQ) per ossidare l’etanolo in acetaldeide; PQQ è un ortochinone eterociclico aromatico che svolge una funzione simile al NAD: nei mitocondri vi è la riconversione di PQQ-H2 in PQQ utilizzando enzimi della catena respiratoria utile nella produzione di energia sotto forma di ATP.
- durante la seconda fase l’acetaldeide viene ossidata ad acido acetico dall’aldeide deidrogenasi NAD-dipendente (ALDH) (Fig.9).²

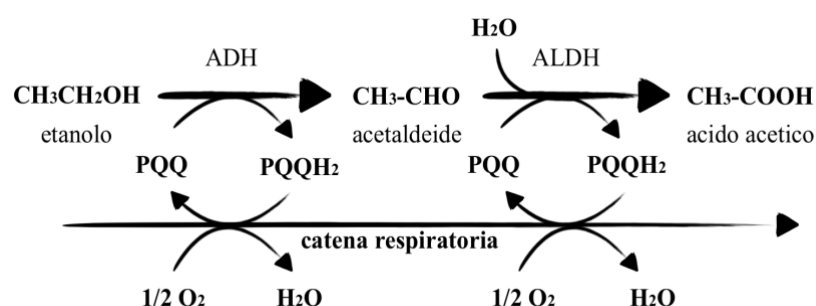


Figura 9: Reazione di conversione dell'alcol etilico in acido acetico.

Il complesso enzimatico è localizzato sul lato periplasmatico della membrana cellulare interna² ed è strettamente legato alla catena respiratoria, nella quale l'ossigeno funge da accettore finale degli elettroni.³

Per garantire che questo processo avvenga in condizioni ottimali è necessario mantenere una certa concentrazione di ossigeno disciolto perché può influenzare la velocità del processo di fermentazione e le qualità organolettiche del prodotto finale;³ infatti, secondo uno studio, la mancanza di ossigeno durante la fermentazione acetica potrebbe portare all'accumulo di acetaldeide e ad una minore produzione di acido acetico.¹²

L'acido acetico, però, risulta tossico per il batterio che lo produce, di conseguenza quello che si trova all'interno della cellula può essere completamente ossidato dall'acetil-CoA sintasi comportando l'ingresso di acetil-CoA nel ciclo di Krebs e fornendo energia sotto forma di ATP. Ci sono inoltre delle proteine della membrana esterna (OMPA) e delle pompe di efflusso (trasportatori OPRM e ABC) che possono essere attivate per il rilascio

di acido acetico e la disintossicazione cellulare nei momenti finali del processo; queste proteine di membrana sono molto importanti nel controllo della produzione cellulare di acido acetico (Fig.10).²

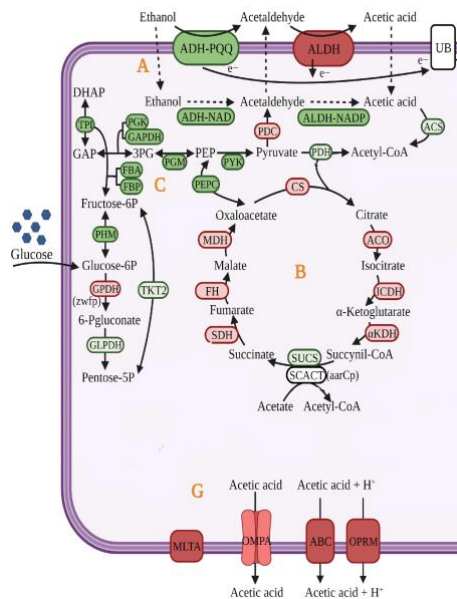


Figura 10: Processi molecolari che avvengono in *K. europaeus* durante il processo di acetificazione. (A) ossidazione dell'etanolo in acido acetico, (B) ciclo di Krebs, (C) glicolisi, (G) meccanismi di membrana per il rilascio di acido acetico. GAP, gliceraldeide 3-fosfato; DHAP, diidrossiacetone fosfato; 3PG, 3-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolo-piruvato.²

Quindi, in conclusione, le principali condizioni ambientali che garantiscono un corretto svolgimento della fermentazione acetica sono le seguenti:

- temperatura compresa tra 20 e 30 °C;
- concentrazione di etanolo non superiore o inferiore al 10-14% v/v;
- presenza di ossigeno;
- mantenimento di concentrazioni inferiori a 5 g/l di acido acetico.

1.1.6 Tipologie di aceto

In tutto il mondo è presente una grande varietà di aceti, le cui proprietà organolettiche sono conferite dalla composizione microbica iniziale, dalla materia prima e dai processi produttivi. Diverse materie prime possono essere lavorate e utilizzate come substrati della fermentazione acetica, tra cui vini, liquori, cereali, succhi di frutta, siero di latte, miele... Data la materia prima da cui derivano e le regioni in cui vengono prodotti, gli aceti possono essere suddivisi in varie tipologie

- **Aceto di alcool o aceto bianco**

L'aceto di alcol si ottiene dalla fermentazione acetica di un mezzo alcolico prodotto da una precedente fermentazione alcolica di un prodotto agricolo contenente zuccheri fermentabili. Questa tipologia di aceto può raggiungere alti livelli di acidità e anche se, da un punto di vista sensoriale, il suo profilo organolettico è molto scarso, in termini quantitativi è uno degli aceti più prodotti in tutto il mondo, principalmente in Gran Bretagna, Germania e Stati Uniti. L'aceto di alcol viene principalmente utilizzato come prodotto per la pulizia ma anche come condimento e conservante alimentare.²

- **Aceto asiatico: aceto di cereali**

Questi aceti differiscono in base a diversi fattori come la tipologia di cereali utilizzati come materia prima (riso, sorgo, orzo, mais e grano), la composizione microbica delle colture iniziali, le procedure di produzione e i periodi di invecchiamento; tra questi, l'aceto di riso ottenuto dalla fermentazione del vino di riso *Sake* è popolare nei paesi asiatici.² È ottimo per aromatizzare erbe, spezie e frutta grazie al suo sapore delicato ed è ampiamente utilizzato nei piatti asiatici poichè non altera significativamente l'aspetto e il sapore del cibo.³

- **Aceto di frutta**

Questa tipologia di aceto viene solitamente prodotto come alternativa per andare a sfruttare le eccedenze di frutta e degli scarti di essa esistenti, riducendo così l'impatto economico e ambientale prodotto dall'industria della frutta. Sebbene i paesi asiatici siano stati i primi ad interessarsi allo sfruttamento della frutta diversa dall'uva come materia prima, negli ultimi decenni il suo uso è aumentato anche in altre parti del mondo: un esempio è l'aceto di mele che deriva dalla fermentazione acetica del sidro, succo di mela fermentato, molto utilizzato soprattutto nel Regno Unito, negli Stati Uniti e in Svizzera.

Negli ultimi anni molti altri tipi di frutti diversi sono stati presi in considerazione per la produzione di aceti come bacche, fragole, ananas, ciliegie, cachi, arance, banane e pomodori. A seconda del frutto utilizzato il prodotto finale avrà una composizione nutrizionale diversa perché ad esempio nel caso dell'aceto di mele, l'alto contenuto di polifenoli sarà responsabile delle caratteristiche proprietà organolettiche tra cui un'elevata viscosità, nonché molti benefici per la salute.²

- **Aceto di bambù**

Questa tipologia di aceto ha una caratteristica colorazione marrone-rossa ed è composto da quasi 90% di acqua, più di 200 tipi di componenti chimiche e presenta un odore di fumo. Viene quotidianamente utilizzato in Giappone in agricoltura in quanto è dimostrato che ha un effetto significativo sulla germinazione e crescita delle radici delle piante da seme: secondo Mu, Uehara e Furuno (2003), stimola le sostanze simili agli ormoni che regolano la germinazione e la crescita radicale dei semi.³

- **Aceto mediterraneo: di vino e Aceto Balsamico**

Gli aceti di vino possono derivare sia da vini bianchi che rossi. In Spagna, ad esempio, ci sono tre Denominazioni di Origine Protette (DOP): “Aceto di Jeres”, “Aceto di Condado de Huelva” e “Aceto di Montilla-Moriles”, tutti situati in Andalusia.

Nel nord Italia, l'aceto balsamico tradizionale presenta due Denominazioni di Origine Protetta, quali l'“Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP” e l'“Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia”; l'Aceto Balsamico di Modena presenta invece l'Indicazione Geografica Protetta.

Dalle varietà autoctone di uva coltivate specificatamente nella provincia di Modena si ottiene un mosto d'uva, che una volta cotto, viene sottoposto a fermentazione simultanea e spontanea con aceto di vino e aceto invecchiato di almeno 10 anni, seguita da un periodo di invecchiamento utilizzando botti di diversi tipi di legno e dimensioni.² Ci sono alcuni fattori che influenzano le proprietà chimiche e organolettiche dell'aceto, come il sistema di produzione utilizzato, la materia prima utilizzata come substrato, la quantità di tempo trascorso in botti di legno e la tipologia di legno che costituisce le botti per l'invecchiamento.³

1.1.7 Composti volatili e acidi organici negli aceti: bioattività e benefici per la salute

L'aroma e il sapore degli aceti sono dovuti dalla presenza di acido acetico, ma anche da acidi organici, esteri, chetoni e aldeidi prodotti a partire dall'acido acetico durante il processo di fermentazione e invecchiamento. La formazione di questi composti volatili può essere influenzata dalle materie prime utilizzate, dai metodi di produzione e dal tempo impiegato per il processo di acetificazione.¹³

La tabella 1 elenca i composti volatili identificati dal mio collega negli Aceti Balsamici di Modena IGP Ponti, dove la presenza di alcune delle seguenti molecole all'interno della frazione volatile di aceti balsamici è stata attestata da diversi lavori scientifici.¹⁸

Composto volatile	Numero CAS	Fonte
Acetato di isobutile	110-19-0	13
Acetato di propile	109-60-4	13
Acetato di isoamile	123-92-2	15
Furfurale	98-01-1	15
Acetoina	513-86-0	15
Acido acetico	64-19-7	15
Diacetile	431-03-8	15
Acetato di isopropile	108-21-4	13
Pentanale	100-62-3	16
Acetato di etile	141-78-6	17
Isoprenolo	763-32-6	-
1,1-dietossietano	105-57-7	-
3-pentanone	96-22-0	-
2-pentanone	107-87-9	-

Tabella 1: Composti volatili rilevati in campioni di Aceto Balsamico di Modena IGP con i relativi numeri CAS.¹⁸

In uno studio condotto da Rodríguez Madrera *et al.* viene evidenziato come la presenza dei composti volatili negli aceti sia influenzata in maniera significativa dalla maturazione stessa dell'aceto; si è scoperto che gli aceti con periodi di maturazione prolungati, presentano concentrazioni più elevate di questi composti.¹⁴

Focalizzandoci sull'Aceto Balsamico di Modena IGP, ci sono dei composti volatili responsabili dell'aroma fruttato (Tabella 2).¹⁸

Composto volatile	Numero CAS	Aroma
Acetato di isoamile	123-92-2	Banana
Acetato di isobutile	110-19-0	Fruttato, banana
Acetato di propile	109-60-4	Pera
Acetato di isopropile	108-21-4	Fruttato
Acetato di etile	141-78-6	Fruttato
3-pentanone	96-22-0	Dolce
2-pentanone	123-42-2	Dolce

Tabella 2: Composti volatili caratterizzanti l'aroma di Aceti Balsamici di Modena IGP con i relativi numeri CAS.

Per quanto concerne l'acetato di etile contenuto negli aceti, secondo *Nada et al.*, presenta la capacità di inibire la crescita di cellule cancerose umane come le cellule di adenocarcinoma del colon (Caco-2), carcinoma polmonare (A549), adenocarcinoma alla mammella (MCF-7), carcinoma alla vescica (5637) e carcinoma della prostata (LNCaP). In questo studio, l'aceto utilizzato è l'aceto Kurosu, tradizionale aceto giapponese derivante dalla fermentazione del riso, che si è visto in grado di inibire le linee cellulari in maniera dose-dipendente con un'inibizione pronunciata soprattutto nel caso della linea cellulare Caco-2 (inibizione fino al 62% con una dose del 0,025%) dove si è vista una diminuzione del numero di cellule nella fase G2/M del ciclo cellulare ed un aumento nella fase sub-G1 (apoptotica) data anche dalla frammentazione del DNA. Inoltre un'analisi tramite RT-PCR ha rivelato che l'espressione dell'mRNA di p21 era indotta nelle cellule Caco-2 trattate con aceto di Kurosu, suggerendo quindi che l'arresto del ciclo cellulare era probabilmente dato dall'induzione di p21 andando potenzialmente ad indurre l'apoptosi nella linea cellulare Caco-2.¹⁹

Un'altra molecola volatile che presenta bioattività è l'acido acetico: secondo *Terasaki et al.* è in grado di causare danni alle cellule tumorali in quanto quest'ultime si è scoperto siano più sensibili alle specie reattive dell'ossigeno, la cui produzione è indotta dall'acido acetico. Questo lo capirono andando a studiare il coinvolgimento dello stress ossidativo

nella morte selettiva delle cellule tumorali da parte dell'acido acetico sia nelle cellule *wild-type* della mucosa gastrica che in quelle tumorali della mucosa gastrica. Anche in questo caso, la capacità dell'acido acetico di indurre apoptosi è dose-dipendente in quanto è necessaria una concentrazione di 2-5 μM di acido acetico per indurre l'apoptosi.

Hanno dimostrato che le cellule tumorali della mucosa gastrica presentavano una maggiore espressione del trasportatore degli acidi monocarbossilici 1 (MTC1) e un elevato assorbimento di acido acetico rispetto alle normali cellule della mucosa gastrica. Quindi l'esposizione delle cellule tumorali all'acido acetico ha aumentato la produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'espressione di MTC1 inducendo l'apoptosi, mentre invece l'esposizione dell'acido acetico alle cellule *wild-type* della mucosa gastrica ha mostrato effetti minori, indicando quindi che l'acido acetico ha indotto l'apoptosi delle cellule tumorali gastriche attraverso un meccanismo che coinvolge lo stress ossidativo.^{20,21}

Oltre agli esempi riportati in precedenza, l'aceto è anche in grado di migliorare la digestione, stimolare l'appetito, ridurre i livelli di glucosio nel sangue,²³ regolare la pressione sanguigna²² e presenta anche proprietà antiossidanti.^{23,24}

1.2 I mosti d'uva

Come già accennato in precedenza, oltre all'aceto di vino, l'altra materia prima da cui partire per ottenere l'Aceto Balsamico di Modena IGP è il mosto d'uva ottenuto direttamente dalle uve dei vitigni tradizionalmente presenti in provincia di Modena.

Prima di poter essere utilizzati per la produzione di Aceto Balsamico, i mosti d'uva devono essere concentrati e/o cotti. In base al prodotto che si vuole ottenere, il procedimento di concentrazione e cottura del mosto è differente e regolato dal rispettivo disciplinare di produzione.

1.2.1 La reazione di Maillard

La reazione prende il nome da Louis Maillard, un chimico francese che nel 1912 osservò l'imbrunimento in soluzioni di zuccheri e amminoacidi dove avvengono una serie complessa di fenomeni in seguito all'interazione di zuccheri riducenti e gruppi amminici delle proteine in processi ad alte temperature di trattamento e in condizioni di bassa attività dell'acqua.

In generale la reazione dipende da molteplici fattori come ad esempio la tipologia e la quantità di reagenti in quanto gli zuccheri chetosi sono più reattivi degli aldosi così come i pentosi lo sono di più degli esosi, dall'attività dell'acqua dove in sistemi ad attività dell'acqua intermedia (AW tra 0,4 e 0,6) la reazione raggiunge la massima velocità. Questa reazione dipende inoltre anche dal tempo e dalla temperatura del trattamento in quanto con una temperatura bassa ma in tempi molto lunghi si può avere la formazione di grandi quantità di prodotti della reazione di Maillard ed è favorita da pH debolmente acidi (pH 4-7) in quanto l'acido catalizza il primo passaggio e l'eccessiva acidità però protonerebbe il gruppo amminico con calo della nucleofilicità.

I composti ottenuti sono di colore bruno e presentano aromi caratteristici di "cotto" quali il pane appena sfornato, cacao, caffè o, nel nostro caso, frutta cotta.

Questa reazione quindi interessa gli alimenti che contengono zuccheri o composti carbonilici come aldeidi e chetoni, dove gli zuccheri maggiormente coinvolti sono gli aldosi come il glucosio, e proteine dove in particolare la reazione interessa il gruppo amminico che può essere quello terminale o quello delle catene laterali degli amminoacidi lisina.

1.2.2 Produzione di mosti per Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP

Come da disciplinare di produzione, il mosto d'uva utilizzato per ottenere l'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP proviene da uve di vigneti localizzati in provincia di Modena composti in tutto o in parte da Lambrusco, Ancellotta, Trebbiano, Sauvignon, Sgavetta, Berzemino e Occhio di Gatta. Inoltre, le uve destinate alla produzione del balsamico tradizionale devono assicurare al mosto un titolo di almeno 15 gradi saccarometrici e una volta ottenuti i mosti freschi dalla pigiatura e sgrondatura o torchiatura dell'uva fresca o ammostata, possono essere sottoposti ad un processo di decantazione in modo da illimpidire il mosto senza l'ausilio di chiarificanti e refrigerazione purché non provochi il congelamento della parte acquosa. Dopodiché, i mosti destinati alla produzione della denominazione di origine protetta, sono sottoposti a cottura a pressione atmosferica in vasi aperti a fuoco diretto per almeno 30 minuti a temperatura non inferiore a 80°C.²⁹

1.2.3 Produzione di mosti per Aceto Balsamico di Modena IGP

Come da disciplinare, i mosti utilizzati per la produzione di Aceto Balsamico di Modena IGP derivano da uve provenienti dai seguenti vitigni: Lambrusco, Sangiovese, Trebbiano, Albana, Ancellotta, Fortana e Montuni che possono essere coltivati al di fuori della provincia di Modena ma che possiedano le seguenti caratteristiche:

- acidità totale minima: 8g/kg (esclusivamente per mosti cotti e concentrati)
- estratto secco netto minimo: 55 g/kg (esclusivamente per mosti cotti e concentrati)

L'azienda che produce il mosto non sarà la stessa che produce l'Aceto Balsamico, in quanto il Balsamico verrà prodotto nell'Acetaia.

Il mosto d'uva si ricava direttamente da uve fresche e quindi durante il periodo di vendemmia che va da settembre a dicembre, per poi essere conservato, con lo scopo di evitare qualsiasi fenomeno fermentativo, attraverso due principali modalità:

- mutizzazione, ovvero renderlo inadatto alla fermentazione aggiungendo grandi quantità di anidride solforosa, circa 1000 bpm, 5/10 volte al di sopra della quantità di anidride solforosa presente nel vino;
- refrigerazione, in particolare per i mosti destinati alla produzione di Aceto Balsamico biologico perché da disciplinare non è consentita l'aggiunta di solfiti.

Prima di poter essere utilizzati per la produzione di Aceto Balsamico, i mosti d'uva devono essere concentrati e/o cotti.

Per ottenere il mosto concentrato è necessario innanzitutto eliminare l'anidride solforosa insufflando vapore direttamente nella massa definita anche "mosto muto" per la presenza molto alta di solfiti e l'impossibilità di innescare fermentazioni; ovviamente, meno tempo è passata dalla raccolta, pigiatura dell'uva e aggiunta di anidride solforosa e più è semplice rimuoverla. Secondo la normativa 1169 del 2011, è utile ottenere dei mosti che contengano una concentrazione di anidride solforosa al di sotto di 10 ppm in quanto, essendo considerato un allergene, per poterne omettere la sua presenza in etichetta è necessario che sia presente in concentrazioni minori a 10 ppm.²⁵ Dopodiché è possibile ottenere il mosto concentrato con una riduzione sino ad un terzo del suo volume iniziale utilizzando un sistema di concentrazione sottovuoto così da mantenere bassa la temperatura mantenendo, in parte, le caratteristiche sensoriali e organolettiche di partenza del prodotto.²⁵ Quindi il mosto viene filtrato e conservato in serbatoi di acciaio inossidabile, avendo cura di controllare la temperatura per impedire fermentazioni indesiderate.⁴³

A questo punto è possibile ottenere il mosto d'uva concentrato cotto: a pressione atmosferica si attua una cottura lenta e prolungata per diverse ore a temperatura controllata. Tradizionalmente venivano utilizzati paioli in rame, materiale che generalmente è stato sostituito dall'acciaio inox. Inizialmente si raggiunge una temperatura di cottura appena al di sotto del punto di ebollizione in modo da far sì che le impurità naturalmente contenute nel mosto raggiungano la superficie in modo tale che poi possono essere eliminate manualmente utilizzando dei colini. Dopodiché la cottura continua a fuoco lento intorno ai 65°C per 24/36 ore, il quale potrebbe comportare una perdita di frazioni aromatiche presenti nella materia prima. In generale il mosto cotto è pronto quando buona parte dell'acqua è evaporata, da disciplinare la cottura si protrae fino a che non si raggiunge una densità non inferiore a 1,240 a 20 °C.

Quello che si ottiene è un liquido denso e viscoso di colore bruno con riflessi ambrati e dal profumo intenso in quanto la concentrazione a caldo innesca la reazione di Maillard che, coinvolgendo zuccheri e aminoacidi, ha come risultato finale la polimerizzazione in composti bruni ad alto peso molecolare a cui si aggiunge la condensazione dei tannini, che a loro volta concorrono all'intensità colorante finale.

Quindi il mosto concentrato, dai sentori più freschi e fruttati, apporta profumi e note floreali all'Aceto Balsamico, mentre invece il mosto cotto dal profumo intenso e sapore dolce, apporta profumi e note che ricordano la frutta cotta.^{25,26}

1.3 Aceto balsamico

I primi utilizzi dell'espressione "aceto balsamico" risalgono ai primi del '700 per indicare un prodotto che si differenzia dal comune aceto di vino, con una accezione storico-tradizionale legata al territorio delle province di Modena e Reggio Emilia.²⁷

In generale il termine "balsamico" non ha mai avuto uno scopo descrittivo delle caratteristiche organolettiche dell'aceto ma puramente identificativo, infatti a oggi viene sfruttato come elemento distintivo del nome di prodotti riconosciuti prima a livello nazionale e successivamente sul piano comunitario.²⁸

Dopo anni di dibattiti e modifiche giuridiche, l'Unione Europea ha assegnato l'indicazione geografica a tre prodotti che godono di questa terminologia, quali l'Aceto Balsamico di Modena IGP, l'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP e l'Aceto Balsamico di Reggio Emilia DOP.

1.3.1 Produzione di Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP

La produzione dell'Aceto balsamico tradizionale di Modena DOP è regolamentata dal disciplinare di produzione all'interno del quale vi sono descritte le materie prime e i passaggi da effettuare per poterlo ottenere.

L'unica materia prima che deve essere utilizzata è il mosto d'uva cotto proveniente, come già detto in precedenza, dai vigneti in provincia di Modena composti in tutto o in parte da Lambrusco, Ancellotta, Trebbiano, Sauvignon, Sgavetta, Berzemino e Occhio di Gatta.

Il mosto d'uva, una volta cotto, deve poi essere sottoposto a fermentazione alcolica ed acetica nelle acetaie situate sempre in provincia di Modena che devono rispondere alle esigenze ambientali e termiche tali da consentire una maturazione del prodotto secondo le tradizionali metodologie assicurando al prodotto stesso la necessaria ventilazione e l'esposizione alle naturali escursioni termiche, portando così alla formazione di precipitazioni e solubilizzazioni all'interno della botte in maniera del tutto naturale, dipendente dal freddo o caldo, inducendo tutta una serie di reazioni chimiche.

Il processo di maturazione non deve essere inferiore a 12 anni, rispettando le procedure consolidate nella tradizione plurisecolare e senza addizione di altre sostanze fatta eccezione dell'eventuale innesto delle colonie batteriche note con il nome di "madre" presente già all'interno della botte come aliquota di aceto precedentemente ottenuto.

Il mosto, quindi, viene inizialmente posto all'interno della "botte madre", dove vi permane per almeno un anno, all'interno del quale è presente una parte del prodotto degli

anni precedenti sfruttato come innesto di batteri acetici e lieviti selezionati naturalmente all'interno dell'acetaia di produzione; in particolare sono responsabili della parziale fermentazione del mosto cotto i generi *Zygosaccharomyces* osmotolleranti e *Saccharomycodes* resistenti all'acido acetico, a cui segue l'acidificazione ad opera dei batteri acetici, come *Gluconobacter* e *Acetobacter*.¹¹

Successivamente, partendo dalla botte più piccola fino alla "botte madre", una serie di travasi, rinalzi e rabbocchi permettono di compensare la perdita di volume dovuta all'evaporazione evitando anche il raggiungimento di una densità troppo elevata (Fig. 11). Le botti utilizzate possono essere di varie dimensioni e costituite da diverse tipologie di legno quali rovere, ginepro, ciliegio, gelso e castagno.

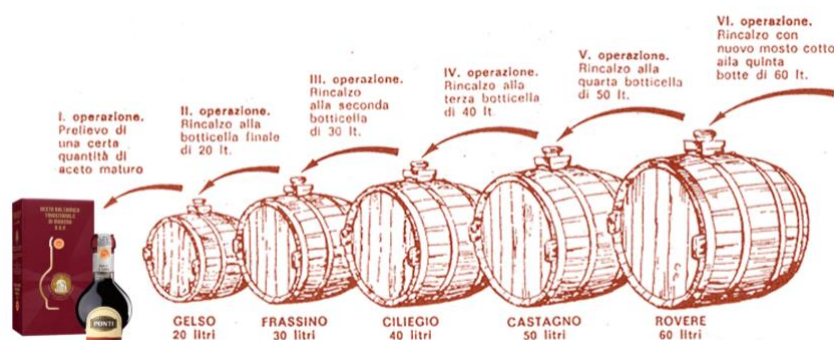


Figura 11: Processo di maturazione, prelievi e rinalzi dell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP.

Dopo 12 anni dall'inizio dell'attività della batteria, ovvero l'insieme delle botti, è possibile estrarre piccole quantità di aceto dalla botte più piccola.

È vietata l'aggiunta di qualsiasi sostanza non prevista nel disciplinare e il prodotto, che a giudizio del detentore, ha acquisito le caratteristiche minime previste dal disciplinare per l'immissione al consumo sarà poi sottoposto ad esame analitico ed organolettico in quanto, all'atto dell'immissione al consumo, deve rispondere alle seguenti caratteristiche citate sempre nel disciplinare:

- colore: bruno scuro, carico e lucente;
- densità: apprezzabile in una corretta, scorrevole sciropposità;
- profumo: "bouquet" caratteristico, fragrante, complesso ma bene amalgamato, penetrante e persistente, di evidente ma gradevole ed armonica acidità;
- sapore: caratteristico del balsamico, dolce e agro e ben equilibrato con apprezzabile acidità e con lieve tangente di aromaticità ottenuta per influenza dei vari legni utilizzati;

- acidità totale: non inferiore a 4,5 gradi (espressa in grammi di acido acetico per 100 grammi di prodotto);
- densità a 20 °C: non inferiore a 1,240.

L’imbottigliamento del prodotto giudicato idoneo deve avvenire in provincia di Modena in appositi contenitori in vetro di colore bianco cristallino e di forma sferica a base rettangolare che devono necessariamente presentare alcune caratteristiche riportate sempre nel disciplinare in modo tale da assicurare la conservazione della qualità e il prestigio del prodotto. Una volta effettuato l’imbottigliamento, ogni contenitore deve essere corredato di un contrassegno non riutilizzabile a serie numerata in modo tale che il contenuto non possa essere estratto senza la rottura del contrassegno stesso.

Tutte le operazioni di elaborazione, invecchiamento obbligatorio e imbottigliamento del prodotto devono avvenire nel territorio della provincia di Modena e ad opera di alcuni addetti del Consorzio Tutela Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP.²⁹

Nel caso specifico dell’azienda Ponti S.P.A vengono prodotti sia l’Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP invecchiato 12 anni, che l’Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP “extravecchio”, ovvero invecchiato 25 anni.

1.3.2 Produzione di Aceto Balsamico di Modena IGP

La produzione di Aceto Balsamico di Modena con Indicazione Geografica Protetta è regolamentata dal disciplinare di produzione contenuto nel regolamento (CE) n. 583/2009, dove viene definito come il prodotto ottenuto, con particolare e tradizionale tecnologia, da mosti d’uva provenienti dai vitigni sopra citati con l’aggiunta di aceto ottenuto per acetificazione di solo vino nella misura di almeno il 10% e di un'aliquota di aceto vecchio di almeno 10 anni che può essere sia aceto di vino che Aceto Balsamico di Modena;³⁰ questo permette ai produttori di differenziare il proprio prodotto utilizzando ricette tradizionali legate alle singole famiglie.⁴³

La percentuale di mosto d’uva cotto e/o concentrato utilizzato non dovrà essere inferiore al 20% della massa totale da avviare all’elaborazione.

In questo caso è consentita l’aggiunta di caramello fino ad un massimo del 2% di volume, utile per la stabilizzazione colorimetrica, ma è vietata l’aggiunta di qualsiasi altra sostanza.

Il processo produttivo parte dalla miscelazione delle materie quali mosto cotto e/o concentrato, aceto di vino e caramello e a seguire avviene una prima filtrazione.

Dopodichè, tramite il consueto metodo di acetificazione lento in superficie (metodo tradizionale statico) o lenta a truciolo (metodo a percolamento) e mediante l'utilizzo di colonie batteriche selezionate, inizia l'elaborazione dell'Aceto Balsamico di Modena. Questo processo e l'affinamento avvengono in recipienti di legno pregiato quali, ad esempio, quercia, rovere, castagno, gelso e ginepro per un periodo minimo di 60 giorni. Il prodotto che subisce una maturazione non inferiore a 3 anni può godere della dicitura "invecchiato".³⁰

Le fasi che devono necessariamente avvenire in provincia di Modena e Reggio Emilia sono l'assemblaggio di materie prime, l'elaborazione, l'affinamento e/o l'invecchiamento in botti di legno; il prodotto poi, dopo un'ulteriore filtrazione, può essere imbottigliato al di fuori della provincia di Modena.

Da disciplinare, il prodotto finale che si ottiene deve presentare le seguenti caratteristiche:

- limpidezza: limpido e brillante;
- colore: bruno intenso;
- odore: caratteristico, persistente, intenso e delicato, gradevolmente acetico e con eventuali note legnose;
- sapore: agrodolce, equilibrato, gradevole, caratteristico
- densità a 20°C non inferiore a 1,06 g/l;
- titolo alcolometrico effettivo: non superiore a 1,5% in volume;
- estratto secco netto minimo: 30 gr per litro;
- acidità totale minima: 6%;
- anidride solforosa totale: massimo 100 mg/l;
- quantitativo di ceneri: minimo 2,5 per mille;
- zuccheri riduttori: minimo 110 g/l.

Le analisi chimico-fisiche e l'accertamento delle caratteristiche analitiche del prodotto finito vengono garantite dall'ente certificatore CSQA che si affida ai laboratori certificati dell'Unione Italiana Vini (UIV). Mentre invece le caratteristiche sensoriali vengono verificate da un gruppo di tecnici e assaggiatori esperti tramite un esame analitico sensoriale ad opera dei laboratori dell'UIV, secondo la norma UNI EN ISO 13299:2016.

Con l'emanazione del nuovo Regolamento (UE) 512/2023³¹ vengono apportate delle modifiche al disciplinare di produzione dell'Aceto Balsamico di Modena IGP.³⁰

In particolare le modifiche riguardano:

- l'aggiunta di nuovi parametri analitici per l'Aceto Balsamico di Modena IGP "invecchiato", il quale deve avere una densità a 20°C non inferiore a 1,15 g/l e un'acidità totale minima del 5,5%;
- introduzione di nuove misure per i contenitori utilizzati nell'imbottigliamento, dove quindi i consumatori potranno acquistare l'Aceto Balsamico di Modena IGP, oltre ai formati già presenti da 0,250 L, 0,500 L, 0,750 L, 1 L, 2 L, 3 L o 5 L, anche in formati da 0,100 L, 0,150 L, 0,200 L e 1,5 L.
- un ampliamento del sistema di controllo della filiera anche ai produttori vinicoli introducendo analisi isotopiche per l'accurata verifica dell'autenticità delle materie prime.³¹

In particolare l'Aceto Balsamico di Modena I.G.P. Ponti nasce nell'acetaia di Vignola (MO), con quantità di mosto, tempi di maturazione e densità minimi superiori a quelli stabiliti dal Disciplinare; è il risultato della lenta maturazione di aceto di vino di alta qualità Ponti e di mosto d'uva cotto e concentrato in tini, botti e barrique di legni diversi e per periodi diversi a seconda delle ricette. Gli Aceti Balsamici di Modena I.G.P. Ponti più pregiati maturano in barrique di tre differenti essenze, che conferiscono ognuna caratteristiche peculiari all'aceto: il rovere un profumo gentile e vanigliato, il castagno la ruvidezza aromatica del tannino e il ciliegio il dolce aroma della frutta. Le barrique sono mantenute a temperatura naturale nell'acetaia così da trarre il massimo beneficio dalle variazioni climatiche delle stagioni. Il caldo favorisce la fermentazione e la concentrazione, il freddo la sedimentazione.³²

1.4 Ponti

Operante da nove generazioni nel settore della produzione di aceti, la nascita della prima acetaia è documentata a circa 230 anni fa, nel 1795, a Sizzano.

Nel 1864 Giovanni Ponti prende le redini dell'azienda familiare dopo la morte del padre e nel 1903, il figlio realizza un nuovo stabilimento per la produzione di aceto a Sizzano, iniziando un'attività industriale ottenendo il Diploma d'Onore per “vini ed aceti” alla Fiera Internazionale di Parigi.

Nel 1939 Antonio ponti, insieme al figlio Guido Ponti, iniziano la produzione di conserve vegetali all'aceto e all'olio di oliva.

Dieci anni dopo viene inaugurato lo stabilimento di Ghemme (NO) e nel 1965 entrano in azienda i figli di Guido, Cesare e Franco, iniziando una fase di espansione dell'azienda con l'apertura di nuovi stabilimenti in Veneto, a Dosson di Casier (TV), e in Lazio, ad Anagni (FR). Con il tempo, grazie all'acquisizione di Modenaceti inizia un percorso che farà di Ponti un leader nel settore dell'Aceto Balsamico di Modena IGP aggiungendo quindi un nuovo stabilimento a Vignola (MO).

L'azienda, quindi, oltre ad essersi specializzata nella produzione di Aceti Balsamici di Modena IGP, aceti di mele e glasse all'aceto, nel 1983 sviluppa i prodotti Peperlizia®, un marchio registrato ad indicare le conserve di verdure in agrodolce.

Nel 2000, con l'entrata in azienda di Giacomo Ponti, viene proiettato il gruppo verso una dimensione internazionale esportando in oltre 70 paesi e introducendo inoltre prodotti di origine biologica, fornendo il marchio BIO all'Aceto balsamico di Modena IGP ma anche ad aceti di mele, glasse, conserve e più recentemente ad aceti di vino.

Dieci anni dopo, l'affiancamento di Lara Ponti al cugino indirizza l'azienda verso una produzione sempre più sostenibile e responsabile.

In questi anni l'azienda si espande sempre di più a livello globale aprendo sedi a New York e a Parigi.

Nel 2021 diventa la prima Società Benefit nel mercato degli Aceti e delle Conserve di Verdure ottenendo nel 2023 la certificazione B Corp soddisfacendo alti standard di performance sociale ed ambientale, responsabilità e trasparenza.

I campioni di mosti e Aceti Balsamici IGP oggetto di studio sono stati analizzati nel Laboratorio di Ricerca e Sviluppo e Controllo Qualità dello stabilimento di Ghemme (NO) disponendo delle più moderne apparecchiature, quali le strumentazioni HS-GC-IMS.³²

1.5 Analisi delle sostanze volatili

Qualsiasi prodotto alimentare presenta un odore caratteristico dato dalla presenza di una varietà di composti organici volatili (VOCs)³³, ovvero composti alifatici ed aromatici a basso peso molecolare con un basso punto di ebollizione, molecole organiche con la caratteristica comune di essere volatili a temperatura ambiente.³⁴

L'analisi e l'identificazione dei composti volatili è utile e necessaria al fine dell'identificazione di un profilo organolettico oggettivo del prodotto.

Uno screening rapido dei composti organici volatili mediante analisi dirette presenta diverse applicazioni nel settore alimentare e degli aromi, come ad esempio la rilevazione delle adulterazioni, lo studio dei processi produttivi che comportano la formazione dei VOCs o l'identificazione di sostanze responsabili di off-flavours.

Per poter fare ciò esistono dei metodi analitici convenzionali quali ad esempio la gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS), un potente strumento analitico che confronta il tempo di ritenzione dei VOCs mentre si spostano lungo la colonna gascromatografica con gli standard stabiliti in modo da identificare la sostanza chimica; si ha quindi una prima separazione cromatografica degli analiti seguita poi da una rilevazione ad opera dello spettrometro di massa.

Tuttavia però l'approccio richiede in genere molto tempo, in alcuni casi è richiesto un pretrattamento complesso del campione e inoltre presenta un vincolo significativo nella distinzione delle molecole isomeriche in quanto, date le loro somiglianze strutturali, questi composti hanno tempi di ritenzione e spettri di massa di ionizzazione elettronica quasi comparabili, portando quindi all'adozione di nuove tecniche per l'analisi diretta dei composti volatili, come ad esempio la gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa a mobilità ionica (HS-GC-IMS) (cap. 1.4.1).³³

Questo strumento può essere definito anche “naso elettronico”, in quanto è in grado di riconoscere l'impronta olfattiva sia di campioni semplici ma anche complessi; è uno strumento in grado di imitare il sistema olfattivo umano sfruttando un complesso insieme di sensori che rilevano i VOCs nello stesso modo in cui agiscono i chemiorecettori olfattivi.

Anche il “naso elettronico”, così come il naso umano, non è in grado di effettuare l'identificazione delle singole molecole che compongono il campione, ma può stabilire un “*fingerprint*” del profilo volatile andando a distinguere diversi campioni in base all'insieme dei sentori percepiti. Proprio per questo viene utilizzato per la distinzione di

alimenti che presentano diversa provenienza, controlli sulla freschezza dei prodotti e studi di shelf-life.

Queste tecniche strumentali possono affiancare o addirittura andare a sostituire l'analisi sensoriale in quanto presenta alcuni svantaggi come i costi elevati e la difficoltà di dover lavorare per tempi prolungati; di conseguenza l'accoppiamento delle analisi strumentali con le valutazioni sensoriali può portare a risultati che soddisfino sia la percezione umana che la rilevazione analitica, cosa molto importante soprattutto per le aziende che lavorano nel campo alimentare.³⁵

1.5.1 Gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa a mobilità ionica

La gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa a mobilità ionica (HS-GC-IMS) fornisce una nuova tecnologia di separazione e rilevamento dei VOCs andando a combinare l'elevata capacità di separazione della gascromatografia e la risposta rapida della spettrometria di massa a mobilità ionica.

La gascromatografia è una tecnica di separazione di sostanze volatili tramite una colonna cromatografica che sfrutta una fase mobile costituita da un gas di trasporto inerte come ad esempio elio, idrogeno o azoto e una fase stazionaria solida o liquida.

La separazione si basa sull'interazione tra i vari VOCs e la fase stazionaria dove maggiore è l'affinità tra analita e fase stazionaria e maggiore sarà il suo tempo di ritenzione; è quindi necessario che l'analita sia in fase gassosa o volatilizzabile e che abbia un basso peso molecolare, inoltre occorre che sia termostabile in modo da evitare la sua decomposizione a temperature elevate, che nel caso della gascromatografia possono raggiungere i 300°C. Lo strumento è costituito da un iniettore, una colonna cromatografica posta all'interno di un termostato, un sistema di alimentazione del gas carrier e un detector per la rilevazione dei segnali corrispondenti agli analiti in esame.

Dopo quindi una prima separazione all'interno della colonna cromatografica, i composti volatili raggiungono lo spettrometro di massa, l'IMS, un metodo utilizzato per rilevare quantità in tracce di VOCs in diverse matrici in quanto mostra una risposta rapida e un'elevata sensibilità nel separare gli ioni in base alla loro mobilità in un campo elettrico in un gas tampone neutro.³⁶

La componente principale del sistema IMS, come mostrato in figura 13, è data dalla presenza di un tubo di volo che si divide in una regione di ionizzazione e una di separazione grazie alla presenza di una griglia.³³

All'interno del tubo di volo è presente una sorgente di trizio per l'emissione di radiazioni β a bassa intensità in modo da rendere carico positivamente il gas di trasporto che nel nostro caso sarà l'azoto; a questo punto una reazione articolata coinvolge il gas carrier e le tracce di acqua presenti nel campione fino a creare degli aggregati di acqua carichi positivamente.³⁶

La carica positiva delle molecole di acqua può essere così trasferita alle molecole volatili presenti nel campione, sia sottoforma di monomeri che di dimeri, a seconda della concentrazione in cui le sostanze volatili si trovano nel gas di trasporto. All'aumentare della concentrazione dell'analita diminuisce il RIP, il picco dello ione reagente, ovvero le molecole di acqua protonata, conseguentemente alla cessione di ioni H^+ dall'acqua agli analiti. Contemporaneamente tenderà ad aumentare il picco relativo ai dimeri, la cui formazione è direttamente collegata all'aumento della concentrazione del relativo composto (Fig. 12).

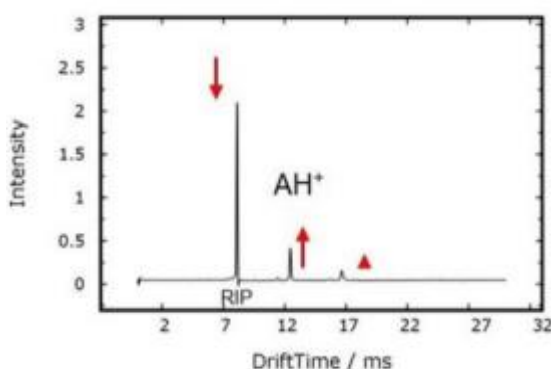


Figura 12: Relazione tra l'aumento di concentrazione dell'analita (picco centrale), la diminuzione del segnale del RIP (picco di sinistra) e la formazione di dimeri (picco di destra).

Gli ioni ottenuti viaggiano influenzati da un campo elettrico entrando così nella regione di separazione. A questo punto, scontrandosi con un gas carrier che scorre in controtendenza, perdono energia determinando velocità di movimenti diversi così che vengano rilevati in tempi diversi, ottenendo informazioni sulla tipologia e concentrazione degli analiti studiando semplicemente il rapporto massa/carica delle molecole in esame ionizzate in forma gassosa.^{33,36}

Il tempo di volo è dell'ordine di millisecondi, a differenza della separazione gascromatografica che può durare diversi minuti, ed è dipendente dalla massa delle molecole, dall'impedimento sterico dei diversi composti, dalla temperatura, dalla forza del campo elettrico e dalla lunghezza del tubo.

Quindi, quando GC e IMS vengono combinati, viene aggiunta una capacità di separazione per la risoluzione di matrici complesse andando a migliorare l'accuratezza del rilevamento.³³

In questo caso avremo inizialmente la separazione tramite gascromatografia e il detector sarà rappresentato da uno spettrometro di massa direttamente accoppiato al gascromatografo; quindi avremo un sistema di introduzione del campione direttamente collegato all'uscita della colonna cromatografica, una regione sorgente per la ionizzazione degli analiti, un selettore di massa e un detector (Fig. 13).³⁷

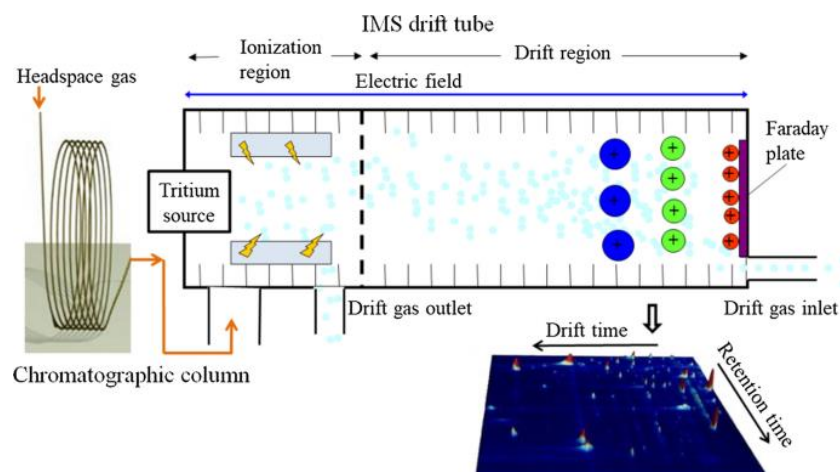


Figura 13: Rappresentazione schematica di un gascromatografo accoppiato a spettrometria di massa a mobilità ionica con un esempio di cromatogramma che sarà tipico del campione in esame.³⁷

1.6 Analisi sensoriale

L'uomo ha sempre utilizzato i propri sensi per valutare la sicurezza e la qualità degli alimenti, in quanto è in grado di stabilire se un cibo o una bevanda sono buoni o cattivi utilizzando la vista, l'olfatto, il tatto e il gusto; nel tempo sono state sviluppate delle procedure standard di classificazione della qualità dei prodotti alimentari e delle bevande fino ad arrivare all'ottenimento di linee guida per l'analisi sensoriale in materia di ordinamento generale, vocabolario, metodologia, apparecchiatura e metodi di analisi sensoriale specifici per ogni prodotto alimentare.³⁹

Solitamente, associato alle convenzionali analisi chimiche, fisiche, microbiologiche e nutrizionali dei prodotti alimentari, l'analisi sensoriale è il metodo utilizzato nelle industrie alimentari per controllare la qualità sensoriale dei prodotti e valutarne le caratteristiche organolettiche, quali aroma, sapore, texture e colore andando a delineare un profilo sensoriale in grado di descrivere in modo univoco ed obiettivo il prodotto studiato. Tuttavia però creare e mantenere panel sensoriali ben addestrati e calibrati può essere economicamente impegnativo e richiede molto tempo, in particolare quando si ha a che fare con un prodotto complesso come l'Aceto Balsamico di Modena IGP; inoltre, data la formazione approfondita che possiedono i giudici, questi possono percepire qualità sensoriali diverse dai consumatori che mostrano un'impressione unificata e olistica del prodotto.³⁸

Gli obiettivi dell'analisi sensoriale variano in base ai giudici che andranno a comporre il gruppo di valutazione e alla scelta del metodo da utilizzare durante il test, il quale si può suddividere in due macrocategorie

- *test sensoriali oggettivi* basati sull'uomo come strumento di rilevazione, come
 - i *test discriminanti qualitativi* i quali identificano l'esistenza di una differenza tra due o più campioni e i risultati possono essere facilmente accertati facendo riferimento a delle tabelle di significatività, quelli più comuni includono il confronto a coppie, il test del triangolo e A non A. Essendo test relativamente semplici sono più adatti ad un gruppo di giudici selezionati che presentano una limitata esperienza nell'analisi sensoriale ma che dispongono di un'ottima conoscenza del prodotto.
 - l'*analisi descrittiva* viene utilizzata per caratterizzare il profilo sensoriale di un alimento. In questo i dati vengono trattati come se provenissero da uno strumento analitico e non ci sono punti di vista soggettivi o misure di

gradimento da parte di un panel di analisi sensoriale descrittiva. Questo test è condotto da un gruppo di assaggiatori esperti e addestrati a identificare attributi sensoriali e a valutare l'intensità utilizzando una scala quantitativa. I dati generati vengono analizzati statisticamente e utilizzati così come sono per raggiungere obiettivi analitici sensoriali specifici o combinati con altri.

- i *test temporali* sono dei test sensoriali che cercano di documentare l'aspetto dinamico dell'esperienza sensoriale, ad esempio la profilazione della texture da parte di un panel addestrato.
- *test sensoriali affettivi* che invece si concentrano sulle risposte dei consumatori il cui compito è quello di fornire pareri personali e soggettivi sul prodotto che si traducono in gradimento e preferenze sulla base delle sensazioni percepite.^{39,40}

Complessivamente sono test fondamentali per lo sviluppo di un nuovo prodotto, per prevedere la reazione del mercato e trovare, se necessario, vie di miglioramento dello stesso.⁴⁰ Per comprendere però meglio la percezione dell'aroma dell'aceto è necessario trovare una correlazione tra i dati sensoriali e le misurazioni strumentali.³⁸

1.6.1 Codice visivo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP

La vista è uno tra gli organi di senso importante per la valutazione organolettica dell'Aceto Balsamico di Modena IGP, ma in linea di principio di tutti i prodotti alimentari. L'organo umano considerato è l'occhio dove la luce esterna attraversa la cornea e il cristallino per finire sulla retina dove vi sono i coni, sensibili ai colori e dettagli e preposti alla visione diurna, e i bastoncelli che danno una visione più approssimativa e sono preposti soprattutto alla visione crepuscolare. Dai coni e bastoncelli il segnale viene trasmesso al cervello attraverso il nervo ottico, dove poi verrà elaborato.

L'Aceto Balsamico di Modena IGP presenta delle specifiche caratteristiche visive quali

- ***intensità o saturazione del colore***
equivale alla valutazione sensoriale della quantità di sostanza colorante presente nell'Aceto Balsamico di Modena IGP. I composti responsabili derivano dagli zuccheri, infatti la tonalità del colore dipende dalla quantità di mosto cotto o concentrato utilizzato, dalla cottura e caramellizzazione degli zuccheri del mosto e dall'affinamento del prodotto.

- ***viscosità***

indica la resistenza che oppone un fluido allo scorrimento. Nel caso specifico dell'Aceto Balsamico di Modena IGP è data da zuccheri e altre sostanze presenti nell'estratto, dipendendo quindi dalla quantità e dalla tipologia di mosto presente, dalla modalità di assemblaggio delle materie prime e dal periodo di affinamento o invecchiamento del prodotto in quanto le fasi di lavorazione possono favorire o meno l'evaporazione aumentando di conseguenza la viscosità.⁴¹

1.6.2 Codice olfattivo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP

L'olfatto è un altro tra gli organi di senso ampiamente sfruttato per la valutazione organolettica dell'Aceto Balsamico di Modena IGP.

In questo caso le molecole raggiungono l'epitelio olfattivo attraverso tre vie: ortonasale, retronasale e sanguigna. La via ortonasale è quella che inizia con le narici, la via retronasale parte invece dalla faringe ed è in comunicazione diretta con la via ortonasale in modo da creare una vera corrente d'aria ed infine la via sanguigna è generata dai vasi che irrorano l'epitelio olfattivo. In quest'ultimo sono presenti le cellule sensoriali attive che sono i veri e propri neuroni collegati da una parte al bulbo olfattivo e dall'altra ad una vescicola olfattiva; ogni vescicola porta circa una trentina di villi olfattivi e quando una molecola olfattivamente attiva entra in contatto con il villo olfattivo, l'energia chimica viene commutata in segnale elettrico che, attraverso il bulbo olfattivo, giunge al cervello.⁴¹

L'Aceto Balsamico di Modena IGP presenta un profilo aromatico molto complesso dove risaltano gli aromi formatosi durante la cottura/concentrazione del mosto, le fermentazioni batteriche e il periodo di affinamento in botti di legno. I principali descrittori del profilo volatile dell'Aceto Balsamico di Modena IGP sono

- ***fruttato***

esprime la misura delle note odorose riconducibili ai frutti di ogni genere e specie. I composti responsabili sono molti, alcuni presenti nelle materie prime di origine terpenica che danno ad esempio sentori di mela, agrumi, frutta esotica, mora e ciliegia, e altri originati dalle reazioni di Maillard partendo da zuccheri e composti azotati presenti nel mosto che portano invece il caratteristico aroma di mosto cotto ma anche di marmellata e frutta sciropata. Si hanno anche le molecole generate durante le fermentazioni tra cui gli acidi che nelle fasi di affinamento ossidative

danno origine a chetoni ed esteri che andranno ad ampliare il corredo aromatico del prodotto andando a portare o aumentare i sentori di frutti esotici e lampone. Avremo inoltre anche le molecole cedute dal legno quali fenoli e polifenoli e le loro successive trasformazioni che invece porteranno sentori di nocciola, noce, frutti essiccati, prugna e ciliegia.

- ***floreale***

esprime la misura delle note odorose riconducibili al profumo dei fiori come ad esempio viola, rosa, rosa appassita e miele. I composti responsabili sono i composti derivanti dall'ossidazione dei caroteni e dei polialcoli che generano principalmente chetoni come α e β ionone responsabili del sentore di violetta, ma anche componenti secondari di fenoli e terpeni che forniscono la nota di rosa o più in generale floreale. In questo caso le molecole si originano principalmente durante le fermentazioni e le trasformazioni ossidative durante l'affinamento.

- ***vegetale***

indica la misura dell'intensità con la quale vengono percepiti sia i sentori vegetali freschi come erba falciata e verdure, sia vegetali secchi ad esempio fieno, tabacco e tè. I composti responsabili sono le pirazine, i fenoli volatili, gli esteri e i composti solforati che esprimono sentori di sottobosco e verdure cotte. Alcune note sono legate direttamente al vitigno e allo stato di maturazione delle uve, come ad esempio le pirazine che sono maggiormente presenti quando il frutto non è completamente maturo; altre però possono derivare da reazioni di Maillard e da composti generati durante la fermentazione e l'affinamento dove gioca un ruolo fondamentale anche la tipologia di legno che compone le botti.

- ***speziato***

evidenzia un'importante nota che nel prodotto assume caratterizzazioni diverse andando dalle spezie specifiche come pepe e liquirizia, ai sentori di legno e tostato, fino alla vaniglia o cuoio e pelliccia. Anche in questo caso i composti responsabili sono innumerevoli e derivanti dalla reazione di Maillard sulle materie prime o estratti dai vari tipi di legno; ad esempio possiamo avere il furfurale, guaiacolo, vanillina, siringaldeide...⁴¹

Oltre a sentori positivi è possibile anche riscontrare odori anomali, definiti difetti, ovvero percezioni olfattive sgradevoli derivanti da errori nella lavorazione e/o conservazione del prodotto. Principalmente è possibile riscontrare

- **odori di ossidato e putrido**, come mela ossidata o odore stagnante che sono legati a fermentazioni anomale delle materie prime con formazione di composti solforati (SH). Ad esempio un eccesso di metanetiolo, etanetiolo e propanetiolo danno odore di marciume; un eccesso di 2,6-dimetiltiofenolo, pinanetiolo, dimetil trisulfide ed etil mercaptano danno odore di cipolla e la presenza di idrogeno solforato da sentore di uova marce.
- **odori di fumo e bruciato** legato all'eccessivo protrarsi delle reazioni di Maillard del mosto o alla tostatura delle botti con formazione di etil maltolo, acido pirolineoso, fenolo, 4-metil-(p-cresolo), 2-etile-2-metossi-(guaiacolo), 2,6-dimetossisiringolo e 4-etilguaiacolo.
- **odori microbiologici**, come ad esempio odori legati a muffa, legno bagnato e sudore dati dall'utilizzo di legni difettati dovuti principalmente alla presenza di isopropenil toluene, isopropil fenilacetato, ossido di linalolo, 2-etil-3-metilpirazina. È inoltre possibile percepire sentori di terra dovuti dalla presenza di muffa o batteri sui legni o negli ambienti di affinamento con la formazione di fenoli, metossi pirazine, composti solforati e geosmina.
- **odori di chimico**, come plastica o pneumatico, derivante dalla presenza di molecole come il TDN (1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene), che si formano per idrolisi acida durante le fasi di affinamento.

Quindi le cause principali di questi odori anomali si possono attribuire a materie prime di scarsa qualità, non corretta cottura del mosto con tempi o temperature di cottura troppo elevati, utilizzo di materiali di contatto nelle varie fasi non puliti o difettosi e utilizzo di legni difettosi in affinamento.⁴¹

1.6.3 Codice gustativo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP

Il gusto, un altro organo di senso fondamentale nella valutazione sensoriale, ha sede nel cavo orale ed è preposto alla definizione qualitativa di molecole disperse in un liquido in base al sapore. Il sito principale delle papille gustative è la lingua e ogni papilla, a sua volta, contiene uno o più bottoni gustativi costituiti da cellule gustative che terminano con microvilli sensibili alle sostanze dotate di sapore; quando una di queste sostanze raggiunge un microvillo un segnale elettrico, attraverso il nervo gustativo, raggiunge il cervello dove viene elaborato. La percezione di dolce e amaro, a livello della membrana, è mediata da particolari transfer proteici che riconoscono la molecola e la legano facendo così partire l'impulso elettrico. Nel caso della percezione dell'amaro il recettore di membrana è il T2R e nell'uomo se ne riconoscono 26 tipologie, mentre invece nel caso della percezione del dolce avremo il T1R. Il salato e l'acido, invece, non necessitano la presenza di proteine specifiche ma la loro percezione avviene per depolarizzazione della membrana cellulare tramite i canali ionici generando un potenziale d'azione che arriva direttamente al cervello tramite impulso elettrico. In particolare, per quanto riguarda l'acido, gli ioni idrogeno con carica positiva sono fissati su un canale ionico da cui si libera potassio con carica positiva innescando direttamente l'impulso elettrico che andrà al cervello per poi essere tradotto in sensazione. ⁴¹

Il codice gustativo dell'Aceto Balsamico di Modena IGP è relativamente semplice ma fondamentale per la caratterizzazione qualitativa del prodotto e sarà descritto da

- ***dolcezza***

evidenzia l'intensità della percezione del dolce attraverso il senso gustativo. I composti responsabili sono gli zuccheri e i polialcoli ed è fortemente correlato alle materie prime utilizzate, alla concentrazione e cottura del mosto d'uva e/o alle concentrazioni del prodotto durante gli affinamenti.

- ***acidità***

misura la percezione della forza acida attraverso il senso del gusto. Questo descrittore dipende dal vitigno e dalla maturazione dell'uva, ma soprattutto dalle fermentazioni acetiche, infatti i composti responsabili sono tutti gli acidi, tra cui il più importante l'acido acetico, in base alla loro presenza e alla loro capacità di dissociare ioni idrogeno; è una attenuata dalla presenza del "dolce".

- ***pungenza***

indica la sensazione di pungenza nel cavo orale dovuta ad elevate concentrazioni di acido. Anche in questo caso il maggior responsabile è l'acido acetico il quale dipende sempre dal vitigno e dalla maturazione dell'uva, ma soprattutto dalle fermentazioni acetiche e dalla quantità di aceto di vino utilizzata.⁴¹

1.6.4 Valutazione sensoriale dell'aceto balsamico

Il disciplinare di produzione dell'Aceto Balsamico di Modena IGP rende possibile la produzione di diverse tipologie di prodotti contraddistinte da diversi periodi di affinamento e invecchiamento e anche da differenti caratteristiche organolettiche indotte dalla quantità e tipologia di materie prime utilizzate; è quindi necessario avere un sistema collettivo di descrizione di tali differenze in modo che il consumatore possa scegliere in maniera consapevole.

Per garantire la commercializzazione dell'Aceto Balsamico di Modena IGP, infatti, è richiesta una valutazione sensoriale da parte di un gruppo di giudici esperti dell'Unione Italiana Vini (UIV) al fine di valutare in maniera più oggettiva possibile le caratteristiche organolettiche.⁴¹

A tal proposito, nel 2001 a Modena, è nata l'associazione Assaggiatori Italiani Balsamico (Aib) composta da produttori, consumatori ed esperti sensoriali che si sono dedicati ad analizzare e descrivere il prodotto ottenendo così degli schemi di analisi sensoriale elaborati nel corso degli anni in collaborazione con il Centro Studi Assaggiatori per l'Aceto Balsamico di Modena IGP.

Il metodo sensoriale di Aib e Centro Studi Assaggiatori è fondato sull'idea secondo cui il prodotto è in equilibrio tra diverse percezioni: per il gusto avremo un equilibrio tra dolce e acido, mentre per l'olfatto avremo un equilibrio tra sentori di fruttato, mosto d'uva cotto e speziato.

Questo metodo ha generato dei profili sensoriali caratterizzanti cinque categorie

- la prima categoria considera aceti con elevata scorrevolezza, con un equilibrio spostato verso l'acidità a livello gustativo e verso il fruttato a livello aromatico (Figura 14a);
- la seconda categoria risalta sempre l'acido ma con maggiore percezione del dolce e a livello aromatico prevale ancora il fruttato ma con il sentore di mosto cotto più presente (Figura 14b);
- la terza categoria comprende gli aceti in cui la densità inizia ad essere osservabile alla rotazione nel bicchiere da assaggio e con percezione gustativa e olfattiva in equilibrio tra acido e dolce. A livello aromatico si percepisce sia il fruttato che il mosto d'uva cotto (Figura 14c);
- la quarta categoria presenta aceti con un'elevata densità con il dolce che prevale sull'acido limitandone la pungenza, mentre a livello olfattivo è il mosto d'uva cotto unito alle note speziate a prevalere sul fruttato (Figura 14d);
- la quinta categoria considera aceti con grande densità manifestata dalla lunga persistenza dopo la rotazione nel bicchiere da assaggio. Al gusto la dolcezza prevale sull'acidità rivelando una pungenza appena percepibile, mentre a livello aromatico è presente una netta prevalenza di spezie e mosto d'uva cotto sul fruttato (Figura 14e).⁴¹

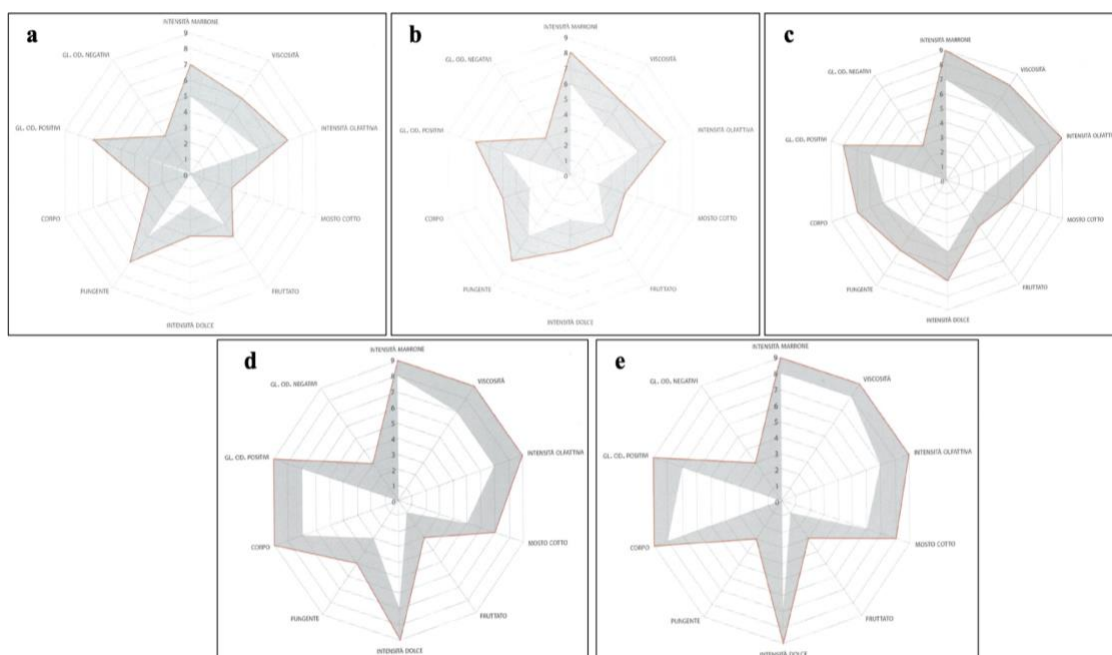


Figura 14: Grafici radar di Aceti Balsamici di Modena IGP analizzati e suddivisi nelle varie categorie in base alle caratteristiche organolettiche.⁴¹

Scopo del lavoro

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso il laboratorio di Controllo Qualità e Ricerca e Sviluppo dello stabilimento PONTI S.P.A. di Ghemme (NO) che ha messo a disposizione della ricerca di tesi i campioni e le strumentazioni HS-GC-IMS FlavourSpec®.

L'Aceto Balsamico di Modena I.G.P. è un condimento pregiato la cui produzione è regolamentata da un disciplinare e in quanto tale può essere oggetto di frodi.

Presenta delle caratteristiche sensoriali uniche che possono variare in base al metodo di produzione, materie prime utilizzate e aggiunta di caramello.

Visti i pochi dati presenti in letteratura in riferimento all'analisi dell'Aceto Balsamico di Modena IGP e i relativi mosti d'uva, in questo lavoro di tesi ci si è proposti di ottimizzare le condizioni di analisi al HS-GC-IMS FlavourSpec® sia per gli Aceti Balsamici di Modena IGP, ma anche per i mosti utilizzati nella loro produzione in modo tale da poter ottenere dei risultati che siano il più caratterizzante possibile del loro profilo aromatico. Per poter comprendere al meglio il profilo aromatico dei balsamici sono stati organizzati delle sessioni di valutazione sensoriale utilizzando dei “campioni esempio” di balsamici che andassero a definire il limite massimo e minimo di alcuni parametri descrittivi dell'Aceto Balsamico di Modena IGP, scelti basandoci su risultati ottenuti con lo strumento, così che possano essere un sostegno per i giudici aiutandoli nella valutazione delle varie tipologie di Aceti Balsamici di Modena IGP Ponti. I risultati ottenuti dalle valutazioni sensoriali sono stati poi confrontati con quelli ottenuti con lo strumento in modo da valutarne la congruenza.

Lo scopo finale è stato quello di andare a valutare differenze o uguaglianze tra i cromatogrammi dei balsamici con i relativi mosti, in modo da poter comprendere quali molecole volatili e di conseguenza quali caratteristiche sensoriali derivino dai mosti e quali invece dall'azione dei batteri durante la “fermentazione acetica”, dall'aggiunta di caramello oppure da altre variabili inerenti ad esempio alle metodiche di produzione.

Materiali e Metodi

3.1 FlavourSpec

Lo strumento utilizzato per la caratterizzazione volatile dei campioni in esame è *FlavourSpec*® prodotto dall'azienda G.A.S. (Gesellschaft für Analytische Sensorsysteme, Dortmund, Germania), costituito da un gascromatografo con colonna capillare accoppiato a un piccolo spettrometro di massa a mobilità ionica. Il tutto a sua volta collegato ad un autocampionatore prodotto da HTA (Fig.15) il quale è dotato anche di un fornello in grado di riscaldare e agitare le provette contenenti il campione.

Lo scopo della strumentazione è ricavare una fotografia delle sostanze volatili fornendo una documentazione oggettiva dell'aspetto aromatico del prodotto analizzato.

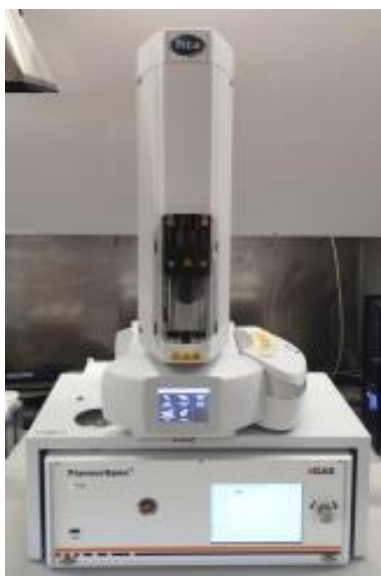


Figura 15: Impianto HS-GC-IMS (FlavourSpec®) e autocampionatore HTA utilizzati presso il laboratorio Ponti.

L'autocampionatore HTA presenta un iniettore di tipologia “*splitless*” con temperature operative che vanno da 35°C fino a 80°C.

Le impostazioni dell'autocampionatore ottimali per l'analisi dell'Aceto Balsamico di Modena IGP sono le seguenti:

- Generali
 - Syringe Volume [ml]: 2.5
 - Analysis Time [min]: 22
 - Method Type: Constant Mode
 - Preparation Time: 00:01:50
- Preparazione
 - Syringe Temperature [°C]: 60
 - Oven Temperature [°C]: 50
 - Incubation [min]: 20

- Shaker on [min]: 0.2
- Shaker off [min]: 0.1
- Campione
 - Sample Volume [ml]: 0.50
 - Fill Volume [ml]: 1.0
 - Pull Up Strokes: 2
 - Equilibration Delay [s]: 1
 - DHS time [min]: 0.0
 - Sample Speed [ml/min]: 6.0
 - Syringe Prefill: No
- Iniezione
 - Injection Speed [ml/min]: 30.0
 - Pre Injection Dwell [s]: 1
 - Post Injection Dwell [s]: 3
 - Flush Time [min]: 3

Mentre invece le impostazioni ottimali per l'analisi dei mosti sono le seguenti:

- Generali
 - Syringe Volume [ml]: 2.5
 - Analysis Time [min]: 37
 - Method Type: Constant Mode
 - Preparation Time: 00:01:50
- Preparazione
 - Syringe Temperature [°C]: 65
 - Oven Temperature [°C]: 55
 - Incubation [min]: 35
 - Shaker on [min]: 0.2
 - Shaker off [min]: 0.1
- Campione
 - Sample Volume [ml]: 0.50
 - Fill Volume [ml]: 1.0
 - Pull Up Strokes: 2
 - Equilibration Delay [s]: 1
 - DHS time [min]: 0.0
 - Sample Speed [ml/min]: 6.0
 - Syringe Prefill: No
- Iniezione
 - Injection Speed [ml/min]: 30.0
 - Pre Injection Dwell [s]: 1
 - Post Injection Dwell [s]: 3
 - Flush Time [min]: 3

Nel momento in cui è stato necessario valutare se la presenza/assenza di alte temperature influisca o meno sul risultato, sono state utilizzate le seguenti impostazioni:

- Generali
 - Syringe Volume [ml]: 2.5
 - Analysis Time [min]: 22
 - Method Type: Constant Mode
 - Preparation Time: 00:01:50
- Preparazione
 - Syringe Temperature [°C]: off
 - Oven Temperature [°C]: off
 - Incubation [min]: 1
 - Shaker on [min]: 0.2
 - Shaker off [min]: 0.1
- Campione
 - Sample Volume [ml]: 0.5
 - Fill Volume [ml]: 1.0
 - Pull Up Strokes: 2
 - Equilibration Delay [s]: 1
 - DHS time [min]: 0.0
 - Sample Speed [ml/min]: 6.0
 - Syringe Prefill: No
- Iniezione
 - Injection Speed [ml/min]: 30.0
 - Pre Injection Dwell [s]: 1
 - Post Injection Dwell [s]: 3
 - Flush Time [min]: 3

Focalizzandoci invece sul gascromatografo, è presente una colonna cromatografica capillare MTX-5 lunga 15 m, con un diametro interno di 0,53 mm ed esterno di 0.68 mm. La fase stazionaria è costituita da 5% bifenile e 95% polidimetilsilossano con uno spessore del film interno di 1 µm. Il gas carrier è azoto da generatore LNI, qualità 5.0, purezza 99,999%.

L'IMS presenta un tubo lungo 53 mm, un campo elettrico di 500 V/m e temperature operative che vanno da 35 a 80°C. La sorgente di ionizzazione è il trizio radioattivo (radiazioni β), il voltaggio drift: 2,7 kV e anche in questo caso il gas carrier è sempre azoto ottenuto da generatore LNI, qualità 5.0, purezza 99,999%.

Le impostazioni di pressione e temperatura dello strumento FlavourSpec®, mantenute invariate durante tutta la durata delle analisi, sono le seguenti (Fig. 17):

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

e i cromatogrammi sono stati registrati utilizzando polarizzazione positiva.

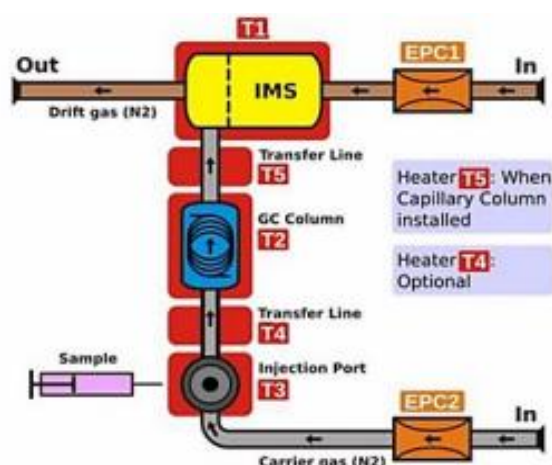


Figura 17: Rappresentazione schematica della struttura interna dell'HS-GC-IMS: EPC2 ed EPC1 rappresentano i sistemi di controllo elettronico della pressione rispettivamente del gas carrier del GC e del drift gas dell'IMS; T1, T2, T3, T4, T5 indicano i sistemi di controllo della temperatura rispettivamente dell'IMS, della colonna cromatografica, della porta di iniezione del GC, della prima e seconda linea di trasferimento.

L'indice di ritenzione di ciascun composto volatile è stato calcolato utilizzando una miscela di n-chetoni C4-C9 (G.A.S., Dortmund, Germania) come standard di riferimento. Questa miscela di chetoni è chiamata Testmix_HS_6_Sub, specifica per FlavourSpec®, ed è essenziale per la normalizzazione della colonna (Tabella 3).

Sostanza	Massa molare [g/mol]	Densità [g/ml]	Concentrazione [g/ml]
2-butanone	72,11	0,81	0,81
2-pentanone	86,13	0,81	0,81
2-esanone	100,2	0,81	0,81
2-eptanone	114,19	0,82	0,82
2-octanone	128,21	0,82	0,82
2-nonanone	142,24	0,82	0,82

Tabella 3: lista dei sei chetoni presenti nel Testmix_HS_6_Sub.

La normalizzazione della colonna consiste nel correlare i tempi di ritenzione misurati di molecole standard (ad esempio Testmix_HS_6_Sub da GAS Dortmund) con i loro RI estratti dal database NIST che fornisce librerie di di Indici di Ritenzione (RI).

Da questa correlazione, è possibile prevedere il tempo di ritenzione nelle condizioni sperimentali di separazione scelte per qualsiasi molecola presente nella libreria GC-RI.

3.1.1 Preparazione dei campioni di Aceto Balsamico di Modena IGP

I campioni di aceto balsamico scelti come oggetto di studio appartengono alla linea di Aceti Balsamici di Modena (ABM) IGP di Ponti, composta da diverse categorie merceologiche, che si distinguono in funzione dei seguenti parametri: quantità di mosto, densità, periodo d'invecchiamento, estratto secco e presenza di caramello. In tabella 4 sono elencate le categorie e i relativi parametri caratterizzanti:

Nominativo campione	Invecchiamento [gg]	% peso di mosto cotto e/o concentrato [p/p]	Densità a 20 °C [g/ml]	Estratto secco [g/l]	Presenza di caramello
F1	≥72-356	≥24-39	≥1,0710-1,0780	≥160-170	SÌ
H1	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥1,095 - 1,129	≥210 - 309	SÌ
H1N	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥1,095 - 1,129	≥210 - 309	NO
E1	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥1,095 - 1,129	≥210 - 309	SÌ
G1	≥ 72 - 356	≥ 24 - 39	≥1,095 - 1,129	≥210 - 30	SÌ
A1	≥ 72 - 356	≥ 40 - 49	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	SÌ
D1	≥ 72 - 356	≥ 40 - 49	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	SÌ
D2	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥1,095 - 1,129	≥210 - 309	NO
C2	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	NO
B2	≥ 72 - 365	≥ 24 - 39	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	NO
A2	≥ 72 - 365	≥ 40 - 49	≥ 1,160	≥ 400	NO
C1	≥ 366 - 1095	≥ 40 - 49	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	SÌ
C1N	≥ 366 - 1095	≥ 40 - 49	≥ 1,130 - 1,159	≥ 310 - 399	NO
B1	≥ 1096	≥ 50	≥ 1,160	≥ 400	SÌ
B1N	≥ 1096	≥ 50	≥ 1,160	≥ 400	NO

Tabella 4: Classi merceologiche di ABM analizzati con relativi parametri distintivi.

I campioni di ABM sono stati scelti in base ai risultati cromatografici ottenuti tramite HS-GC-IMS; in particolare sono stati ricercati campioni caratterizzati da significative differenze nella frazione volatile, focalizzandoci sui campioni di ABM invecchiati in barrique e quelli affinati al fine di visualizzare delle molecole che identificano il sentore legnoso.

Campioni significativamente diversi dal punto di vista analitico sono stati successivamente impiegati come oggetto di valutazione in test sensoriali in modo da verificare la presenza di relazioni tra la rilevazione strumentale e la percezione sensoriale; sono stati inoltre utilizzati anche come “campioni esempio” così da aiutare i giudici nella comprensione di alcuni parametri descrittivi durante le sessioni di valutazione sensoriale (vedi cap. 3.2.1).

Per la preparazione dei campioni di ABM ci si è avvalsi di (Fig.18):

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



Figura 18: Strumentazione utilizzata in laboratorio per la preparazione dei campioni di ABM.

Il metodo di analisi utilizzato in laboratorio dell'azienda prevede la preparazione di ABM a due distinte diluizioni: una prima diluizione 1:100 e una seconda 1:50, per permettere la rilevazione anche di composti meno concentrati. La prima diluizione viene preparata prelevando 10 μ l di aceto balsamico e portando a 1000 μ l di volume in una fiala

aggiungendo 990 µl di acqua deionizzata prelevata da un baker. La seconda diluizione prevede 20 µl di campione con l'aggiunta di 980 µl di acqua deionizzata.

Durante però la mia ricerca in laboratorio ho notato che per un'analisi precisa, ovvero che includa tutte i composti volatili presenti nel campione di balsamico in esame, non bastava analizzare il campione diluito 1:100 e 1:50, ma è necessario aggiungere una diluizione 1:10, ottenuta prelevando 100 µl di aceto balsamico e portando a 1000 µl di volume in una fiala aggiungendo 900 µl di acqua deionizzata.

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

Le fiale vengono quindi inserite all'interno dell'autocampionatore, dove possono essere riscaldate e agitate prima che lo spazio di testa venga prelevato dalla siringa per l'iniezione in colonna. I parametri secondo cui è stato impostato l'autocampionatore HTA e il HS-GC-IMS sono descritti in precedenza (vedi cap. 3.1).

3.1.2 Preparazione dei campioni di mosti d'uva

I campioni di mosti scelti come oggetto di studio sono quelli che vengono utilizzati nella sede di Vignola (MO) per produrre l'Aceto Balsamico di Modena IGP Ponti e l'Aceto Tradizionale di Modena DOP Ponti e sono stati analizzati presso il laboratorio di Controllo Qualità e Ricerca e Sviluppo dello stabilimento di Ghemme (NO).

Le caratteristiche chimico-fisiche di tali campioni sono descritte in tabella 5.

Tipologia di mosti d'uva	Acidità totale [g/Kg]	Densità a 20 °C [g/ml]	Estratto secco [g/Kg]	Anidride solforosa [ppm]	Alcol [% v/v]
COTTO e COTTO BIO	>8	≥ 1,240	≥ 55	≤ 70	<1
CONCENTRATO e CONCENTRATO BIO	>8	≥ 1,240	≥ 55	≤ 70	<1

Tabella 5: Tipologie di mosti analizzati con relativi parametri analitici.

Per la preparazione dei campioni di mosti ci si è avvalsi di (Fig.19):

- fiale in vetro da 20 ml
- chiusure in alluminio da 20 mm con setto in silicone/PTFE
- piegatore da 20 mm per la chiusura delle fiale
- baker di volume variabile con acqua deionizzata
- pipette Pasteur in polietilene da 1,5 ml
- bilancia analitica
- micropipetta da 1000 μ l
- puntali da 1000 μ l



Figura 19: Strumentazione utilizzata in laboratorio per la preparazione dei campioni di mosto.

Il metodo utilizzato prevede la preparazione dei campioni a due distinte diluizioni: una prima diluizione 1:5 e una seconda 1:2 per permettere la rilevazione anche di composti volatili meno concentrati. La prima diluizione viene preparata pesando su bilancia analitica 0,2 g di mosto e portando a 1000 μ l di volume in una fiala aggiungendo 800 μ l di acqua deionizzata prelevata da un baker. La seconda diluizione prevede 0,5 g di campione con l'aggiunta di 500 μ l di acqua deionizzata.

Ogni serie di campioni viene sempre preceduta da due bianchi: un primo per l'aria ambientale, tramite una fiala in vetro vuota, e un secondo per l'acqua deionizzata utilizzata per le diluizioni, prelevando 1000 μ l di acqua e introducendoli in una seconda fiala. Le fiale vengono quindi inserite all'interno dell'autocampionatore, dove subiscono un riscaldamento e agitazione prima che lo spazio di testa venga prelevato dalla siringa per l'iniezione in colonna. I parametri secondo cui è stato impostato l'autocampionatore HTA e il HS-GC-IMS sono stati descritti in precedenza (vedi cap. 3.1).

3.1.3 Software

Per la preparazione dei campioni e l'elaborazione dei dati ci si è avvalsi rispettivamente del software Sequence Designer v1.2 e del software VOCal v0.4.03; il primo è stato utilizzato per la definizione delle sequenze dei campioni inseriti e del programma di analisi impiegato.

Tramite VOCal, invece, è possibile visualizzare i singoli cromatogrammi ottenuti così da ottenere una prima distinzione e quantificazione visiva dei risultati.

Il risultato dell'analisi tramite HS-GC-IMS è un cromatogramma a tre dimensioni, quali il tempo di eluizione [s] sulle ordinate, il tempo di drift [ms] sulle ascisse, ovvero il tempo in cui le molecole permangono all'interno del tubo di volo, e il segnale del detector [mV] corrispondente alla quantità della singola molecola e riscontrabile dall'intensità di colore rosso dello spot (Fig.20).

Il segnale del RIP, ovvero dell'acqua protonata residua nel campione, corrisponde alla linea rossa evidenziata nella figura 20, caratterizzata da un tempo di volo di 5,5 ms; accanto ad essa, sempre nella figura 20, è possibile osservare il segnale relativo all'acido acetico, anch'esso particolarmente visibile e sempre presente in ogni campione data la sua elevata concentrazione, sia all'interno del campione ma anche nell'ambiente.

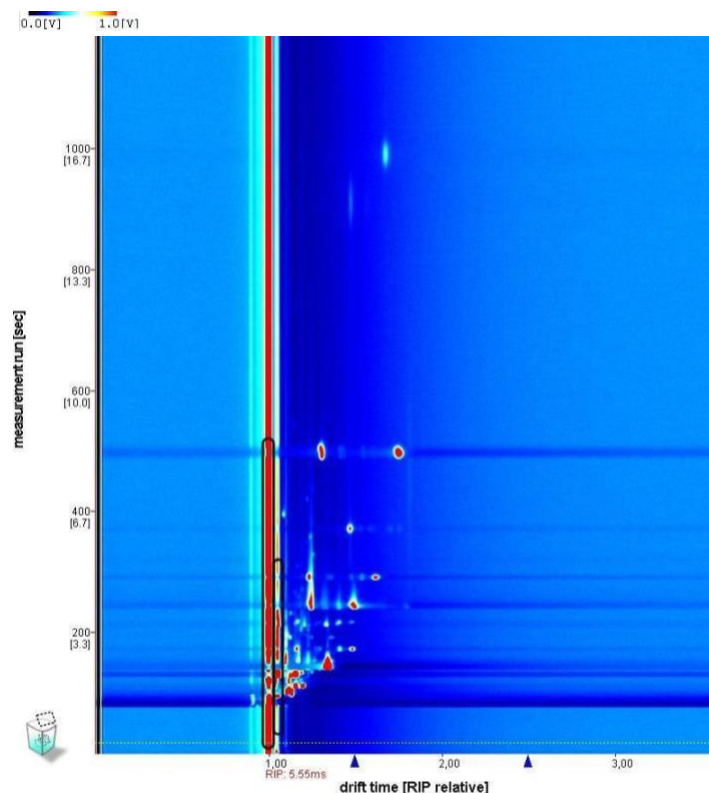


Figura 20: Esempio di cromatogramma di un ABM ottenuto tramite analisi con HS-GC-IMS; i due riquadri neri evidenziano rispettivamente il segnale del RIP (a sinistra) e il segnale dell'acido acetico (a destra).

All'aumentare della concentrazione di una determinata molecola si formerà di conseguenza il relativo dimero. All'interno del cromatogramma gli spot di monomeri e dimeri dello stesso composto possiedono lo stesso tempo di eluizione [s] e differiscono per il tempo di volo [ms] proprio perché la formazione di dimeri avviene all'interno del tubo di volo conseguentemente alla cessione di protoni H^+ da parte delle molecole d'acqua residue.

I monomeri sono caratterizzati da un tempo di volo minore rispetto ai relativi dimeri, il cui spot si posiziona sulla destra del monomero, poiché il tempo di volo è direttamente dipendente dalla massa della molecola. Per la rilevazione e la quantificazione dei composti, è preferibile affidarsi allo spot del relativo dimero come nel caso del 3-idrossi-2-butanone il cui spot del monomero è sovrapposto e oscurato al segnale dell'acido acetico (Fig. 21).

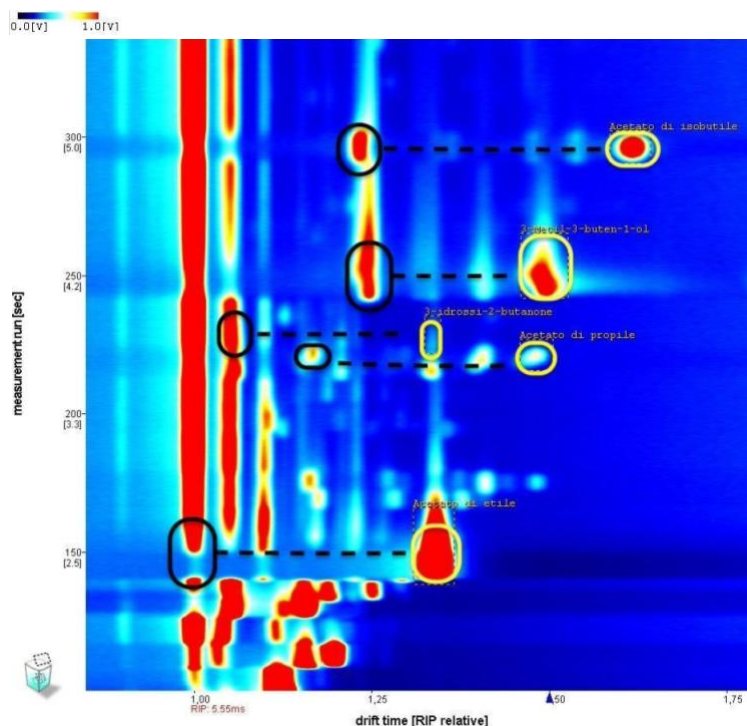


Figura 21: Cromatogramma rappresentativo della corrispondenza tra monomeri (riquadri neri) e dimeri (riquadri gialli) di alcune molecole identificate in ABM. Partendo dall'alto possiamo vedere l'acetato di isobutile, il 3-metil-3-buten-1-olo o isoprenolo, il 3-idrossi-2-butanone, l'acetato di propile e l'acetato di etile dove si vede che la sua presenza causa l'interruzione del RIP.

Sempre in figura 21 è osservabile anche come elevate concentrazioni di una molecola volatile causino un'interruzione del segnale del RIP. Un esempio è dato dall'acetato di etile, uno dei composti volatili maggiormente presenti nell'aceto balsamico e nei mosti; l'elevata presenza di questa molecola provoca il trasferimento totale di protoni dalle

molecole d'acqua all'acetato di etile. A questo punto l'acqua non è più protonata e quindi rilevabile dal detector, portando ad una sospensione temporanea del segnale del RIP.

Anche per quanto riguarda i campioni di mosti otterremo dei cromatogrammi che presentano sia monomeri che dimeri e anche in questo caso è necessario prendere in considerazione i dimeri. Da come si può osservare in figura 22, anche in questo caso una concentrazione elevata di una molecola volatile causa un'interruzione del segnale del RIP (vedi nella figura la molecola "furfurale").

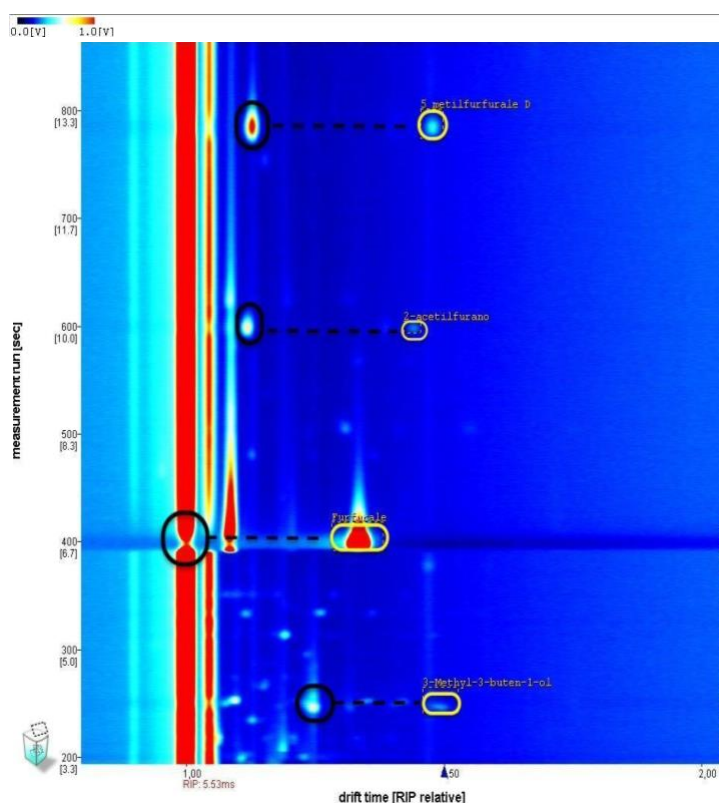


Figura 22: Cromatogramma rappresentativo della corrispondenza tra monomeri (riquadri neri) e dimeri (riquadri gialli) di alcune molecole identificate in mosti. Dall'alto possiamo osservare il 2-acetilfurano, il furfurale dove la sua presenza causa l'interruzione del RIP e il 3-metil-2buten-1-olo o isoprenolo.

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

- **Dynamic PCA** dove è possibile ottenere confronti elaborati su un elevato numero di campioni caratterizzati da numerose variabili, sfruttando un approccio statistico multivariato quale l'analisi delle componenti principali (PCA); l'approccio statistico è una tecnica fattoriale che fornisce come risultato il numero degli effetti significativi ed indipendenti sufficienti a descrivere adeguatamente la struttura dei

dati, consentendone la trasformazione di tabelle molto complesse in diagrammi di più immediata comprensione. Utilizzando questa funzione è stato possibile effettuare confronti su diversi campioni di ABM e mosti sulla base dei molteplici composti individuati e presenti in quantità più o meno rilevanti. Quello che si ottiene utilizzando questa funzione è un grafico in cui i campioni sono rappresentati in forma dispersa se significativamente diversi o raggruppati se presentano similarità.

- **Gallery** permette di confrontare diversi cromatogrammi in funzione di determinate aree individuate dall'operatore. Quello che si ottiene è una tabella per la visualizzazione di aree corrispondenti a determinati spot appartenenti a ciascun cromatogramma scelto per il confronto; da questa tabella è possibile fare confronti visivi dati dalle sequenze degli spot e le loro diverse intensità, oppure è possibile confrontare i cromatogrammi sfruttando l'indice di similarità tra campioni automaticamente calcolato dal software. Utilizzando questa funzione è inoltre possibile ottenere una valutazione semi-quantitativa delle molecole ottenendo la concentrazione in mV degli spot dei relativi composti volatili identificati.
- **Reporter** è utile per confrontare, sempre visivamente, diversi cromatogrammi in base all'intensità degli spot. Impostando come riferimento un singolo cromatogramma è possibile confrontarlo con diversi campioni i cui cromatogrammi mostreranno zone di colore rosso intenso se il segnale dello spot è maggiore rispetto al riferimento o blu se il segnale è minore. Questa funzione è molto utile per visualizzare il rumore di fondo nei cromatogrammi dei campioni andando a confrontarli con i rispettivi bianchi in modo d'andare ad individuare le sostanze derivanti dall'aria ambientale o dall'acqua di diluizione: ad esempio, impostando come riferimento l'acqua è possibile visualizzare nel campione in esame alcune zone di colore blu corrispondenti agli spot presenti nel cromatogramma del bianco e di conseguenza non appartenenti al campione oggetto di studio (Fig. 23). Non è presente però una funzione per la sottrazione automatica dei segnali derivanti da aria o acqua ed è quindi possibile effettuare solamente confronti visivi.

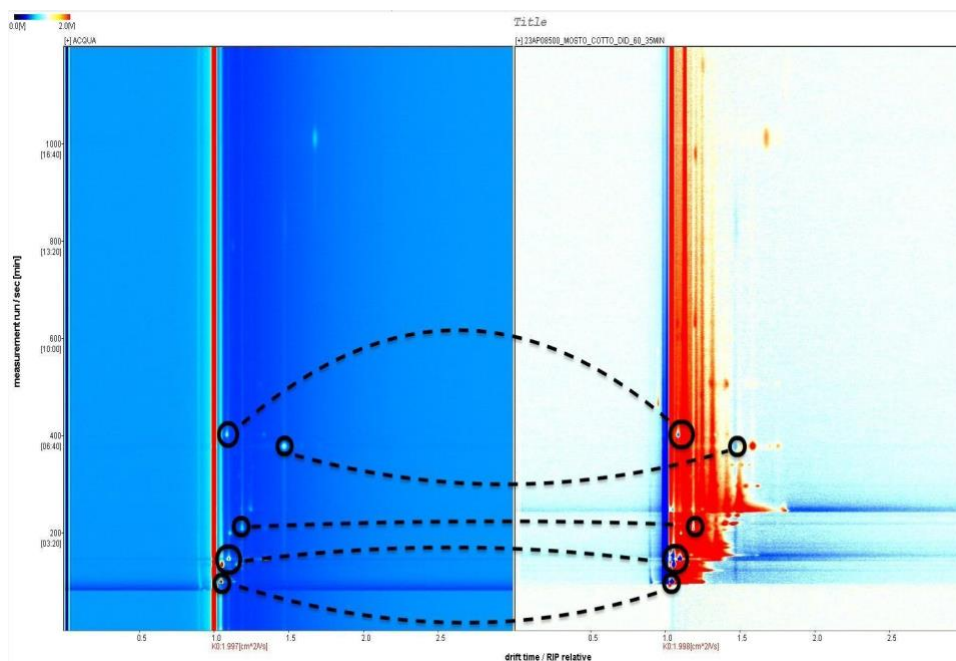


Figura 23: Confronto tra cromatogramma dell'acqua (sinistra) e quello del campione di mosto (destra) con impostato come riferimento il cromatogramma del bianco.

I composti volatili sono stati identificati confrontando l'indice di ritenzione e il tempo di deriva (il tempo in millisecondi impiegato dagli ioni per raggiungere il collettore attraversando il tubo di deriva) con le librerie fornite dal software dello strumento, ovvero la libreria NIST 2014 degli indici di ritenzione accoppiata alla libreria sviluppata da Dortmund GAS sulle mobilità ioniche (*GCxIMS average low polar*). La finestra di ricerca nella libreria è integrata nella finestra del progetto ed è accessibile cliccando sulla funzione “*Library Search*”. Per poter effettuare ricerche nella libreria è necessaria la normalizzazione della colonna che viene effettuata con una misurazione HS-GC-IMS di una miscela di calibrazione, nel nostro caso GAS Dortmund raccomanda di misurare la miscela di sei chetoni. La normalizzazione avviene collegando il tempo di ritenzione GC misurato con l'indice di ritenzione dal database RI. L'operatore ha due opzioni generali per configurare una ricerca all'interno delle librerie selezionate: cliccando con il puntatore del mouse su una caratteristica (picco) di interesse nella finestra dei dati HS-GC-IMS, oppure inserendo l'identificatore molecolare (numero CAS, nome del frammento, ecc.) di interesse ed eseguendo la ricerca. Confermare l'identità di una molecola è un lavoro analitico complesso dove la ricerca tramite il numero CAS può essere molto utile ma tuttavia, per le ricerche con il nome del frammento molecolare, è necessario tenere presente che i risultati ottenuti dal database possono talvolta essere discordanti nella nomenclatura. Pertanto, è possibile che la ricerca non dia alcun risultato.

3.2 Formazione dei panel

Gli Aceti Balsamici di Modena IGP sono stati testati e valutati da giudici con media esperienza nell'analisi sensoriale degli aceti data da iniziali corsi di formazione e addestramento. Nel nostro caso i giudici sono stati selezionati all'interno del personale aziendale e al fine di assicurare un'omogeneità del gruppo, le aree di competenza e professione, in alcuni casi, potevano non riguardare l'ambito tecnico produttivo, infatti alcune persone disponevano di conoscenze limitate riguardo la produzione del prodotto.

3.2.1 Sessioni di valutazione sensoriale

Le sessioni di valutazione sensoriale si sono basate su un'analisi descrittiva del campione valutato per via oronasale proposto anonimamente ad ogni giudice. In ogni sessione sono stati utilizzati

- circa 15 ml di campione in bicchieri in vetro trasparente muniti di steli dalla capacità di circa 100 ml conformi alla norma UNI ISO 3591:1979. La geometria a tulipano di questi piccoli calici è stata studiata per ottenere un buon sviluppo degli aromi nello spazio di testa limitando la pungenza che potrebbe compromettere la loro rilevazione;
- tra l'analisi di un campione e l'altro sono stati utilizzati acqua e crackers per non affaticare il gusto e chicchi di caffè per l'olfatto a discrezione del giudice;
- schede di valutazione sensoriale per ogni Aceto Balsamico di Modena IGP, dove vi sono dei parametri caratterizzanti delle caratteristiche di ogni tipologia di Aceto Balsamico di Modena IGP (Fig. 24).

ACETO BALSAMICO DI MODENA		data	
scheda di valutazione organolettica		id campione	
		operatore	
descrittori principali			
1	densità velva (sensazione)		
2	intensità olfattiva		
3	aggressività olfattiva		
4	franchezza olfattiva		
5	aromi fruttati		
6	aroma di legno		
7	armonia dei profumi		
8	armonia del gusto		
9	persistenza del gusto		
10	franchezza gustativa		
		PUNTEGGIO COMPLESSIVO	
valutazioni accessorie			
	retrogusto dolciastro		
	retrogusto acido		
	impedimento/brillantezza		
descrizione personale			

Figura 24: Scheda di valutazione sensoriale utilizzata dai giudici durante le sessioni di valutazione.

In particolare è possibile andare a suddividere i descrittori presenti in base agli organi di senso utilizzati dal giudice per andare a descrivere le caratteristiche peculiari di ciascun campione; avremo, quindi, per la vista

- la **densità visiva**;
- la **limpidezza/brillantezza** che in realtà sono indipendenti uno dall'altro, dove nel caso della limpidezza sarà una classificazione della torbidità del campione, infatti, l'aceto, più sarà limpido e meno sarà torbido il quale indica una nota positiva del campione. Invece il parametro della brillantezza descrive la capacità del campione di riflettere la luce in superficie; è possibile quindi avere ABM non limpidi ma brillanti e viceversa.

Considerando invece l'olfatto avremo

- l'**intensità olfattiva** che viene valutata in maniera dipendente al parametro degli **aromi fruttati** in quanto il naso umano associa l'intensità olfattiva alla presenza di aromi fruttati. In questo caso sarà maggiore, se maggiore sarà la concentrazione di molecole volatili che indicano il sentore fruttato;
- l'**aggressività olfattiva**, data dalla sensazione di pizzicore che si viene a creare nel naso. In generale l'aceto sarà meno pungente e aggressivo se è più maturo e invecchiato perché l'acido acetico durante il periodo di maturazione si armonizza;
- la **franchezza olfattiva** descrive invece l'assenza di difetti o note estranee nell'odore esprimendo quindi la valutazione del grado di pulizia del profumo e dell'aroma del prodotto: infatti più un campione è franco e meno presenterà difetti;
- l'**aroma legno** è dato dalla presenza di molecole volatili e non, rilasciate dalle botti di legno o prodotte durante la "fermentazione acetica" nel periodo d'invecchiamento e maturazione in barrique, infatti si avranno dei valori alti di questa tipologia di descrittore in aceti che presentano tempistiche di invecchiamento più lunghe;
- l'**armonia dei profumi**, ovvero quanto gli odori siano in armonia e omogenei tra di loro senza che uno spicchi e sovrasti il resto.

Invece per il senso del gusto avremo

- l'**armonia del gusto** quindi quanto gli aromi gustativi sono in armonia tra di loro senza che uno specifico gusto prenda il sopravvento;
- la **persistenza del gusto**, esprime il tempo che intercorre tra la deglutizione del sorso e la scomparsa delle sensazioni olfattive percepite per via retronasale;

- la **franchezza gustativa** che, come quella olfattiva, descrive l'assenza di difetti e note estranee;
- il **retrogusto dolciastro**;
- il **retrogusto acido**.

Con il fine di andare ad aiutare i giudici nella valutazione sensoriale dei campioni in esame, sono stati valutati una serie di “campioni esempio”, alcuni diversi per ogni sessione mentre altri invece sempre gli stessi, che indicassero gli estremi minimi e massimi di alcuni descrittori presenti nella scheda di valutazione; sono stati utilizzati

- “campioni esempio” di massima e minima intensità olfattiva e aroma fruttato;
- “campioni esempio” di massima e minima presenza di sentore di legno;
- “campioni esempio” di massimo e minimo colore;
- “campioni esempio” di massima e minima densità.

Nei primi due casi, per scegliere i “campioni esempio”, ci siamo avvalsi dell'aiuto del FlavourSpec® prendendo in considerazione i campioni di ABM che presentano determinate caratteristiche, in questo caso molecole volatili, in grado di identificare la massima e minima intensità e la massima e minima presenza di sentori legnosi.

Negli ultimi due casi invece ci siamo avvalsi delle conoscenze delle caratteristiche peculiari delle varie tipologie di ABM in base alla specifica ricetta utilizzata nella loro produzione, riconoscendo in alcune tipologie un esempio di massima e minima densità e colore.

Quindi, in ogni sessione di valutazione sensoriale, vengono presentati 15 ml di campioni anonimi in bicchieri di vetro ad ogni giudice seguendo la stessa sequenza con lo scopo di andare a caratterizzare gli aceti avendo come esempio di alcuni descrittori presenti sulla scheda di valutazione alcune tipologie di ABM precedentemente valutate tramite HS-GC-IMS FlavourSpec®. Ogni scheda di valutazione sarà identificativa di un solo campione. Dopodichè l'elaborazione statistica è stata sviluppata con il software Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Risultati e Discussione

4.1 Ottimizzazione delle condizioni analitiche per la determinazione qualitativa dei composti volatili (VOCs) in Aceti Balsamici di Modena I.G.P.

Il metodo di analisi tramite HS-GC-IMS FlavourSpec® è stato precedentemente sviluppato e ottimizzato dal reparto Ricerca e Sviluppo di Ponti al fine di ottenere un sistema adatto all'analisi di aceti di vino e balsamici, i cui cromatogrammi ne rappresentassero al meglio il profilo volatile.^{18,45}

4.1.1 Ottimizzazione del metodo di analisi dell'Aceto Balsamico di Modena I.G.P.

Partendo dal metodo sviluppato in precedenza dal mio collega,¹⁸ abbiamo provato a modificare le tempistiche di permanenza della provetta contenente il campione nel fornello dell'autocampionatore HTA. Nello specifico, il metodo in questione, denominato per comodità M4, era caratterizzato dalle seguenti impostazioni:

- Generali
 - Syringe Volume [ml]: 2.5
 - Analysis Time [min]: 20
 - Method Type: Constant Mode
 - Preparation Time: 00:01:50
- Preparazione
 - Syringe Temperature [°C]: 60
 - Oven Temperature [°C]: 50
 - Incubation [min]: 1
 - Shaker on [min]: 0.2
 - Shaker off [min]: 0.1
- Campione
 - Sample Volume [ml]: 0.5
 - Fill Volume [ml]: 1.0
 - Pull Up Strokes: 2
 - Equilibration Delay [s]: 1
 - DHS time [min]: 0.0
 - Sample Speed [ml/min]: 6.0
 - Syringe Prefill: No
- Iniezione
 - Injection Speed [ml/min]: 30.0
 - Pre Injection Dwell [s]: 1
 - Post Injection Dwell [s]: 3
 - Flush Time [min]: 3¹⁸

Quello che siamo andati a modificare sono i seguenti parametri:

- Generali
 - Analysis Time [min]: **22**
- Preparazione
 - Incubation [min]: **20**

aumentando così il tempo di permanenza della provetta contenente il campione nel fornello facendo sì che venga riscaldata per più tempo.

Questo perché, come possiamo vedere nelle immagini 25, 26 e 27, ottenute tramite la funzione *gallery* del software, quello che ne consegue è che se vado a scaldare il campione per 20 minuti riesco a visualizzare meglio la maggior parte delle molecole rispetto al riscaldamento di un solo minuto.

Nel caso della diluizione 1:100 possiamo osservare una maggior concentrazione di acetato di isopropile, acetato di isoamile, isoprenolo, 2,3-esanedione, furfurale e 5-metilfurfurale.

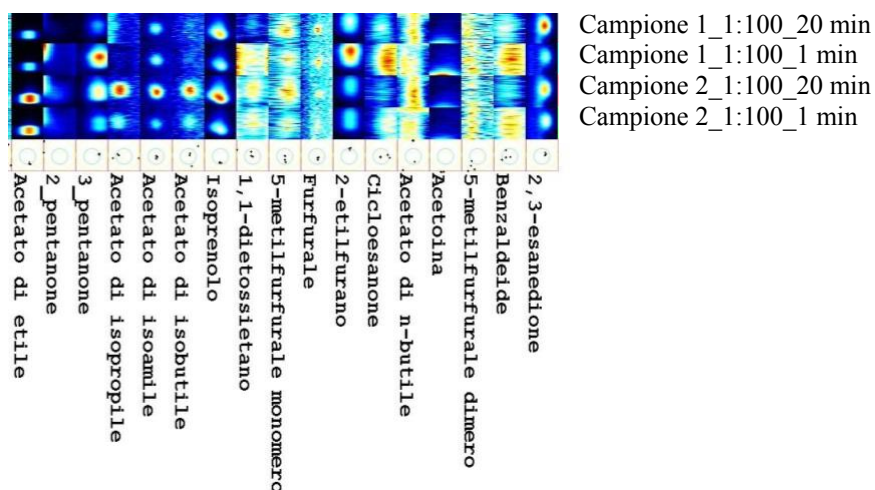


Figura 25: Confronto dei diversi spot ottenuti; dall'alto verso il basso abbiamo due campioni diversi diluiti 1:100 e riscaldati prima per 20 minuti e poi 1 minuto.

Valutando i risultati ottenuti diluendo il campione 1:50 possiamo sempre osservare una maggior concentrazione di acetato di propile, acetato di isopropile, acetato di isoamile, acetato di isobutile, isoprenolo, 1,1-dietossietano, 5-metilfurfurale, furfurale, acetato di n-butile e 2,3-esanedione nei campioni che hanno subito un riscaldamento di 20 minuti.

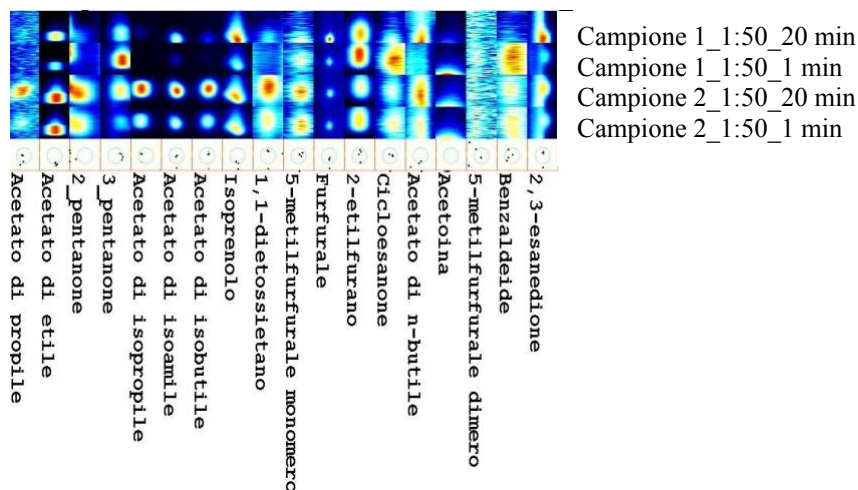


Figura 26: Confronto dei diversi spot ottenuti; dall'alto verso il basso abbiamo due campioni diversi diluiti 1:100 e riscaldati prima per 20 minuti e poi 1 minuto.

Per poter ottenere un'ulteriore conferma ho provato ad analizzare gli stessi campioni ma diluiti 1:10 e anche in questo caso è stato possibile osservare una maggior concentrazione delle molecole citate in precedenza, riuscendo inoltre a notare anche una maggior presenza di 2-pentanone e 3-pentanone nei campioni che hanno subito un riscaldamento per 20 minuti (vedi cap. 4.1.2 e 4.1.3).

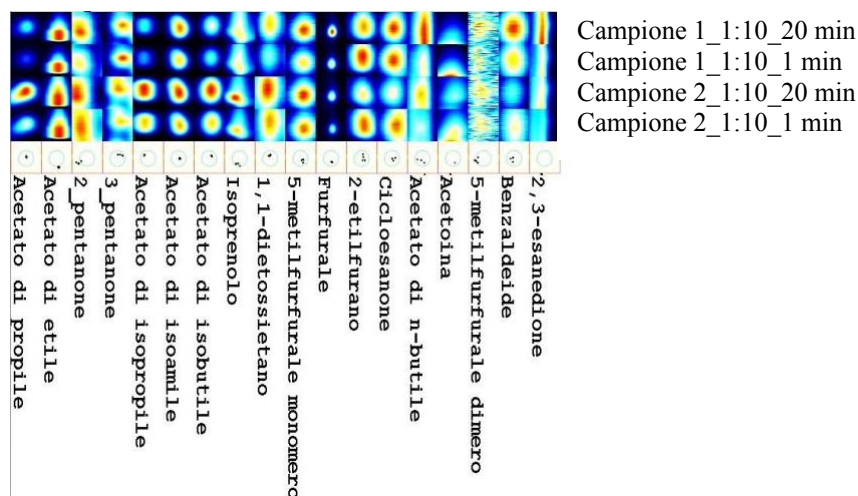


Figura 27: Confronto dei diversi spot ottenuti; dall'alto verso il basso abbiamo due campioni diversi diluiti 1:100 e riscaldati prima per 20 minuti e poi 1 minuto.

Per confermare quanto appena detto, sono stati presi in considerazione i valori dell'intensità di segnale dei principali spot indicante la concentrazione dei composti volatili riportati nelle tabelle 6 e 7.

Intensità segnale spot [mV]							
	Acetato di propile	Acetato di isopropile	Acetato di isoamile	Acetato di isobutile	Isoprenolo	Furfurale	Acetato di n-butile
Campione 1 1:100	217	216	335	231	517	190	198
Campione 2 1:100	198	264	397	281	581	179	203
Campione 1 1:50	196	241	825	327	1236	356	292
Campione 2 1:50	233	863	1156	766	1117	264	295
Campione 1 1:10	572	1512	2837	1869	1713	1663	640
Campione 2 1:10	1064	3191	3062	2890	2276	1225	574

Tabella 6: Intensità di segnale dei principali composti volatili utili nell'identificazione delle migliori condizioni di analisi del campione con riscaldamento di 20 minuti nel fornello dell'autocampionatore.

Intensità segnale spot [mV]							
	Acetato di propile	Acetato di isopropile	Acetato di isoamile	Acetato di isobutile	Isoprenolo	Furfurale	Acetato di n-butile
Campione 1 1:100	197	192	330	225	421	187	196
Campione 2 1:100	195	225	303	246	427	177	197
Campione 1 1:50	192	192	377	231	764	242	218
Campione 2 1:50	211	592	831	540	983	245	252
Campione 1 1:10	386	1171	2530	1516	1670	1325	489
Campione 2 1:10	698	2732	2696	2430	1931	1031	446

Tabella 7: Intensità di segnali derivanti da principali composti volatili utili nell'identificazione delle migliori condizioni di analisi del campione con riscaldamento di un minuto nel fornello dell'autocampionatore.

In conclusione è possibile affermare che sia a livello visivo che numerico, considerando la concentrazione in mV, è meglio analizzare i campioni riscaldandoli per 20 minuti in modo da ottenere un cromatogramma che sia il più rappresentativo possibile del campione in esame.

4.1.2 Ottimizzazione delle condizioni di preparazione del campione di Aceto Balsamico di Modena IGP

Una volta ottenute le condizioni di iniezione ottimali, ho provato a variare le concentrazioni di campioni in ogni provetta in modo da visualizzare se vi fosse o meno un miglioramento nella rilevazione di molecole volatili.

Partendo dalle condizioni definite dal mio precedente collega, ovvero analizzare i campioni 1:100 e 1:50, ho provato a variare tali condizioni soffermandomi sulla diluizione 1:10, in quanto dopo molteplici prove utilizzando tale diluizione, abbiamo notato la presenza di molecole non presenti nelle precedenti diluizioni.

Osservando la figura 28 e considerando dal primo al quarto spot, è possibile visualizzare un incremento di concentrazione dipendente dall'aumentare della concentrazione del campione analizzato, utile nell'andare ad identificare al meglio la molecola corrispondente. Nel caso invece del quinto e del sesto spot possiamo vedere come inizi a presentarsi ad una diluizione 1:50 ma compare in maniera molto più definita e chiara nella diluizione 1:10.

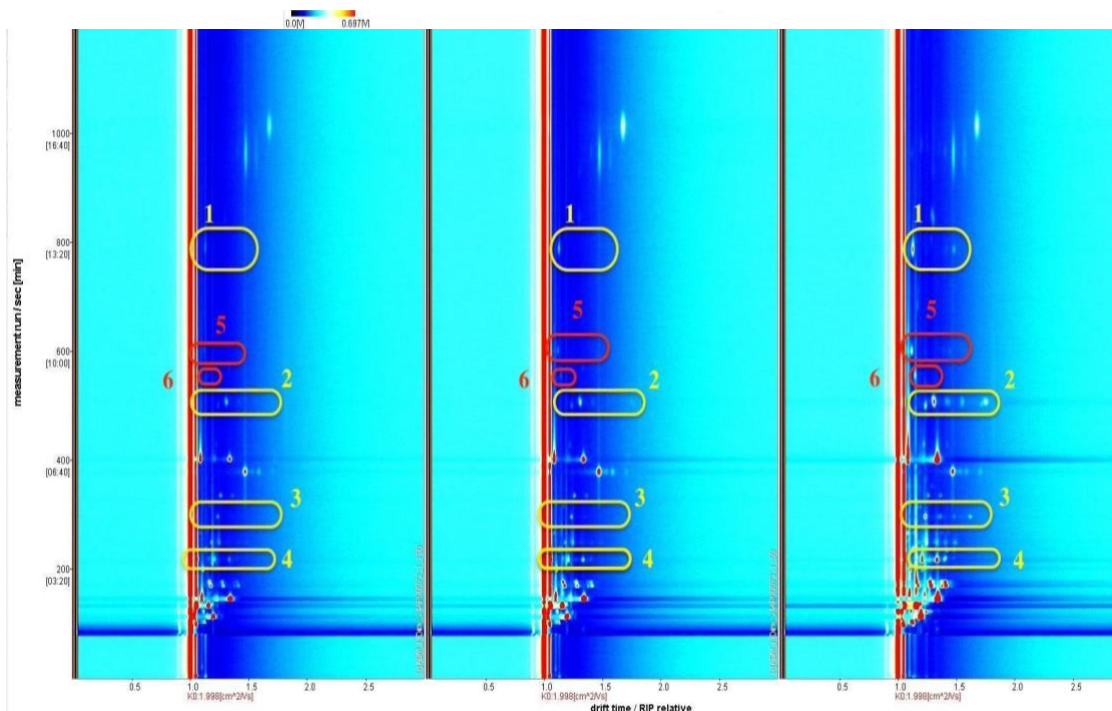


Figura 28: Confronto di tre cromatogrammi dello stesso campione di ABM iniettato a diverse diluizioni; partendo da sinistra 1:100, 1:50 e 1:10.

I riquadri gialli indicano le molecole presenti in tutte le diluizioni: 5-metilfurfurale (spot 1), acetato di isoamile (spot 2), acetato di isobutile (spot 3), 2-etil furano (spot 4).

I riquadri rossi indicano le molecole visualizzabili solo nella diluizione 1:10: 2-acetilfurano (spot 5) e cicloesanone (spot 6).

Confrontando in maniera più specifica le molecole presenti nei cromatogrammi è possibile confermare la precedente ipotesi in quanto possiamo visualizzare in maniera molto più chiara la presenza di alcune molecole e la loro maggiore concentrazione nel cromatogramma ottenuto diluendo il campione 1:10 rispetto ai cromatogrammi ottenuti diluendo il campione 1:100 e 1:50.

È inoltre importante sottolineare il fatto che alcune molecole sono state identificate solo grazie all'analisi del cromatogramma ottenuto dall'analisi del campione diluito 1:10 in quanto, anche se presenti nel cromatogramma del campione 1:100, sono quasi invisibili e di conseguenza non visualizzabili in maniera immediata. Ne sono un esempio l'1,1-dietossietano, il 5-metilfurfurale (dove il suo dimero è presente solo nella diluizione 1:10) e il 2-etilfurano, poi abbiamo la benzaldeide, il cicloesano, l'acetato di propile e l'acetoina, assenti nelle prime due diluizioni (Fig. 29).

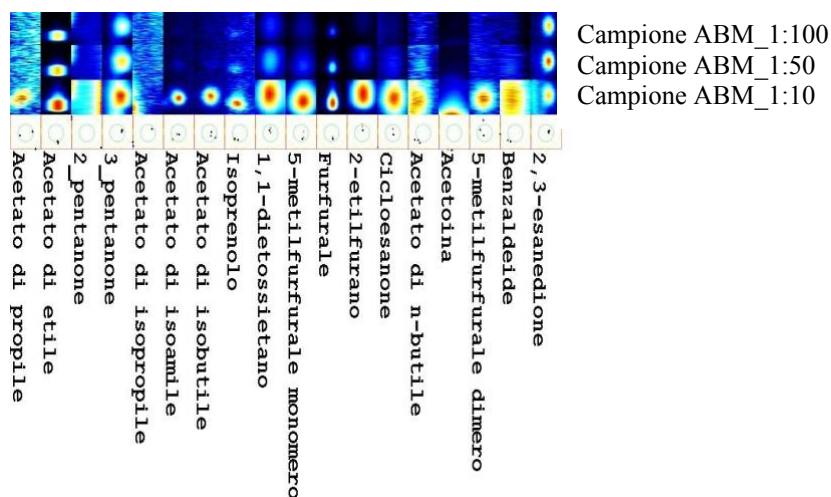


Figura 29: visualizzazione della diversa presenza di composti volatili nelle diverse diluizioni tramite la funzione gallery del software. Dall'alto verso il basso abbiamo il campione diluito 1:100, 1:50 e poi 1:10.

In conclusione è possibile affermare che, oltre a diluire il campione 1:100 e 1:50 in modo da ottenere un cromatogramma pulito e osservare le molecole principali, è necessario analizzare il campione diluito 1:10 in modo tale da riuscire a visualizzare anche le molecole volatili presenti in minor concentrazione nel campione ottenendo un cromatogramma che sia il più rappresentativo possibile ottenendo una visione più completa della complessità volatile che caratterizza l'Aceto Balsamico di Modena IGP.

4.1.3 Composti volatili caratterizzati in Aceti Balsamici di Modena IGP utilizzando il nuovo metodo di analisi

Analizzando i cromatogrammi ottenuti con il nuovo metodo di analisi ho potuto osservare la presenza di nuovi spot appartenenti a molecole diverse rispetto a quelle identificate utilizzando il precedente metodo (Fig.30).

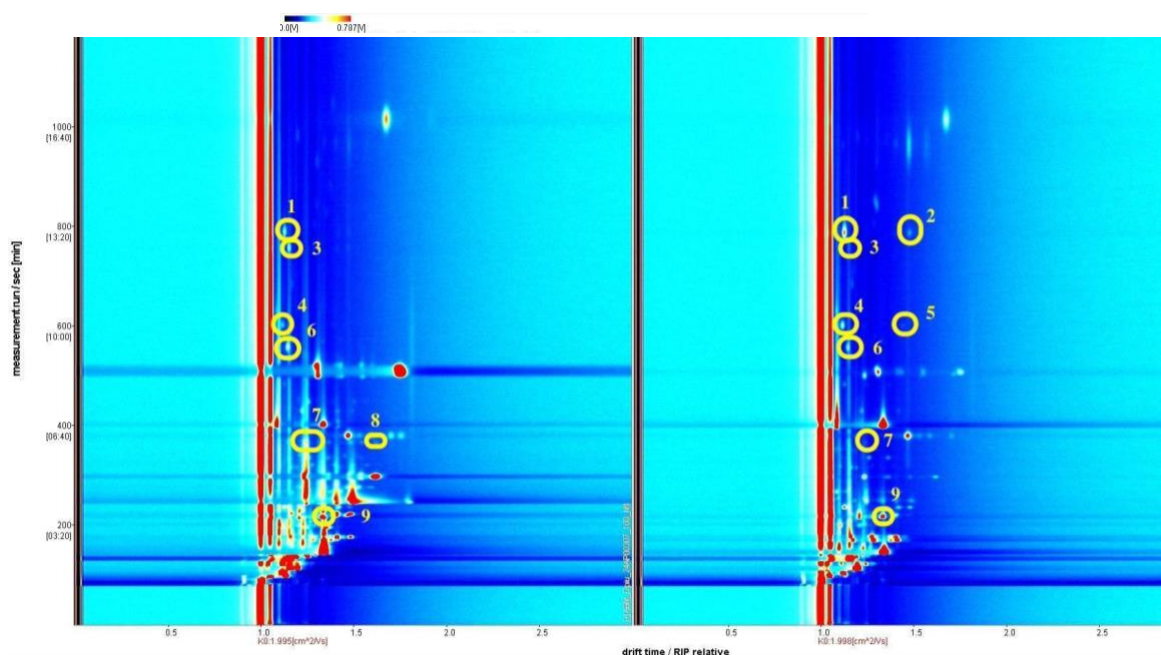


Figura 30: Confronto di due cromatogrammi di campioni diversi di ABM dove a destra abbiamo quello di un ABM invecchiato, ottenuti con diluizione 1:10.

I riquadri gialli indicano i nuovi spot identificati come il monomero di 5-metilfurale (spot 1), il dimero di 5-metilfurale (spot 2), la benzaldeide (spot 3), il monomero (spot 4) e il dimero (spot 5) di 2-acetilfurano, cicloesانونe (spot 6), il monomero (spot 7) e il dimero (spot 8) di acetato di n-butile e 2-acetilfurano (spot 9).

La tabella 8 elenca i composti relativi a ciascuno spot indicati nel cromatogramma precedente; i nomi sono stati identificati utilizzando la libreria *GCxIMS average low polar* presente nel software (elaborato dal software mediante riconoscimento diretto, utilizzando gli indici di Kovats) e la presenza di alcune delle seguenti molecole all'interno della frazione volatile di Aceti Balsamici di Modena IGP è stata attestata da diversi lavori scientifici.^{46,50}

Numero spot	Composto	Numero CAS	RI	Rt [sec]	Dt [a.u.]	Fonte
1	5-metilfurfurale monomero	620-02-0	966.0	788.597	1.12588	46
2	5-metilfurfurale dimero	620-02-0	966.0	788.631	1.4772	46
3	Benzaldeide	100-52-7	958.1	757.611	1.15258	50
4	2-acetilfurano monomero	1192-62-7	912.8	602.681	1.11982	50
5	2-acetilfurano dimero	1192-62-7	912.6	602.113	1.45104	50
6	Cicloesanone	108-94-1	897.0	556.446	1.14867	-
7	Acetato di n-butile monomero	123-86-4	810.4	364.786	1.25085	-
8	Acetato di n-butile dimero	123-86-4	810.6	365.251	1.62679	-
9	2-etilfurano	3208-16-0	709.3	218.681	1.33386	-

Tabella 8: Composti volatili presenti nei campioni analizzati con i rispettivi indici di ritenzione (RI), tempi di ritenzione (Rt) e tempi di volo (Dt).

Considerando ogni singola molecola, il contributo che vanno a dare alle caratteristiche sensoriali dell'ABM sono le seguenti:

- **5-metilfurfurale** è un derivato del furano prodotto durante la reazione di Maillard; è responsabile, con altre molecole, del sapore e odore di zucchero bruciato degli aceti⁴⁶ e inoltre è associato all'aroma di mandorla e mandorla tostata.⁴⁷ Secondo *Dumitriu et al.* il 5-metilfurfurale, il furfurale e il 5-idrossimetilfurfurale derivano dalla degradazione delle emicellulose durante il processo di tostatura del legno che costituisce la botte dove, una volta esausta nell'industria enologica, verrà utilizzata per l'invecchiamento dei balsamici; hanno infatti osservato che questi composti volatili aumentano in relazione all'aumento delle tempistiche d'invecchiamento e inoltre che un grado di tostatura elevato del legno ne comporta una maggior concentrazione (Fig. 31).⁴⁸

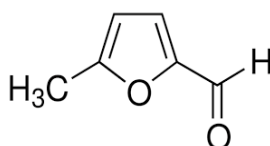


Figura 31: Struttura del 5-metilfurfurale.⁵²

- **Benzaldeide**, appartenente al gruppo delle aldeidi aromatiche, è responsabile del sentore di mandorla ed è stato dimostrato che la sua concentrazione aumenta durante la lavorazione termica (Fig. 32).⁵⁰

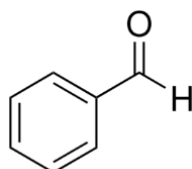


Figura 32: Struttura della benzaldeide.⁵²

- **2-acetilfurano** deriva dal furano e presenta un aroma caramellato o simile al miele; questo è dovuto al gruppo acetilico che contribuisce con note di zucchero bruciato e caramello. Può anche presentare note che ricordano la frutta cotta e presenta inoltre delle sfumature tostate o nocciolate che possono ricordare le nocciole tostate o il pane appena sfornato (Fig. 33).⁵⁰

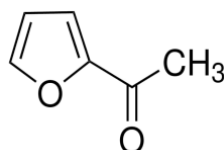


Figura 33: Struttura del 2-acetilfurano.⁵²

- **cicloesانون** è un chetone ciclico che solitamente non è presente nell'aceto, la sua presenza infatti potrebbe derivare da una contaminazione accidentale che potrebbe essere avvenuta anche in fase di analisi. Questa molecola presenta un odore dolce simile alla menta e di conseguenza può influenzare negativamente il profilo aromatico dell'aceto conferendo odori indesiderati (Fig. 34).

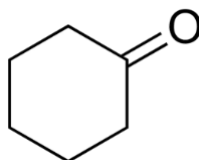


Figura 34: Struttura del cicloesانون.⁵²

- **Acetato di n-butile**, estere dell'acido acetico, presenta un odore fruttato che ricorda le mele o le banane aggiungendo una nota fresca e dolce al profilo sensoriale dell'Aceto Balsamico di Modena IGP (Fig. 35).

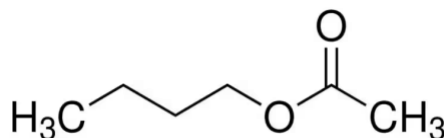


Figura 35: Struttura dell'acetato di n-butile.⁵²

- **2-etilfurano**, derivato del furano, conferisce un sentore dolce simile al caramello e alla vaniglia con note fruttate che ricordano le mele o le pere. Il furano può essere presente nell'aceto balsamico in quanto contenuto nel caramello E150d ma anche nelle materie prime come il mosto cotto in quanto i derivati furanici sono presenti negli alimenti trattati termicamente (Fig. 36).⁵¹

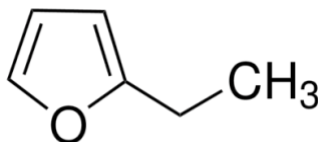


Figura 36: Struttura del 2-etilfurano.⁵²

4.2 Valutazione sensoriale

4.2.1 Sessioni di valutazione sensoriale utilizzando campioni esempio ottenuti tramite confronto strumentale

Sono state effettuate quattro sessioni di valutazioni sensoriali di varie tipologie di Aceti Balsamici di Modena IGP Ponti utilizzando dei “campioni esempio” rappresentanti minime e massime referenze di alcuni descrittori in modo tale che siano da supporto ai giudici nelle loro valutazioni. Durante tutte le sessioni

- il campione utilizzato come esempio del minimo colore è l'ABM BIO Ponti perché, in quanto biologico, per legge non può contenere caramello E150d il quale ne conferirebbe un colore molto più scuro;
- il campione utilizzato invece come riferimento di massimo colore e minima densità è il campione F1 date le peculiari caratteristiche da ricetta interna; nelle ultime due sessioni questo stesso campione è stato anche utilizzato come metro di paragone per la minima presenza di aroma legno in quanto non presenta periodi di maturazione in barrique oltre ai mesi dichiarati nel disciplinare;
- il campione indicante, invece, il parametro di massima densità è l'ABM con il maggior contenuto di mosto, considerato ad alta densità.

Durante la prima sessione sono stati valutati 3 campioni di ABM di tre tipologie diverse con lo scopo d'andare a creare dei grafici radar che caratterizzino al meglio il campione in esame. In questo caso i “campioni esempio”, utilizzati in seguito a rilevazione delle molecole volatili tramite FlavourSpec®, sono il campione C1N per quanto riguarda l'indicazione di massima intensità, mentre il campione A2, biologico, indicante la minima intensità.

Per poter scegliere questi campioni sono stati confrontati tutta una serie di ABM di tipologie diverse iniettati fino a quel momento, in modo d'andare a identificare quale di questi potesse essere maggiormente esemplificativo dell'aroma fruttato.

In realtà, da una prima analisi visiva dei due cromatogrammi utilizzando il modulo reporter del software, non si evidenziano delle differenze sostanziali tra i due campioni (Fig. 37).

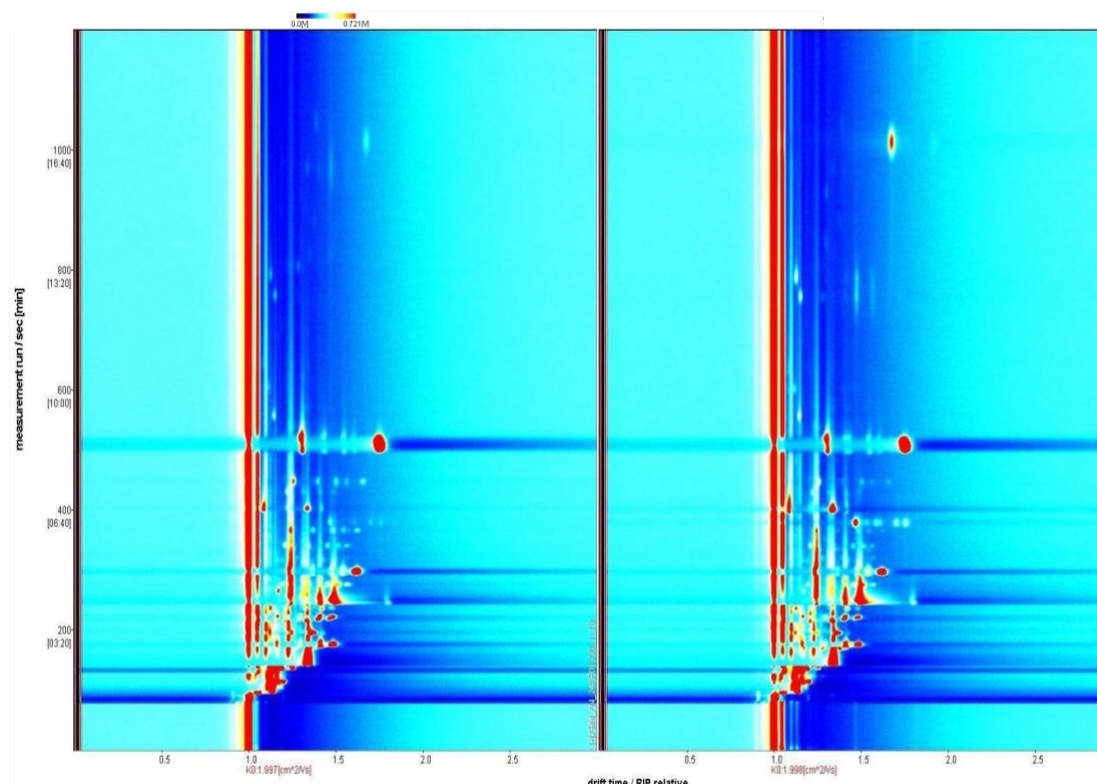


Figura 37: Cromatogrammi dei campioni scelti rispettivamente come “campione di massima intensità/aromi fruttati” a sinistra e a destra “campione di minima intensità/aromi fruttati”.

Analizzando più nello specifico i due cromatogrammi è possibile notare una differenza di concentrazione tra i due campioni, evidenziando una maggior presenza di molecole volatili indicanti l’aroma fruttato nel campione di ABM C1N rispetto al biologico (Fig.38).

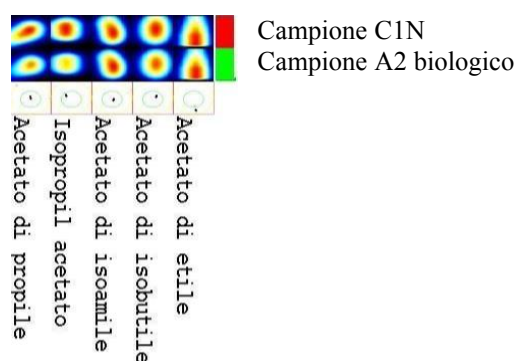


Figura 38: Confronto della presenza delle molecole dei campioni scelti come “campione di massima intensità/aromi fruttati” in alto e “campione di minima intensità/aromi fruttati” in basso.

A sostegno di questa ipotesi è stata fatta un’analisi delle componenti principali (PCA) che ci consente di confrontare i due cromatogrammi in modo da capire come una singola area, corrispondente alla molecola volatile, sia significativa rispetto ad un’altra; permette,

quindi, di visualizzare come i file si discostano nel grafico in base alla loro somiglianza, dove maggiore è la vicinanza tra più file e maggiore sarà la loro similarità in funzione delle aree selezionate che in questo caso sono le molecole volatili che conferiscono sentori fruttati al campione. Il grafico ottenuto ci permette di vedere come i due campioni si discostano tra di loro e che quasi tutte le molecole tendono verso il campione esempio di massima intensità (Fig.39), confermando la nostra precedente ipotesi.

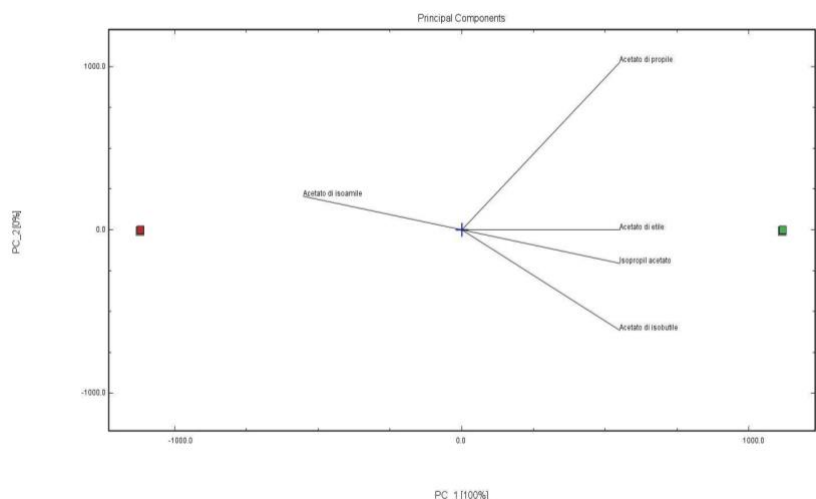


Figura 39: Confronto tramite PCA del campione esempio di massima intensità (quadrato rosso) e di minima intensità (quadrato verde) sulla base della concentrazione delle molecole volatili precedentemente identificate che danno sentore fruttato.

Nella seconda sessione di valutazione sensoriale sono state analizzate le quattro tipologie di biologici utilizzando due campioni diversi come riferimento alla massima e minima intensità.

Come si può già vedere nella figura 40 vi è una grossa differenza di concentrazione in mV nei due campioni delle molecole caratterizzanti l'aroma fruttato, quali acetato di isoamile, acetato di isobutile, acetato di propile, acetato di isopropile e acetato di etile.

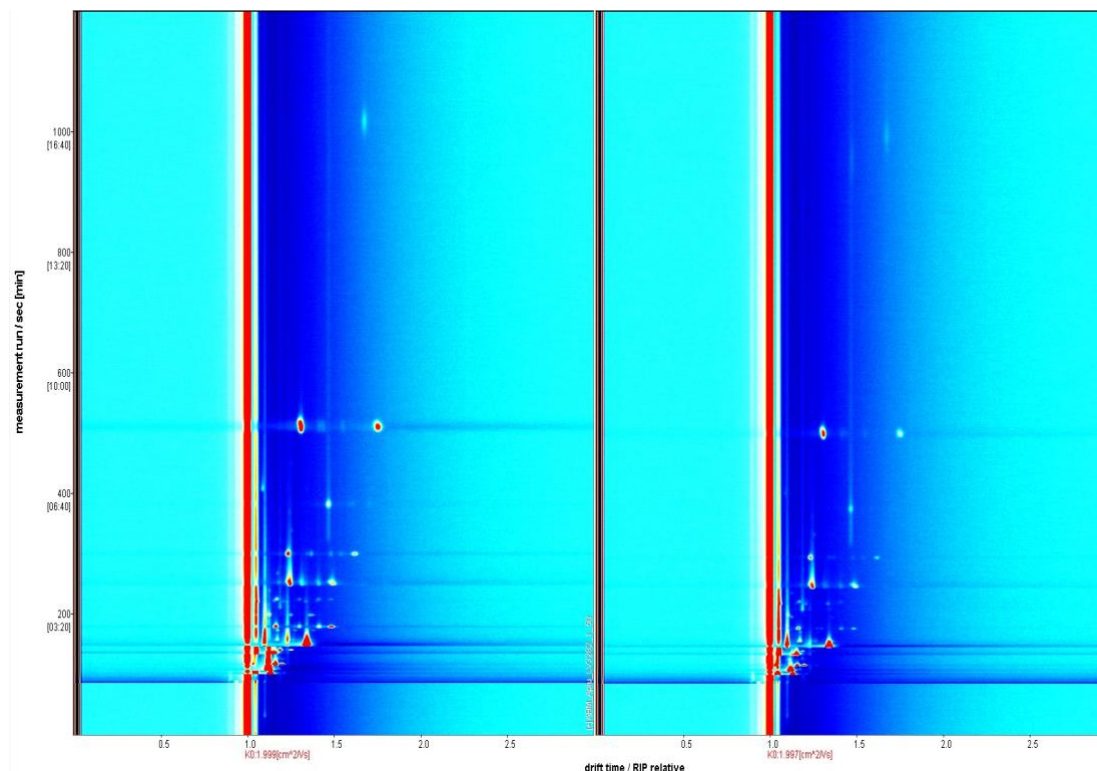


Figura 40: Partendo da destra abbiamo il cromatogramma del campione scelto come riferimento della massima intensità/aromi fruttati e poi quello del campione scelto come riferimento alla minima intensità/aromi fruttati.

Visualizzando il confronto degli spot di tali campioni, si evidenzia la grossa differenza di concentrazione di molecole nei due campioni (Fig. 41), dove, come precedentemente accennato, l'acetato di propile conferirà un sentore di pera, l'acetato di isopropile darà un sentore dolce e fruttato, l'acetato di isoamile e di isobutile daranno invece un sentore di banana, mentre l'acetato di etile conferirà un sentore fruttato simile all'ananas.^{13,15,17}

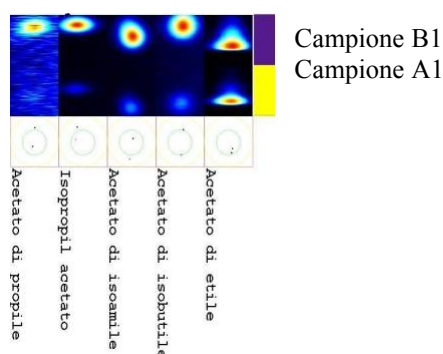


Figura 41: Confronto della presenza di molecole volatili caratterizzanti gli aromi fruttati dei campioni scelti rispettivamente come “campione di massima intensità/aromi fruttati” in alto e “campione di minima intensità/aromi fruttati” in basso.

Come nella prima sessione, anche in questo caso abbiamo voluto un'ulteriore conferma dell'estrema diversità dei due campioni tramite PCA utilizzando sempre come aree di riferimento le molecole volatili che conferiscono l'aroma fruttato al campione.

Da come si vede nell'immagine 42, i due campioni sono molto distanti tra di loro e tutte le aree selezionate che identificano l'aroma fruttato virano verso il file del campione esempio di massima intensità, confermando l'ipotesi che tale campione presenta un'intensità maggiore rispetto al campione di riferimento della minima intensità.

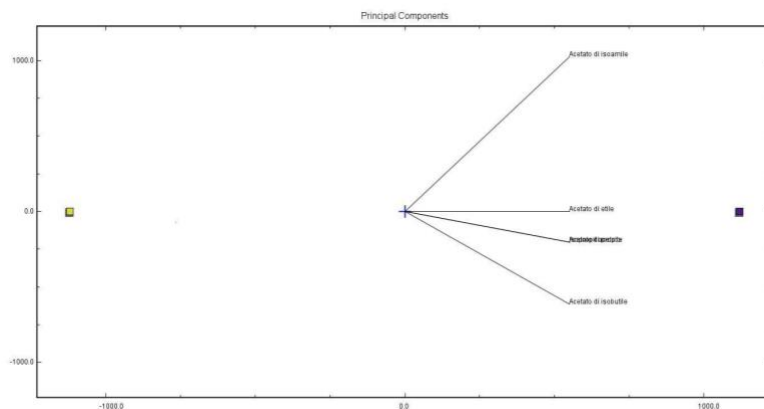


Figura 42: Confronto tramite PCA dei campioni esempio di minima intensità (quadrato giallo) e massima intensità (quadrato viola) sulla base della concentrazione delle molecole volatili precedentemente identificate che danno sentore fruttato.

In una terza sessione di valutazione sensoriale sono state considerate altre tipologie di ABM convenzionali utilizzando come campione per la massima intensità lo stesso campione utilizzato nella precedente sessione, mentre invece come esempio per la minima intensità una tipologia di ABM invecchiato. I campioni sono sempre stati identificati e scelti in base ai cromatogrammi ottenuti tramite HS-GC-IMS FlavourSpec® (Fig. 43) dove appunto vediamo una maggior presenza di molecole volatili nel campione utilizzato come esempio di massima intensità rispetto a quello utilizzato come minima; il tutto viene sempre confermato da un'analisi specifica delle singole molecole (Fig. 44) e da un'analisi delle componenti principali (Fig. 45) così da poter affermare con maggiore sicurezza che il campione esempio caratterizzante una maggiore intensità presenta maggiori sentori fruttati rispetto al campione di ABM invecchiato definito B1-.

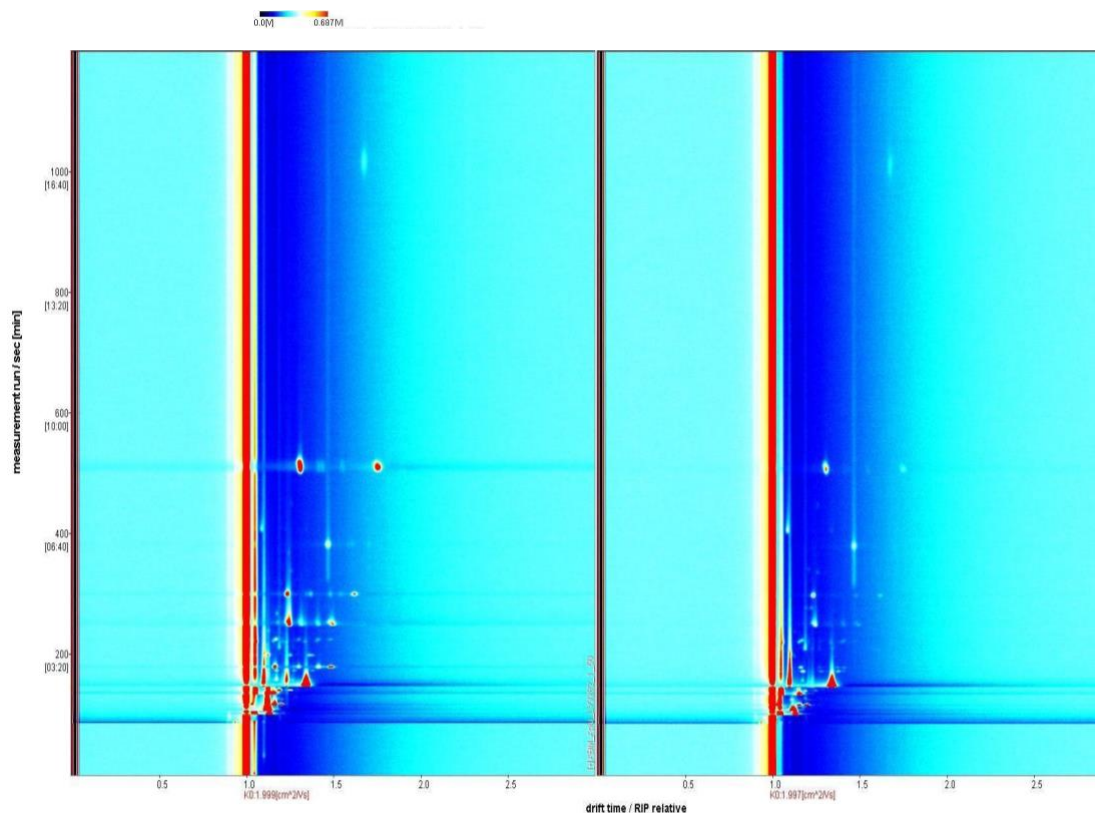


Figura 43: Cromatogrammi dei campioni scelti come “campione di massima intensità/aromi fruttati” a sinistra e a destra il “campione di minima intensità/aromi fruttati”.

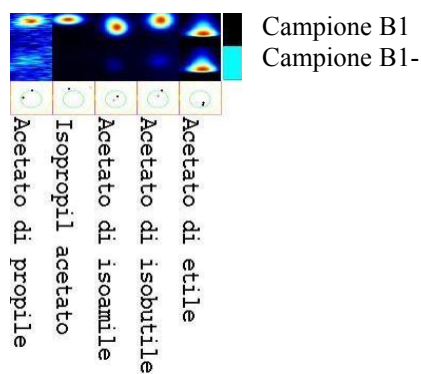


Figura 44: Confronto della presenza di molecole volatili caratterizzanti gli aromi fruttati dei campioni scelti come “campione di massima intensità/aromi fruttati” in alto e “campione di minima intensità/aromi fruttati” in basso.

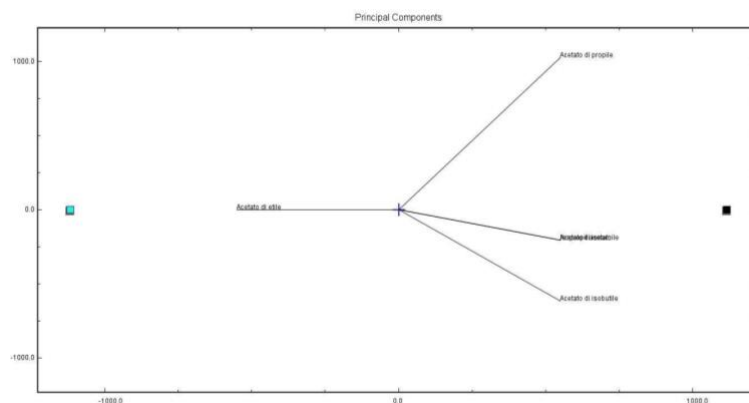


Figura 45: Confronto tramite PCA di campioni di minima intensità (quadrato azzurro) e massima intensità (quadrato nero) sulla base della concentrazione delle molecole volatili precedentemente identificate che danno sentore fruttato.

In questa sessione è stato considerato anche l'utilizzo di altri "campioni esempio" che vadano ad identificare la massima e minima presenza di un'altra tipologia di descrittore quale il sentore legnoso, barricato.

Utilizzando il HS-GC-IMS FlavourSpec® (vedi cap. 4.3) e focalizzandomi sui periodi d'invecchiamento di ogni singolo ABM da ricetta interna, siamo riusciti a trovare due campioni di ABM che si contraddistinguono rispettivamente per la massima e minima presenza dell'aroma legno in modo d'andare a supportare ancora di più i giudici nella valutazione dei singoli aceti balsamici.

In generale avremo quindi il campione di ABM invecchiato 19AP09493, indice di massima espressione del sentore legnoso, e il campione di F1, utilizzato anche come riferimento per la minima densità e massimo colore, indice di minima presenza di aroma legno. Analizzando una serie di Aceti Balsamici di Modena IGP invecchiati in barrique disponibili in laboratorio, sembrerebbe che il campione che presenta note più legnose sia il campione 19AP09493, come raffigurato nell'immagine 46, in quanto possiamo osservare un netto incremento di molecole come acetoina, 5-metilfurfurale e furfurale nel primo campione ad indicare la presenza di note legnose e mandorle tostate.

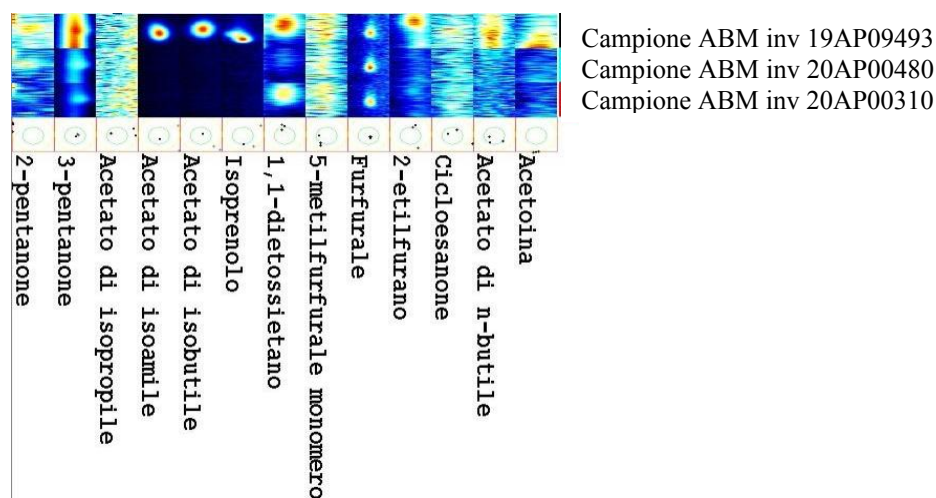


Figura 46: Confronto della presenza di molecole volatili caratterizzanti sia gli aromi fruttati che l'aroma legno in campioni di ABM invecchiato.

Quello che si può notare è che nelle sessioni di valutazione sensoriale non sono stati usati gli stessi “campioni esempio” come indicazione dell'intensità e aroma fruttato, in quanto, andando avanti con le analisi e ampliando la libreria di ABM analizzati, si è cercato sempre di più di affinare la scelta considerando i campioni con le caratteristiche necessarie presenti in laboratorio. Inoltre è possibile osservare che il numero di campioni analizzati in ogni sessione risulta differente: nella prima sono stati analizzati tre campioni, nella seconda quattro, nella terza cinque e nella quarta sempre quattro. Questo è stato fatto per capire quanti campioni i giudici fossero in grado di valutare adeguatamente prima di essere saturi e quindi di non essere più in grado di riconoscere le giuste caratteristiche sensoriali di ogni singolo campione; per capire questo ci siamo avvalsi di un'elaborazione statistica (vedi cap. 4.2.2).

4.2.2 Elaborazione statistica e registrazione dei dati

Avendo le schede di valutazione compilate dai giudici, è possibile ricavare dei valori numerici diversi di ogni singolo descrittore per le diverse tipologie di ABM analizzate. Dopodichè, basandosi su tali valori, ho potuto calcolare il percentile dividendo i dati in quattro parti così da poter escludere i valori al di sotto del 25%, limite minimo, e quelli al di sopra del 75%, limite massimo; facendo così però non siamo riusciti a restringere l'intervallo dei valori da considerare.

Di conseguenza abbiamo provato a calcolare la media dei valori dati da ogni giudice per singolo descrittore per poi sottrarre e aggiungere la deviazione standard di ogni singolo descrittore in modo da capire di quanto i dati si discostano dalla media e ottenere un

valore minimo e massimo utile per andare a formare un range di dati da prendere in considerazione, ovvero dati che si discostano di poco dalla media. Questo è stato fatto per andare a restringere l'intervallo dei valori da considerare in modo da rendere più precisa la media avendo un intervallo di valori più restrittivo.

Dopodichè abbiamo calcolato una nuova media, sempre per ogni singolo descrittore, data dai valori che rientrano nel range e utilizzato tale valore per andare a modificare o ottenere nuovi grafici radar specifici per ogni tipologia di Aceto Balsamico di Modena IGP Ponti (Fig.47).

Avendo confrontato i grafici radar storici di alcuni ABM con quelli nuovi e riscontrando una bassa percentuale di errore, abbiamo dedotto che anche i grafici radar degli ABM che non presentano uno storico sono corretti, estendendo così la presenza di grafici radar a quasi tutta la gamma di Aceti Balsamici di Modena IGP Ponti.

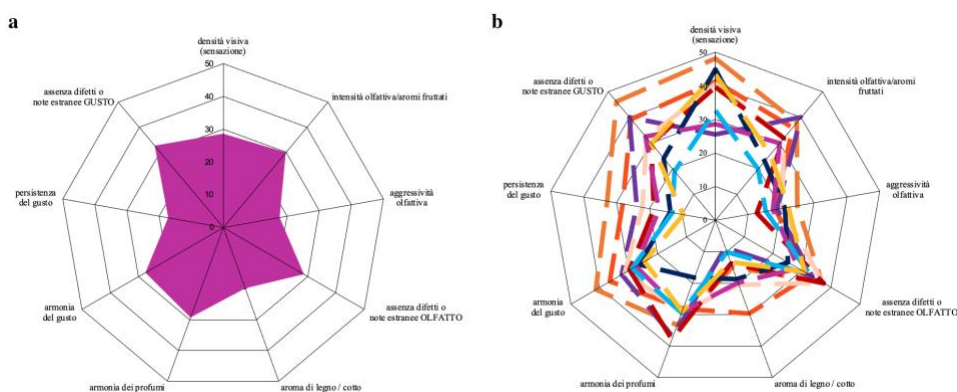


Figura 47: Esempi di grafici radar di Aceti Balsamici di Modena IGP ottenuti in seguito alle sessioni di valutazione sensoriale. (a) grafico di una singola tipologia di ABM, (b) insieme di grafici di varie tipologie di ABM Ponti.

Elaborando i dati, quello che abbiamo potuto evidenziare è che nella terza sessione di valutazione sensoriale la maggior parte dei valori dati dai giudici si trovano al di fuori dal range ottenuto calcolando la media e la deviazione standard; infatti è per questo che alcuni campioni sono stati riproposti nell'ultima sessione di valutazione sensoriale dove invece sono stati ottenuti molti più valori all'interno del range di accettazione confermando l'ipotesi che è possibile valutare più campioni nella stessa sessione, ma che questi non debbano superare un massimo di tre campioni per sessione con almeno 30 minuti di pausa tra un campione e l'altro in modo da non affaticare troppo l'olfatto e il gusto ma anche per far sì che i giudici non utilizzino il campione valutato in precedenza come metro di paragone e non ne siano influenzati.

4.2.3 Confronto dei risultati del panel test con le immagini strumentali del FlavourSpec®

Come indicato precedentemente, le molecole considerate per poter andare a discriminare la presenza o assenza di sentori fruttati sono

- **acetato di propile** il quale ha un odore fruttato, molto simile alla pera;¹⁸
- **2-pentanone** e **3-pentanone** presentano un odore dolce;¹⁸
- **acetato di isopropile** presenta un odore fruttato riconducibile alla frutta fresca;¹⁸
- **acetato di isoamile**, **acetato di isobutile**¹⁸ e **acetato di n-butile** ricordano molto l'odore di banana;
- **isoprenolo** che presenta un odore fresco e floreale, simile a quello del geranio;¹⁸
- **1,1-dietossietano** che ha un odore dolce, simile a quello dei fiori o fruttato.¹⁸

Invece, i composti volatili considerati per poter andare a valutare la presenza o assenza di sentori legnosi sono

- **5-metilfurfurale**, in quanto, come già citato in precedenza, presenta un odore tostato e caramellato, simile a quello della frutta secca;
- **furfurale** ha un odore di caramello e nocciole tostate con leggere note legnose;¹⁸
- **2-etilfurano** presenta un odore caramellato, nocciolato e tostato;
- **acetoina** presenta un odore burroso e leggermente caramellato,¹⁸ mentre il **2-acetilfurano** aggiunge dei sentori affumicati al prodotto.

Partendo dal grafico radar finale (Fig. 48) degli Aceti Balsamici di Modena IGP convenzionali, ovvero tutti i balsamici non biologici, ottenuto in seguito all'elaborazione statistica del panel test, possiamo ordinare i campioni analizzati partendo dall'ABM più fruttato e intenso fino ad arrivare al meno intenso secondo le valutazioni dei giudici:

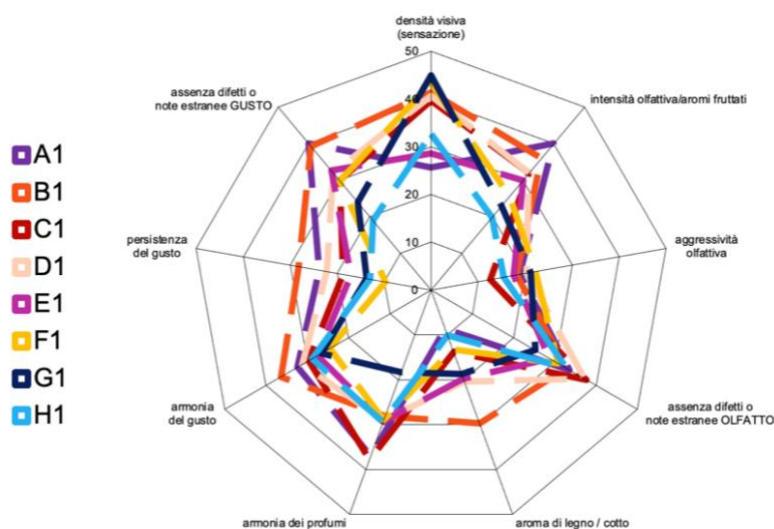


Figura 48: Grafico radar di tutti gli Aceti Balsamici IGP convenzionali Ponti.

Per poter avere un riscontro strumentale da affiancare all'analisi sensoriale, questi campioni sono stati analizzati anche al HS-GC-IMS FlavourSpec®.

Confrontando i cromatogrammi ottenuti (Fig. 49), il campione che presenta una maggior concentrazione di molecole volatili indicanti l'intensità dell'ABM è il campione C1 smentendo la valutazione dei giudici, mentre invece il campione che presenta una maggior concentrazione di molecole volatili indicanti la presenza di aroma legno è il campione B1, andando a confermare la valutazione dei giudici.

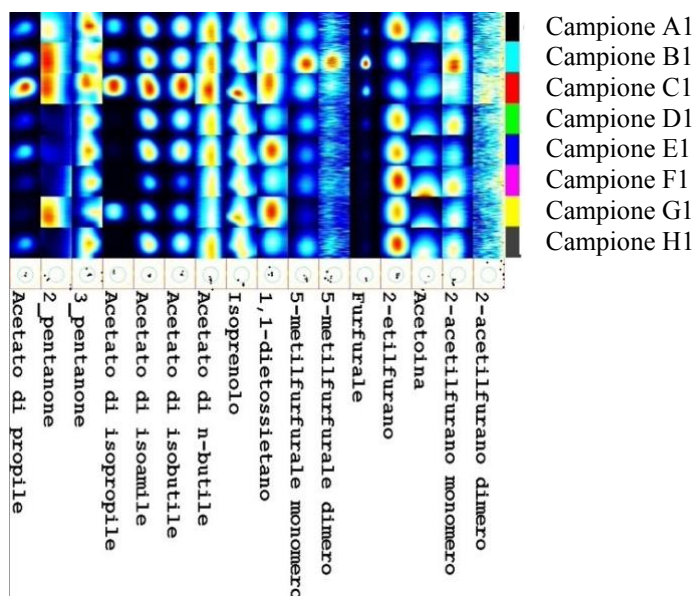


Figura 49: Confronto dei composti volatili dei campioni di ABM convenzionali analizzati ordinati partendo dal campione più intenso, secondi i giudici, fino a quello meno intenso.

Anche gli Aceti Balsamici di Modena IGP biologici sono stati ordinati partendo dal campione più intenso e fruttato fino ad arrivare al meno intenso, sempre secondo il parere dei giudici (Fig. 50).

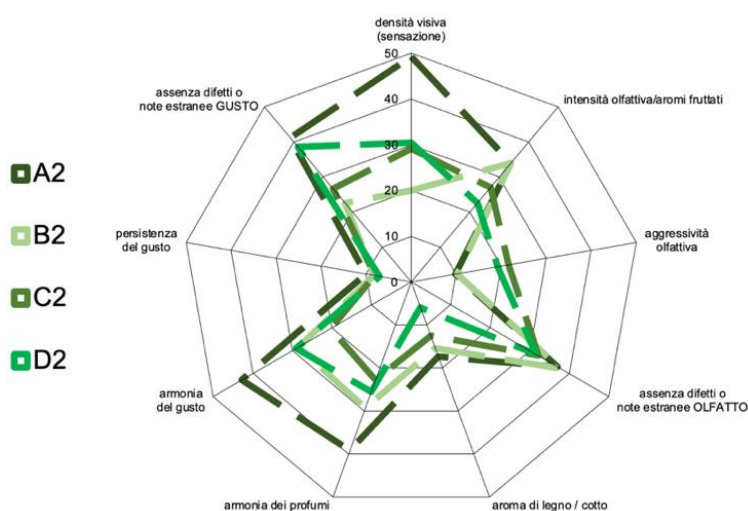


Figura 50: Grafico radar di tutti gli Aceti Balsamici IGP biologici Ponti.

Confrontando i risultati del panel test con quelli strumentali (Fig. 51) è possibile visualizzare una discordanza tra la valutazione dei giudici e le molecole presenti nei cromatogrammi. Focalizzandoci sull'intensità e aromi fruttati degli ABM, al HS-GC-IMS sembrerebbe che il balsamico più intenso sia il campione B2 in quanto presenta una concentrazione molto più elevata di molecole che danno il sentore fruttato rispetto a quanto valutato dai giudici. D'altro canto però il campione A2, in accordo con i giudici, è il campione che presenta la maggior concentrazione di molecole che danno il sentore legnoso, come ad esempio furfurale e 5-metilfurfurale andando probabilmente a confondere i giudici e facendo sì che questa tipologia di ABM sembri più intensa rispetto alla tipologia del campione B2.

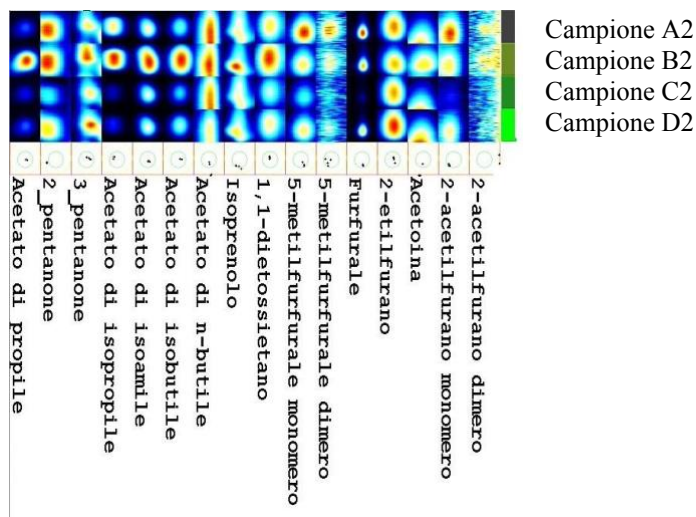


Figura 51: Confronto dei composti volatili dei campioni di ABM biologici analizzati durante la valutazione sensoriale; partendo dall'alto abbiamo il campione che presenta maggiore intensità secondo i giudici fino ad arrivare, in basso, al campione meno intenso.

In conclusione possiamo ribadire la concordanza tra lo strumento e i giudici per quanto riguarda il riconoscimento del campione che presenta sentori più legnosi, di barrique, e la discordanza tra lo strumento e i giudici per quanto concerne invece il riconoscimento del campione più intenso e fruttato.

4.3 Caratterizzazione del profilo volatile dell'Aceto Balsamico di Modena IGP: VOCs che danno il sentore legnoso

In seguito ad un'approfondita ricerca bibliografica non sono riuscita a trovare molti articoli in cui veniva descritto il profilo aromatico di aceti balsamici invecchiati in botti di legno. Considerando però un'altra tipologia di aceto, l'aceto Shanxi, secondo *Liang J et al.* i composti volatili presenti in alte concentrazioni ($>25 \mu\text{g/L}$) nell'aceto invecchiato sono, oltre all'acido acetico, il 2,3-butanedione (o diacetile), il furfurale, il 3-idrossi-2-butanone (acetoina), la tetrametilpirazina, l'alcol furfurilico (2-furfuranmetanolo) e l'acido 3-metilbutanoico (o acido isovalerico, moderatamente volatile ad alte temperature).⁵⁰

La presenza di queste molecole volatili può essere data da diversi fattori quale la specie botanica, età e area di crescita dell'albero, funzionamento tecnologico della botte e produzione di trucioli, il vino che vi è maturato all'interno prima dell'aceto balsamico e soprattutto il processo di tostatura del legno che andrà ad influenzare notevolmente la sua composizione chimica incidendo, di conseguenza, sul vino e poi l'aceto.

Tendenzialmente ci possono essere tre livelli di maturazione in base alla dimensione del contenitore all'interno del quale avviene questo fenomeno:

- Barrique da 220 L ricavate dagli esausti dell'industria enologica in quanto un barrique nuovo rilascerebbe troppe molecole e in concentrazioni troppo elevate dando una connotazione troppo forte di legno che nell'ABM risulterebbe un aspetto negativo.
- Botte da 50 hL o tina da 500 hL che si possono utilizzare nuove e per poi essere riutilizzate anche per 30 anni con la conseguenza che però, nel tempo, cedono sempre meno.

Oltre a queste variabili è necessario considerare le tipologie di materie prime utilizzate nella produzione di ABM e tutti quei composti volatili che si vengono a generare in seguito alla reazione di Maillard⁴⁸, comportando quindi ad una leggera modificazione sensoriale tra lotti diversi di ABM a parità di ricetta.

Abbiamo pensato di provare a creare uno standard di molecole volatili che danno il sentore legnoso analizzando una soluzione di tannini liquidi a diverse diluizioni:

- 1:10, quindi 100 μL di campione diluito in 900 μL di acqua;
- 1:5, quindi 200 μL di campione diluito in 800 μL di acqua;
- 1:2, quindi 500 μL di campione diluito in 500 μL di acqua.

Quella utilizzata è una soluzione di tannini ellagici liquidi estratti da legno di quercia con stagionatura superiore a due anni; è un aroma che può essere usato solo nella produzione di vino per far sì che assuma sentori legnosi, ma non in quella di balsamico.

Quindi una volta iniettato a varie concentrazioni, dalle immagini possiamo notare che per ottenere il risultato migliore è necessario diluire il campione 1:5, in quanto nel cromatogramma del campione diluito 1:10 si vedono meno molecole e in quello del campione diluito 1:2 il cromatogramma non risulta pulito e quindi probabilmente il campione risulta troppo concentrato (Fig. 52).

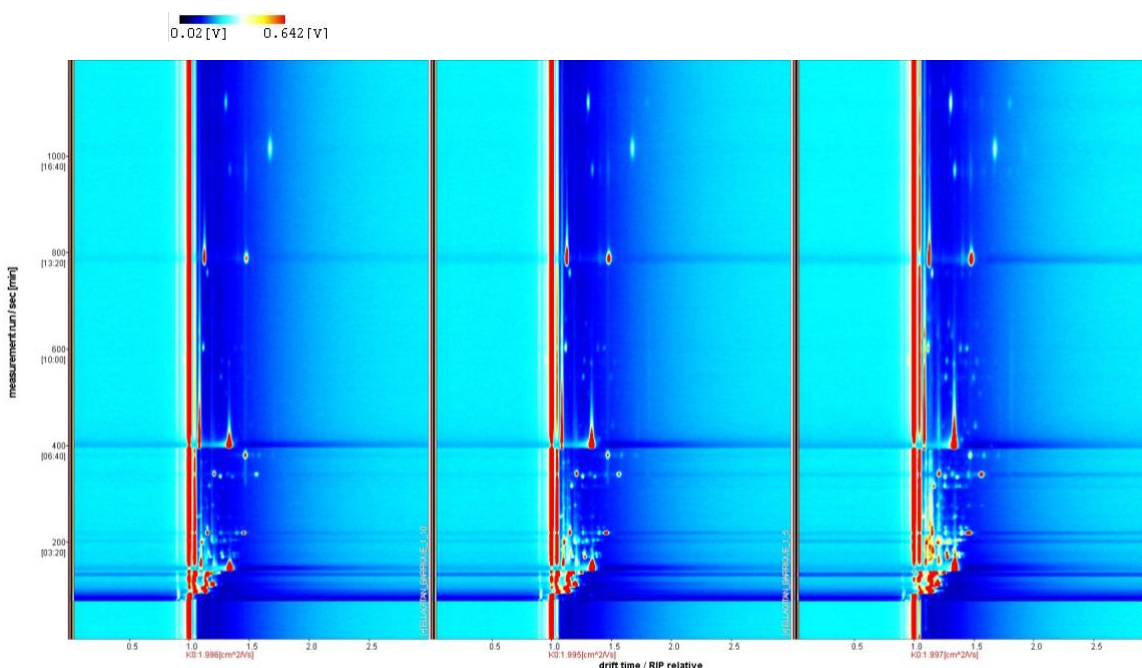


Figura 52: Cromatogrammi ottenuti, da sinistra verso destra, diluendo la soluzione di tannini 1:10, poi 1:5 e infine 1:2.

Focalizzandoci sul cromatogramma migliore, quello che possiamo notare è la presenza di molecole che sono già state individuate nell'Aceto Balsamico di Modena IGP come il 5-metilfurfurale, dove però in questo caso si vede molto bene anche il dimero (Fig.53), benzaldeide, furfurale, 2-pentanone e diacetile (vedi capitolo 4.1.3 e 1.1.7).

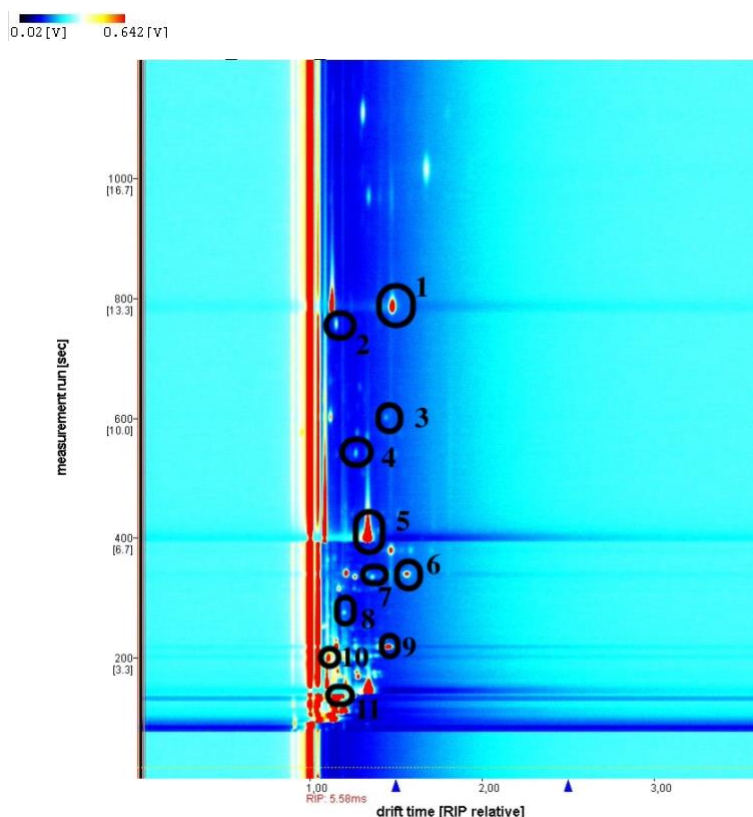


Figura 53: Cromatogramma ottenuto diluendo 200 μL di soluzione di tannini liquidi in 800 μL di acqua con le seguenti molecole volatili: 5-metilfurfurale dimero (spot 1), benzaldeide (spot 2), 2-acetilfurano (spot 3), 2-eptanone (spot 4), furfurale (spot 5), etilbutirrato (spot 6), 2,3-butanediolo (spot 7), etil 2-metilpropanoato (spot 8), propionato di etile (spot 9), 2-pentanone (spot 10) e diacetile (spot 11).

Le molecole invece che prima erano sconosciute e la cui presenza è stata rilevata nel campione di tannini liquidi sono:

- **Etilbutirrato**, la cui presenza in realtà era stata riscontrata anche nei campioni di mosti (vedi cap. 4.4.3), è caratterizzato da un odore simile al kiwi e all'ananas.⁵⁹
- **Etil 2-metilpropanoato**, o etil isobutirrato, (Fig.54) è un estere che si forma dalla reazione tra l'etanolo e l'acido isobutirrico; presenta un odore fruttato gradevole e dolce che ricorda la ciliegia o il lampone e la sua presenza è stata confermata nell'aceto di Jerez.⁶⁰

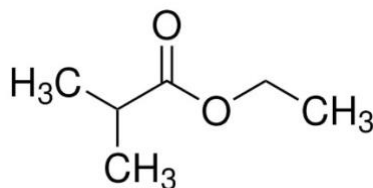


Figura 54: Struttura dell'etil 2-metilpropanoato.⁵²

- **2-eptanone** (Fig.55) è un chetone caratterizzato da un odore fruttato simile al cocco, ma se presente in alte concentrazioni l'odore può acquisire sfumature più secche e legnose. La presenza di tale molecola nel balsamico è stata confermata da Ríos-Reina R. et al..⁶²

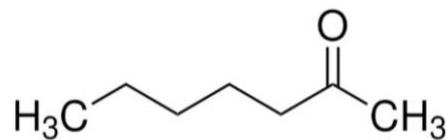


Figura 55: Struttura del 2-eptanone.⁵²

- **Propionato di etile** è un estere prodotto durante la reazione tra l'etanolo e l'acido propionico; presenta un aroma fruttato dolce simile alla mela e la pera ed è stata confermata la sua presenza nell'aceto di Jerez riserva dove in questo caso però presenta un odore sintetico, rancido, di plastica (Fig. 56).⁶³

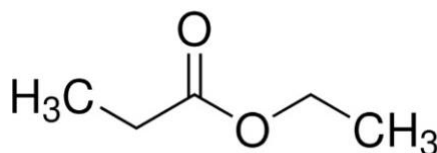


Figura 56: Struttura del propionato di etile.⁵²

- **2,3-butanediolo** è un alcol con due gruppi ossidrilici presenti su due atomi di carbonio adiacenti sulla catena ed è un prodotto secondario della fermentazione alcolica; la sua presenza è stata dimostrata nell'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena DOP.⁶⁴ Presenta un profilo aromatico relativamente neutro con un accenno di sapore che potrebbe essere descritto come leggermente fruttato e legnoso.

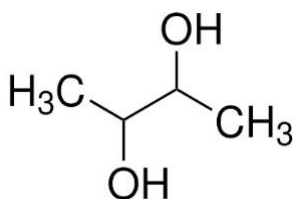


Figura 57: Struttura del 2,3-butanediolo.⁵²

Le molecole che saranno quindi utilizzate per confrontare i cromatogrammi delle seguenti analisi saranno quindi 5-metilfurfurale, benzaldeide, 2-eptanone, furfurale, etilbutirrato, 2,3-butanediolo, etil 2-metilpropanoato, propionato di etile, 2-pentanone e diacetile, a cui si aggiungono

- **dimetilsolfuro**, caratterizzato nei mosti (vedi capitolo 4.4.3), in quanto da letteratura è indice di vino invecchiato;⁵³
- **acetoina**, **2-etilfurano** e **2-acetilfurano** caratterizzate in campioni di aceto balsamico (vedi capitolo 4.1.3) il quale presentano rispettivamente note di burro e mandorle, sentori di caramello e nocchie tostate e infine sentori affumicati.

Per poter restringere il campo delle molecole presenti in aceti invecchiati che potessero indicare il sentore legnoso, abbiamo analizzato aceto di vino bianco e rosso invecchiato in barrique e aceto di vino bianco e rosso prodotto in tina d'acciaio in modo da confrontare i risultati e visualizzarne le differenze. In questo caso quello che andiamo ad ottenere, come si vede nell'immagine 58, è una maggior presenza di 2-etilfurano, 2-pentanone e 2,3-butanediolo rispetto all'aceto di vino prodotto in tina e la presenza di etil 2-metilpropanoato e propionato di etile nell'aceto maturato in barrique assenti invece nell'aceto prodotto in tina.

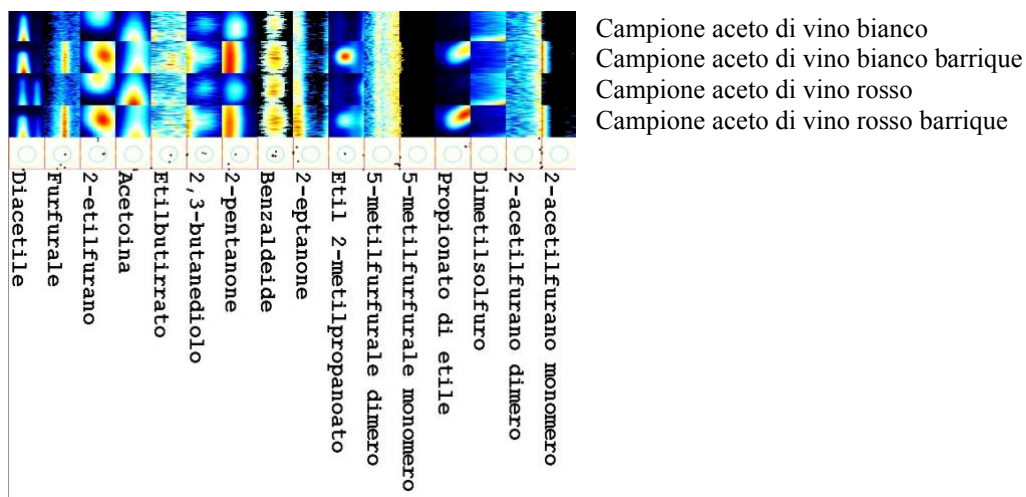


Figura 58: Confronto tra i cromatogrammi, partendo dall'alto, dei campioni di aceto di vino bianco prodotto e conservato in tina d'acciaio, aceto di vino bianco prodotto e conservato in barrique, aceto di vino rosso prodotto e conservato in tina d'acciaio, aceto di vino rosso prodotto e conservato in barrique.

Per poter valutare se i composti volatili considerati vengono prodotti durante fermentazione batterica o vengono rilasciati dal legno, abbiamo provato ad iniettare tre campioni di acqua contenuti in tre botti differenti in modo tale da scongiurare la presenza di batteri e che quindi le molecole presenti vengano rilasciate solo dal legno.

Quello che abbiamo ottenuto dall'analisi strumentale, sono tutta una serie di molecole derivanti probabilmente dell'aceto di vino presente in precedenza, come ad esempio etil 2-metilpropanoato e 2-pentanone; possiamo osservare però, soprattutto nei cromatogrammi dei campioni d'acqua prelevati dalle tine 162 e 169 una maggior concentrazione di etilbutirrato e propionato di etile (Fig. 59).

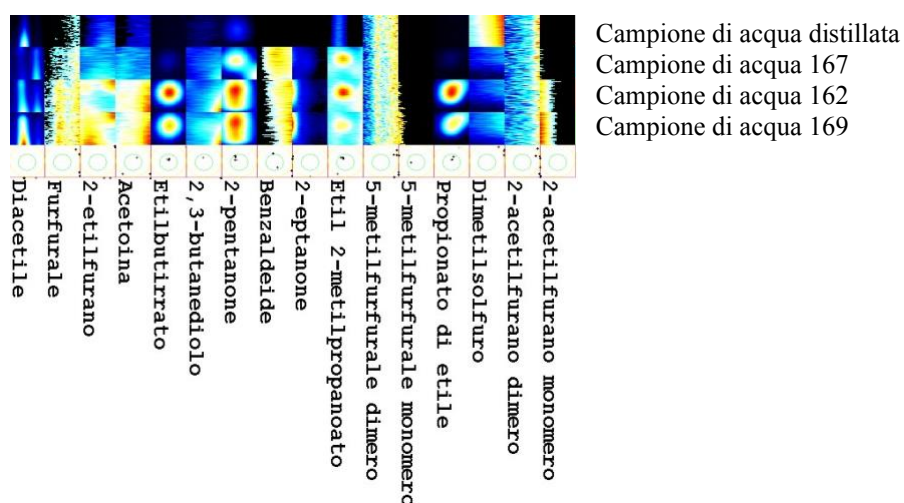


Figura 59: Confronto dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi, partendo dall'alto, di acqua distillata, acqua prelevata dalla tina 167 che conteneva precedentemente aceto di vino bianco, acqua prelevata dalla tina 162 che conteneva precedentemente aceto di vino rosso e acqua dalla tina 169 che conteneva precedentemente aceto di vino bianco.

Dopodichè abbiamo analizzato due tipologie di ABM il più simile possibile a livello di ricetta ma con periodi di maturazione differenti: uno di dodici mesi e un altro di 36 mesi entrambi in barrique di rovere. Questo è stato fatto per vedere se la maturazione prolungata in barrique fa sì che si vadano a produrre delle molecole volatili differenti e/o maggiormente o minormente concentrate, cercando sempre di capire quali molecole vengano rilasciate dalla barrique in modo da poter distinguere gli aceti invecchiati.

Sempre per poter escludere che la presenza di queste molecole volatili sia data dall'aggiunta di caramello, abbiamo analizzato anche un campione di ABM invecchiato dodici mesi ma senza l'aggiunta di caramello (Fig.60).

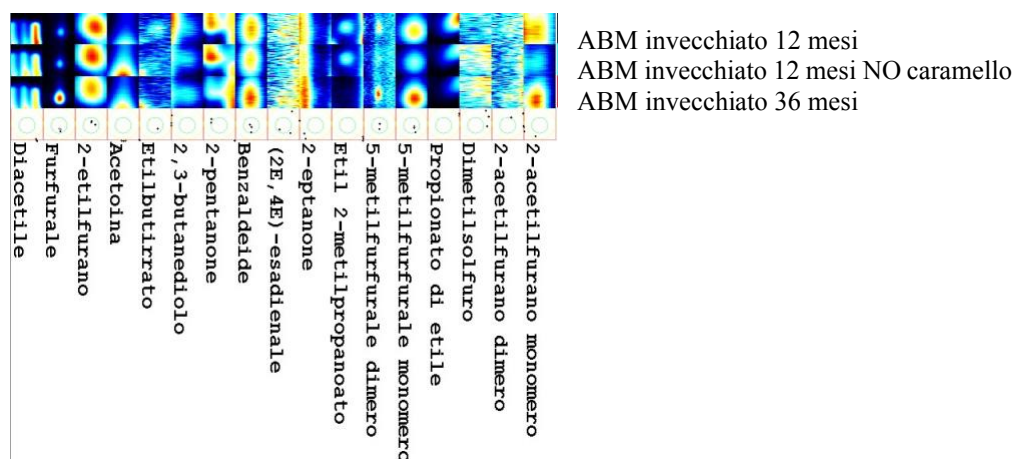


Figura 60: Confronto tra molecole volatili dei cromatogrammi dei campioni di ABM invecchiato 12 mesi, ABM invecchiato 12 mesi senza caramello e ABM invecchiato 36 mesi.

Quello che possiamo osservare nell'immagine 60 è che nel campione invecchiato maggiormente vi è una maggiore concentrazione di furfurale, 5-metilfurfurale e dimetilsolfuro rispetto ai campioni invecchiati 12 mesi; risulta invece assente l'etil 2-metilpropanoato presente invece negli altri due campioni. Vedendo questa immagine si può dedurre che non vi è una vera e propria molecola volatile indice dell'invecchiamento dell'ABM, ma si osserva un aumento di concentrazione di un insieme di molecole i cui odori ricordano quelli del legno e della barrique.

Considerando tutte le precedenti analisi abbiamo provato a confrontare i cromatogrammi della soluzione di tannini liquidi, dei tre campioni di acqua contenuta nelle botti e degli ABM invecchiati 12 mesi e 36 mesi ottenendo la seguente immagine 61.

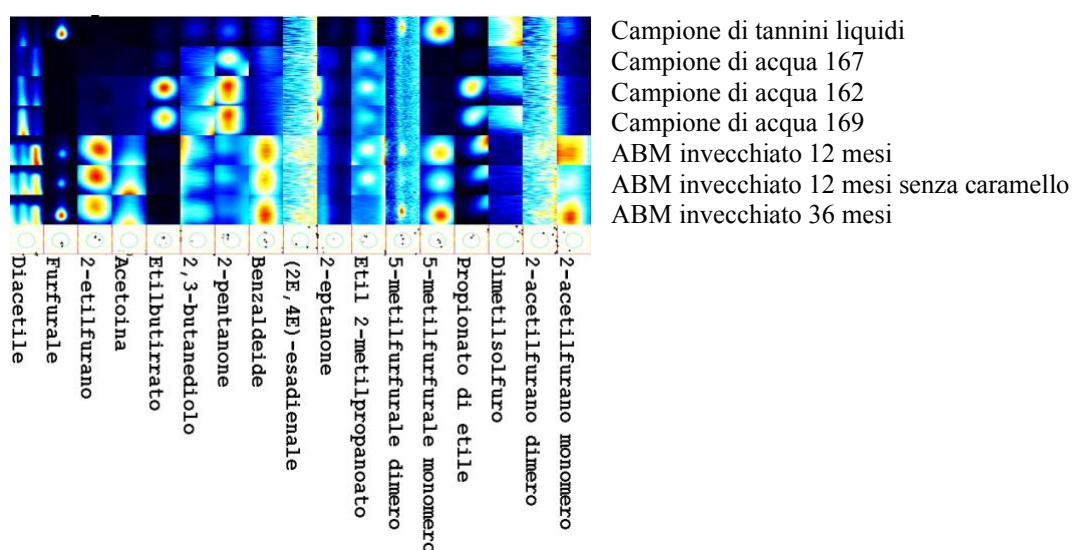


Figura 61: Confronto tra molecole volatili dei cromatogrammi, partendo dall'alto, dei campioni di tannini liquidi, dei tre campioni di acqua prelevata dalle botti e infine dei campioni di ABM invecchiato 12 mesi, 12 mesi senza caramello e 36 mesi.

Analizzando l'immagine 61 di confronto possiamo confermare la presenza di furfurale e 5-metilfurfurale nel campione di tannini liquidi e nell'ABM, assenti però nei campioni di acqua e quindi, probabilmente, non sono molecole rilasciate dal legno; possiamo inoltre notare la presenza di 2-etilfurano solo nei campioni di ABM.

Possiamo osservare però una componente maggiore di 2-acetilfurano e benzaldeide negli ABM, la cui presenza è accentuata dall'aggiunta di caramello, rispetto ai campioni di tannini liquidi e acqua, il quale però ci fa pensare che neanche queste molecole volatili vengano rilasciate direttamente dal legno della botte.

Considerando infine le analisi di aceti invecchiati 2 mesi, 6 mesi, 12 mesi e 36 mesi, possiamo osservare un certo tipo di andamento nella concentrazione di molecole: vediamo un progressivo aumento corrispondente all'aumento della permanenza dell'Aceto Balsamico di Modena IGP in barrique di furfurale, 2-pentanone, benzaldeide, 5-metilfurfurale e 2-acetilfurano; curiosamente però vediamo invece un andamento opposto del 2-etilfurano dato probabilmente dal fatto che evapora rapidamente anche a temperatura ambiente (Fig. 62). Questo va a confermare quanto citato in precedenza descrivendo le caratteristiche delle molecole, in quanto la benzaldeide aumenta man mano che la lavorazione del prodotto avanza, il furfurale, 5-metilfurfurale e 2-acetilfurano sono i responsabili dell'odore di zucchero bruciato e del sentore legnoso.

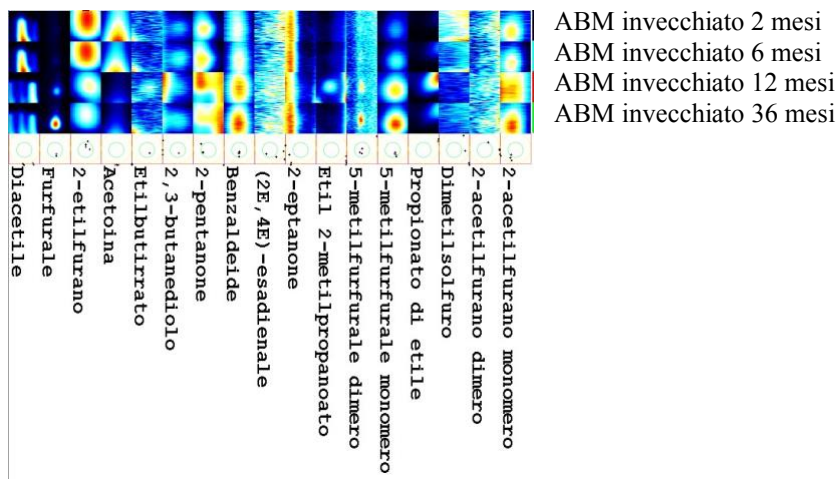


Figura 62: confronto tra cromatogrammi di ABM invecchiati 2, 6, 12 e 36 mesi.

In conclusione, dopo tali molteplici analisi utilizzando questa metodica, possiamo quindi sostenere l'ipotesi che le molecole utili a conferire un sentore legnoso al prodotto finale sono il furfurale, 5-metilfurfurale e 2-acetilfurano, il quale però, probabilmente è influenzato dal *fingerprint* di tutte le molecole volatili caratterizzante l'ABM considerato.

4.4 Valutazione delle condizioni analitiche per la determinazione qualitativa dei composti volatili (VOCs) in mosti d'uva

Per quanto concerne l'analisi strumentale dei mosti d'uva non vi è un precedente studio su cui basarsi, da cui partire per poter definire le condizioni con cui esaminare il mosto, di conseguenza sono state effettuate numerose prove in modo da poter ottenere delle condizioni di preparazione e di analisi del campione che ci permettano di raggiungere dei risultati utili nel discriminare la maggior parte delle molecole volatili presenti.

4.4.1 Messa a punto delle condizioni di preparazione del campione di mosto d'uva

Prendendo in considerazione ogni tipologia di mosto d'uva, quali mosto cotto, sia biologico che convenzionale, e mosto concentrato, sia biologico che convenzionale, in modo da ottenere delle condizioni di preparazione del campione che siano il più standardizzate possibili, i campioni sono stati analizzati a diverse diluizioni:

- 0,1 g di mosto con 900 μ l di acqua (1:10);
- 0,2 g di mosto con 800 μ l di acqua (1:5);
- 0,5 g di mosto con 500 μ l di acqua (1:2).

Focalizzandoci, ad esempio, sul mosto cotto biologico possiamo osservare un aumento degli spot proporzionale all'aumento di concentrazione di mosto iniettato. In particolare, nel cromatogramma del mosto diluito 1:2, da una prima analisi visiva sembrerebbe siano presenti alcune molecole rispetto alle precedenti diluizioni (Fig. 63).

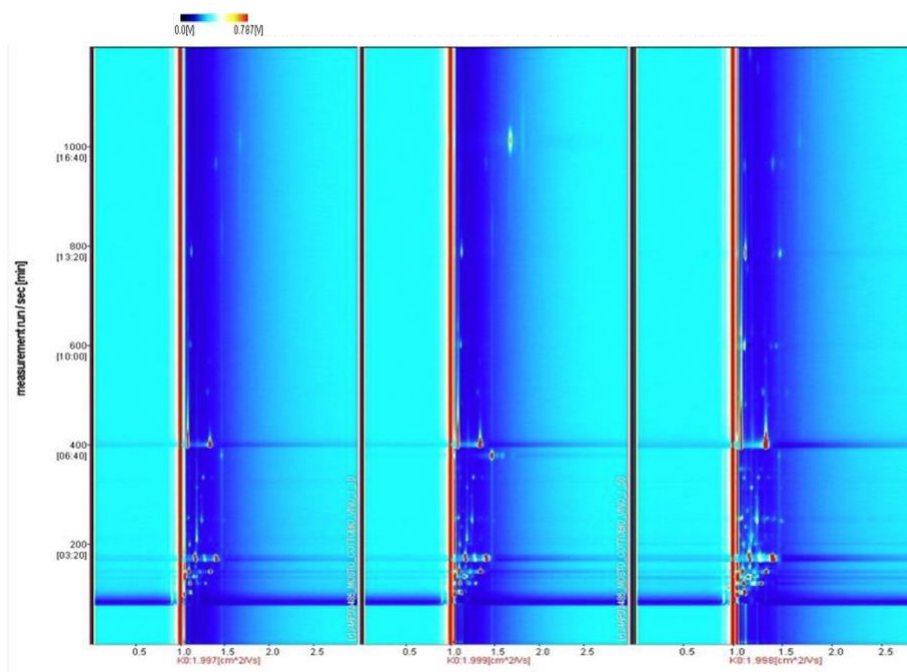


Figura 63: Confronto dei cromatogrammi, da sinistra, dello stesso campione diluito 1:10, 1:5 e 1:2.

Quindi abbiamo deciso di confrontare i singoli spot utilizzando come aree set le molecole precedentemente trovate negli ABM e aggiungendone alcune specifiche per i mosti come ad esempio il tiirano, il dimetilsolfuro (DMS), 1-propanolo e 3-pentanololo (vedi cap. 4.4.3). Alcune molecole come isoprenolo, 3-pentanololo, 3-metilbutanale, il dimero del 5-metilfurfurale e in parte 2-etilfurano sono presenti solo nella diluizione 1:2 (Fig. 64).

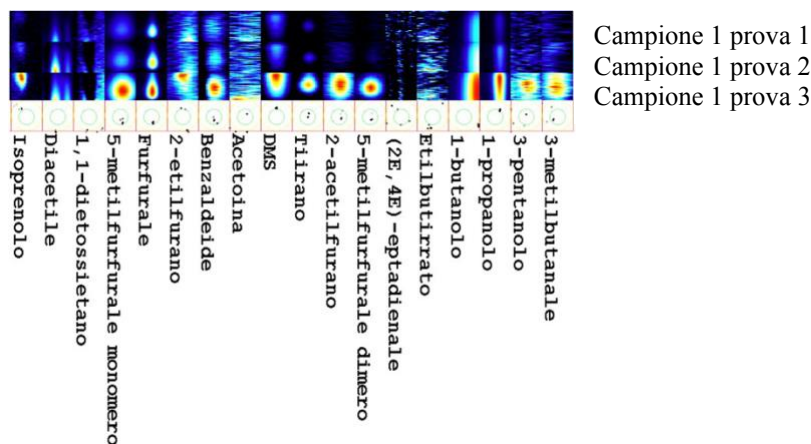


Figura 64: Confronto degli spot presenti nei cromatogrammi, partendo dall'alto, del campione 1 prova 1 (diluito 1:10), campione 1 prova 2 (diluito 1:5) e campione 1 prova 3 (diluito 1:2) in basso.

In seguito ad un'analisi approfondita di molteplici cromatogrammi ottenuti dall'analisi di tutte le tipologie di mosti, siamo arrivati alla conclusione che è necessario analizzare i mosti a due diluizioni:

- 1:5 (0,2 g di mosto e 800 μ l di acqua), utile per andare visualizzare le molecole volatili maggiormente visibili e per ottenere un cromatogramma "più pulito", dato dall'assenza di spot troppo concentrati che coprirebbero le molecole con tempi di ritenzione maggiori rendendole invisibili;
- 1:2 (0,5 g di mosto e 500 μ l di acqua) in modo da poter visualizzare anche le molecole volatili meno concentrate.

4.4.2 Ottimizzazione del metodo di analisi del mosto d'uva: tempistiche e temperature di analisi

Prendendo in considerazione come esempio il campione di mosto cotto biologico citato nel cap. 4.4.1, abbiamo variato le temperature e tempistiche di permanenza nel fornetto del campione nell'autocampionatore.

In questo caso, sono state effettuate numerose analisi dello stesso campione diluito 1:2 inizialmente variando solo il tempo di permanenza nel fornetto dell'autocampionatore HTA; abbiamo quindi provato a scaldare i campioni per 30, 35 e 40 minuti alla stessa temperatura delle condizioni di analisi dell'aceto balsamico, ovvero 50°C.

Dall'immagine 65 di confronto possiamo dedurre che il cromatogramma migliore si ottiene riscaldando il campione per 35 minuti; infatti possiamo vedere una netta diminuzione della presenza di molecole volatili riscaldando il campione per 30 e 40 minuti, soprattutto per le molecole con tempi di ritenzione maggiori.

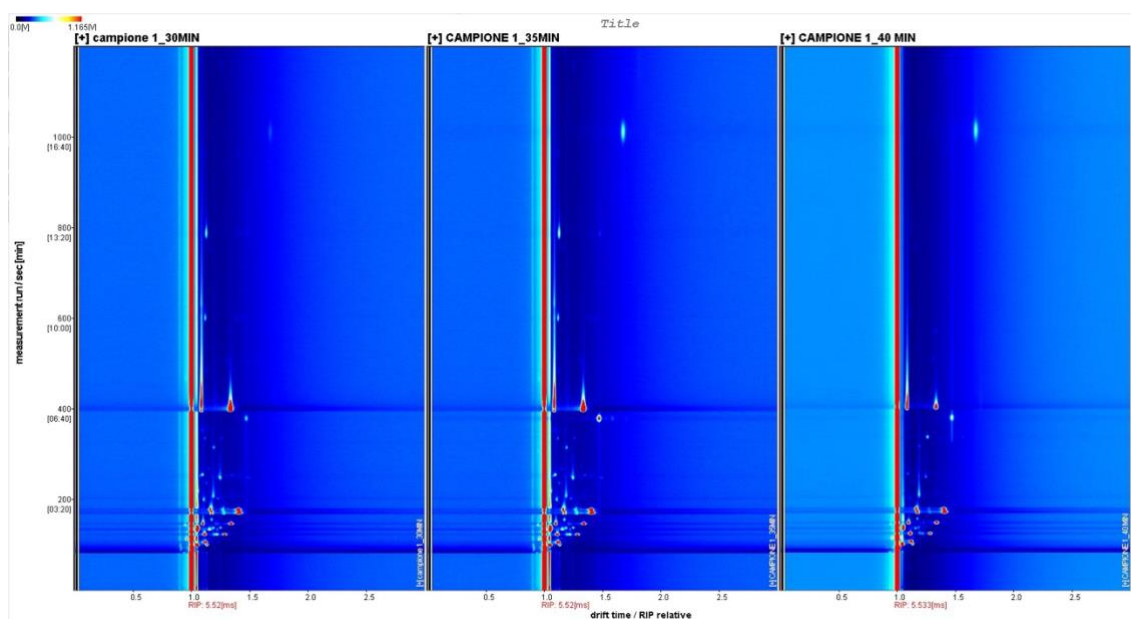


Figura 65: Confronto tra i cromatogrammi, da sinistra, del campione riscaldato per 30 minuti, 35 minuti e a destra 40 minuti.

Una volta definite le tempistiche, abbiamo provato a variare anche la temperatura andando a

- non riscaldare il campione e quindi mantenerlo a temperatura ambiente;
- scaldare il campione per 35 minuti a 50°C;
- scaldare il campione per 35 minuti a 60°C.

Quello che possiamo dedurre dal confronto dei tre cromatogrammi (Fig. 66) è la necessità di dover scaldare il campione perché nel cromatogramma del campione a temperatura ambiente mancano alcune molecole volatili presenti invece negli altri due risultati.

Nel cromatogramma del campione riscaldato a 50°C sono più visibili le molecole con un tempo di ritenzione alto rispetto al campione riscaldato a 60°C, ma quest'ultimo però presenta una separazione maggiore delle molecole con tempi di ritenzione minore, visibili in basso nell'immagine 66.

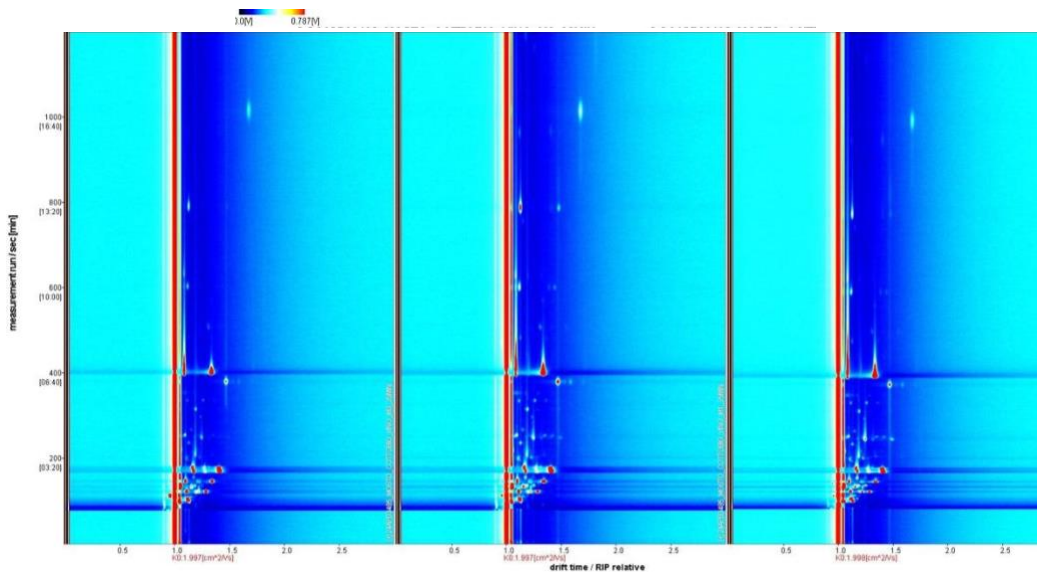


Figura 66: Confronto dei cromatogrammi di mosti: a sinistra ottenuto dal campione non riscaldato, al centro scaldato a 50°C e a destra 60°C.

Andando ad osservare nel particolare i risultati ottenuti valutando i singoli spot corrispondenti alle molecole volatili presenti, possiamo confermare la precedente ipotesi (Fig. 67) in quanto nel cromatogramma ottenuto scaldando il campione a 50° abbiamo una maggior concentrazione di 2-acetilfurano, 5-metilfurfurale sia sottoforma di monomero che dimero, 1,1-dietossietano e benzaldeide. Inoltre, sempre nell'immagine 67 possiamo anche notare una maggior concentrazione di tiirano, 1-propanolo e isoprenolo nel campione di mosto scaldato a 60°C.

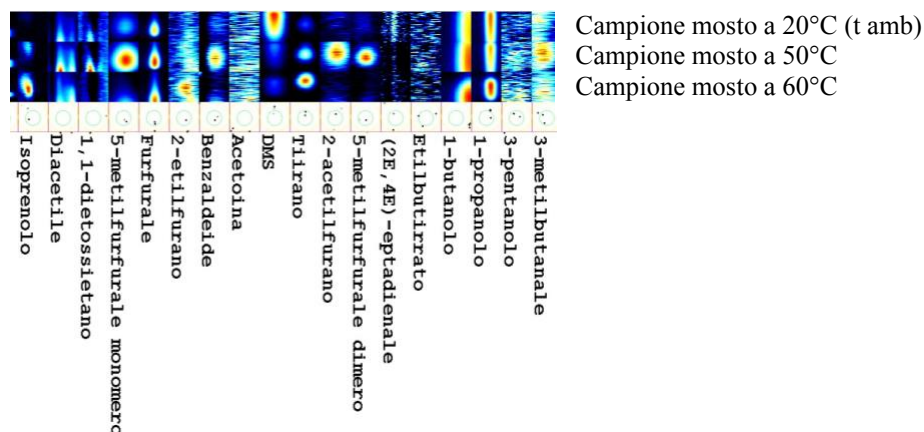


Figura 67: Confronto degli spot dei cromatogrammi dei campioni, dall'alto, non scaldati, scaldati a 50°C e a 60°C per 35 minuti.

Date le precedenti considerazioni abbiamo quindi provato a scaldare il campione a 55°C ottenendo così la temperatura ottimale in quanto, da come si può osservare nell'immagine 68, abbiamo un netto miglioramento nella presenza di molecole volatili ottenendo così un cromatogramma il più rappresentativo possibile del campione in esame.

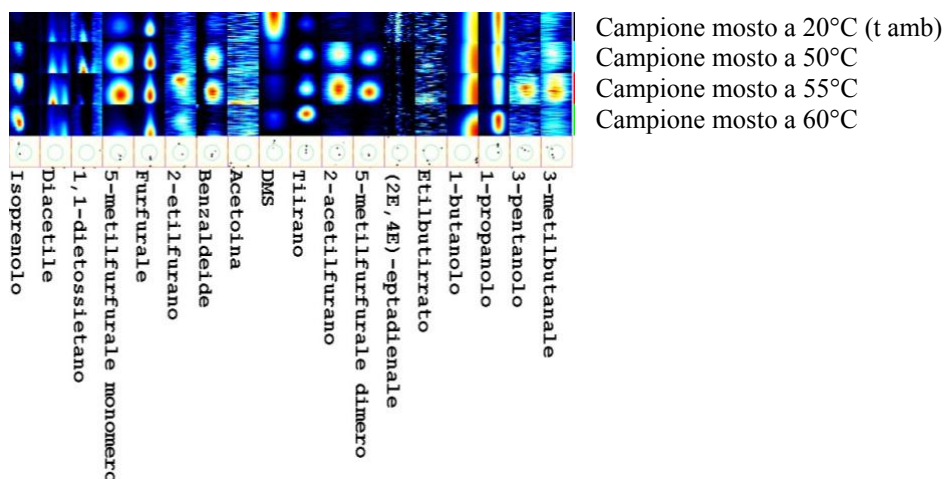


Figura 68: Confronto degli spot dei cromatogrammi dei campioni, partendo dall'alto, non scaldati, scaldati a 50°C, a 55°C e a 60°C per 35 minuti.

In conclusione, valutando i cromatogrammi ottenuti, le tempistiche e temperature secondo cui siamo in grado di ottenere un risultato che sia il più rappresentativo possibile del campione di mosto d'uva è scaldandolo per 35 minuti a 55°C nel fornello dell'autocampionatore HTA.

4.4.3 Composti volatili caratterizzati nei mosti

Basandoci sulle molecole trovate nei campioni di ABM, abbiamo analizzato i cromatogrammi di mosti d'uva ottenuti in modo d'andare a caratterizzare anche i nuovi spot delle molecole volatili presenti dei mosti.

Dopo aver selezionato manualmente e nominato tutte le nuove aree set con il software VOCal delle quattro tipologie di mosti, sempre per cercare di standardizzare il più possibile il metodo, possiamo indicare la presenza di nuove molecole rispetto a quelle presenti negli ABM quali tiirano, dimetilsolfuro, 3-pentanol, 1-propanolo, (2E, 4E)-eptadienale e 3-metilbutanale distribuite in maniera più o meno uniforme nei cromatogrammi dei diversi campioni (Fig. 69), la cui presenza nei vini e mosti è attestata da alcune referenze bibliografiche (tabella 9).

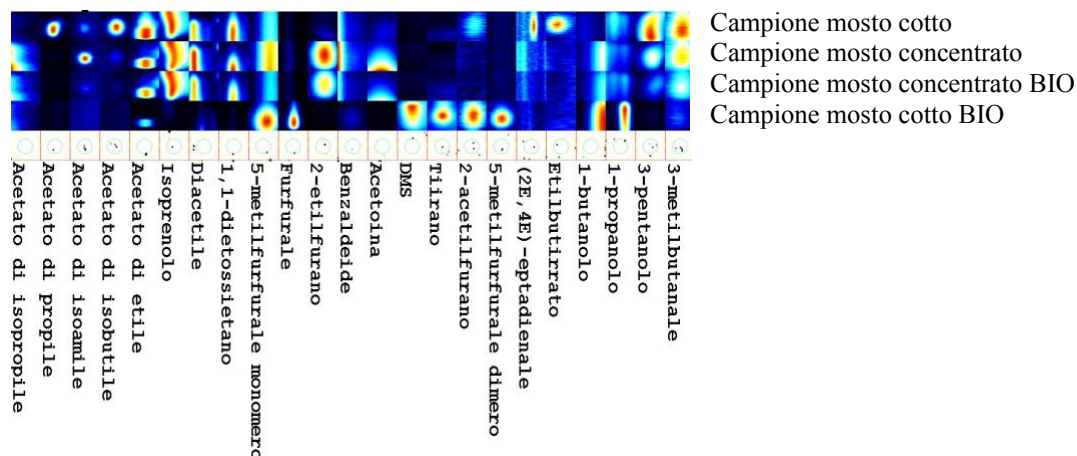


Figura 69: Confronto degli spot dei cromatogrammi delle quattro tipologie di mosti: partendo dall'alto abbiamo il campione di mosto cotto, poi concentrato, concentrato BIO e cotto BIO.

Composto volatile	Numero CAS	RI	Rt [sec]	Dt [a.u.]	Fonte
Tiirano	420-12-2	590.5	140.578	0.94747	-
Dimetilsolfuro	75-18-3	522.0	111.118	0.95909	53
3-pentanol	584-02-1	709.1	218.49	1.39991	54
1-propanolo	71-23-8	555.0	124.489	1.27634	55
(2E, 4E) -eptadienale	4313-03-5	1008.7	978.353	1.20064	56
3-metilbutanale	590-86-3	920.3	625.819	1.19677	57
Etilbutirrato	105-54-4	796.5	341.074	1.55486	58

Tabella 9: Composti volatili presenti nei campioni di mosti analizzati con i rispettivi indici di ritenzione (RI), tempi di ritenzione (Rt), tempi di volo (Dt) e referenze che attestano la loro presenza nei vini e mosti.

Considerando ogni singola molecola, il contributo che porta alle caratteristiche sensoriali dei mosti sono le seguenti:

- il **tiirano**, conosciuto anche come solfuro di etilene, è un terpene che può essere ritrovato in alcuni oli essenziali e resine.⁵² Proprio per questo motivo presenta un profilo aromatico che ricorda note balsamiche o speziate; solitamente la sua presenza nei vini è minima e non viene considerato un componente significativo del profilo aromatico ma può comunque contribuire a sfumature complesse.



Figura 70: Struttura del tiirano.⁵²

- il **dimetilsolfuro** (DMS) è un composto aromatico contenente zolfo a basso peso molecolare che si accumula durante l'invecchiamento in quanto ne è stata accertata la presenza nei vini invecchiati Amarone; la sua presenza è spesso associata a note olfattive di asparagi, cavolfiori, mais in scatola, olive nere e tartufo.⁵³

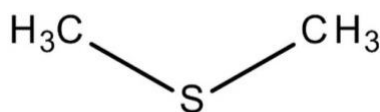


Figura 71: Struttura del dimetilsolfuro.⁵²

- il **3-pentanol** è un alcol a catena lineare ed è presente nei mosti d'uva come prodotto di fermentazione; la sua influenza sul profilo aromatico dipende dalla sua concentrazione e presenta un odore fruttato, verde, che ricorda l'odore di mela verde o di verdure fresche.⁵⁴

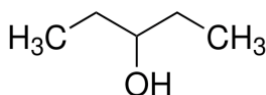


Figura 72: Struttura del 3-pentanol.⁵²

- **l'1-propanolo** è un alcol primario prodotto durante la fermentazione alcolica presente nel mosto d'uva; a basse concentrazioni è generalmente ben tollerato e non influisce sul profilo aromatico del vino, ma se presente ad alte concentrazioni può contribuire ad un aroma alcolico non desiderabile e quindi sgradevole.⁵⁵

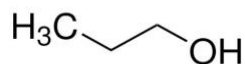


Figura 73: Struttura dell'1-propanolo.⁵²

- **(2E, 4E)-eptadienale** è un'aldeide insatura con due doppi legami in configurazione *trans* e può conferire sentori fruttati e floreali ai mosti d'uva.⁵⁶

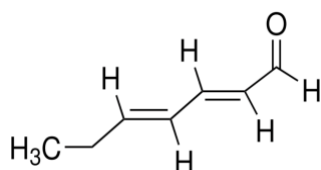


Figura 74: Struttura dell'(2E, 4E)-eptadienale.⁵²

- **3-metilbutanale** è un'aldeide presente nei mosti; se presente nel vino conferisce un odore fruttato simile al melone o al cetriolo, infatti la gestione della sua concentrazione nella vinificazione è cruciale per mantenere un profilo aromatico equilibrato e gradevole del vino.⁵⁷

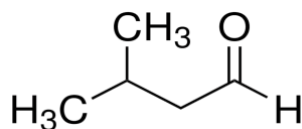


Figura 75: Struttura del 3-metilbutanale.⁵²

- **Etilbutirrato** è un estere ottenuto dall'acido butirrico e dall'etanolo caratterizzato da un odore simile a quello del kiwi e dell'ananas.⁵⁹

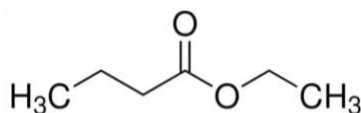


Figura 76: Struttura dell'etilbutirrato.⁵²

4.5 Eterogeneità del profilo volatile dei mosti d'uva

Analizzando molteplici campioni delle quattro tipologie di mosti d'uva ci si è accorti che ogni campione, nonostante la tipologia e l'azienda vinicola da cui derivasse fosse la stessa, presenta un profilo volatile caratteristico.

Ad esempio, confrontando mosti di diverse tipologie, quindi sia cotti che concentrati, ma prodotti nella stessa azienda quello che possiamo osservare è un diverso “*fingerprint*” per ogni campione, dove in alcuni casi sono presenti in minor o maggior concentrazione, o addirittura assenti, le molecole volatili; un esempio è il 3-pentanololo presente maggiormente nel mosto concentrato e leggermente nel concentrato biologico, ma assente nel cotto e cotto biologico (Fig. 77).

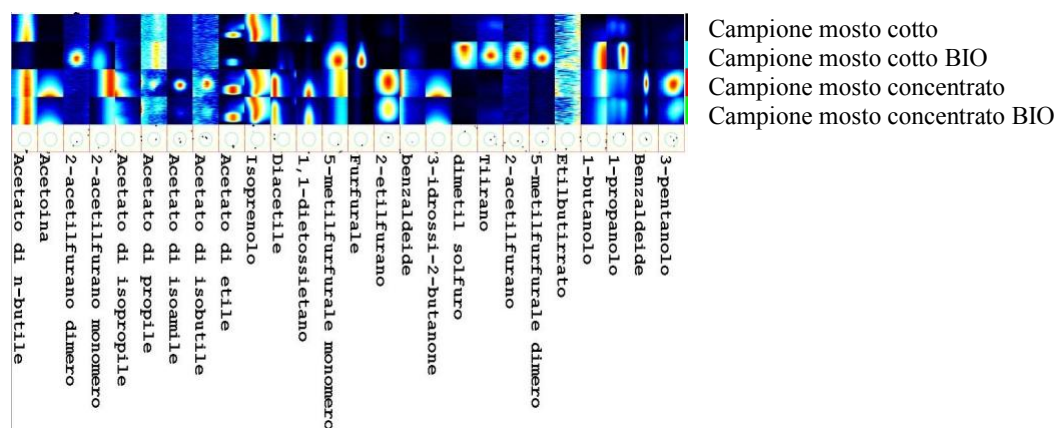


Figura 77: Confronto di molecole volatili di campioni di mosto cotto, cotto biologico, concentrato e concentrato biologico prodotti nella stessa azienda.

A questo punto, per valutare se fosse la tipologia di mosto a differenziarli e quindi il processo di produzione, abbiamo analizzato vari di campioni di mosti cotti prodotti in diverse aziende e quindi con tipologie di uve e terreno di coltivazione differenti. Quello che possiamo osservare, anche in questo caso, è un'eterogeneità di molecole volatili (Fig.78).

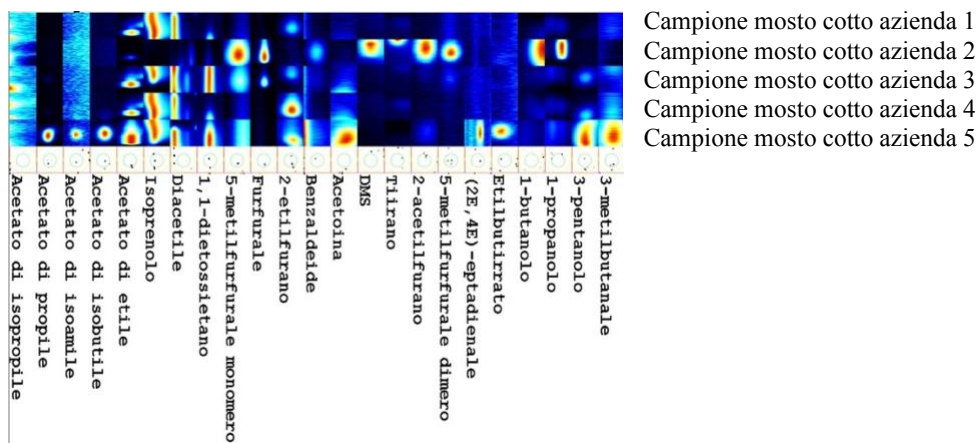


Figura 78: Confronto tra campioni di mosto cotto prodotti in aziende diverse.

Dopodichè siamo andati a confrontare cromatogrammi di campioni di mosti cotti, quindi della stessa tipologia, prodotti nella stessa azienda e quindi utilizzando la stessa tipologia di uve e processo produttivo; quello che possiamo notare nell'immagine 79 è sempre una diversa presenza e concentrazione di molecole volatili nei due campioni prodotti, approssimativamente, nello stesso periodo di tempo.

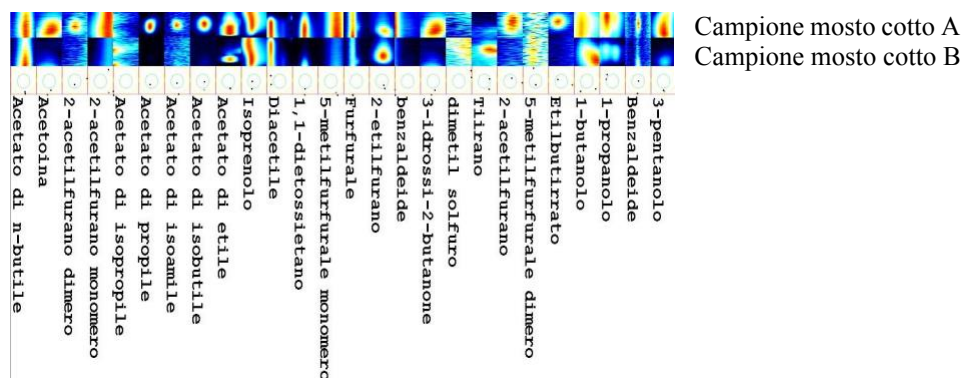


Figura 79: Confronto tra campioni di mosto cotto prodotti nella stessa azienda.

Da questa prima analisi dei mosti con tale strumento, quello che possiamo ipotizzare è la presenza di una variabilità aromatica in ogni lotto di mosto d'uva prodotto anche se deriva dalla stessa azienda. Questo probabilmente può essere dato dall'utilizzo di diverse tipologie di uve e in diverse concentrazioni, coltivate forse in diversi territori, che portano alla presenza di diverse molecole volatili nel prodotto finito comportando ad una variabilità aromatica e sensoriale.

4.6 Comparazione dei cromatogrammi di Aceti Balsamici di Modena I.G.P. con i relativi mosti

Una volta ottenuti i cromatogrammi degli Aceti Balsamici di Modena IGP e dei mosti d'uva, abbiamo provato a confrontarli in modo da capire quali molecole volatili presenti negli ABM derivassero dai mosti e soprattutto se vi fosse una correlazione tra i due.

Quello che abbiamo notato, durante la nostra ricerca, è che presentano delle molecole volatili molto simili tra di loro.

In particolare, ad esempio, l'Aceto Balsamico di Modena IGP BIO 24AP04289 (campione A2) deriva dalla miscelazione e maturazione di aceto di vino, aceto invecchiato di almeno 10 anni e mosto cotto BIO 24AP01495.

Dall'immagine 80 che mette a confronto il cromatogramma del balsamico con quello del mosto, possiamo notare molte somiglianze a livello di presenza e/o assenza di composti volatili.

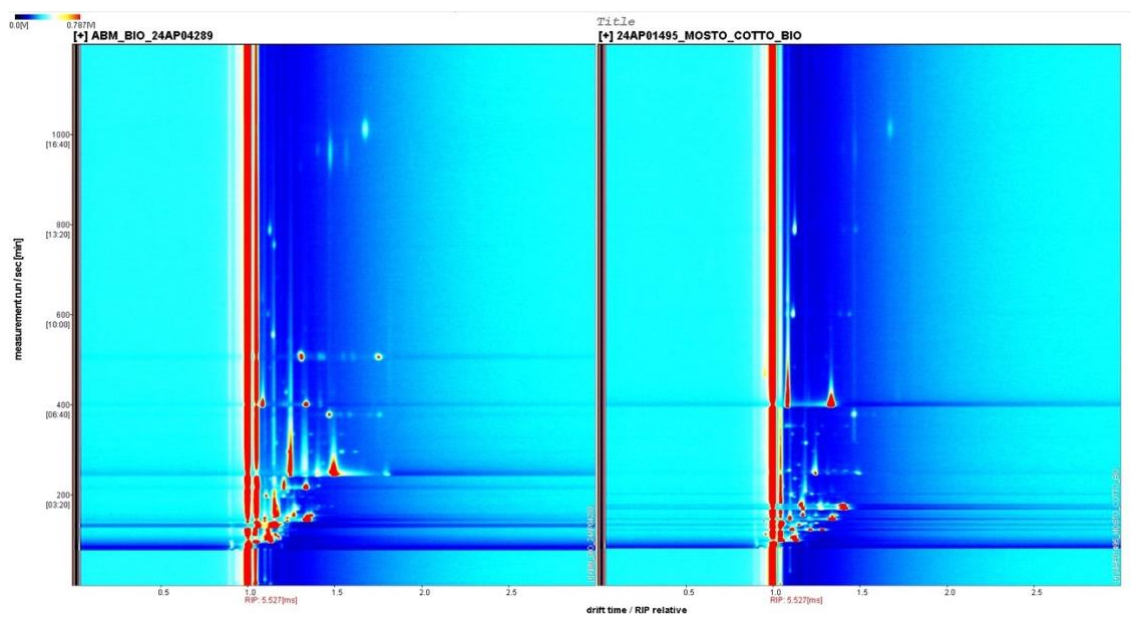


Figura 80: Confronto, da sinistra, tra il cromatogramma di un Aceto Balsamico di Modena IGP BIO e quello del mosto cotto BIO utilizzato per la sua produzione.

Per esempio, nel caso del mosto possiamo vedere molecole volatili molto più concentrate rispetto all'ABM, molecole come 5-metilfurfurale, dove nel caso del mosto è presente anche il dimero, e furfurale, dati probabilmente dalla cottura del mosto ad alte temperature (Fig. 81).

Possiamo inoltre notare che nell'aceto ci sono molte più molecole che danno un sentore fruttato, dolce e burroso, come diacetile, 2-etilfurano, acetoina, 2,3-butanediolo, 2-pentanone, acetato di isopropile, acetato di isoamile, acetato di isobutile, isoprenolo e 3-pentanololo; mentre invece nel mosto cotto sono presenti molte più molecole che danno un

sentore legnoso come appunto furfurale e 5-metilfurfurale, ma anche dimetilsolfuro e 2-acetilfurano. Come citato in precedenza l'1-propanolo è un alcol prodotto durante la fermentazione alcolica ed è corretta la sua assenza nel balsamico, in quanto la sua presenza porterebbe a dei difetti dando un aroma alcolico indesiderato (Fig. 81).

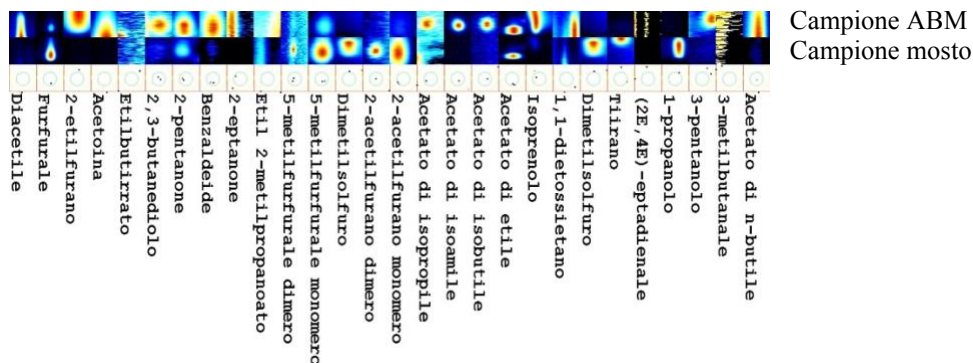


Figura 81: Confronto dei cromatogrammi di campione di ABM e il relativo mosto cotto BIO.

Per comprendere meglio da dove derivino le molecole volatili presenti nell'ABM, abbiamo analizzato e confrontato i due cromatogrammi nell'immagine 80 con il cromatogramma dell'aceto di vino BIO utilizzato nella produzione di questo ABM. Quello che possiamo notare è che le molecole volatili presenti nell'ABM e non presenti nel mosto, sono invece presenti nell'aceto di vino, di conseguenza è probabile che derivino da questa tipologia di materia prima. Le molecole in questione, considerando l'immagine 82, sono ad esempio il diacetile, 2-etilfurano, acetoina, 2,3-butanediolo, benzaldeide, acetato di isoamile, isoprenolo, 3-pentanol e acetato di n-butile.

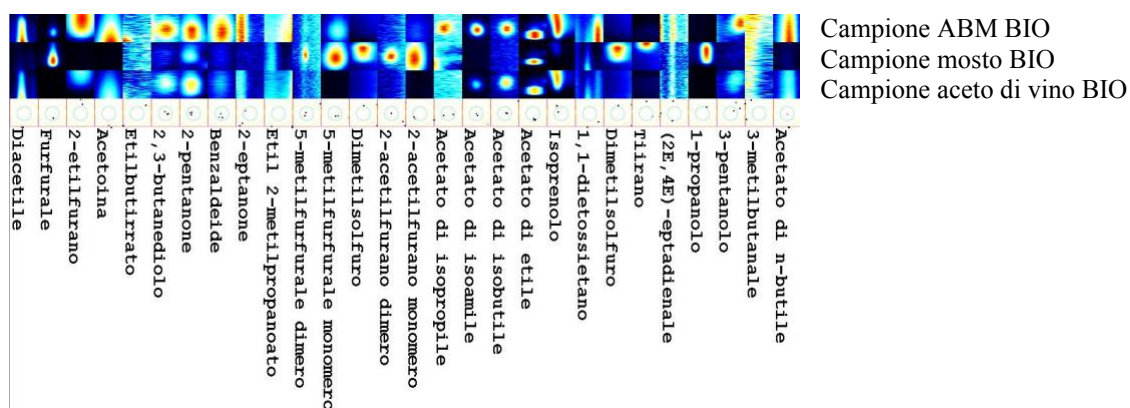


Figura 82: Confronto dei cromatogrammi di ABM, mosto e aceto di vino BIO focalizzandoci sulle molecole volatili.

In conclusione possiamo affermare che le molecole volatili presenti negli Aceti Balsamici di Modena IGP derivano principalmente dalle materie prime utilizzate quali mosti e aceto di vino con una modificazione nelle concentrazioni data probabilmente dalla fermentazione acetica e dalla maturazione.

Conclusioni

L'aceto Balsamico di Modena I.G.P. si distingue per la sua qualità e autenticità ed è frutto di una lavorazione che rispetta rigorosi standard produttivi definiti dal disciplinare di produzione; i mosti utilizzati derivano dalla spremitura di uve da vitigni selezionati quali Lambruschi, Sangiovese, Trebbiani, Albana, Ancellotta, Fortana e Montuni, e rappresentano l'ingrediente fondamentale, insieme all'aceto di vino e aceto invecchiato di almeno 10 anni, che conferisce a questo condimento il suo caratteristico profilo aromatico e gustativo.

Lo studio dell'Aceto Balsamico di Modena I.G.P. e dei relativi mosti d'uva utilizzando il HS-GC-IMS FlavourSpec® è utile per poter comprendere quali molecole volatili caratterizzano il balsamico potendo distinguere quali portano note positive e quali negative al prodotto finale in modo da attuare, poi, tutta una serie di procedure per scongiurare la presenza di difetti.

A tale scopo abbiamo organizzato dei panel test dove i giudici, aiutati dalla presenza di "campioni esempio" hanno valutato le caratteristiche sensoriali dei campioni di balsamici in esame; i risultati di queste sessioni di valutazione sono stati confrontati con i cromatogrammi ottenuti al HS-GC-IMS FlavourSpec® dimostrando che la percezione dell'aroma legno viene riconosciuta meglio dal panel rispetto all'intensità/aroma fruttato.

In seguito ad un'approfondita ricerca bibliografica e molteplici analisi al HS-GC-IMS FlavourSpec® siamo riusciti a discriminare alcune molecole volatili che conferiscono il sentore legnoso al prodotto finale, confrontando i campioni di Aceto Balsamico di Modena I.G.P. anche con una soluzione di tannini liquidi; le molecole volatili in questione sono il furfurale, 5-metilfurfurale e 2-acetilfurano anche se, probabilmente, la presenza e la percezione dell'aroma legno è influenzata dal *fingerprint* di tutte le molecole volatili presenti nell'Aceto Balsamico di Modena I.G.P..

Nel corso delle analisi si è scoperto che i mosti presentano un'eterogeneità di molecole volatili molto elevata e la presenza e/o assenza di tali molecole non segue un andamento vero e proprio, infatti sembrerebbe che nonostante i mosti vengano ottenuti utilizzando le stesse metodiche di produzione e nella stessa azienda, quindi probabilmente utilizzando gli stessi vitigni, risultano molto diversi tra di loro.

Quindi, una volta ottimizzate le condizioni di analisi sia per l'Aceto Balsamico di Modena I.G.P. che per i mosti, abbiamo identificato le molecole volatili per poi confrontare tali cromatogrammi e capire quali vengano ereditate dall'aceto di vino e quali dai mosti così da creare un profilo aromatico del balsamico che sia il più completo, oggettivo e veritiero possibile in modo da, successivamente, utilizzare tali dati per valutare la qualità del prodotto.

Ulteriori studi sono tuttavia necessari in quanto lo strumento, il HS-GC-IMS FlavourSpec®, rileva le molecole volatili in base all'affinità protonica in quanto, maggiore è l'affinità protonica verso lo ione reagente e maggiore sarà la sensibilità nella rilevazione; quindi verranno rilevati, partendo da molecole con affinità protonica maggiore, le ammine aromatiche come le piridine, ammine come le metilammine, chetoni come il 2-pentanone, esteri come l'acetato di metile, alcheni come l'1-esene, alcoli come il butanolo e le molecole aromatiche come il benzene.

L'unica classe di composti chimici che non è in grado di identificare sono gli alcani in quanto presentano un'affinità protonica minore dell'acqua, di conseguenza non possiamo rilevarne la presenza nei nostri campioni in esame.

Quindi, la conferma della natura delle molecole volatili identificate in questo lavoro di tesi attraverso il software VOCal potrà essere eventualmente effettuata mediante comparazione con uno standard (GC-FID) o attraverso un'analisi al GC-MS.

Bibliografia

1. https://www.senato.it/japp/bgt/showdoc/17/DDLPRES/0/991263/index.html?part=ddlpre_s_ddlpres1-articolato_articolato1-titolo_titolov
2. Román-Camacho JJ, García-García I, Santos-Dueñas IM, García-Martínez T, Mauricio JC. Ultime tendenze nella produzione di aceto industriale e ruolo dei batteri dell'acido acetico: classificazione, metabolismo e applicazioni - Una revisione completa. *Alimenti*. 2023 Oct 9;12(19):3705. doi: 10.3390/foods12193705.
3. Ho CW, Lazim AM, Fazry S, Zaki UKHH, Lim SJ. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chem*. 2017 Apr 15;221:1621-1630. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.128. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27979138.
4. Hailu Simon, S. Admassu, K. Jha, "Vinegar production technology-An overview", *Beverage Food World* 2: 29-32, 2012;
5. García-García, I., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L. (2009). Vinegar Engineering. In: Solieri, L., Giudici, P. (eds) *Vinegars of the World*. Springer, Milano. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0866-3_6
6. Qiu X, Zhang Y, Hong H. Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. *AMB Express*. 2021 Feb 17;11(1):29. doi: 10.1186/s13568-021-01189-6.
7. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 Nov;70(11):5607-5612. doi: 10.1099/ijsem.0.004332.
8. Trček J, Mira NP, Jarboe LR. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Aug;99(15):6215-29. doi: 10.1007/s00253-015-6762-3.
9. Dwivedi Mitesh, "Gluconobacter", *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*: 521-544, 2020;
10. Zamora Fernando, "Biochemistry of alcoholic fermentation", *Wine chemistry and biochemistry*, New York, Springer New York: 3-26, 2009;
11. Rosca I, Petrovici AR, Brebu M, Stoica I, Minea B, Marangoci N. An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. *Braz J Microbiol*. 2016 Oct-Dec;47(4):949-954. doi: 10.1016/j.bjm.2016.07.005.
12. C. Ubeda, R.M. Callejón, C. Hidalgo, M.J. Torija, A. Mas, A.M. Troncoso, M.L. Morales, Determination of major volatile compounds during the production of fruit vinegars by static headspace gas chromatography–mass spectrometry method, *Food Research International*, Volume 44, Issue 1, 2011, Pages 259-268, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.025>.
13. A. Del Signore, Chemometric analysis and volatile compounds of traditional balsamic vinegars from Modena, *Journal of Food Engineering*, Volume 50, Issue 2, 2001, Pages 77-90, ISSN 0260-8774, [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00195-3).
14. R. Rodríguez Madrera, A. Picinelli Lobo, J. J. Mangas Alonso, Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits, *Food Research International*, Volume 43, Issue 1, 2010, Pages 70-78, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.014>.
15. Corsini Lara et al., "Characterization by gas chromatography-olfactometry of the most odour-active compounds in Italian balsamic vinegars with geographical indication", *Food chemistry* 272: 702-708, 2019;
16. Durán-Guerrero Enrique et al., "Evaluation of volatile aldehydes as discriminating parameters in quality vinegars with protected European geographical indication", *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(12): 2395-2403, 2015;
17. Cirlini Martina et al., "HS-SPME/GC–MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and aging", *Food chemistry* 124(4): 1678-1683, 2011;

18. T. Quaglia, Aceti balsamici IGP: confronti analitici GC-IMS e sensoriali, Università degli Studi di Padova, 2022-2023.
19. Nanda K, Miyoshi N, Nakamura Y, Shimoji Y, Tamura Y, Nishikawa Y, Uenakai K, Kohno H, Tanaka T. Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2004 Mar;23(1):69-75. PMID: 15149153.
20. Terasaki M, Ito H, Kurokawa H, Tamura M, Okabe S, Matsui H, Hyodo I. Acetic acid is an oxidative stressor in gastric cancer cells. *J Clin Biochem Nutr.* 2018 Jul;63(1):36-41. doi: 10.3164/jcbtn.17-49.
21. Kurokawa H, Ito H, Matano D, Terasaki M, Matsui H. Acetic acid enhances the effect of photodynamic therapy in gastric cancer cells via the production of reactive oxygen species. *J Clin Biochem Nutr.* 2022 Nov;71(3):206-211. doi: 10.3164/jcbtn.22-34.
22. Elbarbry F, Moshirian N. The Modulation of Arachidonic Acid Metabolism and Blood Pressure-Lowering Effect of Honokiol in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules.* 2022 May 25;27(11):3396. doi: 10.3390/molecules27113396.
23. Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, Kitakoshi K, Nakai N, Tsukamoto Y, Sato Y. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *J Nutr.* 2001 Jul;131(7):1973-7. doi: 10.1093/jn/131.7.1973.
24. Qiu J, Ren C, Fan J, Li Z. Antioxidant activities of aged oat vinegar in vitro and in mouse serum and liver. *J Sci Food Agric.* 2010 Aug 30;90(11):1951-8. doi: 10.1002/jsfa.4040.
25. REGOLAMENTO (UE) N. 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011.
26. <https://acetaiasereni.com/it/conversation/il-mosto-cotto/>
27. Giudici P, Lemmetti F, Mazza S, Balsamic Vinegars, Springer Cham, 2015;
28. REGOLAMENTO (CE) n. 813/2000 del Consiglio del 17 aprile 2000, relativo alla registrazione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine nel quadro della procedura di cui all'articolo 17 del regolamento (CEE) n. 2081/92;
29. PROVVEDIMENTO 15 maggio 2000, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta "Aceto balsamico tradizionale di Modena";
30. REGOLAMENTO (CE) n. 583/2009 della Commissione del 3 luglio 2009, recante iscrizione di una denominazione nel registro delle denominazioni d'origine protette e delle indicazioni geografiche protette [Aceto Balsamico di Modena (IGP)];
31. PROVVEDIMENTO 13 aprile 2023, Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste, Modifica non minore del disciplinare di produzione della IGP «Aceto Balsamico di Modena»;
32. <https://www.ponti.com/>
33. Shuang GU, Jing Zhang, Jun Wang, Xiangyang Wang, Dongdong Du. Recent development of HS-GC-IMS technology in rapid and non-destructive detection of quality and contamination in agri-food products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 144, 2021, 116435, ISSN 0165-9936, doi: 10.1016/j.trac.2021.116435.
34. Cicolella A. Volatile Organic Compounds (VOC): definition, classification and properties. *Rev Mal Respir.* 2008 Feb;25(2):155-63. French. doi: 10.1016/s0761-8425(08)71513-4.
35. Wilson AD, Baietto M. Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors (Basel).* 2009;9(7):5099-148. doi: 10.3390/s90705099.

36. Wang S, Chen H, Sun B. Recent progress in food flavor analysis using gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS). *Food Chem.* 2020 Jun 15;315:126158. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126158.
37. Lu, Y., Zeng, L., Li, M. *et al.* Use of GC-IMS for detection of volatile organic compounds to identify mixed bacterial culture medium. *AMB Expr* 12, 31 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01367-0>
38. Liang S, Liu Y, Yuan S, Liu Y, Zhu B, Zhang M. Study of Consumer Liking of Six Chinese Vinegar Products and the Correlation between These Likings and the Volatile Profile. *Foods.* 2022 Jul 26;11(15):2224. doi: 10.3390/foods11152224.
39. Drake MA, Watson ME, Liu Y. Sensory Analysis and Consumer Preference: Best Practices. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2023 Mar 27;14:427-448. doi: 10.1146/annurev-food-060721-023619.
40. Piggott John R., Stephanie J. Simpson, Simon A.R. Williams, "Sensory analysis", *International journal of food science & technology* 33(1): 7-12, 1998;
41. Bagna Novella, Braceschi Gian Paolo, Desimoni Federico, Odello Luigi, *Il Codice Sensoriale Aceto Balsamico di Modena*, Centro Studi Assaggiatori, 2020;
42. Torri L, Jeon SY, Piochi M, Morini G, Kim KO. Consumer perception of balsamic vinegar: A cross-cultural study between Korea and Italy. *Food Res Int.* 2017 Jan;91:148-160. doi: 10.1016/j.foodres.2016.12.003.
43. Benedetti Benedetto, Ferrari Simona, Federzoni Giovanni, Mascolo Antonio, Amati Aureliano, BALSAMIC VINEGAR OF MODENA D.P.R n°162/1965 - D.M. 3/12/1965 - D.M. 15/11/1989, An anthology of Various Authors tradotto da Chiara Gamberi, Consorzio Tutela Aceto Balsamico di Modena, 1996.
44. Fondazione Giovanni Dalmasso, Convegno internazionale su L'Aceto di Vino: aspetti scientifici, storici e gastronomici, Scuola di specializzazione in Viticoltura ed Enologia Dell'Università di Torino, 1991
45. F. Tondini, HS-GC-IMS as rapid analytical tool for vinegar flavor fingerprinting, Università degli Studi del Piemonte Orientale, 2022-2023.
46. Giordano L, Calabrese R, Davoli E, Rotilio D. Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry using isotope dilution. *J Chromatogr A.* 2003 Oct 31;1017(1-2):141-9. doi: 10.1016/j.chroma.2003.08.029.
47. Li S, Crump AM, Grbin PR, Cozzolino D, Warren P, Hayasaka Y, Wilkinson KL. Aroma potential of oak battens prepared from decommissioned oak barrels. *J Agric Food Chem.* 2015 Apr 8;63(13):3419-25. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00339.
48. Pollon M, Río Segade S, Giacosa S, Botto R, Montanini C, Rolle L. Volatile Compound Release from Oak Chips in Model Wine Media: Combined Influence of Toasting Degree, Size, Time of Contact, and Ethanol Content. *J Agric Food Chem.* 2023 Sep 13;71(36):13440-13450. doi: 10.1021/acs.jafc.3c03469.
49. Dumitriu Gabur GD, Peinado RA, Cotea VV, López de Lerma N. Volatilome fingerprint of red wines aged with chips or staves: Influence of the aging time and toasting degree. *Food Chem.* 2020 Apr 25;310:125801. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125801.
50. Liang J, Xie J, Hou L, Zhao M, Zhao J, Cheng J, Wang S, Sun BG. Aroma Constituents in Shanxi Aged Vinegar before and after Aging. *J Agric Food Chem.* 2016 Oct 12;64(40):7597-7605. doi: 10.1021/acs.jafc.6b03019.
51. M. Bononi, F. Tateo, Determination of furan by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry in balsamic vinegars of Modena (Italy), *Journal*

- of Food Composition and Analysis, Volume 22, Issue 1, 2009, Pages 79-82, ISSN 0889-1575, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.011>.
52. <https://www.sigmaaldrich.com//>
 53. Samaniego Solis JA, Luzzini G, Slaghenaufi D, Ugliano M. Dimethyl Sulfide (DMS) in Amarone Wines: Influence of Aging, Withering, Grape Variety, and Geographical Origin. *J Agric Food Chem*. 2024 Jan 31;72(4):1978-1984. doi: 10.1021/acs.jafc.3c00728.
 54. Zhu FM, Du B, Li J. Aroma enhancement and enzymolysis regulation of grape wine using β -glycosidase. *Food Sci Nutr*. 2014 Mar;2(2):139-45. doi: 10.1002/fsn3.84.
 55. Kim DH, Hong YA, Park HD. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnol Lett*. 2008 Sep;30(9):1633-8. doi: 10.1007/s10529-008-9726-1.
 56. Wang D, Cai J, Zhu BQ, Wu GF, Duan CQ, Chen G, Shi Y. Study of free and glycosidically bound volatile compounds in air-dried raisins from three seedless grape varieties using HS-SPME with GC-MS. *Food Chem*. 2015 Jun 15;177:346-53. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.018.
 57. Castejón-Musulén O, Manuel Aragón-Capone A, Ontañón I, Peña C, Ferreira V, Bueno M. Accurate quantitative determination of the total amounts of Strecker aldehydes contained in wine. Assessment of their presence in table wines. *Food Res Int*. 2022 Dec;162(Pt B):112125. doi: 10.1016/j.foodres.2022.112125.
 58. Boban A, Vrhovsek U, Carlin S, Mucalo A, Budić-Leto I. A Targeted and an Untargeted Metabolomics Approach to the Volatile Aroma Profile of Young 'Maraština' Wines. *Metabolites*. 2022 Dec 19;12(12):1295. doi: 10.3390/metabo12121295.
 59. Ma Y, Deng Q, Du Y, Ren J, Chen Y, Liu X, Guo X, Xiao D. Biosynthetic Pathway for Ethyl Butyrate Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*. 2020 Apr 8;68(14):4252-4260. doi: 10.1021/acs.jafc.0c00750.
 60. Callejón RM, Morales ML, Ferreira AC, Troncoso AM. Defining the typical aroma of sherry vinegar: sensory and chemical approach. *J Agric Food Chem*. 2008 Sep 10;56(17):8086-95. doi: 10.1021/jf800903n.
 61. Šikuten I, Štambuk P, Tomaz I, Marchal C, Kontić JK, Lacombe T, Maletić E, Preiner D. Discrimination of genetic and geographical groups of grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on their volatile organic compounds. *Front Plant Sci*. 2022 Oct 20;13:942148. doi: 10.3389/fpls.2022.942148.
 62. Ríos-Reina R, Segura-Borrego MP, García-González DL, Morales ML, Callejón RM. A comparative study of the volatile profile of wine vinegars with protected designation of origin by headspace stir bar sorptive extraction. *Food Res Int*. 2019 Sep;123:298-310. doi: 10.1016/j.foodres.2019.04.071.
 63. Ríos-Reina R, Segura-Borrego MP, Morales ML, Callejón RM. Characterization of the aroma profile and key odorants of the Spanish PDO wine vinegars. *Food Chem*. 2020 May 1;311:126012. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126012.
 64. Caligiani A, Silva G, Palla G. Determination of 2,3-butanediol and 2-hydroxybutanone stereoisomers in batteries of traditional balsamic vinegar. *J Agric Food Chem*. 2007 Sep 19;55(19):7810-5. doi: 10.1021/jf071206n.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare va al professor Alessio Porta per avermi seguito durante tutto il percorso di stesura della tesi e al dott. Andrea Colonello dell'azienda Ponti S.P.A. per avermi dato la possibilità di partecipare a questo progetto di ricerca mettendo a mia disposizione uno strumento all'avanguardia.

Un ringraziamento speciale va ad Erik, il mio tutor, che fin da subito ha creduto in me e nelle mie capacità, ma soprattutto per aver condiviso le sue conoscenze contribuendo alla mia formazione. Grazie davvero.

Ringrazio anche Samantha, Michela, Enrico, Matteo e tutto il team di laboratorio che con le loro competenze hanno contribuito alla stesura di questo elaborato; mi avete accolto fin da subito, siete stati sempre molto disponibili e per questo vi sono grata.