

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

R.A.I.S.A.

Ricerche Avanzate per Innovazioni nel Sistema Agricolo

Sottoprogetto 4

AGROBIOTECNOLOGIE NEI PROCESSI DI
VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI E SOTTOPRODOTTI
AGRICOLI

Vol. II

ZEPPA GIUSEPPE
PUBB.

Spineto Di Sarteano (SI) 1994

Tematica 4.4.4: Modelli analitici per la caratterizzazione dei prodotti alimentari trasformati

Unità ricerca 4.21 - Coordinatore C. Pompei

Responsabile N.M.: A. Carnacini

Titolo relazione : I polialcoli negli aceti di diversa origine botanica e geografica

Antonelli A.¹, Zeppa G.², Gerbi V.², Carnacini A.¹

(1) - Istituto di Industrie agrarie, Università degli Studi di Bologna, via S. Giacomo 7, 40126 BOLOGNA

(2) - Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali - Settore Microbiologia e Industrie agrarie, Università di Torino, Via P. Giuria 15, 10126 TORINO

INTRODUZIONE

I polialcoli sono una classe di composti molto interessanti nelle bevande fermentate, perché possono dare utili indicazioni circa lo stato sanitario e l'origine botanica delle materie prime, come testimoniano numerosi lavori sull'argomento.

La presenza di queste sostanze nei prodotti enologici è nota da molto tempo ed è stata accertata la presenza di 1,3-propandiolo, meso e levo 2,3-butandiolo, glicerolo, eritritolo, xilitolo, arabitolo, mannitolo, sorbitolo, scillo e mio-inositolo (Dubernet *et al.*, 1974; Bertrand e Pissard, 1976; Drawert *et al.*, 1976; De Smedt *et al.*, 1979, Versini *et al.*, 1984; Sponholtz e Dittrich, 1985). In parte sono già presenti nell'uva e nel mosto, in parte si formano nel corso della fermentazione alcolica e di quella malolattica. Oltre a ciò possono derivare dall'azione di muffe ed altri parassiti o possono essere il prodotto di alterazioni batteriche a carico del vino. Vi sono infine prove che alcuni batteri acetici sono in grado di utilizzare queste sostanze come fonte di carbonio (Kesters *et al.*, 1965). Giova ricordare, a questo punto, che l'aceto proviene da una doppia fermentazione e che i microrganismi coinvolti si comportano in modo differente in funzione della composizione del mezzo ed al variare delle condizioni fisiche. Oltre a ciò le specie coinvolte sono molto eterogenee, dotate di diverse necessità metaboliche e il loro metabolismo produce sostanze diverse. Infine l'acetificazione ha come oggetto prodotti con evidenti difetti che si conservano nel prodotto finale.

È perciò interessante effettuare la quantificazione esatta dei polialcoli in modo tale da notare se vi siano delle differenze tali da permettere una classificazione dei diversi prodotti basandosi sul loro contenuto.

La loro determinazione è stata effettuata con un metodo messo a punto da alcuni di noi (Antonelli *et al.*, 1994) innovativo per quanto riguarda la purificazione del campione rispetto ai lavori presenti in bibliografia (Santa Maria *et al.*, 1985; Tejedor e Santa Maria, 1984).

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati analizzati 84 campioni di aceti bianchi e rossi, di diversa origine botanica e geografica, reperiti presso punti di vendita nazionali ed esteri. I campioni sono stati suddivisi in 15 categorie, opportunamente codificate, in funzione della nazione di produzione, materia prima, del colore e dell'acidità totale (Tab. 1).

Categoria aceto	Codifica categoria	Numero campioni
Italiani di vino bianchi con acidità 6%	IVB6	11
Italiani di vino bianchi con acidità 7%	IVB7	8
Italiani di vino decolorati	IVDE	2
Italiani di vino rossi con acidità 6%	IVR6	9
Italiani di vino rossi con acidità 7%	IVR7	10
Francesi di vino rossi	FVR	5
Francesi di vino bianchi	FVB	5
Spagnoli di vino bianchi	EVB	4
Svizzeri di vino rossi	CHVR	1
Svizzeri di vino bianchi	CHVB	2
Di alcol	AL	8
Di mele	ME	12
Di malto	MA	1
Di miele	MI	3
Di alcol e vino	AV	3

Tabella 1 - Categorie di aceto analizzate e relativo codice di identificazione.

Preparazione del campione

In una provetta SVL 100 µl di campione aggiunto di 100 µl di soluzione di β-fenilglucopiranoside (1 g/l in etanolo assoluto), utilizzato come standard interno, si evapora con un flusso di N₂ a 50 °C. L'eliminazione dell'eventuale acqua residua è stata assicurata aggiungendo di

500 µl di etanolo assoluto ed evaporando fino a secchezza. Il campione essiccato è stato quindi sciolto in 500 µl di piridina : esametildisilazano:trimetilclorosilano 10:5:3 v/v, sigillato e posto in un bagnomaria ad 80 °C per un'ora, trascorsa la quale il campione viene addizionato di 500 µl di n-esano e di 1 ml di HCl 1N ed agitato intensamente mediante un Vortex per 1 min. Al termine si attende la separazione delle fasi e si inietta 1 µl del surmatante nel gascromatografo.

Analisi gascromatografica

Le determinazioni GLC sono state effettuate per mezzo di un gascromatografo 4300 Mega Series (Carlo Erba Instruments) che montava una colonna in vetro di SE 52 da 25 m di lunghezza, con 0,32 mm di diametro interno e 0,4 µm di spessore di fase.

L'iniettore (split, 50:1 di rapporto di splittaggio) e il rivelatore (F.I.D.) erano mantenuti ad una temperatura di 300 °C mentre il forno seguiva il seguente programma di temperatura: 80 °C per 5 min poi fino a 300 °C a 10 °C/min.

Il gas di trasporto (H₂) fluiva in colonna a 3 ml/min corrispondenti ad una pressione di 0,45 Kg/cm².

Elaborazione statistica

I risultati raccolti sono stati elaborati statisticamente con il pacchetto statistico SPSS/PC.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La tabella 2 riporta, per le categorie individuate in tabella 1, i risultati delle determinazioni gascromatografiche dei polialcoli eseguite sui campioni di aceto.

Le differenze riscontrabili fra le diverse categorie di prodotti sono ascrivibili principalmente alla materia prima d'origine. Ben individuati infatti gli aceti di alcole in cui i polialcoli risultano assenti o mediamente molto scarsi; egualmente ben individuati gli aceti di mele per l'elevato contenuto in sorbitolo e gli aceti di miele per l'elevato contenuto in mannitolo.

Al fine di meglio evidenziare la presenza di raggruppamenti all'interno dell'insieme dei dati, è stata utilizzata l'analisi dei raggruppamenti o Cluster Analysis che, eseguita sul contenuto in polialcoli dei soli aceti italiani di vino, individua due grandi gruppi di cui uno formato principalmente da aceti aventi il 7% di acidità dichiarata e l'altro da aceti aventi il 6% di acidità dichiarata (Fig. 1).

Categorie aceto	Eritritolo		Xilitolo		Arahitolo		Mannitolo	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
IVB6	39	11	3	2	136	142	99	83
IVB7	61	31	2	1	118	114	95	24
IVDE	32	6	4	1	181	52	48	54
IVR6	39	11	2	2	94	93	128	138
IVR7	50	7	4	3	109	92	110	35
FVR	28	16	4	2	233	182	113	128
FVB	24	7	3	1	196	129	62	28
EVB	84	12	9	5	244	85	398	217
CHVR	44	nd	2	nd	955	nd	38	nd
CHVB	39	19	1	0	114	62	39	10
AL	0	0	0	0	7	10	31	34
ME	24	10	45	33	117	74	110	95
MA	11	nd	11	nd	5	nd	43	nd
MI	16	10	2	1	39	50	958	305
AV	4	6	1	1	45	14	38	6

Categorie aceto	Sorbitolo		s-Inositolo		m-Inositolo		Trealosio	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
IVB6	21	13	18	7	98	56	177	46
IVB7	24	9	27	8	145	36	225	72
IVDE	15	16	18	18	71	74	169	62
IVR6	30	16	22	5	106	35	216	64
IVR7	42	12	32	10	182	50	265	62
FVR	21	7	22	6	134	40	167	50
FVB	14	7	16	4	119	42	141	12
EVB	45	10	41	2	229	62	206	47
CHVR	21	nd	25	nd	212	nd	97	nd
CHVB	12	8	15	4	121	33	141	88
AL	1	4	0	0	2	4	62	26
ME	3172	1646	4	4	78	34	131	88
MA	185	nd	1	nd	86	nd	212	nd
MI	42	22	10	14	76	35	233	64
AV	36	55	4	3	36	20	89	39

Tabella 2 - Valori medi (mg/l) e deviazioni standard del contenuto in polialcoli per le diverse categorie di aceto. (Per l'interpretazione delle sigle delle categorie vedasi Tab. 1)

Anche il produttore risulta essere elemento caratterizzante: numerosi sono i raggruppamenti formati da aceti prodotti dallo stesso acetificio e commercializzati con nomi diversi.

È il caso dei campioni 3, 36, 4, 22, 7, 21 e 37 prodotti da un solo acetificio e messi in commercio con nomi diversi o dei campioni 32, 34 e 5 anch'essi prodotti da un unico acetificio, ma commercializzati con nomi diversi.

Ciò indica un'influenza, oltre che della materia prima, della tecnologia di produzione ed in particolare della microflora acetificante sulle caratteristiche chimiche del prodotto finito.

Inserendo nella Cluster Analysis i prodotti di origine non enologica ad esclusione degli aceti di vino rossi (Fig. 2) si conferma l'importanza dei polialcoli per la caratterizzazione degli aceti.

Molto ben differenziati infatti dagli aceti di origine enologica gli aceti di alcole, le miscele alcole-vino e gli aceti di miele mentre qualche confusione si ha per gli aceti di mele.

Anche gli aceti spagnoli, prodotti con vino di Jerez, costituiscono un gruppo di prodotti ben differenziato dai restanti aceti di origine enologica.

Sempre individuabili, all'interno dei gruppi formati dagli aceti di origine enologica, dei raggruppamenti per produttore.

Poichè nè la Cluster Analysis nè l'Analisi Multivariata della Varianza (MANOVA) hanno evidenziato differenze tra gli aceti bianchi di origine enologica, è stato effettuato l'accorpamento degli stessi al fine di confrontarli con gli aceti di altra origine.

L'Analisi Discriminante Lineare (LDA) eseguita sull'insieme dei dati così ristrutturato e che vede a confronto aceti di origine enologica, aceti di alcole, aceti di sidro ed aceti di miele, individua tre funzioni discriminanti, tutte statisticamente significative ed aventi un potere di riclassificazione del 98.11%.

Gli aceti derivanti dalla miscelazione di aceti di vino con aceti di alcole, non presi in considerazione dalla LDA ed utilizzati come gruppo di controllo della bontà del modello statistico discriminante, vengono riclassificati, dalla procedura di calcolo, nel gruppo degli aceti di alcole (Tab. 3).

Utilizzando la procedura di Wilks per la selezione delle variabili nella LDA (Norusis, 1985) si ottiene un modello matematico discriminante costituito nuovamente da sole tre funzioni in cui entrano a far parte l'eritritolo, il sorbitolo, il mannitolo, il trealosio e lo xilitolo (Tab. 4). Il potere discriminante del nuovo modello risulta del 96.23% per la presenza di alcuni aceti di vino attribuiti erroneamente al gruppo degli aceti di alcole.

Categoria attuale	N° di campioni	Categoria prevista			
		Vino	Alcol	Mele	Miele
Vino	32	31	1	0	0
Alcol	8	0	8	0	0
Mele	11	0	0	11	0
Miele	2	0	0	0	2
Misc. alcol-vino	3	0	3	0	0

Tab. 3 - Tabella di riclassificazione dei campioni di aceto bianco fra le categorie discriminate. Gli aceti di miscelazione costituiscono il gruppo non classificato.

	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Eritritolo	-0,581	-0,778	0,549
Mannitolo	0,471	1,105	0,121
Sorbitolo	0,975	-0,232	0,097
Trealosio	0,419	0,048	0,681
Xilitolo	0,836	-0,081	0,053

Tab. 4 - Coefficienti delle tre funzioni discriminanti individuate con la procedura *stepwise* nel confronto fra le categorie degli aceti bianchi.

Nessun problema di riclassificazione invece per gli aceti di sidro e quelli di miele. Anche gli aceti da miscele di alcole e di vino continuano ad essere inclusi fra gli aceti di alcole (Fig. 3).

Nel caso degli aceti rossi sono stati messi a confronto gli aceti di origine enologica con quelli di alcole, lasciando gli aceti ottenuti per miscelazione come gruppo indipendente.

L'analisi discriminante lineare effettuata operando una scelta delle variabili mediante la procedura di Wilks (Norusis, 1985) indica come discriminanti l'arabitolio, l'inositolio, il trealosio, lo xilitolo e l'eritritolo (Tab. 5).

	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3	Funzione 4
Arabitolio	-1,046	0,802	0,214	0,915
Inositolio	1,358	0,696	-0,221	-0,406
Trealosio	0,304	-0,971	0,801	-0,282
Xilitolo	1,203	0,376	0,531	-0,719
Eritritolo	0,761	-0,242	-0,556	0,607

Tab. 5 - Coefficienti delle tre funzioni discriminanti individuate con la procedura *stepwise* nel confronto fra le categorie degli aceti rossi.

Le quattro funzioni individuate presentano un potere di riclassificazione del 96,88 % (Tab. 6). Anche in questo caso gli aceti ottenuti per miscelazione vengono riclassificati come aceti di alcole (Fig. 4).

Nei due modelli risultano discriminanti dei polialcoli diversi in quanto nel caso degli aceti bianchi sono stati messi a confronto prodotti di diversa materia prima mentre nel caso degli aceti rossi sono stati confrontati aceti di vino di diversa origine.

Non avendo rilevato per i polialcoli differenze tra gli aceti di origine enologica imputabili al colore né con la Cluster Analysis né con MANOVA, è stato quindi effettuato l'accorpamento degli aceti rossi con gli aceti bianchi di origine enologica ed è stata effettuata un'ulteriore analisi discriminante lineare ponendo a confronto i prodotti di origine enologica con quelli di origine non enologica.

Categoria attuale	N° di campioni	Categoria prevista			
		IVR6	IVR7	FVR	AL
IVR6	8	7	0	1	0
IVR7	10	0	10	0	0
FVR	5	0	0	5	0
AL	8	0	0	0	8
AV	3	0	0	0	3

Tab. 6 - Tabella di riclassificazione dei campioni di aceto rosso fra le categorie discriminate. Gli aceti di miscelazione costituiscono il gruppo non classificato. (Per l'interpretazione delle sigle delle categorie vedasi Tab. 1)

Sono state individuate mediante la procedura di Wilks (Norusis, 1985) tre funzioni discriminanti aventi un potere di riclassificazione del 94.81% e di cui entrano a far parte quasi tutti i polialcoli, ad esclusione dell'arabitolio e dell'inositolio (Tab. 7).

	Funzione 1	Funzione 2	Funzione 3
Eritritolo	-0,318	-0,617	0,285
Mannitolo	0,369	1,038	0,263
scillo-Inositolio	-0,443	-0,209	0,376
Sorbitolo	0,935	-0,209	0,173
Trealosio	0,442	0,126	0,496
Xilitolo	0,778	-0,076	0,156

Tab. 7 - Coefficienti delle tre funzioni discriminanti individuate con procedura la *stepwise* nel confronto fra gli aceti di diversa materia prima.

Ben individuati solo gli aceti di mele e di miele mentre alcuni aceti di vino vengono erroneamente attribuiti al gruppo degli aceti di alcole (Tab. 8); tutti attribuiti al gruppo degli aceti di alcole gli aceti di miscele alcole-vino (Fig. 5).

Categoria attuale	N° di campioni	Categoria prevista			
		Vino	Alcol	Mele	Miele
Vino	56	52	4	0	0
Alcol	8	0	8	0	0
Mele	11	0	0	11	0
Miele	2	0	0	0	2
Misc. alcol-vino	3	0	3	0	0

Tab. 8 - Tabella di riclassificazione dei campioni di aceto rosso fra le categorie di aceto discriminate. Gli aceti di miscelazione costituiscono il gruppo non classificato.

CONCLUSIONI

I polialcoli costituiscono un ottimo parametro chimico per la caratterizzazione degli aceti e l'individuazione della materia prima d'origine. Questo è particolarmente vero per aceti di mele, alcole e, secondariamente, per quello di miele.

Grazie anche alla nuova procedura analitica messa a punto durante l'indagine, è possibile effettuare con relativa semplicità ed in tempi molto brevi la determinazione dei polialcoli negli aceti.

Vista l'efficacia discriminante dei polialcoli, messa in evidenza per gli aceti derivanti da miscele di alcole e di vino, è ipotizzabile un loro utilizzo ai fini legali nella individuazione di eventuali frodi commerciali.

BIBLIOGRAFIA

ANTONELLI, A, VERSARI, A., CARNACINI, A. - (1994) - Liquid-liquid extraction of silylated polyalcohols from vinegar, and their determination by capillary GC. *J. High Resol. Chromat.* 17 553.

BERTRAND, A., R. PISSARD - (1976) - Dosage du sorbitol dans les vins par chromatographie en phase gazeuse de son dérivé acétylé. *Ann. Falsif. Expert. Chim.* 69, 571.

DE SMEDT, P., P.A.P. LIDDLE, B. CRESTO, A. BOSSARD - (1979) - Application del CPG sur colonne capillaire a l'analyse des composé fixes du vins. *Ann. Falsif. Expert. Chim.* 72, 633.

DRAWERT, F., G. LEOPOLD, V. LESSING, Z. KERENYI - (1976) - Gaschromatographische Bestimmung der Inhaltsstoffe von Gärungsgetränken. VI Quantitative gaschromatographische Bestimmung von Neutralstoffen (Kohlenhydrate) und phenolischen Verbindungen in Tokayer Wein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 162, 407.

DUBERNET, M.O., A. BERTRAND, P. RIBEREAU-GAYON - (1974) - Présence dans le vins d'eritrytol, d'arabitol et de mannitol. *CR Acad. Sci. Paris Serie D* 279 1027.

KESTERS, K., W.A. WOOD, J. DE LEY - (1965) - Polyol dehydrogenase of *Gluconobacter oxydans*. *J. Biol. Chem.* 240, 965.

SANTA-MARIA, G., A. OLANO, M. TEJEDOR - (1985) - Quantitative determination of polyalcohols in wine and vinegar by gas chromatography. *Chromatographia* 20, 197.

SPONHOLTZ, W.R., H.H. DITTRICH - (1985) - Zuckeralkohole und myo-Inosit in Weinen und Sherries. *Vitis* 24, 97.

SPONHOLTZ, W.R., H.H. DITTRICH, A. BARTH - (1986) - Die Bildung von Alditolen durch die Hefen des Wines. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 10, 19.

TEJEDOR, M., J.C. SANTA MARIA - (1984) - Métodos de analisis di polialcoholes. *Sem. Vinivinicola* 39, 2349.

VERSINI, G., A. DELLA SERRA, G. FALCERI - (1984) - Polialcoli e zuccheri minori nei mosti concentrati e rettificati. Possibili parametri di qualità? *Vignevini* 11 (3) 41.

Rescaled Distance Cluster Combine

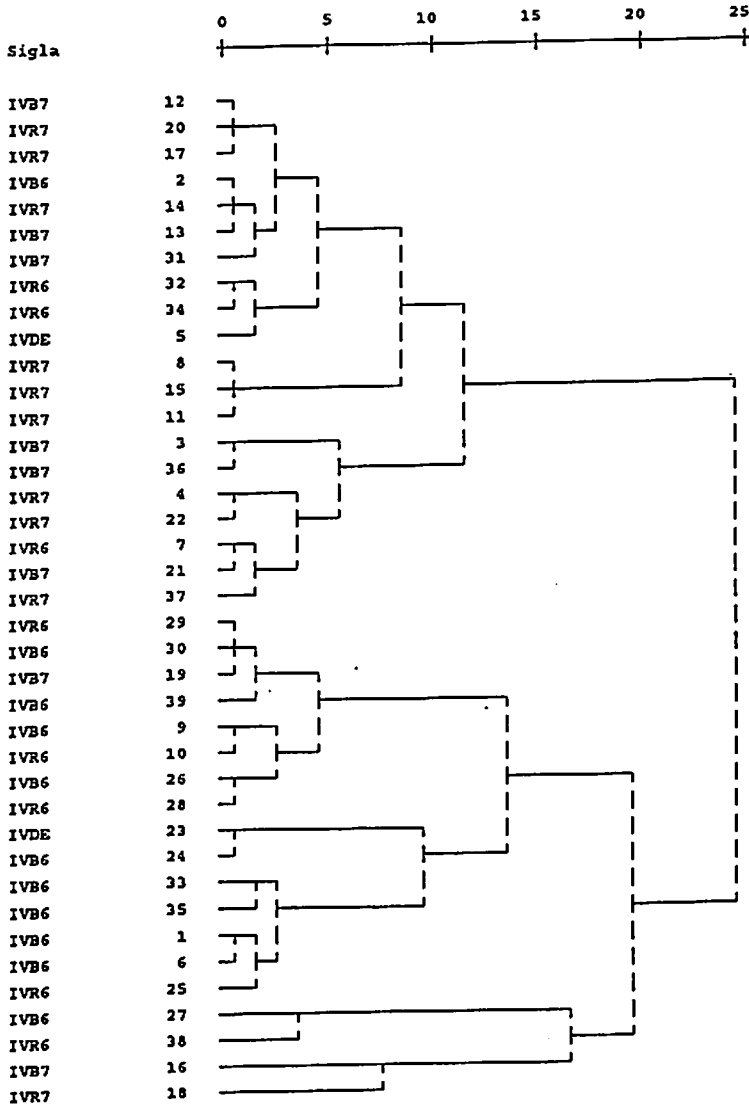


Fig. 1 - Dendrogramma della distanza fra i *clusters* (asse orizzontale) per gli aceti di vino italiani. (Per l'interpretazione delle sigle delle categorie vedasi Tab. 1)

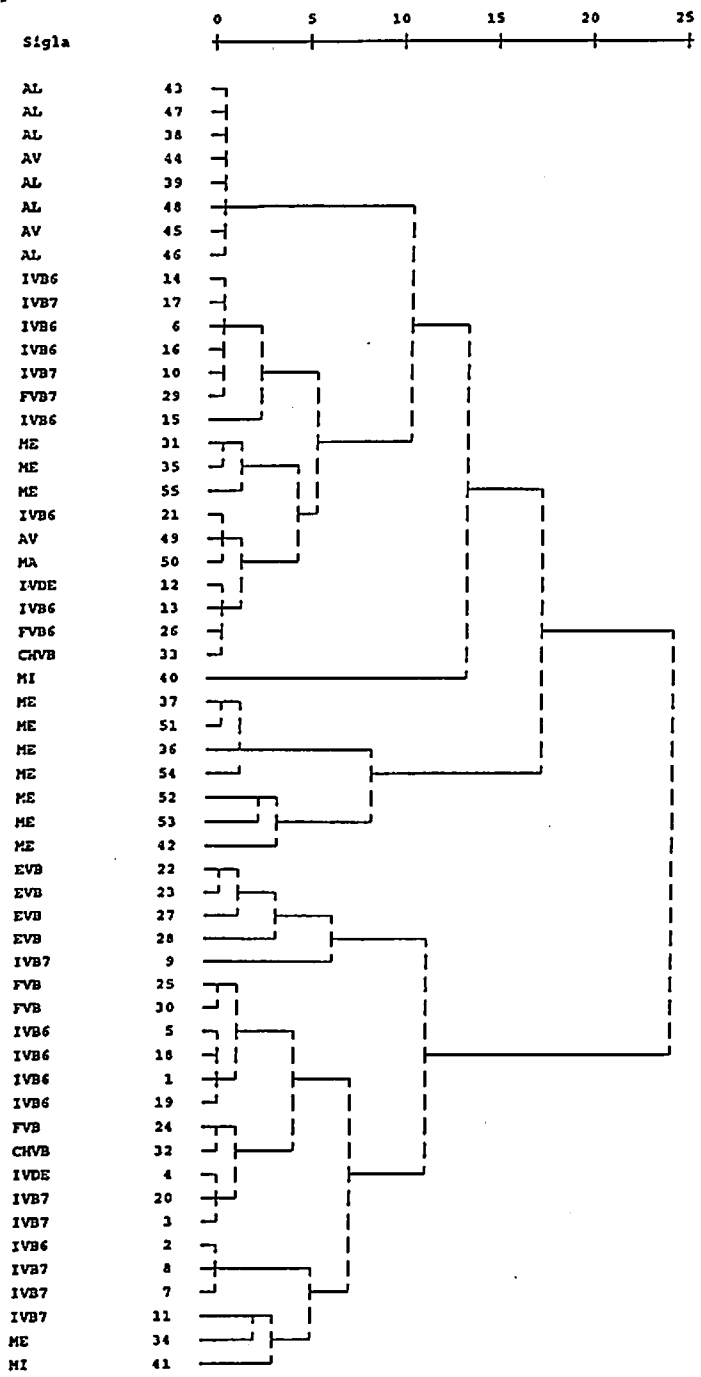


Fig. 2 - Dendrogramma della distanza fra i clusters (asse orizzontale) per tutti gli aceti a confronto. (Per l'interpretazione delle sigle delle categorie vedasi Tab. 1)

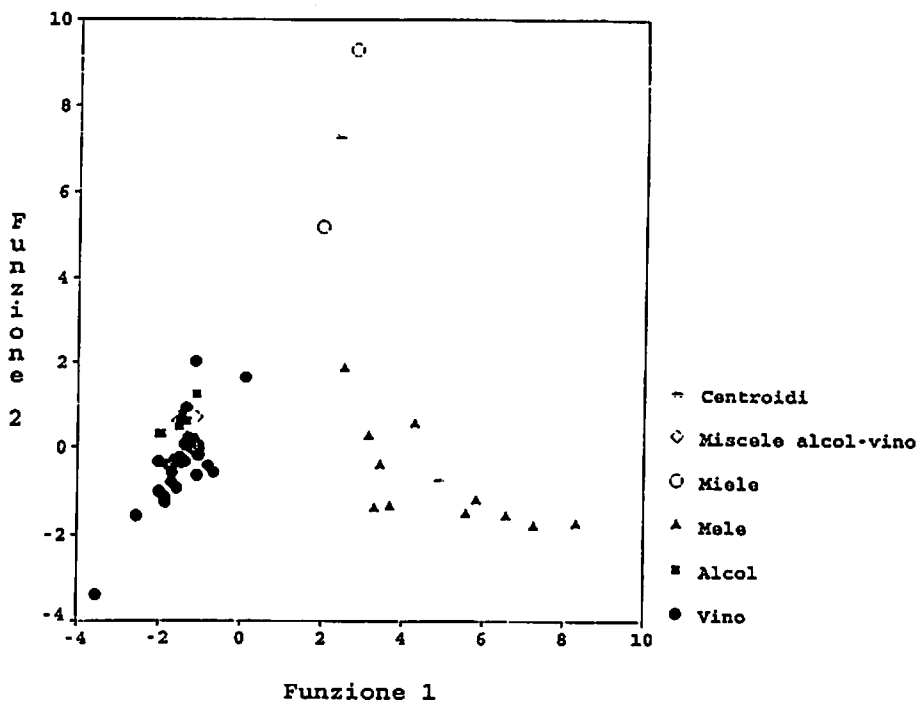


Fig. 3 - Distribuzione, sul piano individuato dalle prime due funzioni discriminanti, degli aceti bianchi raggruppati in funzione della materia prima con cui sono stati elaborati.

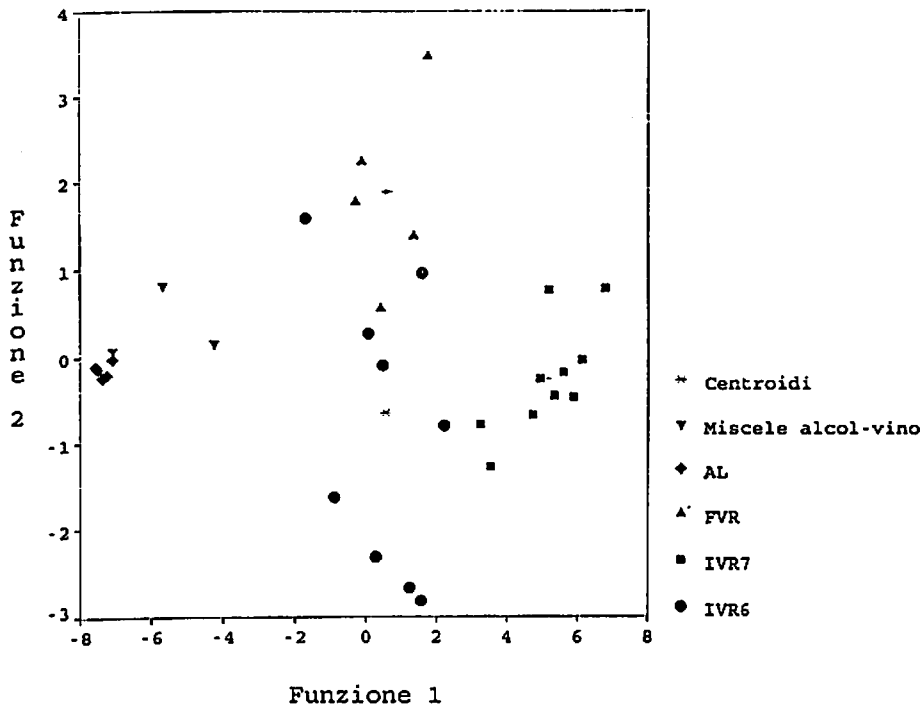


Fig. 4 - Distribuzione, sul piano individuato dalle prime due funzioni discriminanti, degli aceti rossi raggruppati in funzione della Nazione di produzione e degli aceti di alcol.

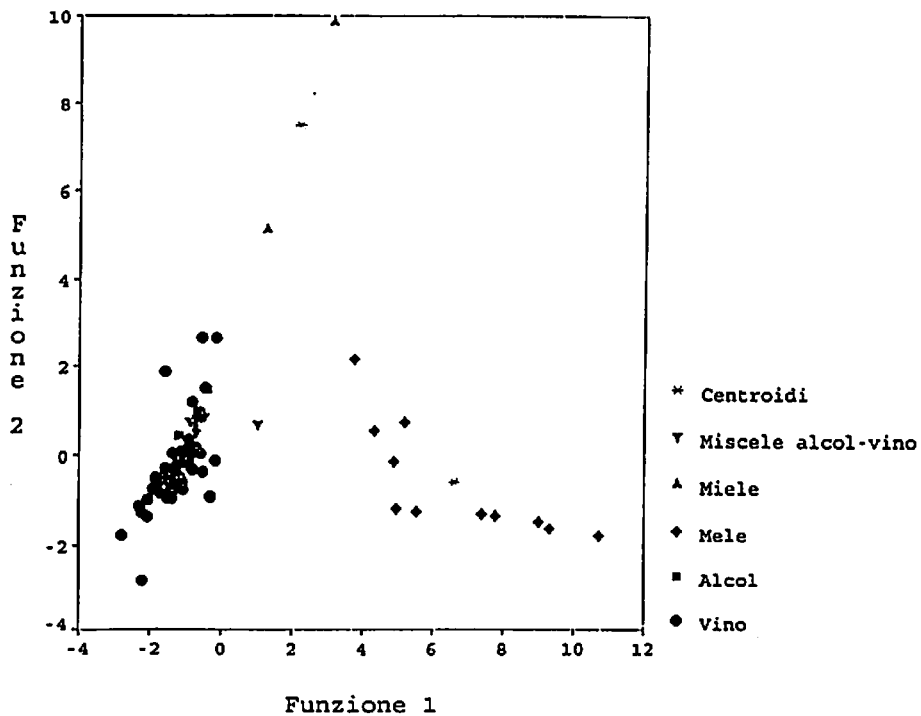


Fig. 5 - Distribuzione, sul piano individuato dalle prime due funzioni discriminanti, di tutti gli aceti analizzati raggruppati in funzione della materia prima con cui sono stati elaborati.