

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

Prestazioni di un prototipo in guida d'onda nella caratterizzazione chimico-fisica di  
aceti di vino.

Tesi in

“Impianti avanzati della tecnologia alimentare”

(“Innovazione nei processi dell’industria alimentare C.I.”)

Relatore:

Prof. Luigi Ragni

Presentata da:

Andrea Campagna

Correlatori:

Dott.ssa Annachiara Berardinelli

Dott. Fabio Chinnici

Sessione Unica

Anno Accademico 2015-2016



## INDICE

### PARTE GENERALE

1	INTRODUZIONE .....	3
2	ACETO DI VINO E PARAMETRI QUALITATIVI .....	5
2.1	Aspetti legislativi.....	5
2.2	Tecnologia di produzione.....	6
2.2.1	Metodo di Orleans.....	6
2.2.2	Il metodo a fermentazione sommersa .....	8
2.2.3	Generatore.....	10
2.2.4	Trattamenti post-fermentazione .....	11
2.3	Parametri influenzanti il processo fermentativo.....	11
2.3.1	I lieviti.....	12
2.3.2	I batteri acetici.....	12
2.4	Gli aceti tipici .....	14
2.4.1	Aceto balsamico Tradizionale di Modena e di Reggio-Emilia (ABTM e ABTRE)....	15
2.4.2	Aceto balsamico di Modena (ABM).....	18
2.4.3	Aceto di Sherry: Vinagre de Jerez .....	19
2.5	Autenticazione.....	19
2.5.1	Contenuto in polialcoli.....	20
2.5.2	Contenuto in amminoacidi .....	20
2.5.3	Contenuto in ammine biogene .....	21
2.5.4	Composti volatili.....	21
2.6	Difetti dell'aceto.....	25
2.6.1	Infezioni batteriche .....	25
2.6.2	La surossidazione.....	25
2.6.3	Polisaccaridi extracellulari.....	25
2.6.4	Altre alterazioni.....	26
2.7	Molecole bioattive ed effetti benefici sulla salute.....	26
3	LE PROPRIETÀ DIELETTRICHE .....	29

3.1	Teoria dielettrica.....	29
3.1.1	Costante dielettrica.....	29
3.2	Propagazione delle onde elettromagnetiche .....	31
3.3	Meccanismi dielettrici .....	31
3.3.1	Rotazione dipolare .....	32
3.3.2	La polarizzazione elettronica ed atomica.....	35
3.3.3	La conduttività ionica.....	35
3.3.4	Polarizzazione interfacciale o spaziale .....	35
3.4	Sistemi di misura.....	36
3.5	Tecniche di misurazione.....	37
4	SPETTROSCOPIA DIELETTRICA E NIR NEGLI ALIMENTI .....	39
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>		
1	ORGANIZZAZIONE GENERALE DEL LAVORO SPERIMENTALE .....	51
2	MATERIALI E METODI .....	51
2.1	I campioni di aceto analizzati.....	51
2.2	Strumentazione per spettroscopia dielettrica in guida d'onda.....	52
2.3	Parametri qualitativi misurati .....	53
2.3.1	Misura del contenuto di sostanza secca .....	53
2.3.2	Misura del residuo secco rifrattometrico .....	54
2.3.3	Misura del pH.....	54
2.3.4	Misura della conducibilità elettrica.....	54
2.4	Analisi dei dati.....	54
3	RISULTATI.....	57
4	CONCLUSIONI.....	65
	BIBLIOGRAFIA .....	67

**PARTE GENERALE**



## **1 INTRODUZIONE**

L'aceto è un prodotto fermentato che può essere ottenuto da qualsiasi forma di carboidrato fermentescibile, sottoposto a fermentazione alcolica ed acetica (Solieri e Giudici, 2009). Le materie prime che vengono utilizzate per la sua produzione possono essere soluzioni idroalcoliche, frutta, cereali ed alimenti amidacei. Tuttavia, in Europa, gli aceti di qualità migliore derivano dal vino, i quali vengono commercializzati sotto le denominazioni DOP (Denominazione d'Origine Protetta) o IGP (Indicazione Geografica Protetta). In particolare, l'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena, l'Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia e gli aceti spagnoli Vinagre de Jerez e Vinagre de Condado de Huelva, sono stati riconosciuti come DOP dall'Unione Europea, mentre la denominazione IGP è stata attribuita all'Aceto Balsamico di Modena. Oltre agli aceti appena citati, recentemente è stato aggiunto alle DOP anche il Vinagre de Montilla-Morilles (Commission implementing regulation, 2015).

Qualsiasi aceto di vino per essere immesso in commercio deve soddisfare dei requisiti legislativi, tra cui l'acidità totale, l'etanolo residuo, l'estratto secco, il contenuto in ceneri e in componenti minori quali zinco, rame, piombo, bromo inorganico, acido borico e sorbitolo (Cabras, 2004). In base all'acidità totale ed alla concentrazione di etanolo residuo, gli aceti di vino si classificano in aceto comune (acidità totale minima pari al 6%, etanolo assente o presente in tracce) e in aceto di qualità (acidità totale minima pari al 7%, etanolo tra 0,6 e 1,5%) (Cabras, 2004).

Gli aceti di vino devono le loro caratteristiche peculiari a numerosi fattori, quali la materia prima, la sua origine, la specie ed il ceppo dei microrganismi utilizzati nella fermentazione sia alcolica che acetica, ed il processo di produzione (Solieri e Giudici, 2009; Giudici et al., 2009). Tra tutti i parametri costitutivi, gli amminoacidi liberi sono molto importanti, perché insieme all'ammoniaca, rappresentano la fonte primaria di azoto per le colture microbiche (Hernández-Orte et al., 2005; Hernandez-Orte et al., 2008). Tuttavia, dal consumo di alcuni amminoacidi, i microrganismi possono produrre le ammine biogene (ten Brink et al., 1990), le quali possono risultare tossiche per l'organismo umano (Bauza e Teisseidre, 1995). La composizione degli amminoacidi nell'aceto è influenzata dal processo di produzione e dalle varie biotrasformazioni che portano alla formazione dei prodotti finali (Chinnici et al., 2016). La composizione in aminoacidi è utile per discriminare tra le differenti tipologie di aceto (Csomós et al., 2002).

Le tecniche ufficiali per la valutazione compositiva dell'aceto prevedono metodiche non rapide anche basate su attrezzature sofisticate come l'HPLC-DAD.

Come dimostra l'analisi della letteratura, le proprietà dielettriche sono state studiate allo scopo di caratterizzare gli alimenti dal punto di vista compositivo. Per esempio, il loro impiego è stato rivolto alla determinazione del contenuto di etanolo in campioni di vino (Bohigas et Tejada, 2010), di acido acetico in campioni di aceto (Bohigas et Tejada, 2009), e del contenuto zuccherino in diverse soluzioni (Tulasidas et al., 1994).

Il presente lavoro si propone di mettere a punto un metodo rapido basato su misure dielettriche in guida d'onda per la stima di taluni principali parametri qualitativi degli aceti di vino. A partire dall'informazione dielettrica, modelli di regressione multivariata saranno esplorati al fine di stimare il contenuto di sostanza secca, il residuo secco rifrattometrico, la conducibilità elettrica e il pH, di campioni di aceto balsamico di Modena e di diversi campioni provenienti dalle acetaie di Jerez (Spagna). Saranno valutati anche modelli predittivi costruiti a partire da valori di aminoacidi (contenuto totale, mg/kg) e ammine biogene (contenuto totale, mg/kg) ottenuti in un precedente lavoro da Chinnici et al. (2015). Analisi discriminanti saranno inoltre condotte allo scopo di differenziare i campioni presi in esame sulla base del valore di acidità totale riportato in etichetta.

## **2 ACETO DI VINO E PARAMETRI QUALITATIVI**

### *2.1 Aspetti legislativi*

In Italia, l'aceto di vino viene regolamentato mediante la legge 82 del febbraio 2006, il cui comma 1 riferisce che per "aceto di vino" si intende il liquido ottenuto dalla fermentazione acetica del vino; il limite di alcol etilico finale non deve essere superiore all'1,5% in volume, mentre il contenuto in acido acetico deve essere almeno il 6%. I vini destinati alla produzione di aceto possono essere vini o vinelli rossi, bianchi o ros e, purch e siano privi di qualsiasi difetto o alterazione, con un'acidità superiore al 6%. La quantità di anidride solforosa residua nel vino, non deve superare i 100 mg/L, altrimenti la crescita dei batteri acetici viene contrastata. La legislazione sancisce anche il limite di acidità totale, intesa come i grammi o la percentuale di acido acetico in 100 ml di prodotto. In base ad essa, gli aceti di vino vengono classificati in:

- aceto comune. Presenta un'acidità totale minima pari al 6% e l'etanolo risulta assente o presente in tracce. Per la produzione di questi aceti,   possibile l'utilizzo di vini con concentrazione alcolica compresa tra 7-10 . Il prodotto stabilizzato viene commercializzato fresco o conservato per alcuni mesi, in quanto un invecchiamento prolungato, a causa dell'azione dell'ossigeno, porterebbe ad un decadimento organolettico del prodotto;
- aceto di qualità. Presenta un'acidità totale minima pari al 7%, mentre la concentrazione di etanolo ammessa oscilla tra 0,6-1,5%. I vini utilizzati, presentano un titolo alcolico superiore ai 10 , pertanto necessitano di essere diluiti con acqua o con vini poco alcolici, allo scopo di portare la materia prima alla gradazione alcolica ottimale per l'acetificazione. Per legge la diluizione   ammessa soltanto negli acetifici. A causa dell'elevata gradazione alcolica, i batteri acetici si sviluppano lentamente, quindi il tempo di acetificazione risulter  pi  lungo. Infine, per questo prodotto,   previsto anche l'invecchiamento che dura circa un anno per gli aceti di vino bianco, e tre anni per gli aceti di vino rosso.

La denominazione di "aceto di vino aromatizzato",   rivolta a quegli aceti di vino a cui sono state aggiunte sostanze aromatizzanti naturali, tramite macerazione diretta o tramite infusi; quest'ultimi non devono superare il 5% in volume. Per produrli, vengono utilizzati solo aceti di qualità e la macerazione o infusione dura circa 40-60 giorni. Le sostanze aromatizzanti utilizzate sono sia erbe aromatiche (aglio, aneto, basilico, cipolla, dragoncello, maggiorana, menta, rosmarino, ruta, salvia, santoreggia, scalogno) che spezie (cannella, noce moscata, pepe nero, peperoncino, cumino, chiodi di garofano, senape e zenzero) (Cabras, 2004).

Per "aceto decolorato", si intende l'aceto comune decolorato, mediante l'aggiunta di carbone ed è destinato all'industria alimentare per la conservazione degli ortaggi sottaceto.

Infine, nella Gazzetta Ufficiale (G.U. n.76 del 27/3/86) per l'aceto di vino, oltre ad essere elencati i limiti riguardanti sia la concentrazione dell'acido acetico che dell'etanolo, sono stati inseriti anche i limiti di concentrazione di altri componenti, quali (Cabras, 2004):

- la concentrazione di estratto secco per vini con acidità totale del 6-7,5% è compresa tra gli 8-20 g/L per vini bianchi, mentre per i vini rossi è compresa tra 11-25 g/L (dedotta la quantità di cloruri eccedente 0,5 g/L espressa come NaCl). Invece nei vini che presentano un'acidità totale superiore al 7,5%, l'estratto secco deve essere compreso tra 12-25 g/L nei vini bianchi, e tra 14-30 mg/L nei rossi;
- la concentrazione massima delle ceneri deve essere compresa tra 0,8-3,5 g/L per vini con acidità totale del 6-7,5%, mentre deve essere compresa tra 1-3,7 g/L per vini con acidità totale superiore al 7,5% (dedotta la quantità di cloruri eccedente 0,5 g/L espressa come NaCl);
- non contenere più di 5 mg/L di zinco, di 1 mg/L di rame, di 0,3 mg/L di piombo, di 1 mg/L di bromo inorganico, di 60 mg/L di acido borico e di 70 mg/L di sorbitolo.

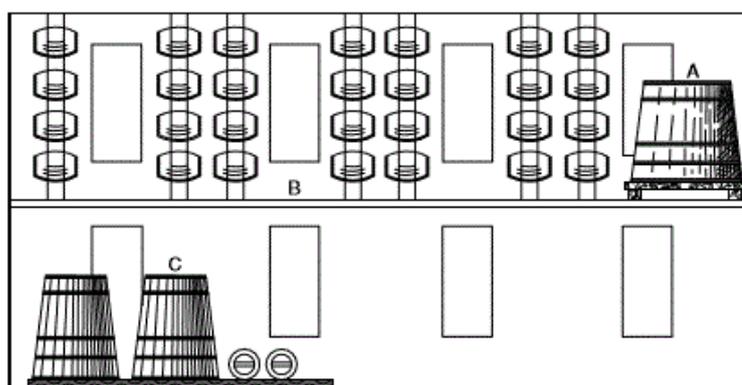
## 2.2 Tecnologia di produzione

Nella produzione di aceto di vino vengono utilizzati tre metodi che sono il metodo di Orleans o a fermentazione in superficie, il metodo a coltura sommersa e la produzione mediante l'utilizzo di un generatore (Tasfaye et al., 2002; Plessi, 2003; Cabras, 2004; Ho et al., 2017). In essi, l'avviamento dell'acetificazione può avvenire mediante l'aggiunta di una cultura pura o più comunemente mediante l'aggiunta di un'aliquota di vino fresco a un aceto in fermentazione (Cabras, 2004). Il liquido così ottenuto dovrebbe avere una gradazione alcolica di 3-4°, che rappresenta la composizione idonea per avviare un nuovo ciclo fermentativo (Cabras, 2004). Di norma, l'acetificazione si blocca quando il livello di alcol etilico è ottimale per la caratterizzazione del prodotto. Tale concentrazione dipende dal tipo di aceto che si vuole ottenere. Infatti, per l'aceto comune il processo si arresta quando il contenuto residuo di alcol è di 0,2-0,3%, mentre per l'aceto di qualità esso si blocca ad una concentrazione alcolica compresa tra 0,6-1,5% (Cabras, 2004).

### 2.2.1 *Metodo di Orleans*

Questo metodo viene chiamato anche metodo a fermentazione in superficie, in quanto i batteri acetici vengono posti nell'interfaccia aria-liquido in contatto diretto con l'ossigeno atmosferico (Tasfaye et al., 2002). Si tratta di un metodo statico, poiché la presenza dei batteri è limitata sulla superficie del liquido in acetificazione (Tasfaye et al., 2002). Il processo di acetificazione avviene per

l'azione dei batteri acetici legati alla superficie di trucioli di legno o di raspi d'uva, che vengono posti all'interno dell'acetificatore (Cabras, 2004). Quest'ultimo consiste in un tino di legno di 500-700 hl, munito all'interno di un diaframma bucherellato, posto ad un metro circa dal fondo, sul quale vengono posti i trucioli o i raspi fino a circa 50 cm dalla parte superiore (Cabras, 2004). Il processo (Fig. A) consiste nel far percolare il vino per caduta dall'alto in basso attraverso i trucioli o i raspi (Plessi, 2003). Durante la percolazione del liquido, i fori disposti nel tino a distanze prefissate consentono la circolazione dell'aria tra l'esterno e l'interno per aspirazione provocata dalla depressione per la caduta del liquido (Cabras, 2004). Per mantenere costantemente la temperatura interna al suo livello ottimale, all'acetificatore viene collegato uno scambiatore di calore che ha la funzione di regolare la temperatura del vino prima che entri nel tino (Cabras, 2004). Dopo circa 8 giorni, durante i quali l'acetificazione si è attivata, dal fondo dell'acetificatore viene spillata un'aliquota di liquido, che corrisponde circa ad 1/2 o a 2/3 del contenuto totale (Plessi, 2003). Suddetta quantità viene messa all'interno delle botti e lasciata maturare per 3 mesi, ovvero fino a quando l'acidità totale non raggiungerà il suo picco (Plessi, 2003). Nel frattempo, nel tino di acetificazione, si trova l'aliquota di liquido acetificato, che funge da liquido madre per il vino che si dovrà aggiungere. Una volta riempito l'acetificatore, ogni settimana dalla base vengono prelevati 2/3 o 3/4 di liquido acetificato posto a maturare all'interno delle botti, e nel frattempo, lo stesso volume di vino viene inviato all'interno del tino (Plessi, 2003). Si tratta di un processo molto lento che dura dai 2-3 mesi, tuttavia la durata dipende da molti fattori quali la temperatura di fermentazione, la concentrazione iniziale di etanolo, il pH della materia prima utilizzata, la specie ed il ceppo dei lieviti e dei batteri acetici utilizzati, e la concentrazione di ossigeno disciolto nel mezzo (Dabija e Hatnean, 2014).



**Figura A:** Metodo di Orleans: (A) tino di fermentazione, (B) botti di maturazione, (c) tino di chiarificazione (Plessi, 2003).

Questa tecnologia viene utilizzata per produrre aceti di elevata qualità, perché consente di ottenere un aceto ricco di componenti estrattivi e di composti volatili (Cabras, 2004). Per contro, la

resa di trasformazione è compresa tra l'80-85%, in cui bisogna considerare le perdite per evaporazione di costituenti volatili (quali alcool, aldeidi, esteri ecc...) (Cabras, 2004).

### 2.2.2 Il metodo a fermentazione sommersa

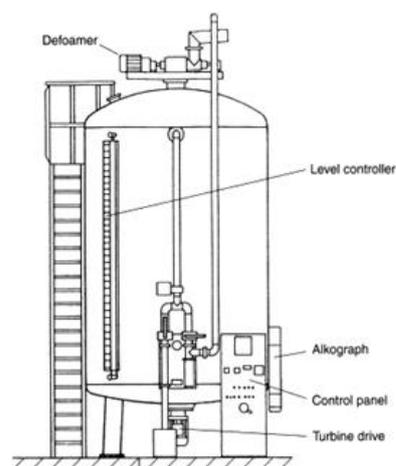
Il metodo a fermentazione sommersa implica che i batteri acetici siano sospesi nel liquido, in cui viene applicata una forte areazione del mezzo, allo scopo di fornire l'ossigeno necessario ai batteri per ossidare l'etanolo (Tesfaye et al., 2002). Non vengono utilizzati i trucioli di legno come fonte batterica, bensì l'aceto madre viene spesso rimpiazzato con degli inoculi di colture starter di acetobatteri (Plessi, 2003). L'ossidazione dell'etanolo inizia lentamente grazie all'insufflaggio controllato dell'aria, la quale viene introdotta ad intervalli orari regolari, permettendo una fermentazione uniforme e rapida (Plessi, 2003). La fermentazione viene bloccata dopo 24 ore, ovvero quando il livello di etanolo è compreso tra 0,2-1,5% che dipende dal tipo di prodotto che si vuole ottenere (Plessi, 2003). Di solito, alla fine di ogni ciclo, una parte del prodotto finito (circa la metà o 2/3) viene prelevata, mentre quella restante viene lasciata nel tino per il ciclo successivo (Tesfaye et al., 2002). Ad ogni modo, la conduzione del processo può avvenire in tre modi differenti:

- in discontinuo, in cui il serbatoio viene svuotato completamente e poi riempito di nuovo;
- semidiscontinuo, in cui si lascia una parte di liquido acetificato nell'acetificatore, in modo da essere utilizzato come aceto madre nel successivo ciclo di acetificazione;
- in continuo, dove la rimozione del liquido di acetificazione ed il rimpiazzo con il substrato da acetificare avvengono simultaneamente. In questo modo, si mantiene costante il volume di substrato necessario per lo sviluppo batterico, in modo da mantenere i batteri sempre nella fase di crescita. Il vantaggio di questi sistemi, sta nella riduzione dei costi di manodopera, nel controllo del processo produttivo che di conseguenza consente di ottenere una migliore qualità del prodotto (Tesfaye et al., 2002).

Gli acetificatori utilizzati (Fig. B), sono dei serbatoi in acciaio inox o in polipropilene rinforzato con fibra di vetro (Plessi, 2003), con una capacità di 100-400 hl (Tesfaye et al., 2002). Si tratta, inoltre, di un processo automatizzato, in quanto nel serbatoio sono annessi dei dispositivi che consentono di controllare il processo. Nella base del serbatoio è inserita una turbina che immette sotto pressione l'aria nel liquido distribuendola uniformemente sotto forma di goccioline molto piccole. L'acetificatore è munito di doppie pareti, in cui è inserito il sistema di raffreddamento dove circola il liquido refrigerante, che ha lo scopo di mantenere costante la temperatura di acetificazione, ossia a 30 °C. Inoltre, c'è la presenza di un termometro per controllare la temperatura, di un alcolometro per controllare la concentrazione di etanolo, di un rotometro per controllare l'alimentazione dell'acetificatore, di un antischiama per evitare la formazione di schiuma, di una valvola di carico e

di scarico che regolano rispettivamente l'entrata e l'uscita del prodotto. Poiché il trasferimento di ossigeno dipende anche dalle dimensioni delle bolle che si formano nel liquido quando l'aria entra nel reattore, è importante anche la presenza di un sistema di agitazione che ha il compito di rompere le bolle d'aria più grandi in più piccole, in modo da farle disciogliere nel liquido rendendole disponibili per i batteri acetici (Tesfaye et al., 2002).

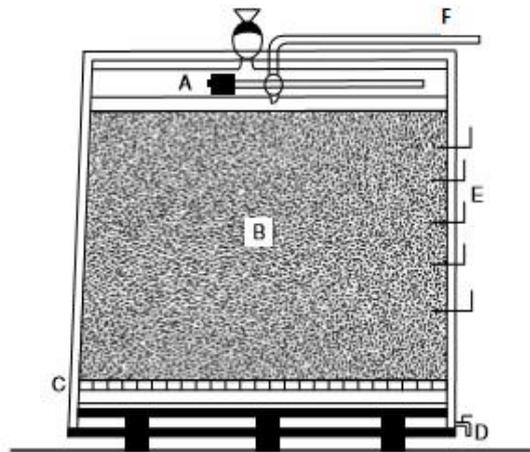
Il vantaggio nell'operare in un sistema automatizzato è quello di poter controllare tutti i parametri che influenzano il processo. Infatti, la produzione giornaliera è 80-90 hl su 200 hl di vino, con il 9% di acidità (Cabras, 2004). Questo significa che la resa in acido acetico è elevatissima, in quanto è compresa tra il 90-95%, poiché le perdite per evaporazione sono ridotte. Tuttavia, lo svantaggio principale è che il prodotto che si ottiene è torbido e meno aromatico rispetto a quello ottenuto col metodo di Orleans. Questo evento, si verifica perché, dato il breve periodo di contatto, le esterasi non hanno abbastanza tempo per eseguire le proprie funzioni, pertanto la formazione delle sostanze volatili è minore (Plessi, 2003). Per migliorare la qualità del prodotto, esso viene filtrato e solo nel caso degli aceti di qualità, viene posto all'interno di botti di legno per completare l'affinamento, ossia la precipitazione dei composti che potrebbero intorbidire il prodotto (Plessi, 2003). Un altro svantaggio riguarda i costi maggiori rispetto alle altre tecniche, a causa dell'elevato consumo di energia per il sistema di raffreddamento. Inoltre, è particolarmente suscettibile alle interruzioni di corrente, in quanto se l'alimentazione dell'ossigeno venisse interrotta, i batteri acetici morirebbero, perché si troverebbero senza alcuna risorsa di ossigeno.



**Figura B:** Schema di un tipico acetificatore utilizzato nel metodo a fermentazione sommersa (Adams, 1999).

### 2.2.3 Generatore

Il sistema di acetificazione (Fig. C) è costituito da un serbatoio di legno o di acciaio, equipaggiato con un termometro per controllare la temperatura, con una serpentina di raffreddamento per mantenere la temperatura a 30 °C, con un irrigatore a spruzzo che alimenta il sistema e con un rubinetto posto alla base della struttura, da cui si raccoglie il liquido acetificato. Esso è suddiviso in due camere divise da una griglia forata; nella camera superiore vengono posti i raspi d'uva o i trucioli di legno (preferibilmente faggio) contenuti i batteri acetici. L'irrigatore spruzza il substrato sui trucioli di legno, il quale sgocciola su di essi fino a quando non raggiunge il fondo. A questo punto l'aria, attraversando la griglia, circola dalla camera inferiore a quella superiore per poi uscire. Successivamente, il liquido viene ri-pompato verso lo spruzzatore che lo spruzza di nuovo all'interno della camera superiore, allo scopo di miscelare bene. Il processo continua fino a quando l'acetificazione non è finita, la cui durata è di circa 3-7 giorni, dopodiché 2/3 del prodotto vengono prelevati dal rubinetto e viene poi eseguito il rimpiazzo con lo stesso volume di liquido fresco. Si tratta di un processo continuo utilizzato soprattutto a livello industriale per produzioni a larga scala, che porta alla produzione di aceti chiari con buone caratteristiche organolettiche. Tuttavia, è lento e la resa finale è bassa, in quanto bisogna considerare che il 20% viene perso a causa di perdite per evaporazione. Inoltre, necessita di manutenzione in quanto i trucioli di legno devono essere cambiati almeno una volta l'anno (Plessi, 2003).



**Figura C:** Design tipico di un generatore: (A) irrigatore a spruzzo, (B) trucioli di legno, (C) griglia da cui entra l'aria, (D) uscita dell'aceto, (E) termometri, (F) uscita dell'aria esausta (Plessi, 2003).

#### 2.2.4 Trattamenti post-fermentazione

Indipendentemente dal tipo di tecnologia utilizzata, dopo essere stato prelevato, il liquido acetificato viene stabilizzato prima di essere imbottigliato. Durante il periodo di stabilizzazione, dei costituenti solubili, quali tartrato, proteine e sostanze tanniche intorbidiscono il prodotto. Questo problema, viene risolto mediante la chiarificazione, che consiste nell'utilizzo di colloidali per far precipitare le sostanze intorbidenti. A tale proposito, viene utilizzato il gel di bentonite per far precipitare le proteine, mentre le sostanze tanniche vengono fatte precipitare tramite l'aggiunta di gelatine o gel di silice. Invece per rimuovere le sostanze tanniche ossidate, si aggiunge il caseinato di potassio. Dopo la chiarificazione, si esegue la filtrazione, allo scopo di rimuovere tutte le sostanze che sono precipitate. Se si tratta di aceto comune, prima dell'imbottigliamento, esso viene pastorizzato a 70°C, allo scopo sia di eliminare i batteri residui che causerebbero la surossidazione dell'aceto a discapito della sua acidità. Per quanto riguarda l'aceto di qualità, si procede all'invecchiamento, in cui avvengono dei processi chimici, come la conversione di acidi organici e costituenti secondari in sostanze aromatiche che andranno a caratterizzare il bouquet dell'aceto. Il periodo di stabilizzazione dipende dal tipo della materia prima utilizzata e dall'acidità del liquido acetificato: maggiore è quest'ultima e maggiore sarà la velocità con cui si stabilizzerà il prodotto.

#### 2.3 Parametri influenzanti il processo fermentativo

La fermentazione acetica è un processo aerobio operato dai batteri acetici, mediante il quale l'etanolo viene ossidato in acido acetico. Tale ossidazione prevede l'intervento di due deidrogenasi di membrana, in cui l'alcol deidrogenasi ossida l'etanolo in acetaldeide, seguita dall'ossidazione dell'acetaldeide in acetato, mediante l'azione dell'acetaldeide deidrogenasi. Al termine della reazione, oltre all'acido acetico si forma anche una molecola di acqua, che deriva dall'ossidazione dell'ossigeno lungo la catena respiratoria da cui si ottengono anche 6 ATP (Plessi, 2003). La reazione può essere sintetizzata come di seguito (Suàrez-Lepe, 1990):



Lo scopo del processo produttivo è quello di ottenere la maggiore resa in acido acetico possibile, ciò è possibile se la fermentazione viene condotta nelle condizioni ottimali. Bisogna considerare che la resa teorica in acido acetico per grammo di etanolo, è di 1,3 g. Tuttavia, la resa reale è inferiore di circa il 15-20% rispetto alla teorica, in quanto bisogna considerare le perdite di etanolo, acido acetico ed acetaldeide, in quanto tendono a volatilizzare (Plessi, 2003).

### 2.3.1 I lieviti

I ceppi di lievito possono influenzare la composizione dell'aceto in termini di composizione dei volatili, contenuto in alcol e quindi in acido acetico (Valles et al., 2005). Esistono circa 32 ceppi diversi di *Saccaromyces cerevisiae* (Maris et al., 2006) che producono differenti concentrazioni di alcol e di acido acetico. Ad esempio, alcuni studi mostrano che a 18°C *Saccaromyces cerevisiae r. bayanus* produce un quantitativo di acido acetico maggiore rispetto a *Saccaromyces cerevisiae r. cerevisiae* (Valles et al., 2005). Inoltre, il contenuto alcolico del vino dipende anche dal tipo di processo fermentativo utilizzato. Infatti, con il metodo di fermentazione spontanea si è riscontrato un grado alcolico inferiore rispetto all'inoculazione (Ubeda et al., 2011). Infatti, negli aceti ottenuti tramite la fermentazione spontanea sono stati riscontrati lieviti non *Saccaromyces*, quali *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Hansienospora* (Solieri e Giudici, 2008).

I fattori che incidono sulla loro crescita sono la concentrazione zuccherina, il pH del mosto, e la temperatura dell'ambiente in cui si trovano. Il mosto d'uva presenta un grado zuccherino intorno ai 15-25° Brix. I lieviti xerofili possono svilupparsi anche in mosti ancor più concentrati, poiché sopravvivono in un intervallo di attività dell'acqua compreso tra 0,61-0,75. Tuttavia, per la maggior parte dei lieviti il livello minimo di attività dell'acqua è di 0,85 (Solieri e Giudici, 2008). Solitamente, la fermentazione alcolica si arresta quando la concentrazione zuccherina è di circa 7 °Brix.

Poiché sono dei microrganismi mesofili, essi si sviluppano tra 20-40°C, tuttavia *Hansienospora* e *Candida* possono crescere anche al di sotto dei 20 °C. Invece, ad una temperatura inferiore ai 20 °C la crescita dei lieviti *Saccaromyces* si blocca, in quanto aumenta la loro suscettibilità all'etanolo (Fleet, 1993; Raineri et al., 1998). Infine, essi possono svilupparsi anche a pH inferiore a 3 (Adams, 1998).

### 2.3.2 I batteri acetici

I batteri acetici destinati alla produzione di aceto vengono selezionati in base alla loro capacità ed alla velocità di ossidare etanolo, alla tolleranza all'etanolo, all'acido acetico, a pH bassi, ai batteriofagi, e alla capacità di produrre cellulosa ed aromi indesiderati. I batteri acetici che vengono riscontrati negli aceti appartengono ai generi *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*. Nella tabella A sono elencate le specie che sono state isolate dall'aceto di vino.

**Tabella A:** Specie di batteri acetici caratteristici dell'aceto di vino (Gullo e Giudici, 2008).

Specie	Riferimento
<i>A. Pasteuranius</i>	Bartowsky et al. (2003)
<i>G. oxydans</i> ; <i>Ga. Hansenii</i>	González et al. (2004)
<i>A. aceti</i>	
<i>A. nitrogenifigens</i>	Dutta e Gachhui (2006)
<i>A. oeni</i>	Silva et al. (2006)

A: *Acetobacter*; G.: *Gluconobacter*; Ga.: *Gluconoacetobacter*

L'abilità di ossidare l'etanolo è il requisito principale per questi microorganismi (Gullo e Giudici, 2008). Tra di essi gli *Acetobacter* ed i *Gluconacetobacter* ossidano con maggiore facilità l'etanolo, mentre per i *Gluconobacter* preferiscono gli zuccheri (Gullo e Giudici, 2008). Infatti, quest'ultimi si sviluppano meglio sulle uve, mentre gli *Acetobacter* ed i *Gluconacetobacter* predominano nelle fasi dell'acetificazione (Joyeux et al., 1984). La tolleranza all'etanolo dipende dalla specie, dal ceppo, e dalle condizioni di temperatura, pH e concentrazione di ossigeno (Drysdale e Fleet, 1988; Du Toit e Pretorius, 2002). Ad ogni modo, è stato visto che i batteri acetici rimangono vitali in un mezzo in cui la concentrazione di etanolo è compresa tra 10-14%. Durante il processo produttivo, la concentrazione di etanolo può essere controllata, caricando la giusta quantità di substrato all'interno dell'acetificatore, la quale dipende dalla concentrazione di etanolo e di acido acetico (Tesfaye et al., 2002). L'istante esatto per evitare inconvenienti (arresto fermentativo quando l'etanolo è in eccesso o la surossidazione quando non è abbastanza) è a fine ciclo, cioè quando la concentrazione di etanolo è pari a 0,1% (Tesfaye et al., 2002). Infine, Tesfaye et al. (2002) hanno osservato che la resa aumenta quando il rapporto tra substrato caricato e batteri acetici è di 1:1.

Un altro fattore che incide sulla crescita microbica è la tolleranza all'acido acetico, la quale è correlata con le caratteristiche ambientali e del substrato. A livello industriale, la tolleranza richiesta è di circa il 12% (Adams, 1998). Anche la concentrazione zuccherina influenza lo sviluppo di questi batteri, i quali non tollerano concentrazioni elevatissime, in quanto non sono osmotolleranti (Gullo et al., 2006).

L'ossigeno è un fattore limite in acetificazione in quanto è l'unico elemento solubile e la sua solubilità è influenzata dalla temperatura e dalla densità del mezzo (Adams, 1998). Inoltre, bisogna considerare che i batteri acetici sono aerobi obbligati, pertanto muoiono se non c'è abbastanza ossigeno. La concentrazione ottimale per lo sviluppo microbico è di 1-3 ppm, la massima è di 8 ppm (Romero et al., 1994), mentre essi sono in grado di ossidare l'etanolo fino a 0,4-0,5 ppm di ossigeno,

ma non possono moltiplicarsi al di sotto di questo livello (Nieto et al., 1993). Durante l'invecchiamento, la presenza dell'ossigeno è limitata nello spazio di testa tra botte e liquido, le quali vengono riempite di circa 3/4 del loro volume complessivo. Oltretutto, l'aria passa anche attraverso le doghe della botte stessa. A livello produttivo, bisogna considerare che per ossidare 1 l di etanolo, servono circa 430 l di ossigeno a 30 °C. Poiché l'ossigeno comprende soltanto il 20% dell'aria, non tutto quel volume sarà consumato dai batteri, pertanto è necessario un volume d'aria maggiore di almeno dieci volte rispetto a quello appena enunciato (Adams, 1998).

La temperatura ottimale di crescita è un parametro molto importante, in quanto influenza la tolleranza dei batteri acetici ai fattori descritti in precedenza e sulla disponibilità di ossigeno disciolto nel substrato. I batteri acetici sono dei microorganismi mesofili, quindi l'intervallo di temperatura ottimale di crescita è compreso tra 25-30 °C (Gullo e Giudici, 2008), la massima è 35 °C (de Ory et al., 1998). Al di sopra di questo intervallo, si verifica l'inattivazione della cellula batterica, grazie alla denaturazione degli enzimi essenziali per la sua vitalità, al danneggiamento delle membrane che a sua volta causa il rilascio delle componenti cellulari. In questa maniera, i microorganismi diventano più suscettibili all'etanolo ed all'acido acetico (de Ory et al., 1998; Ndoye et al., 2006).

Infine, anche la tolleranza ai pH bassi è molto importante, dato che il pH del vino è compreso tra 2,8-3,8. Di norma, il valore ottimale per la crescita dei batteri acetici è tra 5-6,5 (De Ley et al., 1984; Drysdale and Fleet, 1988), ma possono crescere anche a pH molto più bassi, addirittura fino a 2-2,3 (Kittlmann et al., 1989).

#### 2.4 Gli aceti tipici

La categoria degli aceti tipici è legalmente riconosciuta e si differenzia da quelli normali, per ragioni culturali, storiche, o per altre ragioni plausibili. Questi tipi di aceti sono protetti sotto le denominazioni DOP (Denominazione di origine protetta) ed IGP (Indicazione geografica protetta). Gli aceti DOP sono molto costosi e sono prodotti in ridotta o piccola scala, mentre le IGP possono coprire volumi di mercato più grandi (Giudici et al., 2009). Nella tabella B sono riassunte le caratteristiche principali di questi aceti.

**Tabella B:** Requisiti generali per gli aceti tipici (Giudici et al., 2009).

Prodotto	Materie prime ammesse				Invecchiamento	Limite di acidità
	Aceto	Mosto	Zucchero	Caramello		
Vinagre de Jerez	Ammesso	0-50%	Non ammesso	Non ammesso	Ammesso	>7%
Aceto Balsamico di Modena	>10%	>20%	Non ammesso	Max 2%	Min. 60 giorni	>6%
Aceto Balsamico Tradizionale di Modena	Non ammesso	50-100%	Non ammesso	Non ammesso	min. 12 anni	>4,5%
Aceto Balsamico Tradizionale di RE	Non ammesso	50-100%	Non ammesso	Non ammesso	min. 12 anni	>5%

#### 2.4.1 Aceto balsamico Tradizionale di Modena e di Reggio-Emilia (ABTM e ABTRE)

L'ABTM e l'ABTRE sono stati registrati come DOP dalla Comunità Europea il 17 aprile del 2000. I mosti utilizzati come materia prima, devono assolutamente provenire dalle uve prodotte nei territori delle due province e ne deve essere specificata la provenienza. Dunque, possono essere utilizzati i mosti di Lambrusco, Ancellotta, Trebbiano, Sauvignon, Berzamino e Occhio di Gatta (Giudici et al., 2009). I disciplinari di entrambi sono simili, però si differenziano per (Giudici et al., 2009):

- acidità totale minima, la quale è il 4,5% per ABTM ed il 5% per ABTRE;
- densità minima a 20 °C, che è di 1,24 g/ml per ABTM e 1,20 g/ml per ABTRE;
- la forma della bottiglia (Figura D).



**Figura D:** I due aceti balsamici tradizionali DOP (di Reggio Emilia a sinistra e Modena a destra) nelle due bottigliette legalmente registrate.

Per essere immessi in commercio, entrambi devono essere sottoposti ad un'analisi sensoriale condotta da una serie di esperti formati dai Consorzi. Gli attributi valutati sono: l'aspetto visivo, come fluidità, colore e chiarezza; l'aspetto olfattivo come flavour ed aroma in termini di intensità,

persistenza e pungenza; l'aspetto gustativo come intensità, armonia ed acidità. La tabella C elenca quali sono i requisiti sensoriali di un aceto tradizionale.

**Tabella C:** *Requisiti sensoriali generici di un aceto balsamico tradizionale (Giudici et al., 2009).*

<b>Attributi sensoriali</b>	<b>Requisiti</b>
Colore	marrone scuro, vicino al nero ma pieno di lucentezza
Texture	densa ma con consistenza fluida come uno sciroppo
Flavour	limpido e leggermente acido
Aroma	vivido, corposo, intenso, vellutato e persistente

In base al punteggio ottenuto, il Consorzio certifica i due livelli di invecchiamento del prodotto che sono: "Affinato", per aceti invecchiati per almeno 12 anni; "Extravecchio", per quelli invecchiati per almeno 25 anni. Quest'ultima è l'unica dicitura riferita all'invecchiamento che può essere immessa sull'etichetta (Giudici et al., 2009).

La prima fase del processo produttivo è la cottura del mosto all'interno di vasche di acciaio inox, aperte e riscaldate a fuoco vivo. La cottura viene condotta vicino alla temperatura di ebollizione per 12-24 ore (Giudici et al., 2009). Il riscaldamento causa la formazione di schiuma e di colloidali naturali, costituiti soprattutto da proteine coagulate, i quali vengono rimossi meccanicamente dalla superficie del mosto (Giudici et al., 2009). Dopodiché la temperatura si riduce e viene mantenuta a 85-95 °C (Solieri e Giudici, 2008). La cottura si arresta quando la concentrazione del mosto raggiunge i 35-60 °Brix (Solieri e Giudici, 2008), e l'umidità si è ridotta di circa il 30% (Giudici et al., 2009). La cottura causa l'arresto dell'imbrunimento enzimatico, in quanto si denaturano le fenolo ossidasi (Giudici et al., 2009); tuttavia, promuove l'imbrunimento non-enzimatico, grazie alla formazione di pigmenti scuri come le melanoidine (Giudici et al., 2009). Quest'ultime, essendo delle sostanze antimicrobiche (Giudici et al., 2009), possono dare dei problemi durante le fasi di fermentazione. Inoltre, si formano dei composti tossici e cancerogeni, derivanti dal furano, tra i quali il più importante è il 5-idrossimetil-furfurale (Solieri e Giudici, 2008). Dopo la cottura, il mosto cotto sterile viene trasferito all'interno delle vasche di legno aperte, dove viene lasciato fermentare, mediante la fermentazione spontanea. La produzione di questi aceti non prevede l'inoculo (Solieri e Giudici, 2008).

Le prime fasi della fermentazione alcolica sono dominate dai lieviti osmofili (50-60 °Brix), appartenenti al genere *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii*, *Z. mellis*, *Z. bisporus*, *Z. rouxii* e *Z. pseudorouxii*), *Candida* (*C. lactis* e *C. stellata*) e *Hansenospora* (*H. osmophila* e *H. valbyensis*)

(Giudici et al., 2006), mentre le fasi finali, in cui il grado zuccherino è più basso, sono dominati dai lieviti del genere *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) (Solieri et al., 2006). Oltre alla produzione di etanolo, dalla fermentazione si formano numerosi composti volatili, quali acido succinico, glicerolo, etil-acetato, acetoino, acetato e acetaldeide (Ciani, 1998; Ciani e Maccarelli, 1998; Granchi et al., 2002). Al termine della fermentazione alcolica, si avvia la fermentazione acetica, sempre in modo spontaneo (Giudici et al., 2009). I batteri acetici rilevati sono *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter malorum* (De Vero et al., 2006a; Gullo and Giudici, 2006). Al termine della fermentazione, si procede con l'invecchiamento.

L'invecchiamento viene condotto all'interno di almeno cinque botti di legni differenti, quali castagno, acacia, ciliegio, quercia, gelso, frassino e ginepro (Giudici et al., 2009). Generalmente, il tipo di legno della botte incide sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finale. Le botti sono disposte in ordine di volume decrescente, partendo da 75 l a 16 l. La figura E mostra la procedura del "rincalzo", che viene effettuata almeno una volta l'anno. Essa consiste nel prelevare un'aliquota di aceto dalla botte più piccola, che contiene l'aceto pronto, la quale viene poi riempita con una stessa quantità di aceto proveniente dalla botte precedente. Questa procedura continua fino alla botte più grande, la quale viene riempita con la stessa quantità di mosto cotto (Giudici et al., 2009). Lo scopo di questa procedura è quello di mantenere costante il volume di liquido all'interno delle botti, considerando sia il volume prelevato che quello perso per evaporazione (Giudici et al., 2009). Le perdite per evaporazione si verificano a causa della presenza di buchi o di difetti nelle pareti delle botti. Inoltre, durante l'invecchiamento si verifica la precipitazione dei soluti, grazie alla presenza di pori nel legno delle botti, il quale si comporta da setaccio (Siau, 1984). Il tempo di residenza dell'aceto nelle botti dipende dalle perdite per evaporazione ed il trasferimento di massa tra aceto e botte.

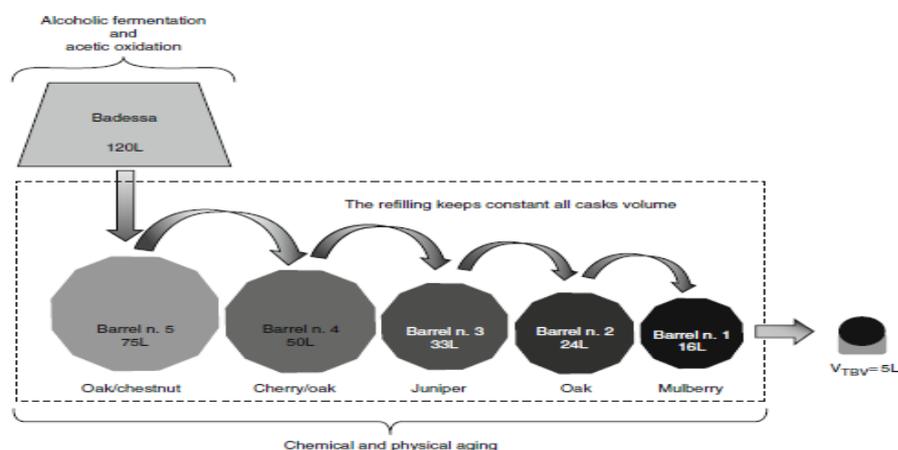


Figura E: Processo del rincalzo (Giudici et al., 2009).

#### 2.4.2 Aceto balsamico di Modena (ABM)

L'ABM non deve essere scambiato con l'ABTM, in quanto sono prodotti totalmente differenti. È un IGP e viene prodotto ugualmente nelle province di Modena e Reggio-Emilia. La differenza sostanziale risiede nella materia prima. Infatti, l'ABM si ottiene a partire da una miscela costituita da:

- almeno il 20% di mosti derivanti dalle uve della zona (già elencate nel paragrafo precedente), parzialmente fermentati e/o cotti e/o concentrati, dove la concentrazione viene portata fino a quando il mosto non raggiunge una densità superiore a 1,240 alla temperatura di 20 °C. Il mosto per essere impiegato deve possedere almeno 8 g/kg di acidità totale minima e 55 g/kg di estratto secco minimo;
- un'aliquota di aceto invecchiato almeno 10 anni per conferire al prodotto le caratteristiche organolettiche della zona;
- 10% di aceto di vino;
- 2% di caramello per stabilizzare il colore ma è vietata l'aggiunta di qualsiasi altra sostanza.

Il processo di acetificazione può avvenire mediante il metodo a fermentazione sommersa, che prevede l'inoculo di colture starter, oppure tramite il metodo di Orleans, dove la fermentazione è spontanea. In ogni caso, l'acetificazione e l'affinamento avvengono in recipienti di legno pregiato, quali quercia, rovere, castagno, gelso e ginepro, per un minimo di 60 giorni, a partire da quando è terminato l'assemblaggio delle materie prime. Nell'etichetta degli aceti invecchiati 3 anni, è possibile inserire la dicitura "invecchiato", però oltre ad essa non è consentita nessun'altra dicitura relativa all'invecchiamento.

Secondo il disciplinare, le fasi del processo che devono verificarsi obbligatoriamente all'interno della zona delineata sono: l'assemblaggio delle materie prime, l'elaborazione, l'affinamento e l'invecchiamento.

Prima dell'immissione in commercio, l'aceto ABM viene valutato da un panel di assaggiatori, formato dallo stesso Consorzio. Nella tabella D sono elencati tutti i requisiti che deve avere prima di essere commercializzato.

**Tabella D:** Requisiti per l'immissione in commercio dell'Aceto Balsamico di Modena (Disciplinare di produzione).

<b>Attributi</b>	<b>Requisiti</b>
Limpidezza	limpido e brillante
Colore	bruno intenso
Odore	caratteristico, persistente, intenso e delicato
Sapore	gradevolmente acetico, con eventuali note legnose
Densità a 20°C	agrodolce, equilibrato, caratteristico
Titolo alcolometrico effettivo	>1,06 per il prodotto affinato
Estratto secco minimo	<1,5% in volume
Acidità totale minima	30 g/l
Anidride solforosa totale	6%
Ceneri	<100 mg/l
Zuccheri riduttori	>2,5 parti per mille
	>110 g/l

#### 2.4.3 Aceto di Sherry: Vinagre de Jerez

Il Vinagre de Jerez, è una tipologia di aceto prodotta nella regione spagnola dell'Andalusia, mediante la fermentazione alcolica dei vini prodotti in quella regione: vino Jerez, Pedro Ximénez ed il Moscatel. Essi vengono prodotti mediante il metodo "solera", che consiste in una serie di 3-8 botti sovrapposte. Il substrato arriva nell'ultima botte posizionata in alto e il prodotto finale viene prelevato dalle botti dell'ultima fila in basso, il quale rappresenta quello più vecchio. Il volume trasferito non supera mai 1/3 del volume totale. Una volta prelevata l'aliquota di aceto dalle botti della prima fila, esse vengono riempite con la stessa aliquota proveniente dalla fila successiva, la quale viene riempita dall'aceto proveniente dalle botti successive. In questo modo, si ottiene l'omogeneizzazione di tutto il sistema (Tsfaye et al., 2002).

#### 2.5 Autenticazione

La qualità finale dell'aceto dipende dalla materia prima usata come substrato, il sistema di acetificazione utilizzato e l'invecchiamento in botte (Morales et al., 2001). In generale, la caratterizzazione degli aceti si basa sui parametri seguenti: la densità relativa, l'acidità totale (grammi di acido acetico su 100 ml di aceto), l'acidità fissa (grammi di acido tartarico su 100 ml di aceto), l'acidità volatile, differenza tra acidità totale e fissa), i solidi totali, le ceneri, l'etanolo, l' azoto totale, il tasso di ossidazione (alcoli ed acetoino sono i fattori che lo influenzano maggiormente), tasso di iodio (è influenzato dall'acetoino e diacetile), concentrazione in esteri (Plessi, 2003). Inoltre, è possibile eseguire la valutazione sensoriale dell'aceto, in cui si valutano il colore, l'aroma ed il gusto (Plessi, 2003). Nel caso in cui l'aceto fosse torbido, bisogna eseguire delle analisi per vedere se si

tratta di una contaminazione da *Anguilla aceti*, si tratta di un nematode tipico parassita dell'aceto (Plessi, 2003).

### 2.5.1 *Contenuto in polialcoli*

Un parametro molto importante è il contenuto in polialcoli, che dipende principalmente dalla materia prima utilizzata, dato che rimane inalterato dopo la fermentazione acetica (Antonelli et al., 1994; Gerbi et al., 1995). Esso è utile per differenziare un aceto di vino di qualità da uno di qualità inferiore, prodotto da un vino con un tasso alcolico basso (Tesfaye et al., 2002). Questo parametro è molto utile per discriminare gli aceti Sherry, grazie alle caratteristiche particolari dei vini utilizzati (Antonelli et al., 1997).

### 2.5.2 *Contenuto in amminoacidi*

Gli aceti possono essere discriminati anche in base al contenuto di amminoacidi, poiché esso dipende dalla materia prima (Alvarez et al., 2014; Valero et al., 2005), dalla tecnologia di acetificazione utilizzata (Maestre et al., 2008) e dalla sua durata (Callejòn et al., 2008). I batteri acetici ed i lieviti utilizzano gli amminoacidi come fonte di azoto (Callejòn et al., 2010). Gli aceti ottenuti con il metodo di Orleans (fermentazione lenta) e con invecchiamento molto lungo, presentano un quantitativo di amminoacidi inferiore rispetto a quelli ottenuti con il metodo di fermentazione a coltura sommersa (fermentazione rapida) e con invecchiamento breve (Callejòn et al. 2008). Inoltre, bisogna considerare che durante la cottura dei mosti si verifica la reazione di Maillard, la quale potrebbe causare la riduzione degli amminoacidi (Palacios et al, 2002). Quindi, da ciò che è stato detto, si presume che nell'ABTM e nell'ABTRE, in cui il processo fermentativo e invecchiamento sono lunghi, il contenuto amminoacidico sia inferiore rispetto all'ABM, dove il processo fermentativo e invecchiamento sono più brevi (Callejòn et al. 2008). Gli amminoacidi più rappresentativi sono la prolina, glicina, acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), arginina e treonina, le quali rappresentano circa il 75% degli amminoacidi totali (Chinnici et al., 2015). La prolina è considerata una delle maggiori riserve di azoto per i batteri acetici (Àlvarez-Càliz et al., 2014; Valero et al., 2005; Callejòn et al., 2008; Àlvarez-Càliz et al., 2012) in quanto, in assenza di ossigeno, i lieviti non la possono consumare durante la fermentazione (Valero et al., 2003). Normalmente, la sua concentrazione diminuisce durante l'invecchiamento, tuttavia ciò dipende dal tipo di ceppo batterico che predomina la fase di fermentazione, in quanto il suo livello nell'aceto potrebbe rimanere invariato o aumentare (Palaciòs et al., 2002; Callejòn et al., 2008). Quindi negli ABTM e ABTRE ci si aspetta un quantitativo inferiore, rispetto all'ABM e agli aceti spagnoli (Chinnici et al., 2015). La prolina nell'aceto è presente in tutte e due le forme stereoisometriche, il cui rapporto viene utilizzato come marker dell'invecchiamento degli ABTM, ABTRE e ABM (Chiavaro et al., 1998; Erbe et al., 1998). La L-

prolina è la forma con cui la prolina si trova in natura, pertanto la sua concentrazione indica che l'aceto è stato ottenuto partendo da mosto d'uva o da vino (Tesfaye et al., 2002), mentre la D-prolina deriva dalla reazione di Maillard e si accumula durante l'invecchiamento, però non deriva dall'isomerizzazione della L-prolina (Erbe and Bruckner, 2000). L'asparagina, invece, viene consumata durante la fermentazione e l'invecchiamento, in quanto è uno dei fattori di crescita maggiormente richiesto dagli *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* (Chinnici et al., 2015). Ad ogni modo, essa potrebbe risultare negli aceti più giovani, come ABM e Vinagre de Jerez poco invecchiati (Chinnici et al., 2015). Lo stesso discorso vale per GABA, il cui contenuto si riduce con l'invecchiamento (Chinnici et al., 2015).

### 2.5.3 *Contenuto in ammine biogene*

Un altro parametro con cui si può caratterizzare un aceto è il contenuto in ammine biogene (ten Brink et al., 1990). Le ammine biogene sono delle sostanze, tossiche (soprattutto in presenza di alcol) e non (Bauza et al., 1995), che derivano dalla decarbossilazione degli amminoacidi. Esse derivano dal mosto, dal vino e dalla tecnologia di produzione utilizzata (Chinnici et al., 2015), ma non vengono prodotte dai batteri acetici, in quanto non possiedono le decarbossilasi necessarie per produrle (Landete et al., 2007). Esse consentono di differenziare un aceto prodotto con il metodo di Orleans da uno con quello a coltura sommersa. Infatti, in ABTM e ABTRE il contenuto in ammine biogene è inferiore rispetto a quello degli altri aceti, mentre alcune (tiramina e putrescina) sono addirittura assenti (Chinnici et al., 2015). Ciò sembra sia dovuto alla presenza predominante dei lieviti *Zygosaccharomyces*, che presentano una minor attitudine a produrre ammine biogene rispetto a quella dei *Saccharomyces*, che predominano la fermentazione alcolica negli altri aceti. Inoltre, durante la produzione di ABTM e ABTRE, non si verifica la fermentazione malolattica, processo chiave per la produzione di ammine. Ad ogni modo, il contenuto in ammine biogene non è tale da causare danni alla salute umana (Chinnici et al., 2015).

### 2.5.4 *Composti volatili*

Gli aceti possono essere discriminati anche in base al contenuto di sostanze volatili, la cui combinazione caratterizza l'aroma del prodotto (Callejòn et al., 2009). Più di settanta componenti sono state identificate, in cui sono inclusi alcoli, esteri, carbonili, acidi, fenoli, lattoni e acetali (Callejòn et al., 2009). Le sostanze più rappresentative sono l'acido acetico, l'acetato di etile e l'acetaldeide. Tuttavia, la qualità dell'aceto viene influenzata anche dai composti minori che si formano soprattutto durante l'invecchiamento in bottiglia o in botti di legno (Callejòn et al., 2009) e la loro concentrazione dipende sia dalla tecnologia di acetificazione impiegata (Callejòn et al., 2009), che dal tipo di legno utilizzato per l'acetificazione e l'invecchiamento (Callejòn et al., 2010). Queste

sostanze sono difficili da determinare, a causa della loro bassissima concentrazione (<mg/l) e della facilità con cui volatilizzano (Callejòn et al., 2009).

Indipendentemente dalla tecnologia impiegata, il processo di acetificazione porta all'aumento dei composti volatili. Tuttavia, questo aumento è meno significativo nel processo a coltura sommersa, in cui esso è pari al 6%, in quanto l'elevata areazione causa la perdita dei composti volatili, i quali vengono trasportati fuori dall'acetificatore dall'aria esausta (Morales et al., 2001b). Durante la fermentazione alcolica, i lieviti producono il substrato per lo sviluppo dei batteri acetici, costituito da etanolo ed alcoli secondari, quali 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-feniletanol, 1-esanol e l'isobutanol, che derivano dal metabolismo degli amminoacidi (Bayonove et al., 2000). I batteri acetici ossidano questi alcoli nei rispettivi acidi grassi (Nieto et al., 1993), con aumento della concentrazione in acido isovalerico, acido esanoico ed ottanoico (Callejòn et al., 2009). La produzione di questi acidi è più accentuata nel sistema a coltura sommersa, in cui l'acido grasso più rappresentativo è l'acido isovalerico (Callejòn et al., 2009). Questo elemento, conferisce l'aroma di formaggio e di piede (Aznar et al., 2001) pertanto diventa un off-flavour se supera la soglia di percezione nell'aceto (150 µg/l) (Callejòn et al., 2009). Inoltre, nella coltura sommersa il consumo di 3-metil-1-butanol è più rapido rispetto al 2-metil-1-butanol (Nieto et al., 1993), mentre si verifica l'aumento dell'isobutanol (Guerrero et al., 2006). Si riscontra il comportamento opposto per quanto riguarda il metodo di Orleans (Nieto et al., 1993; Guerrero et al., 2006). Oltre all'ossidazione degli alcoli, durante la fermentazione acetica si verifica l'idrolisi degli esteri etilici, grazie al consumo di etanolo causato dai batteri acetici (Callejòn et al., 2009), da cui si libera il rispettivo acido. Quindi si assiste alla riduzione del contenuto del propionato di etile, del butirrato di etile, esanoato di etile, lattato di etile, isovalerato di etile e succinato di etile, ma non si assiste al consumo dell'isobutirrato di etile (Callejòn et al., 2009). Ad ogni modo, il tasso di idrolisi dipende dalla durata dell'acetificazione, in quanto più essa è maggiore e più alto sarà il tasso di idrolisi, e dalle specie di batteri acetici presenti (Callejòn et al., 2008). Questo significa che il contenuto in esteri etilici è maggiore in un aceto ottenuto mediante coltura sommersa, anziché con il metodo di Orleans (Callejòn et al., 2009). Nel metodo di Orleans, si verifica l'aumento significativo della concentrazione di acetoino fino a 209-339 mg/l (Callejòn et al., 2009). Si tratta di un composto che presenta aroma di burro o mandorle, che deriva dalla fermentazione alcolica, pertanto il suo contenuto dipende dal vino utilizzato (Pizzarro et al., 2008). Inoltre, con il metodo di Orleans si ottengono degli aceti con un tasso di esteri acetici maggiore rispetto a quelli ottenuti con la coltura sommersa (Callejòn et al., 2009). Si tratta di sostanze aromatiche che conferiscono l'aroma di fruttato (Du Plessis, 1983). Gli esteri acetici, sono le componenti volatili maggiore dopo gli alcoli (3,4-12,6 g/l) (Callejòn et al., 2010) e derivano dall'esterificazione di un alcol con l'acido acetico (Morales et al., 2001a). Tra di essi, il

più rappresentativo è l'acetato di etile, seguito dall'acetato di metile (Callejòn et al., 2010). Questi due composti, sono gli unici esteri acetici a non conferire l'aroma di fruttato al prodotto (Callejòn et al., 2010). Ci sono anche degli esteri acetici minori che caratterizzano l'aroma dell'aceto, come il 2-fenil-etil-acetato ed i propil-, isobutil-, isoamilacetati (Callejòn et al., 2009). Poiché sono delle sostanze altamente volatili, il contenuto in esteri acetici è maggiore negli aceti prodotti con il metodo di Orleans, in quanto non avviene la stessa reazione che si verifica nel metodo di fermentazione a coltura sommersa (Callejòn et al., 2009). Inoltre, durante l'acetificazione ci sono maggiori perdite in acetaldeide diacetilacetale, in cui i batteri acetici utilizzano l'acetaldeide come substrato per produrre acido acetico (Callejòn et al., 2009). La riduzione di questo composto è maggiore con il metodo di Orleans, in quanto il substrato è a contatto con i batteri per un lungo periodo di tempo (Callejòn et al., 2009). Infine, durante l'acetificazione si registra anche la riduzione del  $\gamma$ -butirrolattone (Callejòn et al., 2009).

Durante l'invecchiamento si verifica l'aumento dei composti volatili, dovuti soprattutto al passaggio delle sostanze aromatiche dal legno delle botti al prodotto (Gonzalez et al., 2008) e anche all'attività microbica (Callejòn et al., 2009). Inoltre, l'acetificazione in vasche di legno, consente di effettuare contemporaneamente fermentazione ed invecchiamento (Callejòn et al., 2010). Ad ogni modo, durante l'invecchiamento si verifica l'aumento degli esteri, il quale è indipendente dal contatto con il legno, ma è influenzato dall'ammontare di acidi, alcoli, temperatura e pH (Callejòn et al., 2010). Per quanto riguarda gli esteri acetici, l'acetato di etile, il suo contenuto varia in base al processo di invecchiamento. Diversi studi effettuati, hanno dimostrato che esso aumenta durante l'invecchiamento di ABM, mentre diminuisce negli aceti di Sherry (Callejòn et al., 2010). Il discorso è diverso per l'acetato di etile, il quale aumenta durante la maturazione, soprattutto negli aceti di vino rosso, causato dalla concentrazione di metanolo maggiore rispetto ai vini bianchi (Ribéreau-Gayon et al., 2006) ed all'ambiente acido (Callejòn et al., 2009). Invece, in tutti gli esteri etilici si verifica l'aumento della concentrazione, allo scopo di raggiungere l'equilibrio chimico durante la maturazione (Callejòn et al., 2010). Tra questi composti, l'aumento significativo si è registrato in isobutirrato di etile, isovalerato di etile, propionato di etile ed esanoato di etile (Callejòn et al., 2009). Aldeidi e lattoni, raggiungono il picco nelle fasi finali dell'invecchiamento, soprattutto negli aceti di Sherry. Gli aceti maturati in bottiglia, presentano un contenuto maggiore di sostanze volatili rispetto a quelli maturati in botte. Infatti, alcoli ed aldeidi sono significativamente maggiori in quelli in bottiglia (Callejòn et al., 2010), in quanto l'attività batterica è ridotta a causa della scarsa disponibilità di ossigeno. Tuttavia, negli aceti invecchiati nelle botti di legno c'è maggiore acido acetico, dovuto appunto all'attività dei batteri acetici, anche se negli aceti in bottiglia si verifica un lieve aumento (da 0,1 a 0,7 g/ml) (Callejòn et al., 2010). In entrambi i sistemi, l'acetato di etile si riduce

significativamente, in quanto i batteri acetici lo utilizzano come fonte di etanolo (Callejòn et al., 2010). Inoltre, negli aceti imbottigliati, si verifica l'aumento di diacetile, in seguito all'ossidazione dell'acetoino (Callejòn et al., 2010). Una sostanza aromatica caratteristica degli aceti maturati in bottiglia è il limonene, un monoterpene che conferisce l'aroma di limone. Esso è totalmente assente negli aceti invecchiati nelle botti, in cui sembra che esso venga assorbito dal legno della stessa botte (Garde-Cerdà et al., 2006), soprattutto se vengono utilizzate delle nuove botti (Callejòn et al., 2010). D'altra parte, con l'invecchiamento in botte si consente il passaggio delle sostanze caratteristiche del legno stesso verso il prodotto (Callejòn et al., 2010). Questo processo si verifica anche durante l'acetificazione nei tini di legno, come avviene nel metodo di Orleans, in quanto il legno può rilasciare i precursori che verranno trasformati in sostanze aromatiche durante l'invecchiamento (Callejòn et al., 2010). Quercia e ciliegio sono i materiali migliori per le botti destinate a tale scopo (Callejòn et al., 2010). Il ciliegio rilascia un elevato contenuto di aromi di frutti rossi (Baily et al., 2006), i quali sono benzoato di etile, acetofenone e benzaldeide. Invece, castagno e quercia conferiscono l'aroma di vanillina e di eugenolo (Callejòn et al., 2009). I lattoni della quercia sono i costituenti aromatici principali e conferiscono al prodotto il caratteristico aroma di legno (Cerezo et al., in press). Infatti, negli aceti invecchiati in queste botti, il livello dei lattoni della quercia sono venti volte maggiori rispetto alla soglia di percezione (78 µg/l) (Callejòn et al., 2008a). Oltre a questi composti, nel legno di quercia risiedono anche altre sostanze aromatiche come i derivati guaiacolo e i lattoni del whiskey (Sefton et al., 1993). Il contenuto di queste sostanze può essere aumentato tramite la tostatura delle doghe, dalla quale deriva anche la formazione di furani e di aldeidi (Guchu et al., 2006). Tra i composti furanici, i più caratteristici sono la 2-furfuraldeide e la 5-metil-2-furfuraldeide, che si originano rispettivamente dalla degradazione termica delle emicellulose e delle cellulose (Bozalongo et al., 2007). La loro concentrazione negli aceti è molto elevata, però sono scarse le possibilità che ecceda la soglia massima (Callejòn et al., 2009). Infatti, ciò è stato dimostrato con la 2-furfuraldeide, in cui la concentrazione riscontrata negli aceti è compresa tra 1,33-4,53 mg/l (Callejòn et al., 2009), ma non supera la soglia di percezione che è di 6,2 mg/l (Tesfaye et al., 2008). Tuttavia, la concentrazione finale di questi composti, dipende dalla durata dell'invecchiamento, in quanto se fosse prolungato ci sarebbe il rischio di oltrepassare la suddetta soglia (Tesfaye et al., 2002). Infine, è stato riscontrato l'aumento della 2-furfuraldeide, anche negli aceti invecchiati in bottiglia per un anno (Pérez-Prieto et al., 2003).

## 2.6 *Difetti dell'aceto*

Durante la produzione di aceto si possono verificare degli arresti di fermentazione, che causano un basso livello di acido acetico e pH elevato, che portano allo sviluppo di microrganismi alterativi. Oltre a queste problematiche, si può verificare anche la produzione di molecole di polisaccaridi extracellulari. (Gullo e Giudici, 2008).

### 2.6.1 *Infezioni batteriche*

Le infezioni batteriche inducono la lisi delle cellule dei batteri acetici, causando l'arresto fermentativo. Il problema riguarda soprattutto il sistema di fermentazione a coltura sommersa, in cui la limitata diversità dei ceppi dei batteri acetici comporta una maggiore suscettibilità nei confronti dei fagi. Invece, nel metodo di Orleans, in cui la fermentazione è spontanea, la biodiversità è elevata, pertanto c'è maggiore differenza nella suscettibilità verso i fagi. Infatti, in questo caso, la fermentazione acetica rallenta senza fermarsi (Gullo e Giudici, 2008). Per risolvere questo problema, basta utilizzare dei substrati pastorizzati, dei filtri dell'aria sterili e rimuovere i sedimenti di aceto dai fermentatori (Sellmer et al., 1992)

### 2.6.2 *La surossidazione*

La surossidazione consiste nel consumo di acido acetico attraverso la via del ciclo di Krebs, con produzione di acqua ed anidride carbonica. Questo si verifica quando nel substrato c'è un elevato tasso di ossigeno, ma l'etanolo è assente (Gullo e Giudici, 2008). I generi dei batteri acetici responsabili sono gli *Acetobacter* ed i *Gluconacetobacter*, mentre i *Gluconobacter* non sono in grado di surossidare l'acido acetico, perché non sono muniti dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi e della succinato deidrogenasi, enzimi chiave del ciclo di Krebs (Greenfield e Claus, 1972; Du Toit e Pretorius, 2002). In *Acetobacter aceti* è stata riscontrata una crescita diauxica suddivisa in tre fasi di crescita: nella prima fase avviene l'ossidazione dell'etanolo e la crescita continua fino alla fase stazionaria; successivamente rimangono nella fase stazionaria fino a quando le risorse di etanolo non sono finite; infine, le cellule iniziano a surossidare l'acido acetico, in cui si registra una nuova fase di crescita (Matsushita et al., 2005). La surossidazione è un problema che è presente soprattutto se la temperatura ed il tasso alcolico non vengono controllati. Essa è molto frequente nei paesi tropicali e a clima temperato (Saeki et al., 1997).

### 2.6.3 *Polisaccaridi extracellulari*

*Gluconacetobacter xylinus*, è in grado di produrre un'elevata concentrazione di cellulosa (Swings, 1992), usando come risorse di carbonio il mannitolo, il saccarosio e il glucosio, associati ai peptoni e solfato di ammonio (Ramana et al., 2000). Oltre alla cellulosa, dal metabolismo del glucosio, i batteri acetici sintetizzano anche destrani e levani, i quali danno problemi di filtrazione e

sono sensorialmente indesiderati (Gullo e Giudici, 2008). Essi si presentano sotto forma di un sottile strato sulla superficie dei barili (Hwang et al., 1999).

#### 2.6.4 Altre alterazioni

Durante la fermentazione si potrebbe verificare anche l'effetto opposto della surossidazione, in cui il processo biochimico si blocca alla formazione dell'acetaldeide, la quale si accumula apportando il suo aroma caratteristico. Anche il colore può essere inalterato a causa di processi ossidativi, come la casse ferrica e la casse ossidasica, che portano ad imbrunimenti nell'aceto. La casse ferrica è dovuta alla presenza di ferro che, combinandosi coi tannini, forma il tannato ferroso, il quale reagisce con l'acido acetico e si trasforma in acetato ferroso. Successivamente, quest'ultimo a contatto con l'aria si ossida a sale ferrico di colore scuro. Invece, la casse ossidasica si verifica per azione delle ossidasi presenti nel vino. La casse ferrica può essere risolta mediante la filtrazione su carbone, mentre la casse ossidasica è difficile da eliminare. L'aceto, oltre ad essere contaminato da microorganismi, può essere soggetto anche allo sviluppo di *Aguilulla aceti*, un nematode che si sviluppa nell'aceto quando l'acidità è inferiore al 6% e compete con gli *Acetobacter* per l'ossigeno. Pur non essendo nocivo per l'uomo, questo aceto non può essere immesso in commercio. Infine, altre contaminazioni possono derivare anche dal moscerino dell'aceto, che inquina il prodotto agendo da vettore di microorganismi indesiderati, e dagli acari, i quali sono meno frequenti del moscerino, ma sono più difficili da eliminare.

#### 2.7 Molecole bioattive ed effetti benefici sulla salute

Nell'aceto sono presenti sostanze con attività antimicrobica, antipertensiva, antiossidante, lipolitica, antidiabetica e che stimolano l'appetito.

Gli acidi organici (acido acetico, acido succinico, acido tartarico e acido lattico) (Madrera et al., 2010) sono le sostanze antimicrobiche presenti nell'aceto. Essi si diffondono attraverso la membrana cellulare ed entrano all'interno della cellula microbica, portandola alla morte (Booth e Kroll, 1989). Inoltre, l'acido acetico è un antidiabetico, in quanto possiede l'attività di far aumentare l'assorbimento di glucosio nei tessuti, causandone la riduzione nel sangue (Fushimi et al., 2001). A tale scopo, si è verificata la riduzione della curva dell'insulina del 20%, dopo che ai soggetti in esame fu somministrato del saccarosio con dell'aceto (Ho et al., 2017). Un altro beneficio apportato dall'acido acetico, è quello della riduzione del colesterolo e dei trigliceridi nel sangue (Fushimi et al., 2006), in quanto è in grado di aumentare l'omeostasi lipidica (Ho et al., 2017). L'apporto di acido acetico può anche portare ad un miglioramento delle abilità cognitive, grazie alla sua capacità di produrre lipidi alcalini stabili (ASL) (Fukami et al., 2010). Gli ASL sono i precursori dei sfingolipidi, che sono costituiti da acido sialico e oligosaccaridi coniugati alla ceramide (Fukami et al., 2010). Di

questi sfingolipidi, è stata dimostrata la loro capacità di migliorare gli effetti nei pazienti affetti da Alzheimer (Svennerholm, 1994). Infine, l'acido acetico è in grado di far ridurre la pressione sanguigna, in quanto riduce l'attività della rennina (l'enzima che attiva la reazione iniziale della contrazione dei vasi sanguigni) e degli ACE inibitori (Ho et al., 2017).

L'apporto dei polifenoli è essenziale grazie alla loro attività antiossidante. È stato dimostrato che con l'apporto di queste sostanze, si riduce il rischio di perossidazione lipidica, ipertensione, infiammazioni varie, danni al DNA e cancro (Chou et al., 2015; Osada et al., 2006; Prior e Cao, 2000). Attraverso l'anello benzenico, essi sono in grado di donare un elettrone al radicale libero bloccandone l'ossidazione (Qui et al., 2010). I polifenoli più rappresentativi sono l'acido clorogenico, che blocca l'ossidazione delle LDL (low-density lipoproteins), prevenendo le malattie cardiovascolari (Laranjinha et al., 1994); e le catechine, il cui contenuto è molto elevato negli aceti balsamici tradizionali (Verzelloni et al., 2007). Altre sostanze presenti nell'aceto che possiedono proprietà antiossidanti, sono i carotenoidi, i fitosteroli, vitamina C e vitamina E (Charoenkiatkul et al., 2016).

Negli ABTM, ABTRE e ABM, durante la cottura del mosto si verifica la reazione di Maillard, che porta alla formazione delle melanoidine e dei composti furanoidi. Le melanoidine sono accettate grazie alle loro proprietà benefiche quali: antiossidante (Delgado-Andrade e Morales, 2005; Rufian-Henares e Morales, 2007; Verzelloni et al., 2007), antimicrobica (Rufian-Henares e Morales, 2007), antipertensiva (Rufian-Henares e Morales, 2007), prebiotica (Borrelli e Fogliano, 2005). D'altra parte esse sono criticate, in quanto chelano i metalli essenziali, riducendone la biodisponibilità (O'Brian e Morrissey, 1989). Invece, tra i composti furanoici, il più rappresentativo è il 5-idrossimetil-furfurale (HMF), ma ci sono anche l'acido furoico, la formaldeide e l'acetossimetilfurfurale. Queste sostanze, sono cancerogene, citotossiche e genotossiche (Janowski et al., 2000; Zhang et al., 1993).



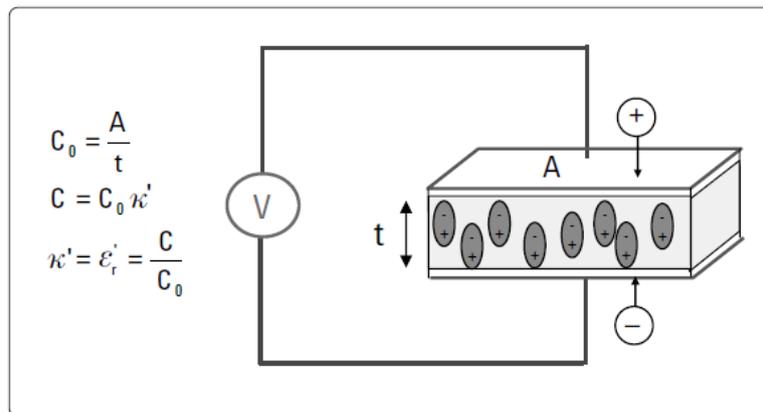
### 3 LE PROPRIETÀ DIELETTRICHE

I prodotti alimentari possiedono delle caratteristiche che possono essere valutate mediante l'analisi delle proprietà dielettriche. La conoscenza di queste proprietà potrebbe risultare utile per il monitoraggio dei processi produttivi allo scopo di migliorare la qualità dei prodotti stessi, caratterizzarli e/o scoprire la presenza di eventuali frodi (Cataldo et al., 2012).

#### 3.1 Teoria dielettrica

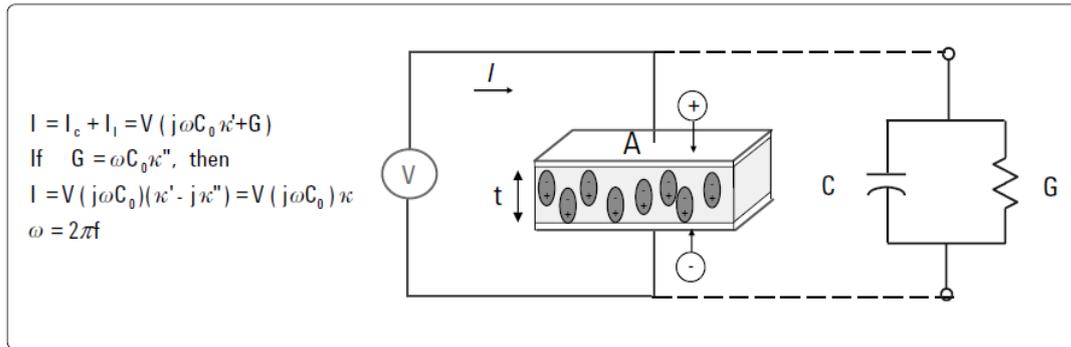
##### *3.1.1 Costante dielettrica*

Esprime la capacità di un materiale di immagazzinare energia quando viene applicato un campo elettromagnetico. Se, in regime di corrente continua un dielettrico viene posto tra due piatti paralleli di un condensatore, la capacità di quest'ultimo aumenta ed è correlata alla costante dielettrica mediante la relazione mostrata in figura F, dove  $C$  e  $C_0$  sono rispettivamente le capacità con e senza dielettrico, mentre  $k'$  è la costante dielettrica reale che coincide con la permittività reale,  $A$  e  $t$  sono rispettivamente l'area dei piatti paralleli del condensatore e la distanza tra di essi.



*Figura F: Condensatore a piatti paralleli (Agilent).*

In caso di corrente alternata (Figura G), la corrente risultante è rappresentata dalla corrente di carica (charging current)  $I_b$  e dalla corrente persa (loss current)  $I_l$ , che è legata alla costante dielettrica. La costante dielettrica complessa  $k$  consiste di una parte reale  $k'$ , che rappresenta l'energia immagazzinata dal materiale, e di una parte immaginaria  $k''$ , che rappresenta le perdite.

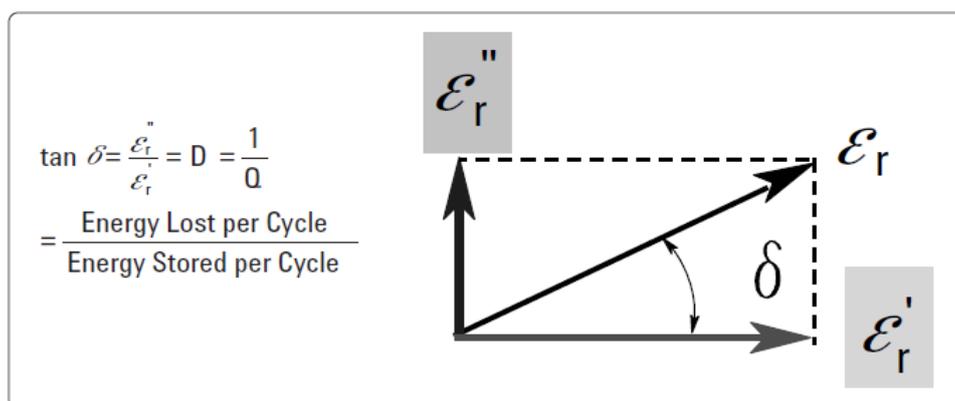


**Figura G:** Condensatore a piatti paralleli (corrente alternata) (Agilent).

La costante dielettrica equivale alla permittività relativa ( $\epsilon_r$ ) o alla permittività assoluta ( $\epsilon$ ) relativa alla permittività dello spazio vuoto ( $\epsilon_0$ ). La relazione tra permittività e costante dielettrica viene rappresentata dalla seguente equazione:

$$\kappa = \frac{\epsilon}{\epsilon_0} = \epsilon_r = \epsilon_r' - j\epsilon_r''$$

La parte reale della permittività ( $\epsilon'$ ) rappresenta la quantità di energia che è stata assorbita dal materiale, mentre la parte immaginaria ( $\epsilon''$ ), o fattore di perdita, ne misura l'energia dissipata. Il fattore di perdita è sempre maggiore di zero e di solito è inferiore alla parte reale. La permittività può essere rappresentata con un diagramma vettoriale (Figura H).

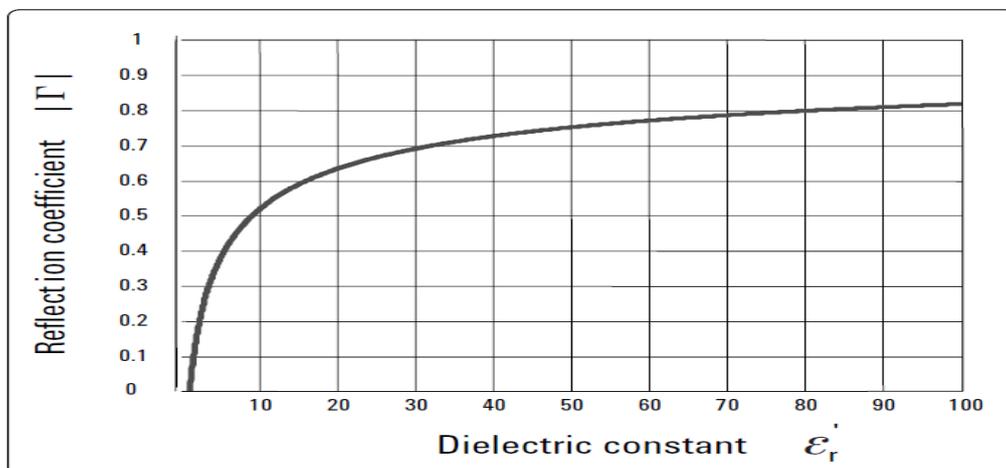


**Figura H:** Diagramma vettoriale della tangente di perdita (Agilent).

### 3.2 Propagazione delle onde elettromagnetiche

Le onde elettromagnetiche si formano per oscillazione di un campo elettrico con un campo magnetico. La propagazione di un'onda in un materiale, dipende dalla permittività e dalla permeabilità di quest'ultimo. Quando un dielettrico viene sottoposto ad un campo elettromagnetico, si formano tre onde risultanti: l'onda riflessa, l'onda incidente e l'onda trasmessa. L'onda riflessa si forma a causa della differenza tra l'impedenza dell'onda nel materiale ( $Z$ ) e l'impedenza dell'onda che si propaga nel vuoto ( $Z_0$  o  $\eta$ ), la quale è maggiore. Questo perché l'onda elettromagnetica penetra nel materiale ad una velocità e lunghezza d'onda inferiore rispetto a quando si propaga nel vuoto, dato che nell'ultimo caso essa viaggia alla velocità della luce ( $c \approx 3 \times 10^8 \text{m/s}$ ).

Il comportamento di un'onda, si può capire attraverso il rapporto tra il coefficiente di riflessione e la costante dielettrica (Fig. I). La fig. I mostra che il coefficiente di riflessione aumenta maggiormente per valori di costante dielettrica molto piccoli. In questo modo il coefficiente di riflessione può essere misurato in modo preciso. Invece, con costanti dielettriche più grandi, si notano variazioni minime del coefficiente di riflessione, pertanto la sua misurazione risulterà meno precisa. Questo significa che nei materiali con elevata costante dielettrica, l'energia riflessa è maggiore rispetto a quella nei materiali con bassa costante dielettrica.

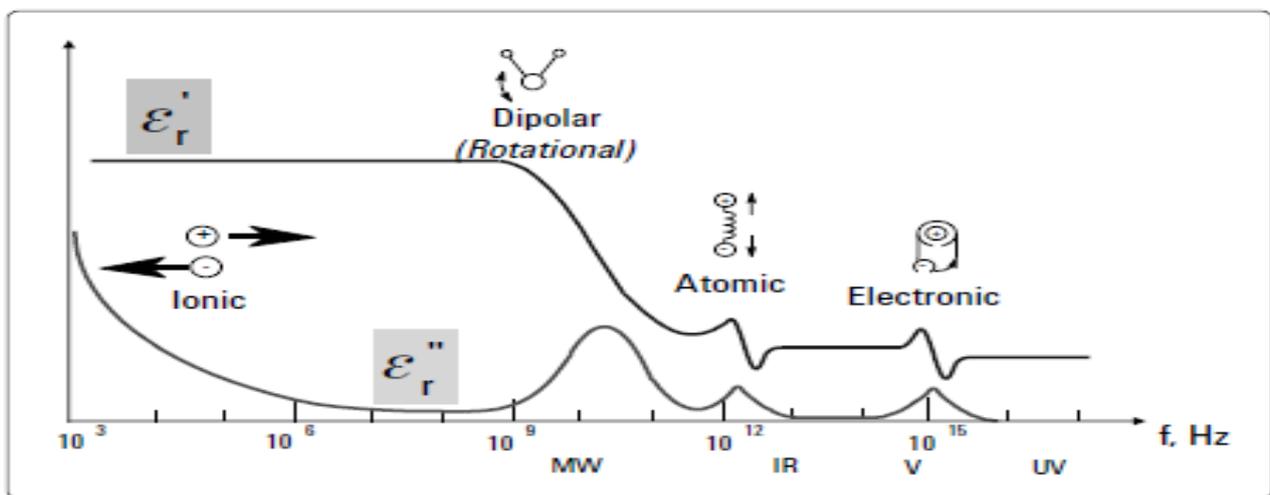


**Figura I:** Rapporto tra coefficiente di riflessione e costante dielettrica (Agilent).

### 3.3 Meccanismi dielettrici

Un dielettrico, quando viene sottoposto ad un campo elettrico, si polarizza per compensare le cariche dell'energia che lo attraversa, in cui le cariche positive e negative si dispongono in direzioni opposte. Ad ogni modo, il comportamento di un dielettrico (fig. J) dipende dalla frequenza dell'onda che lo investe. Infatti, per ogni meccanismo elettromagnetico esiste una determinata frequenza di

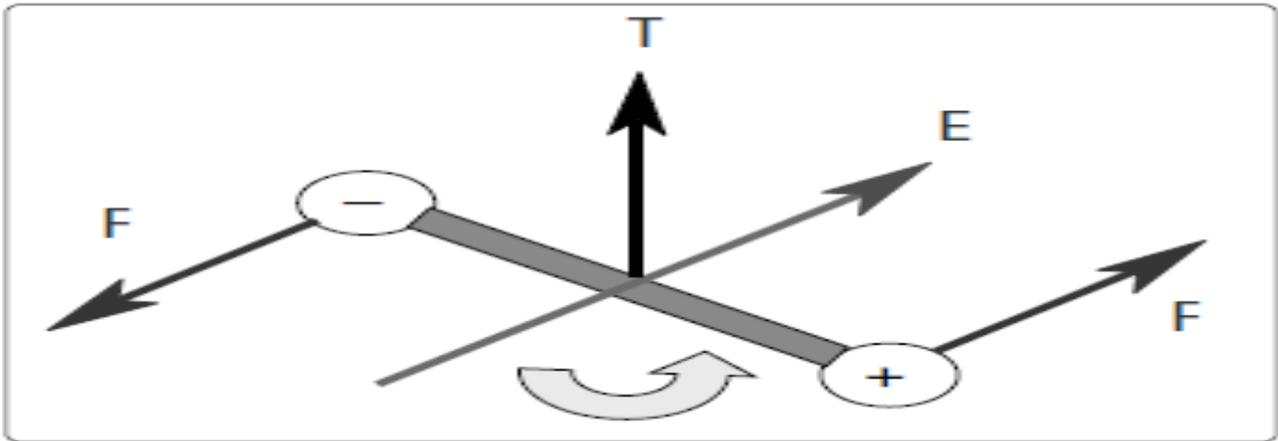
“cut-off”, ossia una frequenza oltre la quale un determinato meccanismo si blocca per lasciare il posto ad uno più veloce. Lontano dalla frequenza di cut-off, l’assorbimento di energia è massimo, quindi la permittività reale  $\epsilon'$  raggiunge il suo picco. Invece, quando il campo elettrico è vicino alla frequenza di cut-off, diminuisce la permittività reale, ma aumenta il fattore di dissipazione  $\epsilon''$ , il quale raggiunge il picco alla frequenza di cut-off. Dalla figura J, si vede che i meccanismi di conduzione ionica e di rotazione dipolare si manifestano nella frequenza delle microonde e sono soggetti ad effetti di rilassamento; mentre la polarizzazione elettronica ed atomica sono relativamente deboli e costanti oltre la regione delle microonde, a cui è associato l’effetto di risonanza.



**Figura J:** Meccanismi dielettrici in base alla frequenza del campo elettrico (Agilent).

### 3.3.1 Rotazione dipolare

La condizione di dipolo in una molecola si verifica quando si incontrano due atomi di elettronegatività differente, in cui quello più elettronegativo attrae gli atomi di valenza dell’altro atomo, acquisendo così carica positiva, ed inducendo carica negativa sull’altro atomo. Allo stato normale, la molecola è apolare, mentre si polarizza quando è sottoposto ad un campo elettrico. Il campo elettrico causa la rotazione del dipolo (fig. K), che ruota per allinearsi con esso. A rotazione completa, il polo positivo si dispone nella direzione opposta del polo negativo ed essi cambiano direzione nel caso in cui si applicasse un campo elettrico di differente orientazione.



*Figura K: Rotazione dipolare in un campo elettrico (Agilent).*

La mobilità dei dipoli viene misurata mediante il tempo di rilassamento, che coincide al tempo che i dipoli necessitano per orientarsi nel campo elettrico. Le perdite per dissipazione, avvengono a causa delle frizioni che si verificano a causa delle collisioni tra le molecole durante la rotazione, che cessano a rotazione finita. Quando cessa la corrente, le molecole si trovano nella condizione in cui la distribuzione delle cariche è stata invertita e per essere ristabilita, le molecole impiegano un tempo pari al tempo di rilassamento. Inoltre, il tempo di rilassamento ( $\tau$ ) è inversamente proporzionale alla frequenza di rilassamento ( $f_c$ ) e sono legati dalla seguente relazione:

$$\tau = \frac{1}{\omega_c} = \frac{1}{2\pi f_c}$$

Quindi, se l'onda elettrica scorre ad una frequenza inferiore a  $f_c$ , le molecole mantengono la loro disposizione, assorbono energia ed aumenta la permittività reale fino al suo picco. Invece, man mano che la frequenza del campo elettrico  $f$  si avvicina a  $f_c$ , le molecole (i dipoli) iniziano a ruotare fino a rotazione completa, in cui  $f = f_c$ . In questa condizione, le molecole assorbono sempre meno energia fino alla completa dissipazione, in cui il fattore di dissipazione raggiungerà il suo picco. Se  $f$  è maggiore di  $f_c$ , l'onda dovrebbe oscillare a  $f$  maggiore di  $f_c$ , ma il campo elettrico è troppo veloce per indurre la rotazione dei dipoli.

Per descrivere il comportamento dei dipoli caratterizzati da un solo tempo di rilassamento, si utilizza la relazione di Debye (Fig. L). La relazione di Debye mette in rapporto la permittività reale e il fattore di dissipazione, con la frequenza di rilassamento. Dal grafico mostrato in figura L, la permittività reale è costante al di sopra o al di sotto del punto di rilassamento e la transizione avviene vicino alla frequenza di rilassamento. Invece, il fattore di dissipazione è piccolo al di sopra o al di sotto del punto di rilassamento, ma raggiunge il picco alla frequenza di rilassamento.

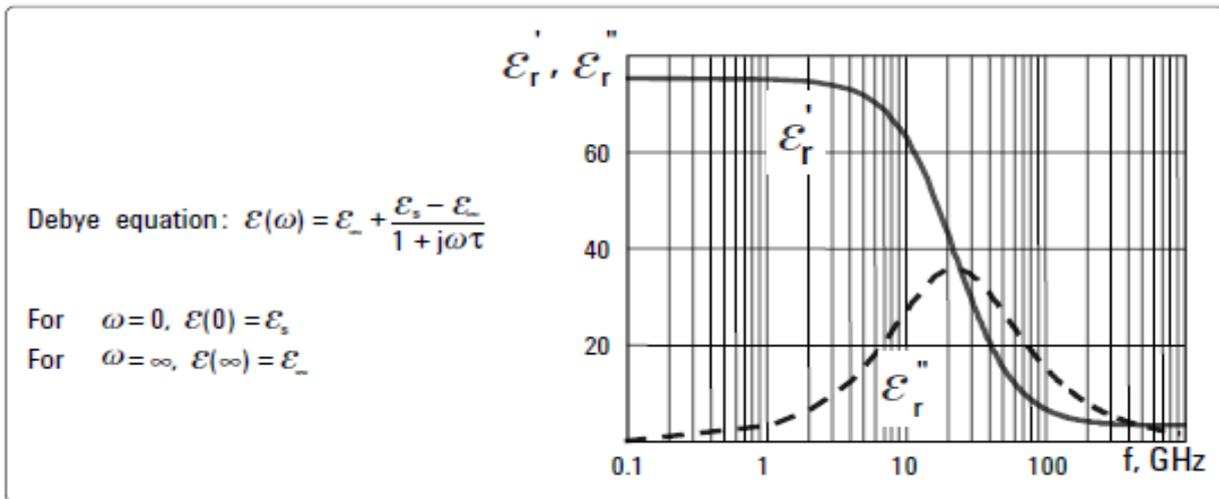


Figura L: Relazione di Debye dell'acqua a 30 °C (Agilent).

Il diagramma di Cole-Cole, invece, mette in relazione il fattore di dissipazione con la permittività reale, in cui la frequenza di rilassamento è un parametro indipendente. Nel grafico (Fig. M), il fattore di dissipazione viene inserito nell'asse verticale, mentre la permittività reale viene inserita nell'asse orizzontale. La curva assume forme differenti in base al tipo di materiale analizzato. Per materiali con un unico tempo di rilassamento, la curva è un semicerchio, il cui centro è pari a  $\epsilon_r'' = 0$  ed il picco corrisponde al reciproco del tempo di rilassamento. Invece, per materiali con diversi tempi di rilassamento, la curva risultante può essere o un semicerchio, per distribuzioni simmetriche, o un arco (per distribuzioni asimmetriche), il cui centro si trova al di sotto dell'asse orizzontale.

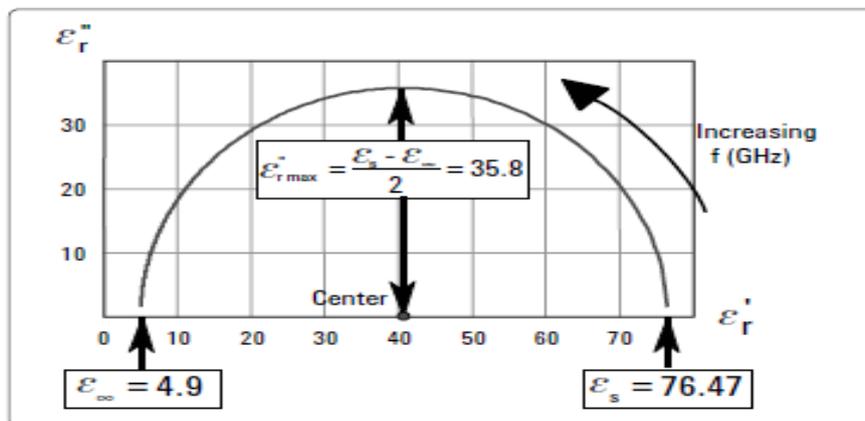


Figura M: Diagramma di Cole-Cole (Agilent).

### 3.3.2 La polarizzazione elettronica ed atomica

La polarizzazione elettronica si verifica negli atomi neutri, dove il campo elettrico causa il dislocamento dei nuclei dagli elettroni che li circondano. Invece, la polarizzazione atomica si verifica quando, a causa del campo elettrico impiegato, ioni negativi e ioni positivi si distendono l'uno verso l'altro. Per i solidi anidri, questi fenomeni si verificano nel range delle microonde, mentre per gli altri materiali essi si verificano nell'infrarosso e nel visibile. Questi due tipi di polarizzazione, posso essere interpretati come delle oscillazioni, le quali sono minime a qualsiasi frequenza al di fuori della frequenza di risonanza, in cui la permittività reale è costante ed il fattore di dissipazione è al minimo. Tuttavia, la frequenza di risonanza coincide col valore minimo della permittività reale e con quello massimo del fattore di perdita. A frequenze superiori a quella di risonanza, il campo elettrico non causa nessun effetto.

### 3.3.3 La conduttività ionica

La conduttività ionica è caratteristica dei materiali umidi e si verifica nelle basse frequenze. In questo caso, il fattore di dissipazione viene influenzato dalla conduttività elettrolitica degli ioni del solvente (acqua). Essa equivale al reciproco della frequenza del campo elettrico applicato e nella curva rappresenta la pendenza del fattore di dissipazione. Ad ogni modo, il fattore di dissipazione ( $\epsilon_r''$ ) è in funzione delle perdite dielettriche ( $\epsilon_{rd}''$ ) e della conduttività ( $\sigma$ ) e questa relazione viene descritta mediante la seguente equazione:

$$\epsilon_r'' = \epsilon_{rd}'' + \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0}$$

### 3.3.4 Polarizzazione interfacciale o spaziale

La polarizzazione interfacciale o spaziale, si verifica quando la migrazione delle cariche viene impedita ed esse rimangono bloccate nell'interfaccia del materiale. Questo fenomeno segue l'effetto Maxwell-Wagner, in cui se gli strati di carica sono più piccoli rispetto alle dimensioni delle particelle, le cariche rispondono indipendentemente dalla carica delle particelle adiacenti. Tutto ciò si verifica quando nel materiale esistono delle regioni elettriche che non sono in contatto l'una con l'altra. Quindi, se il campo elettrico investe queste regioni a basse frequenze, le cariche hanno il tempo necessario per accumulare energia, portando all'aumento della permittività reale. Nel caso contrario, le particelle non accumulano energia, pertanto aumenta il fattore di dissipazione.

### 3.4 Sistemi di misura

Un sistema di misura consente nel determinare la permittività o permeabilità in base alla riflessione o alla trasmissione di energia del materiale sottoposto ad un campo elettrico. Uno dei sistemi utilizzati è il network analyzer (figura 14), che viene utilizzato per segnali compresi tra 300 kHz e 110 GHz. Esso è costituito dal generatore, che invia un impulso elettrico verso il materiale da analizzare, dal ricevitore, che capta il segnale riflesso o trasmesso dal materiale, e da un display per visualizzare i dati, ovvero la magnitudo e la fase alla frequenza con cui è stato inviato il segnale. Ogni volta che termina una misurazione, essa viene ripetuta ad un'altra frequenza ed il risultato finale sarà una funzione di frequenza. Invece, per frequenze più basse, vengono utilizzati l'impedance analyzer e LCR metres. Il materiale viene stimolato con corrente alternata ed i parametri derivano dalla conoscenza delle dimensioni del campione, dalla misura della capacità e del fattore di dissipazione. Ognuno di questi sistemi è munito di un campionatore, in cui viene posto il materiale da analizzare che ha il compito di applicare adeguatamente l'impulso elettromagnetico; e di un software, che converte il dato misurato in permittività o in permeabilità. Ogni strumento necessita di essere calibrato, in modo da eliminare gli errori sistematici, ovvero causati da imperfezioni del sistema. Infine, si devono minimizzare gli errori casuali, dovuti a rumori, drift o all'ambiente (temperatura, umidità pressione), mediante una buona pratica di misurazione, incluso l'ispezione visiva dei connettori per vedere se sono danneggiati o sporchi, ed evitare qualsiasi movimentazione delle sonde dopo che sono state calibrate.

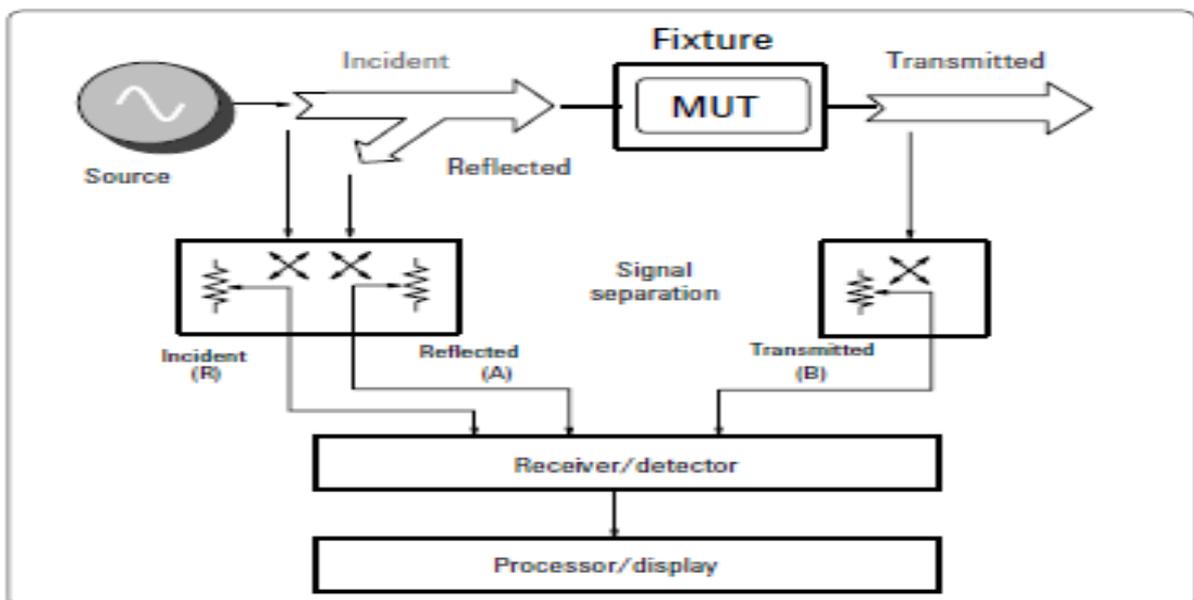


Figura N: Network analyzer (Agilent).

### 3.5 Tecniche di misurazione

Nella scelta della tecnica di misurazione si devono considerare determinati fattori, quali il range di frequenza, il parametro da misurare, l'accuratezza richiesta, proprietà, forma e dimensione del materiale da analizzare, distruttivo o non distruttivo, la temperatura ed il costo.

Una tecnica è quella della sonda coassiale open-ended, che consiste in un'interruzione della linea di trasmissione (Fig. O), protetta da una guarnizione di vetro per aumentare la resistenza alle sostanze corrosive ed abrasive, ed oltretutto per proteggerla dalla temperatura a cui può essere sottoposta (da -40 a 200 °C). La misurazione si esegue inserendo la sonda nei campioni liquidi o ponendo la sonda a contatto con la superficie dei campioni solidi o polveri. Dal momento in cui la sonda entra in contatto con il campione, il campo elettromagnetico cambia di intensità ed il segnale che ne deriva è la radiazione riflessa, intesa come permittività relativa. Si tratta di un metodo semplice, non distruttivo, ottimo per liquidi e solidi, ma la misurazione della permittività relativa è poco accurata. Infine, il campione deve essere poco spesso, non magnetico, isotropico, omogeneo, di superficie regolare.

Il metodo della linea di trasmissione, consiste nel porre il materiale in una porzione chiusa di linea di trasmissione. Di solito, la linea è una sezione di guida d'onda rettangolare o di linea d'aria coassiale (Fig. O). I parametri valutati sono la permittività assoluta, attraverso il segnale riflesso, mentre la permeabilità viene valutata analizzando il segnale trasmesso. La risoluzione e l'accuratezza nella misurazione dipende dalla lunghezza del campione. Inoltre, detta tecnica è in grado di misurare i materiali magnetici ed anisotropi, quest'ultimi in guida d'onda. Il materiale da misurare, deve essere omogeneo, liscio e perpendicolare all'asse dell'onda.

Nella tecnica dello spazio vuoto (Fig. O), il materiale viene interposto tra due antenne che emanano energia sotto forma di microonde e può anche non includere il portacampione. Si tratta di un metodo non distruttivo e può essere applicato per analizzare il comportamento dei materiali ad alte temperature e in ambienti estremi. In quest'ultimo caso, il campione viene messo all'interno di una fornace, le cui finestre sono costituite da materiali trasparenti alle microonde. I campioni devono essere larghi, piatti ed omogenei.

L'utilizzo del condensatore a piatti paralleli consiste nell'inserire un foglietto sottile di materiale tra due elettrodi, che operano a 30 MHz (Fig. O).

La tecnica della cavità risonante (Fig. O) consiste nel porre il materiale in una cavità che può essere rappresentata da una sezione di guida d'onda risonante ad una data frequenza. Il materiale inserito nella cavità fa variare la frequenza di risonanza ed il fattore di qualità della cavità stessa. Si

tratta di un metodo che consente di lavorare in un ambiente caratterizzato da impedenze elevate, consente misure anche su campioni piccoli e ad un'unica o poche frequenze. Infine, è accurato per campioni a bassa perdita.

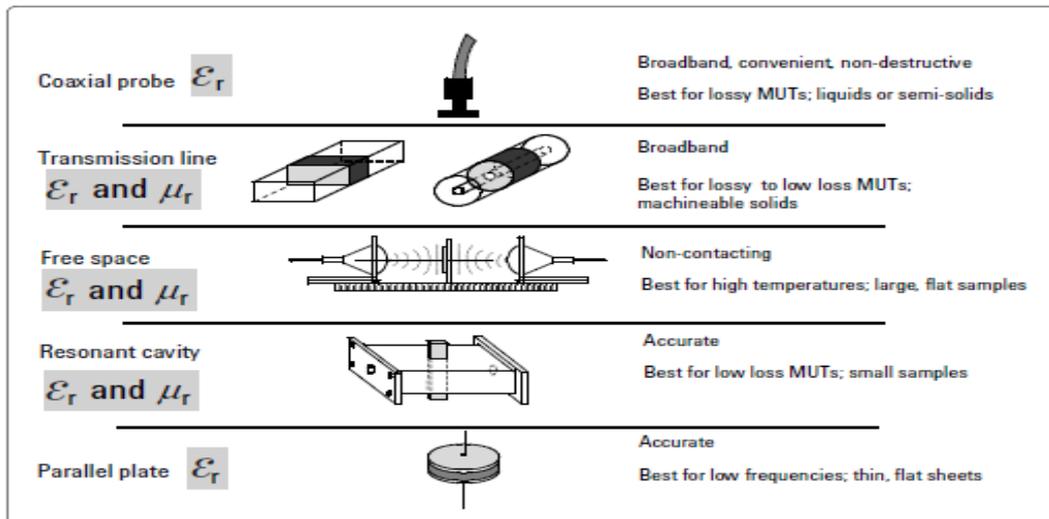


Figura 0: Riepilogo delle tecniche di misurazione (Agilent).

#### **4 SPETTROSCOPIA DIELETTICA E NIR NEGLI ALIMENTI**

Negli anni è cresciuto l'interesse verso le proprietà dielettriche degli alimenti, in particolare per quanto attiene la radiazione elettromagnetica nel range delle microonde. Esiste un'ampia letteratura riguardante lo studio delle proprietà dielettriche per la caratterizzazione degli alimenti e delle loro componenti, allo scopo di valutarne la qualità (Herve et al., 1998; Martinsen, et al., 2000; Nunes et al., 2006). Altri studi hanno avuto lo scopo di determinarne il contenuto zuccherino in differenti soluzioni (Tulasidas et al., 1994), la concentrazione di acido acetico nell'aceto (Bohigas e Tejada, 2009) e dell'etanolo nel vino e in differenti soluzioni (Bohigas e Tejada, 2010).

Oltre alla frequenza del campo elettrico a cui è sottoposto, le proprietà dielettriche di un alimento dipendono dalla sua composizione chimica, in termini di contenuto di umidità, di sali e ceneri, e da quanto il loro movimento è impedito dal legame con gli altri costituenti (Venkatesh e Raghavan, 2004). I costituenti organici sono dielettricamente inerti ( $\epsilon' < 3$  e  $\epsilon'' < 0,1$ ), pertanto potrebbero essere considerati trasparenti all'energia (Mudgett, 1985). Tuttavia, essi diventano la maggiore fonte di riscaldamento quando l'umidità nel prodotto è molto bassa o è presente in tracce (Venkatesh e Raghavan, 2004). Ad ogni modo, la componente che ha una maggiore influenza è l'umidità, perché l'acqua, essendo un dipolo, è in grado di assorbire l'energia del campo elettrico, pertanto maggiore è il suo contenuto e maggiore sarà l'assorbimento. Tuttavia, la frequenza ed il tempo di rilassamento dipendono dallo stato in cui si trova l'acqua e dalla temperatura (Venkatesh e Raghavan, 2004). Infatti, negli alimenti l'acqua contiene componenti disciolte in essa ed è assorbita nei capillari, nelle cavità o è legata ad altre molecole di acqua. Allo stato legato, il rilassamento dell'acqua si verifica a frequenze più basse di quelle dell'acqua libera (19.5 GHz a 25 °C) (Hasted et al., 1948) e la costante dielettrica con il fattore di perdita sono maggiori in quest'ultima (Venkatesh e Raghavan, 2004). In generale, all'aumentare della temperatura, il tempo di rilassamento si riduce ed il picco del fattore di perdita si sposta ad una frequenza maggiore. In questo modo, nella regione di dispersione, la costante dielettrica aumenta proporzionalmente alla temperatura, mentre il fattore di dispersione si riduce o aumenta se la frequenza del campo elettrico è maggiore o inferiore della frequenza di rilassamento. Invece, la costante dielettrica si riduce all'aumentare della temperatura se la frequenza applicata è inferiore o maggiore della regione di dispersione (Venkatesh e Raghavan, 2004).

Pethig (1984) studiò le proprietà dielettriche dei materiali biologici, inclusi gli amminoacidi. Dallo studio emerse che il comportamento dielettrico degli amminoacidi è dovuto sia alla loro caratteristica forma di zwitterione (ione dipolare grazie alla presenza dei gruppi amminici e carbossilici nella struttura), che dalla polarità delle catene laterali (Tab. D).

*Tabella D: Peso molecolare e natura della catena laterale degli amminoacidi (Pethig, 1984).*

Name	Abbreviation	Mol. Wt.	Side-chain Property
Alanine	Ala	89.1	Non-polar
Arginine	Arg	174.2	Polar; Basic
Aspartic acid	Asp	133.1	Polar; Acidic
Asparagine	Asn	132.1	Polar; Neutral
Cysteine	Cys	121.2	Polar; Acidic
Glutamic acid	Glu	147.1	Polar; Acidic
Glutamine	Gln	146.2	Polar; Neutral
Glycine	Gly	75.1	Non-polar
Histidine	His	155.2	Polar; Basic
Isoleucine	Ile	131.2	Non-polar
Leucine	Leu	131.2	Non-polar
Lysine	Lys	146.2	Polar; Basic
Methionine	Met	149.2	Non-polar
Phenylalanine	Phe	165.2	Non-polar
Proline	Pro	151.1	Polar; Neutral
Serine	Ser	105.1	Polar; Neutral
Threonine	Thr	119.1	Polar; Neutral
Tryptophan	Trp	204.2	Polar; Neutral
Tyrosine	Tyr	181.2	Polar; Acidic
Valine	Val	117.1	Non-polar

Nella forma di zwitterione, il momento dipolare dell'amminoacido è maggiore di quello dell'acqua, pertanto soluzioni di amminoacidi presentano una permittività maggiore rispetto ad essa. Tuttavia, a causa della forma non sferica delle molecole degli amminoacidi e le interazioni che si verificano tra loro e le molecole di acqua del solvente, non è possibile un'interpretazione della loro permittività. Così, la permittività degli amminoacidi viene valutata in funzione della loro polarizzabilità, mediante la seguente funzione:

$$\epsilon = \epsilon_1 + \delta c$$

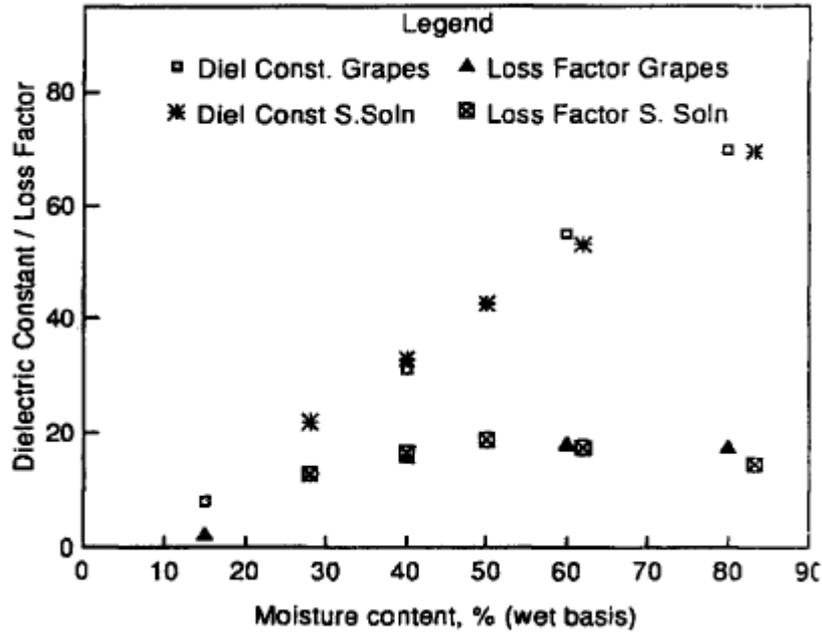
in cui  $\epsilon$  e  $\epsilon_1$  sono rispettivamente la permittività della soluzione e del solvente puro,  $c$  è la concentrazione del soluto (mol/l o g/l) e  $\delta$  è il fattore di polarizzabilità, il quale varia linearmente con la concentrazione. Ad ogni modo, gli amminoacidi presentano valori di  $\delta$  positivi (Tab. E), che comportano l'aumento della permittività della soluzione. Tuttavia, questo incremento viene compensato dalle perdite di permittività causate dalle altre componenti ( $\delta$  negativo).

**Tabella E:** Incremento dielettrico in acqua a 25 °C di alcuni amminoacidi e dei peptidi della glicina (Pethig, 1984).

Sample	Dielectric Increment $\delta$
Alanine	27.7
Asparagine	28.4
Aspartic acid	27.8
Glutamic acid	26
Glycine	26.4
Leucine	25
Glycine dipeptide	70
Glycine tripeptide	113
Glycine tetrapeptide	159
Glycine pentapeptide	215
Glycine hexapeptide	234
Glycine heptapeptide*	290

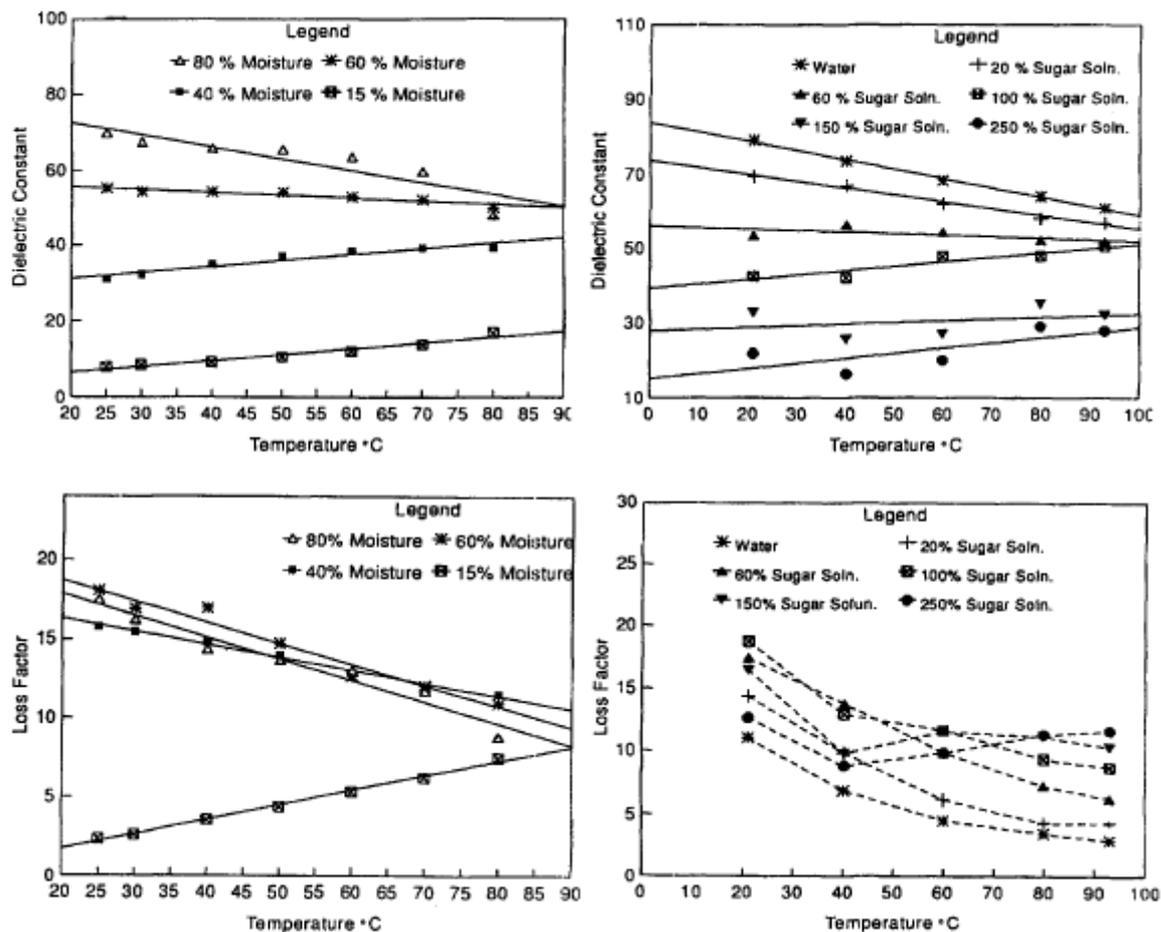
Inoltre, bisogna considerare anche il pH in cui si trovano, in quanto la permittività si riduce a pH inferiori al punto isoelettrico (4.5) o a pH basici. Ciò che si verifica è che a livelli estremi di pH, i gruppi carbossilici (a  $\text{pH} < 4,5$ ) ed amminici (a  $\text{pH} > 7,5$ ) tendono ad interagire con l'ambiente circostante, portando alla scomparsa del momento dipolare. Per esempio, Dunning e Shutt (1938) trovarono che la permittività della glicina rimaneva costante a pH 4,5-7,5, ma si riduceva a pH maggiori ed inferiori. Infine, il comportamento dielettrico di un amminoacido si riduce quando va a formare le proteine, dato che le estremità carbossi- ed ammino-terminali sono state impiegate per il legame peptidico. Tuttavia, tranne che per la glicina e l'alanina, le catene laterali saranno quelle che incideranno sulla polarità del peptide.

Tulasidas et al. (1994), confrontarono le proprietà dielettriche a 2,45 GHz di uve (21-22 °Brix ed umidità che varia da 80 a 15%), con delle soluzioni di saccarosio a differenti concentrazioni (20-250%). Le prove sono state condotte in un range di temperatura compreso tra 25 e 80 °C. Di solito, all'aumento della concentrazione zuccherina, la permittività reale si riduceva e questo potrebbe essere attribuito alla rimozione dell'acqua ed alla stabilizzazione dei legami idrogeno dei gruppi idrossilici (Fig. P). La variazione della permittività reale e del fattore di perdita dell'uva risultò simile a quello delle soluzioni fino a circa il 28% di umidità.



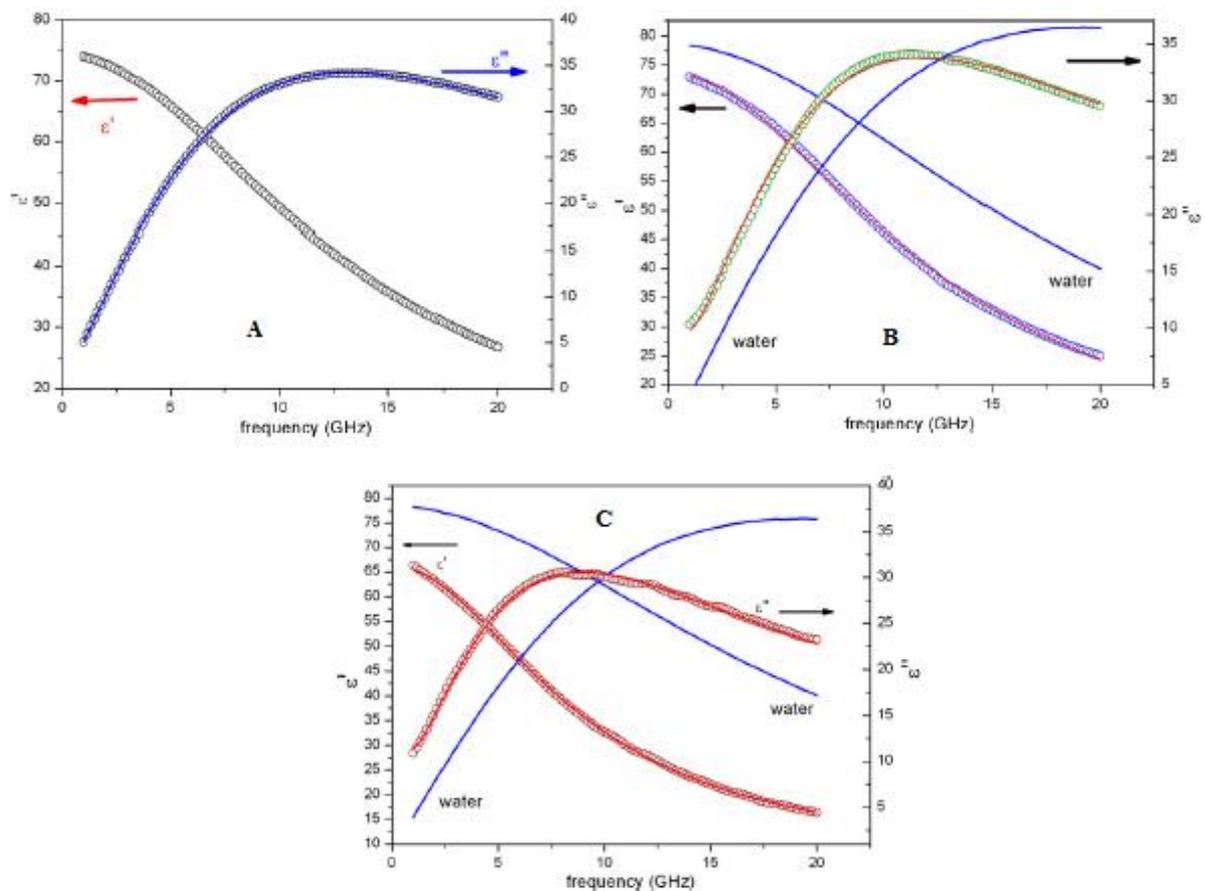
*Figura P: Proprietà dielettriche di uva e soluzioni zuccherine in funzione del contenuto di umidità a 25 °C e 2,45 GHz (Tulasidas et al. 1994).*

In generale, il comportamento fu opposto nel confronto tra le alte concentrazioni zuccherine con quelle basse. Nel caso delle basse concentrazioni di zucchero, la costante dielettrica ed il fattore di perdita si riducevano all'aumentare della temperatura, ma un andamento opposto fu rilevato nelle alte concentrazioni. Le variazioni osservate nelle uve furono simili a quelle delle soluzioni, tuttavia ad elevati °Brix, il fattore di perdita aumentava con la temperatura in misura maggiore rispetto alle soluzioni zuccherine (Fig. Q). Questa discrepanza fu attribuita all'aumento della concentrazione dei sali nelle uve al ridursi dell'umidità. Da come si vede in figura Q, le curve del fattore di perdita delle soluzioni zuccherine, presentano un appiattimento, che indica l'effetto limite della temperatura, in cui il fattore di perdita rimane costante all'aumentare della temperatura, in quanto ad una data temperatura le perdite dipolari sono in equilibrio con le perdite di conduttività (Metaxas e Meredith, 1983). Questo effetto si verificò nelle soluzioni molto concentrate (250% e 150%), in cui a 40 °C si osservò una piccola depressione del fattore di perdita seguita da un aumento graduale (fig. Q).



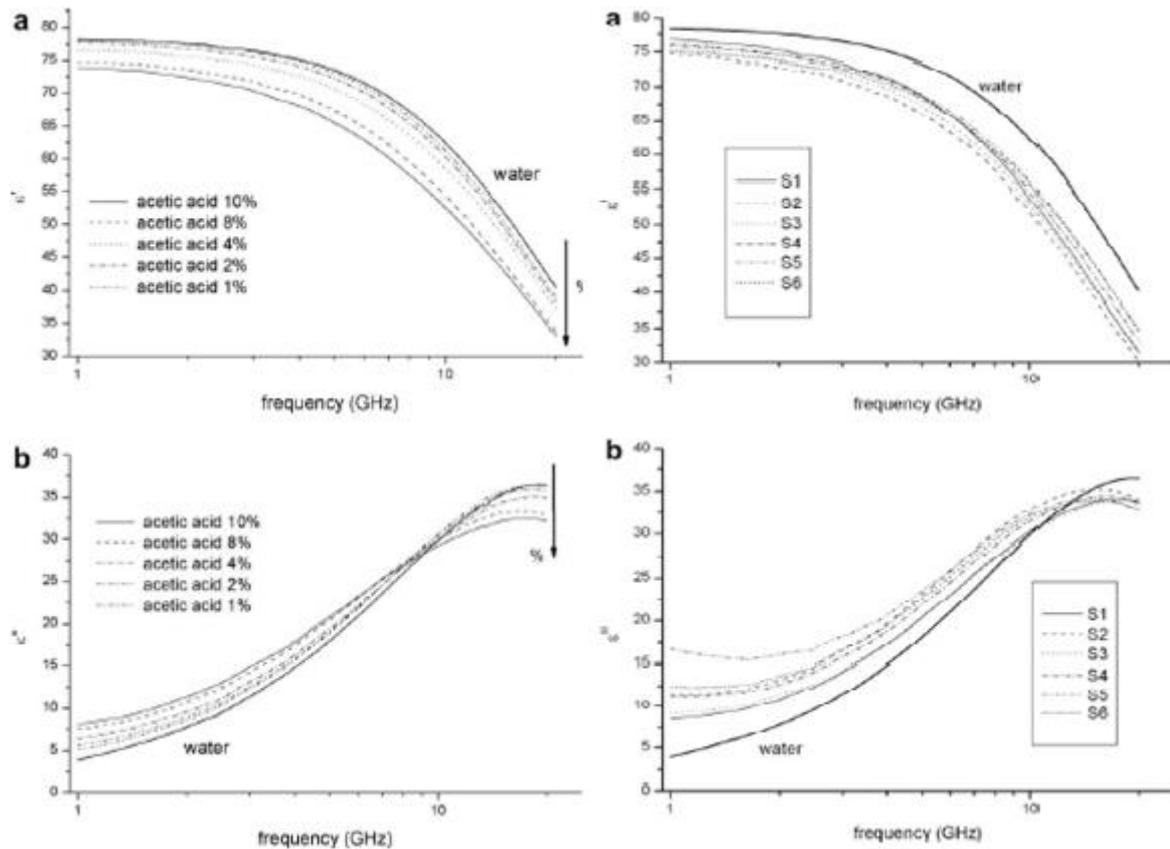
*Figura Q: Comportamento dielettrico di uve (a sinistra) e di soluzioni zuccherine (a destra) in funzione della temperatura (Tulasidas et al., 1994).*

Bohigas e Tejada (2010) utilizzarono le microonde nel range di 1-20 GHz per la caratterizzazione delle bevande alcoliche in base alla concentrazione di etanolo. Essi analizzarono diverse soluzioni contenenti fino al 40% di etanolo, dei vini rossi, bianchi e rosé di 11° alcolici e degli Sherry (bevande alcoliche dolci). In tutti i casi, la permittività reale delle soluzioni diminuiva all'aumentare della concentrazione alcolica. Invece, il fattore di perdita aumentava fino alla frequenza di rilassamento, però esso diminuiva con frequenze maggiori (Fig. R). Nei vini analizzati, si osservò che l'andamento delle curve era indipendente dalle componenti volatili (Fig. R). Invece, negli Sherry lo spettro risultava influenzato dalla percentuale di zucchero disciolto nel prodotto (Fig. R).



**Figura R:** Curva di Debye delle proprietà dielettriche di: (A) di una soluzione del 10% di etanolo, (B) Vino e (C) Sherry (Bohigas e Tajada, 2010).

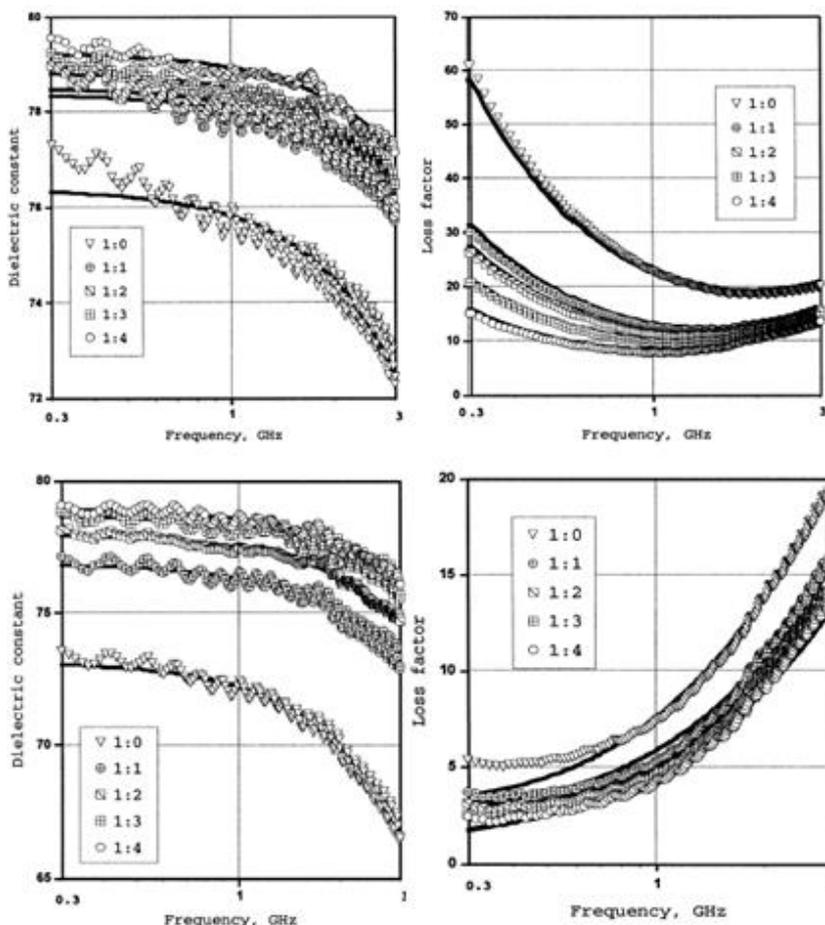
Sempre Bohigas e Tejada (2009) studiarono le proprietà dielettriche dell'aceto in un range di 1-20 GHz, basandosi sul contenuto di acido acetico, che, insieme al contenuto di umidità, fu definito come componente principale per la definizione degli spettri degli aceti. Essi confrontarono gli spettri ottenuti da soluzioni contenenti fino al 10% di acido acetico, con degli aceti commerciali aventi un'acidità totale del 6-7% (Fig. S). Il comportamento risultò simile tra di loro, in cui la permittività reale dell'acido acetico diminuiva all'aumentare della frequenza e della concentrazione di acido acetico, mentre il fattore di perdita aumentava fino ad una frequenza pari a 8 GHz, ma nei campioni di aceto, esso veniva influenzato anche dalla conduzione ionica.



**Figura 5:** Spettri delle soluzioni di acido acetico (a sinistra) e degli acetati (a destra) studiati: (a) permittività reale e (b) fattore di perdita (Bohigas e Tejada, 2009).

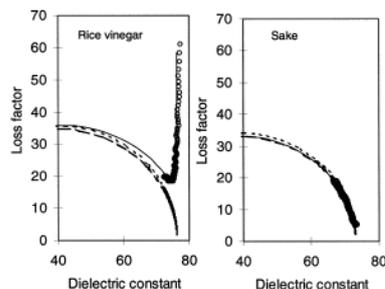
Uno studio delle proprietà dielettriche dell'aceto fu condotto anche da Tanaka et al. (2002). Tramite il metodo dei minimi quadrati non lineare, determinarono la lunghezza d'onda di rilassamento, la conduttività ionica, la costante dielettrica statica di differenti concentrazioni di aceto di riso e sake (diluizioni eseguite con acqua distillata nell'ordine seguente: 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, dove il contenuto di acqua iniziale fu pari al 94% per l'aceto di riso e all'81,5% per il sake), in un range di frequenza da 0.3 a 3 GHz e in un intervallo di temperatura compreso tra 5-70 °C. Dai loro calcoli, risultò che la lunghezza d'onda di rilassamento era proporzionale alla concentrazione delle soluzioni ma inversamente proporzionale alla temperatura. Invece, la costante dielettrica statica diminuiva sia all'aumentare della temperatura che della concentrazione, a causa dell'elevata mobilità dei soluti alle alte temperature. La conduttività ionica risultò maggiormente influenzata dalla temperatura e dalla concentrazione nell'aceto di riso, in quanto nel sake risultarono perdite ioniche maggiori, pertanto la variabile concentrazione non fu considerata. Invece, la costante dielettrica complessiva fu valutata mediante la relazione di Debye e di Cole-Cole modificata (Fig. T), considerando anche la conduttività ionica. Dalla relazione di Debye (Fig. T), in entrambe le matrici, il risultato fu che la costante dielettrica si riduceva all'aumentare della frequenza, della concentrazione e della temperatura.

Nell'aceto di riso, a basse frequenze, il fattore di perdita si riduceva all'aumentare della frequenza a causa della conduzione ionica, mentre il comportamento fu opposto a frequenze elevate a causa dell'orientamento della polarizzazione. Tuttavia, nel sake il fattore di perdita presentava un andamento proporzionale all'aumento della frequenza.



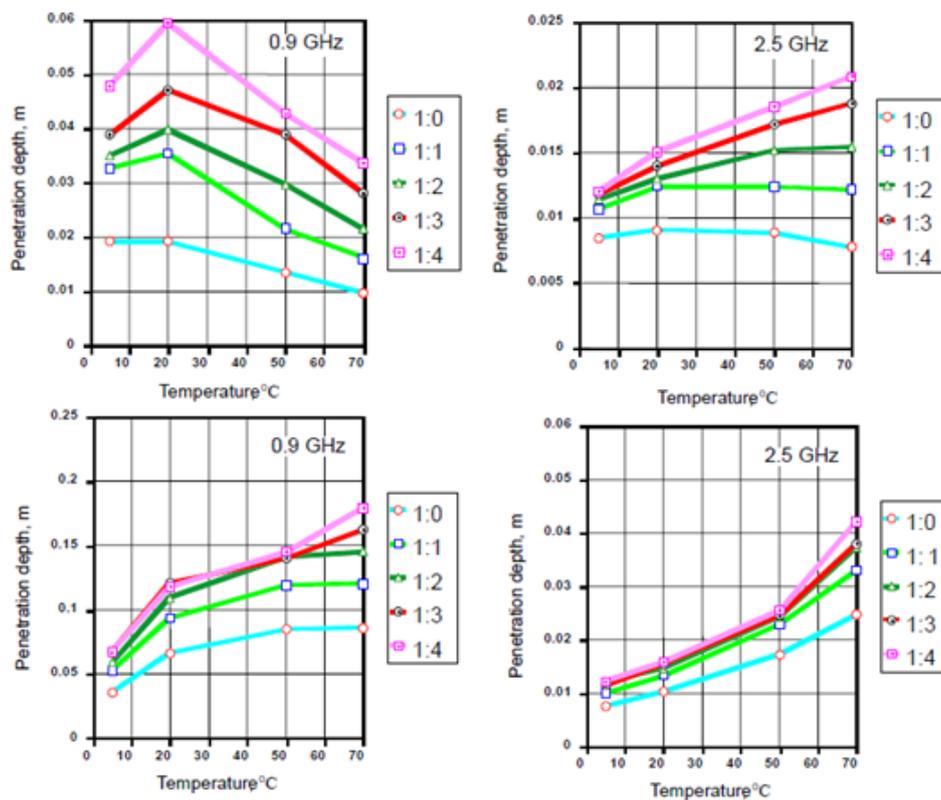
**Figura T:** Diagramma di Debye per aceto di riso (sopra) e di sake (sotto) a 20 °C (Tanaka et al., 2002).

Il diagramma di Cole-Cole (Fig. U) riporta un arco semicircolare per il sake, ma non per l'aceto di riso, perché le perdite di ionizzazione sono differenti (maggiori nell'aceto di riso).



**Figura U:** Diagramma di Cole-Cole di aceto di riso (a sinistra) e di sake (a destra) a 20 °C (linea continua = modello di Cole-Cole modificato; linea punteggiata = modello di Debye; linea tratteggiata = modello di Cole-Cole) (Tanaka et al., 2002).

Infine, essi calcolarono la profondità di penetrazione dell'onda e ne risultò che l'aceto di riso assorbiva le microonde in misura maggiore rispetto al sake, perciò la profondità di penetrazione fu maggiore in quest'ultimo. Il range di frequenza considerato fu 0,9-2,5 GHz, perché sono le frequenze designate per il riscaldamento con le microonde. Nell'aceto di riso a 0,9 GHz la profondità di penetrazione si riduceva a temperature maggiori di 20 °C, a causa delle perdite di ionizzazione. Invece, a 2,5 GHz, essa si riduceva alle alte concentrazioni. Questo significa che le perdite di ionizzazione e di polarizzazione, rendono la lunghezza di penetrazione dipendente dalla temperatura e concentrazione della matrice. Per quanto riguarda il sake, si verificò l'incremento della profondità di penetrazione all'aumentare della temperatura in entrambe le frequenze. Tuttavia, l'incremento fu minore a 0,9 GHz a causa delle perdite di ionizzazione (Fig. V).



**Figura V:** Profondità di penetrazione a 0,9 e 2,5 GHz per aceto di riso (sopra) e sake (sotto) (Tanaka et al., 2002).

Bohigas e Tejada (2009) e Tanaka et al. (2002), caratterizzarono l'aceto basandosi sulle proprietà dielettriche mediante l'utilizzo delle microonde. Tuttavia, un altro metodo che può essere impiegato per lo stesso scopo è il NIR (Near Infrared Spectroscopy), il quale è una tecnica economica, non distruttiva, facile da utilizzare, versatile, che viene impiegata anche per rivelare le frodi. Questo metodo si basa sul fatto che le sostanze sono in grado di assorbire le radiazioni infrarosse (IR) a differenti lunghezze d'onda e lo spettro risultante dipenderà dalla quantità dal tipo di analita e dallo

spessore del campione. Lo spettro è il risultato delle vibrazioni armoniche indotte dalle radiazioni. Ogni sostanza è in grado di assorbire gli infrarossi ad una determinata lunghezza d'onda:

- gli zuccheri assorbono gli IR a 1450 nm, grazie ai legami C-H e O-H;
- l'acqua assorbe gli IR a 1440-1470 nm
- l'acido acetico, glucosio ed altre componenti assorbono gli IR a 1333-1396 nm, grazie alla presenza del gruppo carbossilico (C=O) (Workmann Jr., 1996).

Tale tecnica fu impiegata da Saiz-Abajo et al. (2004) per classificare differenti tipi di aceto in base alla materia prima utilizzata ed il processo di elaborazione, come per esempio l'invecchiamento nelle botti o l'aggiunta di mosto. Essi, furono in grado di discriminare gli aceti invecchiati da quelli non invecchiati e gli aceti balsamici da quelli di Sherry. Inoltre, discriminarono l'aceto de sidro e di malto dagli altri aceti. Tuttavia, non riuscirono a separare gli aceti di melassi dagli aceti di vino e di sidro.

**PARTE SPERIMENTALE**



## **1 ORGANIZZAZIONE GENERALE DEL LAVORO SPERIMENTALE**

Il presente lavoro si propone di mettere a punto un metodo rapido basato su misure dielettriche in guida d'onda per la stima dei principali parametri qualitativi degli aceti di vino come il contenuto di sostanza secca (%), il residuo secco rifrattometrico (°Brix), la conducibilità elettrica (mS/cm), e il pH. Saranno valutati anche modelli predittivi costruiti a partire da valori di aminoacidi (contenuto totale, mg/kg) e ammine biogene (contenuto totale, mg/kg) ottenuti in un precedente lavoro da Chinnici et al. (2016) tramite analisi HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography with diode array detection). Analisi discriminanti saranno infine prese in considerazione al fine di classificare i campioni di aceto sulla base dell'acidità totale (g/100 ml) riportato in etichetta.

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 I campioni di aceto analizzati**

I 15 campioni di aceto analizzati (A-Q) sono riassunti in Tabella 1. Si tratta di 5 “aceti balsamici di Modena” (invecchiati per 3 anni), 2 “Vinagre de Jerez” (invecchiati per più di 6 mesi), 3 “Vinagre de Jerez Reserva” (invecchiati per più di 2 anni), 3 “Vinagre de Jerez Gran Reserva” (invecchiati per più di 10 anni), 2 “Vinagre de Jerez al Pedro Ximénez” (invecchiati per più di 6 mesi) ed 1 “Vinagre de Jerez al Moscatel” (invecchiato per più di 6 mesi). Altre caratteristiche (zona e tecnica di produzione) sono descritte nel lavoro di Chinnici et al., (2015).

*Tabella 1: I campioni di aceto presi in esame.*

Campione	Tipologia di prodotto	origine	Marchio	Acidità totale (g/100 ml)*
A	Aceto balsamico di Modena	Italia	IGP	6
B	Aceto balsamico di Modena	Italia	IGP	6
C	Aceto balsamico di Modena	Italia	IGP	6
D	Aceto balsamico di Modena	Italia	IGP	6
E	Aceto balsamico di Modena	Italia	IGP	6
F	Vinagre de Jerez	Spagna	DOP	7
G	Vinagre de Jerez Reserva	Spagna	DOP	6
H	Vinagre de Jerez Reserva	Spagna	DOP	7
I	Vinagre de Jerez Reserva	Spagna	DOP	7
L	Vinagre de Jerez al Moscatel	Spagna	DOP	6
M	Vinagre de Jerez al Pedro Ximénez	Spagna	DOP	7
N	Vinagre de Jerez al Pedro Ximénez	Spagna	DOP	7
O	Vinagre de Jerez Gran Reserva	Spagna	DOP	7
P	Vinagre de Jerez Gran Reserva	Spagna	DOP	7
Q	Vinagre de Jerez	Spagna	DOP	7

\*Valore riportato in etichetta.

## 2.2 Strumentazione per spettroscopia dielettrica in guida d'onda.

È uno strumento integrato basato su spettroscopia in guida d'onda nel campo di frequenza 1.6 – 2.7 GHz. Interfacciato a PC via USB, è un analizzatore scalare e vettoriale e consente di acquisire sia il guadagno, dB, sia la fase,  $\pm$  Deg ( $^{\circ}$ ).

La strumentazione è stata brevettata dall'Università di Bologna (O2015/107455A1) ed è stata messa a punto allo scopo di fornire uno strumento semplice, poco costoso e di facile utilizzo per la valutazione dei parametri qualitativi dei prodotti alimentari.

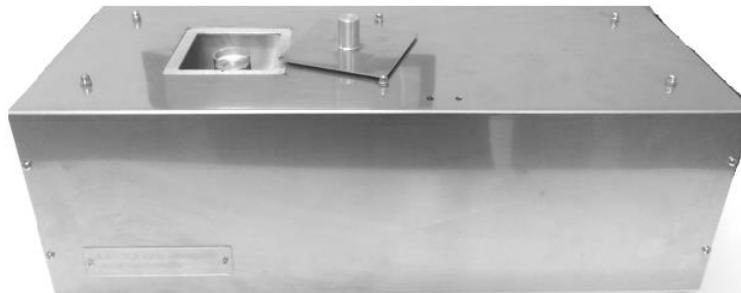
È caratterizzato da una guida d'onda in alluminio provvista di apertura per l'inserimento del porta campione, e di un'antenna trasmittente e di una ricevente posizionate ai due lati opposti di quest'ultimo. Come porta campione durante la sperimentazione è stato utilizzato un contenitore cilindrico di vetro di volume pari a circa 24 ml (Fig. 1). Il sistema comprende infine un oscillatore connesso all'antenna trasmittente per la generazione del segnale radio, un comparatore di fase e guadagno connesso ad entrambe le antenne e ad un'unità di controllo provvista di un microcontrollore economico e di convertitori A/D e D/A.

L'acquisizione, la visualizzazione e il salvataggio delle forme d'onda (guadagno e fase) sfrutta un programma dedicato basato su linguaggio Java.

Per ogni campione di aceto sono state condotte tre acquisizioni provvedendo ogni volta a svuotare e a riempire il porta campione con un volume costante di prodotto (circa 20 ml). Ad ogni acquisizione è stato sottratto il segnale acquisito con il contenitore vuoto.

Le misure dielettriche state condotte a temperature ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Risoluzione = 0.03 (guadagno),  $0.18^\circ$  (fase); frequenza = 0.35 MHz; conversione A/D: 10 bit; tempo di acquisizione: 36 s.



*Figura 1: Strumentazione per spettroscopia dielettrica in guida d'onda.*

### 2.3 Parametri qualitativi misurati

I parametri misurati sono stati il contenuto di sostanza secca (%), il residuo secco rifrattometrico ( $^\circ\text{Brix}$ ), il pH e la conducibilità elettrica (mS/cm). Per ogni campione sono state condotte tre repliche a temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

#### *2.3.1 Misura del contenuto di sostanza secca*

Il contenuto di sostanza secca è stato calcolato gravimetricamente. Sono stati pesati, con una bilancia di precisione, 10 g di prodotto, con previa taratura delle celle di campionamento. Successivamente, i campioni sono stati posti in stufa, preriscaldata a  $80^\circ\text{C}$ , ad essiccare fino a peso costante, che è stato raggiunto al terzo ciclo di essiccazione.

La sostanza secca in percentuale è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{S.S.} = (\text{peso campione secco}/\text{peso campione umido}) \times 100.$$

### *2.3.2 Misura del residuo secco rifrattometrico*

La sua misurazione (°Brix) è stata eseguita mediante il rifrattometro digitale PR1 (Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan). Prima dell'utilizzo, lo strumento è stato calibrato con acqua distillata. Alla fine di ogni misurazione, l'aliquota di campione è stata rimossa e poi la lente è stata pulita con dell'acqua distillata, in modo da evitare dell'interferenze causate dai residui dei campioni analizzati in precedenza.

### *2.3.3 Misura del pH*

La misura del pH è stata eseguita mediante il ph-metro GLP22 della Crison. Prima dell'uso, lo strumento è stato calibrato con tre soluzioni tampone a pH noto (7.1, 10.1 e 4.1). Al termine di ogni misurazione, la sonda è stata prima sciacquata con dell'acqua distillata e poi asciugata.

### *2.3.4 Misura della conducibilità elettrica*

La misura della conducibilità elettrica, è stata effettuata mediante il conduttimetro HD2306.0 della Delta Ohm. La cella di misura, con costane di cella pari a  $0.7 \text{ cm}^{-1}$ , è del tipo a quattro poli ed è stata calibrata con soluzioni 0.01 Molare di KCl ( $1413 \mu\text{S}/\text{cm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) e 0.1 Molare di KCl ( $12880 \mu\text{S}/\text{cm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ).

## *2.4 Analisi dei dati*

Modelli multivariati PLS “Partial Least Square regression” sono stati esplorati al fine di stimare i parametri qualitativi presi in considerazione a partire dalle acquisizioni in frequenza (1.6 - 2.7 GHz) di guadagno e fase. I risultati sono stati espressi in termini di coefficienti di determinazione  $R^2$  e valori RMSE “Root Mean Square Error” calcolati per la calibrazione e la “segmented cross validation” (random, 10% dei campioni) (The Unscrambler 9.7, CAMO).

La regressione PLS è un metodo di modellazione bilineare che permette di proiettare le variabili indipendenti X (informazione spettrale) su un numero limitato di variabili latenti denominate “componenti PLS”. I valori della variabile dipendente Y (parametri qualitativi) sono impiegati attivamente nell'estrazione delle variabili latenti. Le prime componenti sono quelle più rilevanti per la stima della variabile Y.

L'analisi PLS DA “Discriminant Analysis” è stata inoltre impiegata al fine di classificare i campioni di aceto sulla base dei valori di acidità totale (g/100 ml) riportati in etichetta (vedi Tabella 1). I campioni caratterizzati da un valore di acidità totale pari a 6 g/100 ml sono stati codificati con il valore “0” e quelli pari a 7 g/100 ml con il valore “1”. La “segmented cross validation” (random, 10% dei campioni) è stata impiegata per validare il modello.

Il risultato è stato interpretato analizzando l'andamento dei valori predetti/osservati:

$Y_{\text{predetto}} > 0.5$ , osservazione appartenente alla classe dei campioni con acidità pari a 7;

$Y_{\text{predetto}} < 0.5$ , osservazione non appartenente alla classe dei campioni con acidità pari a 7.



### 3 RISULTATI

I valori medi e le deviazioni standard dei parametri qualitativi misurati sui campioni di aceto sono riassunti in Tabella 2. I valori più elevati del contenuto di sostanza secca (%), e di residuo secco rifrattometrico (°Brix) caratterizzano i 5 (A-E) “aceti balsamici di Modena”, i “Vinagre de Jerez al Pedro Ximénez” e il “Vinagre de Jerez al Moscatel”. In generale i campioni balsamici sono caratterizzati anche dai più alti valori di aminoacidi totali (mg/kg) e mediamente dai più bassi valori di ammine biogene (mg/kg), rispetto agli aceti Spagnoli. I risultati delle correlazioni lineari (valori  $R^2$ ) tra i diversi parametri qualitativi analizzati sono riassunti in Tabella 3. Come atteso, i valori di  $R^2$  più alti (0.994) sono stati osservati tra il contenuto di sostanza secca (%) e il residuo secco rifrattometrico (°Brix). Valori di  $R^2$  decisamente inferiori sono stati ottenuti per tutte le altre relazioni lineari analizzate.

Esempi di andamenti spettrali acquisiti per differenti campioni di aceto sono riportati in Figura 1 e in Figura 2 rispettivamente per il guadagno e la fase. Sia per il guadagno che per la fase, gli andamenti spettrali sembrano essere influenzati dalla tipologia di aceto.

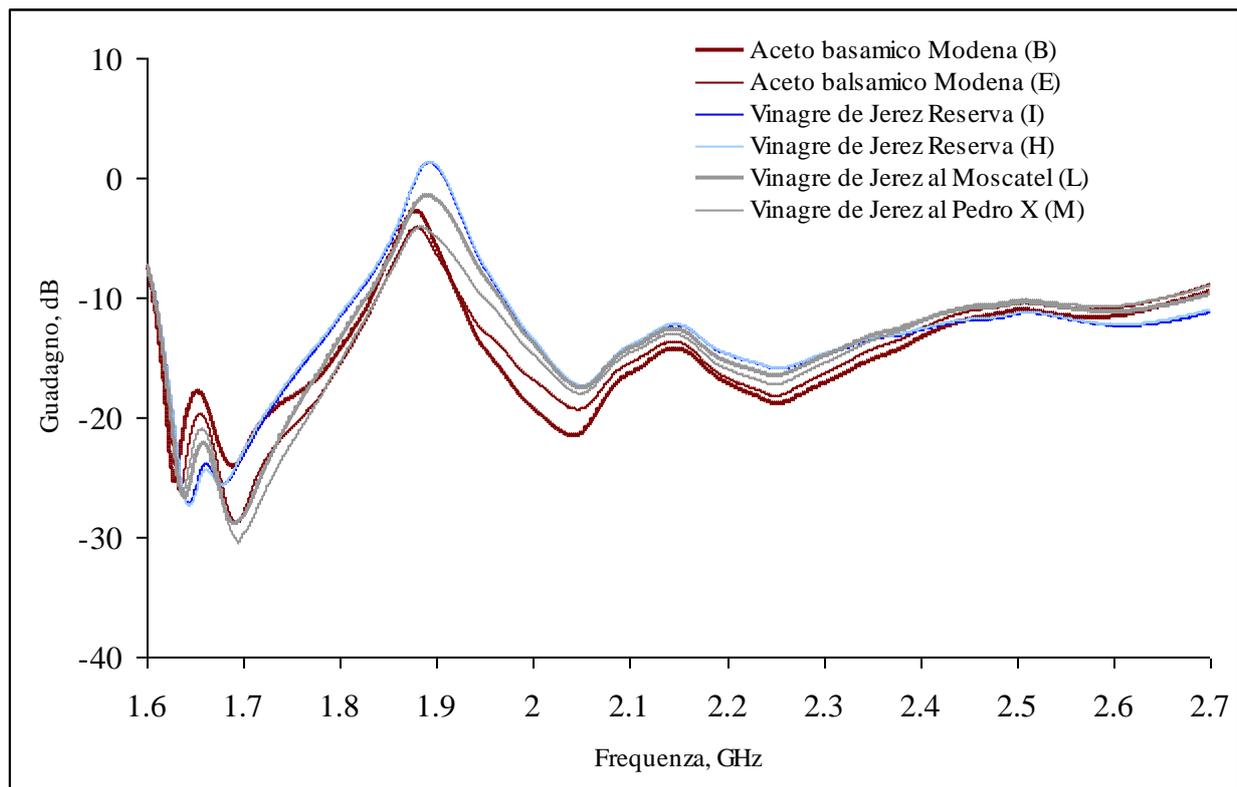
**Tabella 2:** Valori medi e deviazioni standard dei parametri qualitativi misurati.

Campione*	Sostanza secca (%)		Conducibilità elettrica (mS/cm)		Residuo secco rifrattometrico (°Brix)		pH		Aminoacidi totali (mg/kg)**	Ammine biogene totali (mg/kg)**
A	21.9	(0.2)	3.30	(0.01)	24.4	(0.1)	2.98	(0.01)	861	14.3
B	50.5	(0.3)	1.51	(0.01)	51.0	(0.1)	3.18	(0.01)	1233	8.2
C	32.3	(0.3)	2.86	(0.01)	33.3	(0.0)	3.15	(0.01)	1125	13.5
D	23.1	(0.9)	3.44	(0.01)	24.4	(0.0)	3.00	(0.02)	1330	13.1
E	41.3	(0.3)	2.15	(0.01)	41.1	(0.0)	3.07	(0.01)	1063	11.8
F	1.9	(0.1)	3.96	(0.01)	6.2	(0.1)	2.79	(0.01)	486	18.2
G	2.4	(0.5)	6.40	(0.03)	7.1	(0.1)	3.32	(0.03)	886	17.2
H	2.2	(0.1)	3.91	(0.01)	6.9	(0.1)	2.78	(0.01)	539	42.2
I	2.4	(0.4)	3.96	(0.02)	6.7	(0.0)	2.90	(0.01)	488	17.7
L	19.8	(0.2)	2.53	(0.01)	22.1	(0.1)	2.90	(0.02)	493	28.1
M	31.5	(0.2)	1.64	(0.01)	32.4	(0.1)	2.84	(0.01)	546	58.2
N	16.1	(1.6)	4.12	(0.01)	19.4	(0.0)	2.87	(0.01)	789	13.3
O	3.1	(0.1)	4.15	(0.00)	7.9	(0.1)	2.76	(0.01)	441	29.7
P	2.8	(0.0)	4.32	(0.02)	8.1	(0.0)	2.75	(0.01)	428	27.9
Q	1.2	(0.0)	2.95	(0.01)	1.7	(0.0)	3.30	(0.01)	420	5.0

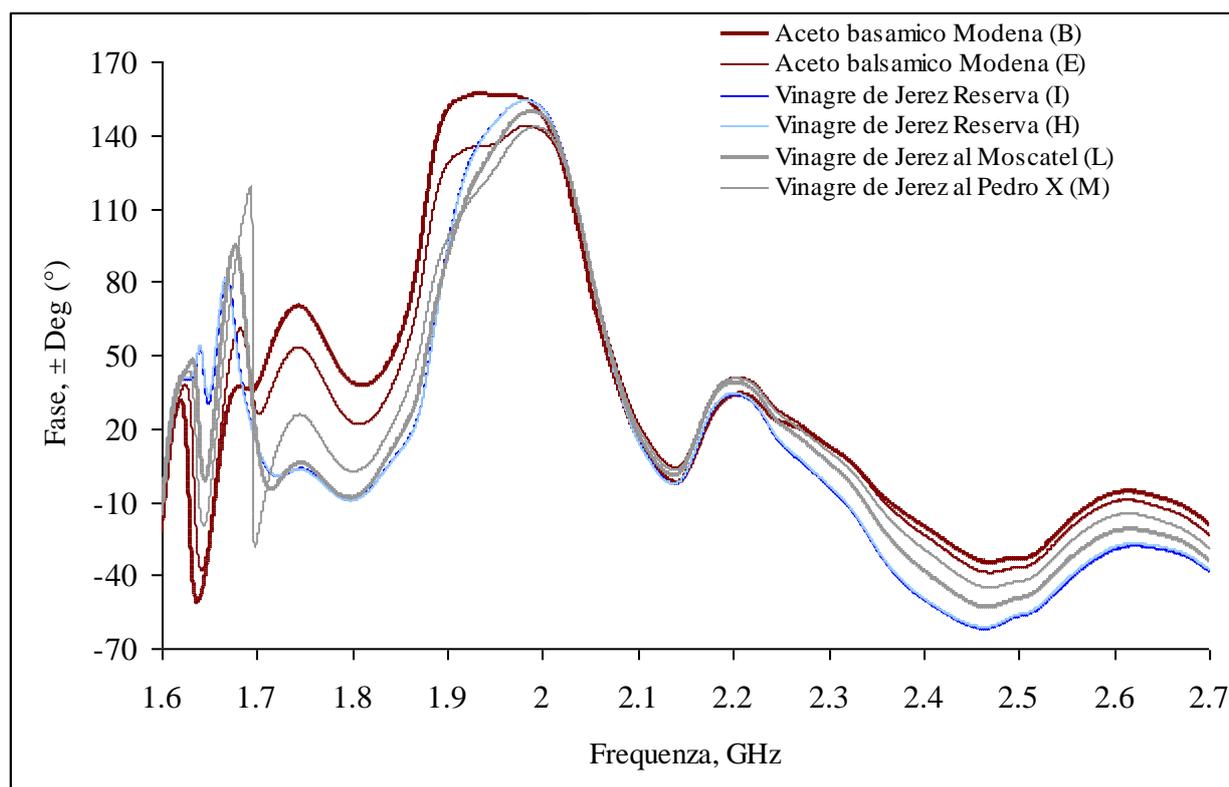
\*Vedi Tabella 1. \*\*da Chinnici et al., 2016. I valori tra parentesi sono deviazioni standard.

**Tabella 3:** Correlazioni lineari ( $R^2$ ) tra i parametri qualitativi.

	Sostanza secca (%)	Conducibilità elettrica (mS/cm)	Residuo secco rifrattometrico (°Brix)	pH	Aminoacidi totali (mg/kg)	Ammine biogene totali (mg/kg)
Sostanza secca (%)	-	0.580	0.994	0.084	0.520	0.017
Conducibilità elettrica (mS/cm)	0.580	-	0.538	0.001	0.052	0.008
Residuo secco rifrattometrico	0.994	0.538	-	0.062	0.520	0.011
pH	0.084	0.001	0.062	-	0.261	0.373
Aminoacidi totali (mg/kg)	0.520	0.052	0.520	0.261	-	0.225
Ammine biogene totali (mg/kg)	0.017	0.008	0.011	0.373	0.225	-



**Figura 1:** Andamento del guadagno per diverse tipologie di aceto.



*Figura 2: Andamento della fase per diverse tipologie di aceto.*

I risultati ottenuti dall'analisi multivariata PLS sono riassunti in tabella 4. In generale, sia per il guadagno che per la fase, i valori più elevati del coefficiente di determinazione  $R^2$  caratterizzano i modelli predittivi del contenuto di sostanza secca e del residuo secco rifrattometrico. In validazione, tali valori sono risultati pari a 0.992 (guadagno, RMSE = 1.46 %) e 0.997 (fase, RMSE = 0.81 %) per la sostanza secca e 0.979 (guadagno, RMSE = 0.26 °Brix) e 0.994 (fase, RMSE = 1.18 °Brix) per il residuo secco rifrattometrico. L'accuratezza della stima è risultata di poco inferiore per quanto riguarda la conducibilità elettrica; in validazione sono stati osservati valori di  $R^2$  pari a 0.972 (RMSE = 0.20 mS/cm) e 0.970 (RMSE = 0.21 mS/cm) rispettivamente per il guadagno e la fase.

I segnali elettrici sembrano inoltre essere influenzati anche dal pH, anche se in misura minore rispetto alla sostanza secca, al residuo secco rifratto metrico e alla conducibilità elettrica. Il pH, come mostrato in Tabella 3, non presenta forti correlazioni con gli altri parametri presi in considerazione.

Buoni modelli predittivi sono stati ottenuti infine anche per gli aminoacidi totali: in validazione sono stati osservati  $R^2$  pari 0.917 (RMSE = 91 mg/kg) e 0.936 (RMSE = 80 mg/kg) rispettivamente per il guadagno e la fase. Di poco più deboli sono risultati i modelli per la stima delle ammine biogene,

caratterizzati da valori di  $R^2$  pari a 0.857 (RMSE = 5.4 mg/kg) e 0.773 (RMSE = 6.6 mg/kg), per guadagno e fase, rispettivamente.

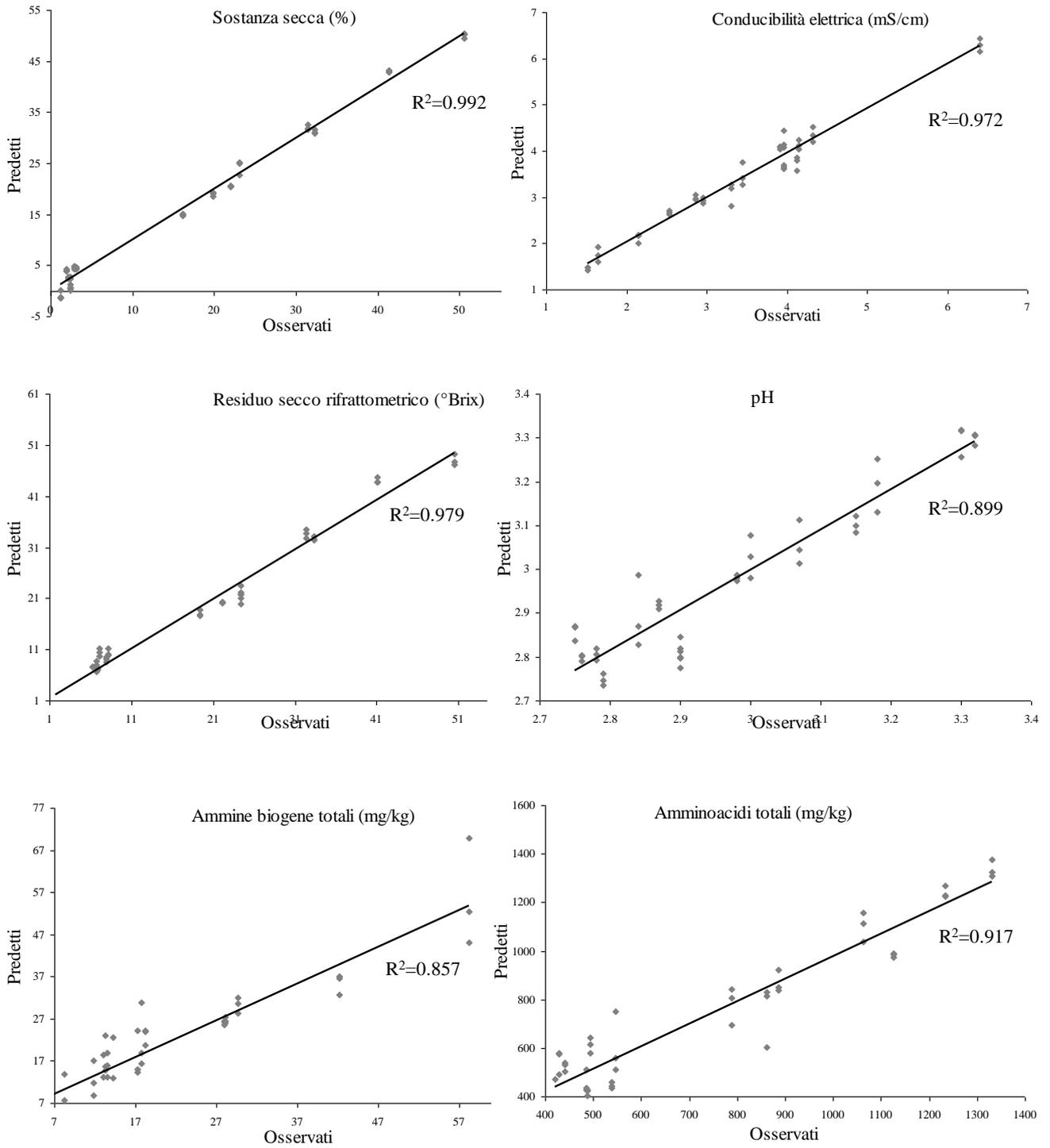
I valori predetti/osservati dei parametri qualitativi sono riassunti nelle Figure 3 e 4 rispettivamente per il guadagno e la fase (segmented cross validation).

Dall'analisi PLS-DA, riassunta in Tabella 5 e in Figura 5, emerge che gli spettri (guadagno e fase) consentono di discriminare i campioni di aceto sulla base del valore di acidità riportato in etichetta (6 g/ml o 7 g/ml). Il 100% dei campioni analizzati è stato correttamente classificato nella classe di appartenenza (0 = 6 g/ml; 1 = 7 g/ml) (segmented cross validation).

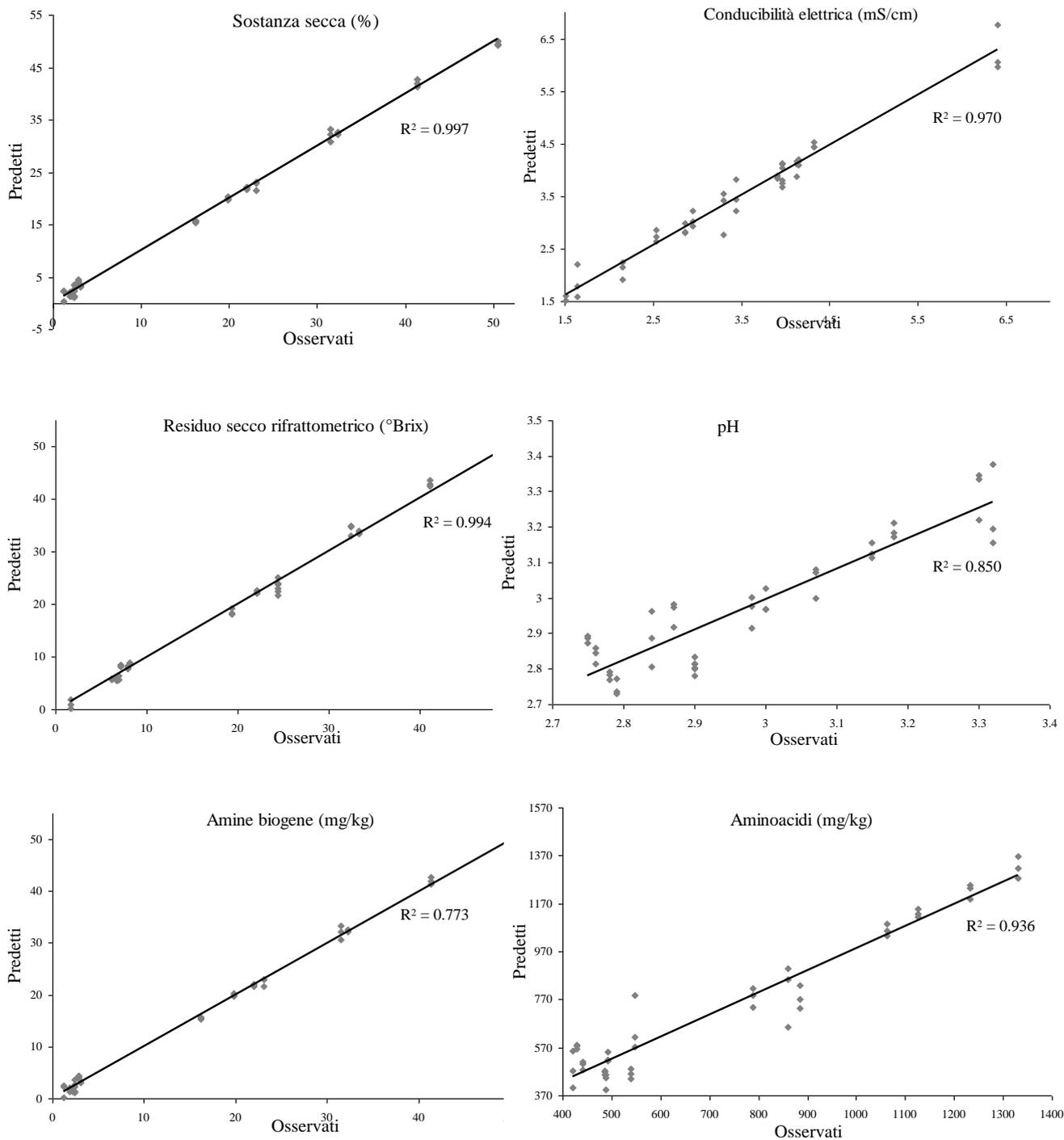
**Tabella 4:** Risultati dei modelli PLS.

Parametro qualitativo	Parametro dielettrico	PLS regression					
		Calibrazione			Segmented Cross Validation		
		PCs	$R^2$	RMSE	PCs	$R^2$	RMSE
Sostanza secca (%)	guadagno	4	0.994	1.22	4	0.992	1.46
	fase	4	0.998	0.62	4	0.997	0.81
Conducibilità elettrica (mS/cm)	guadagno	4	0.980	0.17	4	0.972	0.20
	fase	6	0.988	0.13	6	0.970	0.21
Residuo secco rifrattometrico (°Brix)	guadagno	2	0.979	2.06	2	0.979	2.26
	fase	3	0.998	0.67	3	0.994	1.18
pH	guadagno	6	0.924	0.05	6	0.899	0.06
	fase	5	0.900	0.06	5	0.850	0.07
Aminoacidi totali (mg/kg)	guadagno	5	0.935	79	5	0.917	91
	fase	7	0.967	56	7	0.936	80
Ammine biogene totali (mg/kg)	guadagno	10	0.947	3.1	10	0.857	5.4
	fase	5	0.832	5.6	5	0.773	6.6

PCs: n° di componenti PLS.



**Figura 3:** Valori predetti/osservati dei parametri qualitativi ottenuti dai modelli di regressione PLS per il guadagno.

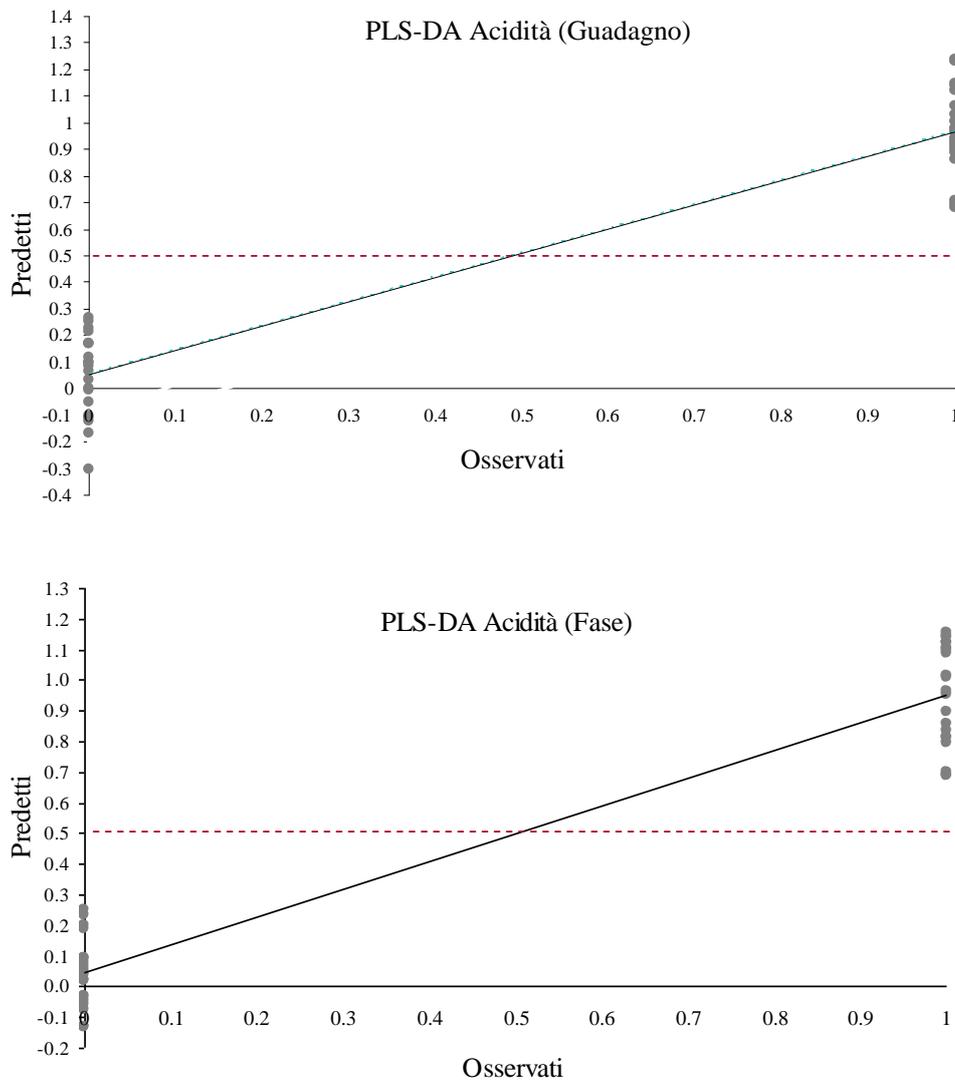


**Figura 4:** Valori predetti/osservati dei parametri qualitativi ottenuti dai modelli di regressione PLS per la fase.

**Tabella 5:** Risultati dell'analisi PLS-DA.

Parametro dielettrico	PLS-DA (Y=0/1)*						
	Calibrazione			Segmented Cross Validation			
	PCs	R <sup>2</sup>	RMSE	PCs	R <sup>2</sup>	RMSE	% campioni correttamente classificati
guadagno	12	0.990	0.05	12	0.905	0.16	100
fase	6	0.948	0.11	6	0.923	0.14	100

\*Y: acidità totale, 6 g/100 ml →0, 7 g/100 ml →1. PCs: n° di componenti PLS.



**Figura 5:** Valori predetti/osservati ottenuti dall'analisi PLS-DA(segmented cross validation).



#### **4 CONCLUSIONI**

Le potenzialità di una strumentazione innovativa in guida d'onda unitamente all'uso di analisi statistiche multivariate sono state esplorate al fine di stimare in modo rapido i principali parametri chimico-fisici di diversi campioni di aceto di vino.

Le forme d'onda acquisite nell'intervallo di frequenza 1.6-2.7 GHz (guadagno e fase) sono risultate essere influenzate dai principali parametri compositivi dei campioni analizzati. In validazione, i modelli di regressione PLS hanno evidenziato valori del coefficiente di determinazione  $R^2$  fino a 0.997 (RMSE = 0.81 %) per il contenuto di sostanza secca e fino a 0.994 per il residuo secco rifrattometrico (RMSE = 1.18 °Brix. Accuratezze di poco inferiori sono state osservate per la conducibilità elettrica ( $R^2 = 0.972$ , RMSE = 0.2 mS/cm) e per gli aminoacidi totali ( $R^2 = 0.936$ , RMSE = 80 mg/kg).

L'analisi statistica delle forme d'onda tramite la tecnica PLS-DA ha permesso inoltre di poter classificare i campioni di aceto sulla base del valore di acidità riportato in etichetta (6 g/100 ml o 7 g/100 ml). Il 100% dei campioni validati è stato correttamente classificato nella classe di appartenenza.

La strumentazione presa in esame potrebbe competere con le tecniche analitiche tradizionalmente impiegate per l'analisi dei principali parametri compositivi dell'aceto di vino, quantomeno per una stima orientativa dei parametri stessi. Di facile utilizzo, consentirebbe di ridurre notevolmente il tempo di analisi e i relativi costi dovuti alla preparazione del campione e alla gestione delle attrezzature. La strumentazione proposta potrebbe inoltre fornire un valido supporto per il controllo dei parametri da tenere in considerazione durante le fasi di produzione e di invecchiamento dell'aceto. Sviluppi della presente ricerca potrebbero consistere nell'utilizzo di altri metodi di stima dei parametri chimico-fisici di interesse. Modelli non lineari multivariati potrebbero, in tal senso, consentire determinazioni più precise rispetto a quelle ottenibili con la regressione dei minimi quadrati parziali qui utilizzata.



## **BIBLIOGRAFIA**

- Adams, M. R., Vinegar. *Academic Press*, School of Biological Sciences, Gulldford, UK, pp. 2258-2263 (1999).
- Adams, M.R., Vinegar, In: Wood, J.B. (Ed.), 2nd Ed. *Microbiology of fermented food*, vol.1. Blackie Academic and Professional, London, pp. 1–44 (1998).
- Agilent Technologies, Agilent Basics of Measuring the Dielectric Properties of Materials, Application Note, 2006.
- Álvarez-Cáliz, C., Santos-Dueñas, I.M., Cañete-Rodríguez, A.M., García-Martínez, T., Mauricio, J.C., e García-García, I., Free amino acids, urea and ammonium ion contents for submerged wine vinegar production: influence of loading rate and air-flow rate. *Acetic Acid Bact*, **1**:1 (2012).
- Álvarez-Cáliz, C., Santos-Dueñas, I.M., García-Martínez, T., Cañete-Rodríguez, A.M., Millán-Pérez, M.C., Mauricio, J.C., et al., Effect of biological ageing of wine on its nitrogen composition for producing high quality vinegar. *Food Bioprod. Process*, **92**:291–297 (2014).
- Antonelli, A., Zeppa, G., Gerbi, V. e Carnacini, A., I polialcoli negli aceti di diversa origine botanica e geografica. In *Proceedings of the RAISA meeting of Sarteano (SI)*, Rome, 26–27 October 1994.
- Antonelli, A., Zeppa, G., Gerbi, V., e Carnacini, A., Polyalcohols in vinegar as an origin discriminator. *Food Chemistry*, **60**:403–407 (1997).
- Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J. F., e Ferreira, V., Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC–MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**:2924–2929 (2001).
- Bailly, S., Jerkovic, V., Marchand-Brynaert, J., e Collin, S., Aroma extraction aroma analysis of Sauternes wines. Key role of polyfunctional thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(19):7227–7234 (2006).
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., e Henschke, P.A., Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters and Applied Microbiology*, **36**:307–314 (2003).
- Bauza, T., e Teisseidre, P.L., Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. *Bull l'Office Int. du Vin* **68**:42–67 (1995).
- Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J. e Günata, Z., Aromas. In C. Flanzky, *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, 10th ed., pp. 137–176 (2000).
- Bohigas, X., e Tejada, J., Dielectric characterization of alcoholic beverages and solutions of ethanol in water under microwave radiation in the 1–20 GHz range. *Food Research International*, **43**:1607–1613 (2010).
- Bohigas, X., e Tejada, J., Dielectric properties of acetic acid and vinegar in the microwave frequencies range 1–20 GHz. *Journal of Food Engineering*, **94**:46–51 (2009).

- Booth, I. R., e Kroll, R. G., The preservation of foods by low pH. New York: Elsevier Science Publishers (1989).
- Borrelli, R. C., e Fogliano, V., Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.*, **49**:673–678 (2005).
- Bozalongo, R., Carrillo, J. D., Fernández Torroba, M. A., e Tena, M. T., Analysis of French and American oak chips with different toasting degrees by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1173**(1–2):10–17 (2007).
- Cabras, P., Aceto. *Chimica degli Alimenti*, Piccin, **23**: 547-556.
- Cabras, P., Vino. *Chimica degli Alimenti*, Piccin, **22**: 521-546.
- Callejón, R. M., González, A. G., Troncoso, A. M., e Morales, M. L., Optimization and validation of headspace sorptive extraction for the analysis of volatile compounds in wine vinegars. *Journal of Chromatography A*, **1204**:93–103 (2008).
- Callejón, R. M., Morales, M. L., Silva Ferreira, A. C., e Troncoso, A. M., Defining Sherry vinegar tipicity: Sensory and chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(17): 8086–8095 (2008).
- Callejón, R., Tesfaye, W. e Torija, M., HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surfaceacetifications and its relation to the microbiota. *Eur. Food. Res. Technol.*, **227**:93–102 (2008).
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., e Morales, M.L., Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd., **113**: 1252–1259 (2009).
- Callejón, R.M., Torija, M.J., Mas, A., Morales, M.L., e Troncoso, A.M., Changes of volatile compounds in wine vinegars during their elaboration in barrels made from different woods. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd., **120**: 561–571 (2010).
- Cataldo, A., PiuZZi, E., Cannazza, G., e De Benedetto, E., Classification and adulteration control of vegetable oils based on microwave reflectometry analysis. *Jour. of Food Eng.*, **112**:338-345 (2012).
- Cerezo, A. B., Tesfaye, W., Soria-Díaz, M. E., Torija, M. J., Mateos, E., García-Parrilla, M. C., et al. (in press). Wood impact on phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during aging. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Charoenkiatkul, S., Thiyajai, P., e Judprasong, K., Nutrients and bioactive compounds in popular and indigenous durian (*Durio zibethinus murr.*). *Food Chemistry*, **193**:181–186 (2016).
- Chiavaro, E., Caligiani, A., e Palla, G., Chiral indicators of ageing in balsamic vinegars of Modena. *Italian Journal of Food Science*, **10**:329–337 (1998).

- Chinnici, F., Durán-Guerrero, E., e Riponi, C., Discrimination of some European vinegars with protected denomination of origin as a function of their amino acid and biogenic amine content, *J Sci Food Agric*, Society of Chemical Industry (2016).
- Chou, C. H., Liu, C. W., Yang, D. J., Wu, Y. H., e Chen, Y. C., Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects in vivo. *Food Chemistry*, **168**:63–69 (2015).
- Ciani, M., e Maccarelli, F., Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**:199–203 (1998).
- Ciani, M., Wine vinegar production using base wines made with different yeast species. *J. Sci. Food Agric.*, **78**:290–294 (1998).
- Commission implementing regulation (EU) 2015/48 of 14 January 2015. *Official Journal of European Commission*, **2015**:11-16 L9 (2015).
- Csomós, E., Héberger, K., e Simon-Sarkadi, L., Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in Hungarian wines. *J. Agric. Food Chem.* **50**:3768–3774 (2002).
- Dabija, A., e Hatnean, C. A., Study concerning the quality of apple vinegar obtained through classical method. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **20(4)**:304–310 (2014).
- De Ley, J., Gillis, M., e Swings, J., Acetobacteraceae. In: Holt, J.G. (Ed.), Family VI. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Baltimore, Baltimore, **1**:267–278 (1984).
- de Ory, I., Romero, L.E., e Cantero, D., Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**:189–193 (1998).
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., e Giudici, P., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*, **23**:809–813 (2006).
- Delgado-Andrade, C., e Morales, F. J., Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.*, **53**:1403–1407 (2005).
- Discipinare di produzione, Aceto Balsamico di Modena, Indicazione Geografica Protetta.
- Drysdale, G.S., e Fleet, G.H., Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**:143–154 (1988).
- Du Plessis, C. S., Influence de la temperature d'elaboration et de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. *Bulletin of OIV*, **624**:105–115 (1983).
- Du Toit, W.J., e Pretorius, I.S., The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, **52**:155–179 (2002).

- Dunning, W. J., e Shutt, W. J., The dielectric constants of zwitterions and polar molecules as related to pH. *Trans. Faraday Soc.*, **34**:479-485 (1938).
- Dutta, D., e Gachhui, R., Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**:1899–1903 (2006).
- Erbe, T., e Brückner, H., Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography selected ion monitoring mass spectrometry. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung A.*, **207**:400–407 (1998).
- Erbe, T., e Brückner, H., Studies on the optical isomerization of dietary amino acids in vinegar and aqueous acetic acid. *European Food Research and Technology*, **211**:6–12 (2000).
- Fleet, G.H., The microorganisms of winemaking— isolation, enumeration and identification. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 1–27 (1993).
- Fukami, H., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., e Tanaka, Y., Acetic acid bacteria lipids improve cognitive function in dementia model rats. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **58**:4084–4089 (2010).
- Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukiharu, M., Tsukamoto, Y., e Goda, T., Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, **95**:916–924 (2006).
- Fushimi, T., Tayama, K., Fukaya, M., Kotakoshi, K., Nakai, N., e Tsukamoto, Y., Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *Journal of Nutrition*, **131**:1973–1977 (2001).
- Garde-Cerdán, T., e Ancín-Azpilicueta, C., Review of quality factors in wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science and Technology*, **17(5)**:438–447 (2006).
- Gerbi, V., Zeppa, G., Antonelli, A., Natali, N., e Carnacini, A., Evoluzione dei costituenti principali del vino e del sidro nel corso dell'acetificazione. *Industrie delle Bevande*, **24**:241–246 (1995).
- Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L., De Vero, L., Landi, S., Pulvirenti, A., Rainieri, S., Le fermentazioni dell'Aceto Balsamico Tradizionale. *Stati di Luogo Diabasis*, Reggio Emilia, Italy, 2006.
- Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L., e Falcone, P. M., Technological and Microbiological Aspects of Traditional Balsamic Vinegar and Their Influence on Quality and Sensorial Properties, in *Advances in Food and Nutrition Research*, ed. da Elsevier Inc., 137-182 (2009).

- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., e Guillamón, J.M., Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, **96**:853–860 (2004).
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., e Ancín-Azpilicueta, C., Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels. *Food Chemistry*, **108**(1):213–219 (2008).
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., e Vincenzini, M., Oenological properties of *Hanseniaspora* osmophila and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.*, **2**:403–407 (2002).
- Greenfield, S., e Claus, G.W., Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology*, **112**:1295–1301 (1972).
- Guchu, E., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., e Cabezudo Ibáñez, M. D., Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chip. *Food Chemistry*, **99**(2):350–359 (2006).
- Guerrero, E. D., Castro, R., Natera, R., Palma, M., Gómez Beser, J., e Barroso, C. G., Seguimiento del proceso de acetificación de un vinagre de Jerez mediante SBSE-GC-MS E IR-MEDIO. In Segundas jornadas de I+D+I en la elaboración de vinagres. *Córdoba: Argos Impresores S.L.*, pp. 117–126 (2006).
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., e Giudici, P., Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal Food Microbiology*, **106**:209–212 (2006).
- Gullo, M., e Giudici, P., Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier B.V., Department of Agricultural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Italy, **125**: 46–53 (2008).
- Gullo, M., e Giudici, P., Isolation and selection of acetic acid bacteria strains for traditional balsamic vinegar. *Industrie Delle Bevande*, **35**:345–350 (2006).
- Hasted, J. B., Ritson, D. M., e Collie, C. H., Dielectric properties of aqueous ionic solutions. Parts I and II. *Journal of Chemical Physics*, **16**(1):21 (1948).
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., e Ferreira, V., Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **12**:150–160 (2006).

- Hernández-Orte, P., Ibarz, M., Cacho, J., e Ferreira, V., Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.* **89**:163–174 (2005).
- Herve, A.-G., Tang, J., Luedecke, L., e Feng, H., Dielectric properties of cottage cheese and surface treatment using microwaves. *Journal of Food engineering*, **37**:389–410 (1998).
- Ho, C. W., Lazim, A. M, Fazry, S., Zaki, U. K. H, e Lim, S. J., Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry*, **221**: 1621–1630 (2017).
- Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., e Kim, Y.S., Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**:183–188 (1999).
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., e Ribereau-Gayon, P., Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* **48**:153–156 (1984).
- Kittelmann, M., Stamm, W.W., Follmann, H., e Truper, H.G., Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **30**:47–52 (1989).
- Landete, J.M., Ferrer, S. e Pardo, I., Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria e yeast isolated from wine. *Food. Control.*, **18**:1569–1574 (2007).
- Laranjinha, J. A., Almeida, L. M., e Madeira, V. M., Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: Antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, **48(3)**:487–494 (1994).
- Madrera, R. R., Lobo, A. P., e Alonso, J. J. M., Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits. *Food Research International*, **43(1)**:70–78 (2010).
- Maestre O., e Santos-Dueñas, I., Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator. *Process. Biochem.*, **43**:803–807 (2008).
- Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., Brink, J., Kuyper, M., Luttkik, M. A. H., Pronk, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, **90(4)**:391–418 (2006).
- Martinsen, O. G., Grimmes, S., e Mirtaheri, P., Non-invasive measurements of post-mortem changes in dielectric properties of haddock muscle – a pilot study. *Journal of Food Engineering*, **43**:189–192 (2000).
- Matsushita, K., Inoue, T., Theeragool, G., Trcek, J., Toyama, H., e Adachi, O., Acetic acid production in acetic acid bacteria leading to their ‘death’ and survival. In: Yamada, M. Kerala (Ed.),

- Survival and Death in Bacteria. Research Signpost, Kerala, India, pp. 169–181 (2005).
- Metaxas, R. C., e Meredith, R. J., Industrial microwave heating. Peter Peregrinus Ltd., Herts, U.K., 1983.
  - Morales, M. L., González, G. A., Casas, J. A., e Troncoso, A. M., Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: Influence of acetification and aging. *European Food Research and Technology*, **212**:676–682 (2001a).
  - Morales, M. L., Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C., Casas, J. A., e Troncoso, A. M., Sherry wine vinegar: Physicochemical changes during the acetification process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**:611–619 (2001b).
  - Morales, M.L, Gonzàlez, G. A., Casas, J. A., e Troncoso, A. M., Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. *European Food Research Technology*, **212**:676–682 (2001).
  - Mudgett, R., Dielectric properties of foods. *Microwaves in the Food Processing Industries*, pp 15–37 (1985).
  - Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A.T., Kere, C., Diawara, B., e Thonart, P., Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**: 916–923 (2006).
  - Nieto, J., González-Viñas, M. A., Barba, P., Martìn-Ivarez, P. J., Aldavem, L., García-Romero, E., e Cabezudo, M. D., Recent progress in wine vinegar R & D and some indicators for the future. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors, ingredients and composition* (pp. 469–500). Amsterdam: Elsevier Science (1993).
  - Nunes, A. C., Bohigas, X., e Tejada, J., Dielectric study of milk for frequencies between 1 and 20 GHz. *Journal of Food Engineering*, **76**:250–255 (2006).
  - O'Brian, J., e Morrisey, P. A., Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci.*, **28**:24213–24217 (1989).
  - Osada, K., Suzuki, T., Karakami, Y., Senda, M., Kasai, A., Sami, M., e Ikeda, M., Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple phenol in rats fed cholesterol. *Lipids*, **41**:33–139 (2006).
  - Palacios, V., Valcárcel, M., Caro, I., e Pérez, L., Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. *J. Agric. Food. Chem.*, **50**:4221–4225 (2002).

- Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo-Mínguez, F., e Gómez-Plaza, E., Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(18)**:5444–5449 (2003).
- Pethig, R., Dielectric properties of biological materials: biophysical and medical applications. *Transactions on Electrical Insulation*, Vol. EI-19 No.5, pp. 453-474 (1984).
- Pizarro, C., Esteban-Díez, I., Sáenz-González, C., e González-Sáiz, J. M., Vinegar classification based on feature extraction and selection from headspace solid-phase microextraction/gas chromatography volatile analyses: A feasibility study. *Analytica Chimica Acta*, **608**:38–47 (2008).
- Plessi M., VINEGAR. Elsevier Science Ltd., Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Modena, Modena, Italy, 5996-6004 (2003).
- Prior, R. L., e Cao, G., Flavonoids: Diets and health relationships. *Nutrition in Clinical Care*, **3**:279–288 (2000).
- Qui, J., Ren, C., Fan, J., & Li, Z. (2010). Antioxidant activities of aged oat vinegar in vitro and in mouse serum and liver. *Journal of the Science and Food Agriculture*, **90(11)**:1951–1958.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J.E., Pulvirenti, A., Giudici, P., *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, **177**:177–185 (1998).
- Ramana, K.V., Tomar, A., e Singh, L., Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**:245–248 (2000).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., e Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology, the chemistry of wine stabilization and treatments*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Romero, L. E., Gómez, J. M., Caro, I., e Cantero, D., A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. *The Chemical Engineering Journal*, **54**:B15–B24 (1994).
- Rufian-Henares, J. A., e Morales, F. J., Effect of in-vitro enzymatic digestion on and activity of coffee melanoidins and fractions. *J. Agric. Food Chem.*, **55**:10016–10021 (2007).
- Saeki, A., Taniguchi, M., Matsushita, K., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., e Adachi, O., Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **61**:317–323 (1997).
- Sáiz-Abajo, M.J., González-Sáiz, J.M., e Pizarro, C., Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods applied to the classification of vinegar according to raw material and elaboration process *J. Near Infrared Spectrosc.*, **12**:207–219 (2004).

- Sefton, M. A., Francis, I. L., Pocock, K. F., e Williams, P. J., The influence of natural seasoning on the concentrations of eugenol, vanillin and cis and transmethyl-octalactone extracted from French and American Oakwood. *Sciences des Aliments*, **13**:629–643 (1993).
- Sellmer, S., Sievers, M., e Teuber, M., Morphology, virulence and epidemiology of bacteriophage particle isolated from industrial vinegar fermentations. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**:610–616 (1992).
- Siau, J. E., Transport Process in Wood. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1984.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., e Velázquez, E., *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**:21–24 (2006).
- Solieri, L., e Giudici P., Yeasts associated to Traditional Balsamic Vinegar: Ecological and technological features. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier B.V., Department of Agricultural Science, University of Modena and Reggio Emilia, Italy, **125**: 36–45 (2008).
- Solieri, L., e Giudici, P., (eds), *Vinegars of the World*. Springer, Milan (2009).
- Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., Giudici, P., Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *Journal of Applied Microbiology*, **101**:63–71 (2006).
- Suarez-Lepe, J.A., Microbiología enológica: fundamentos de vinificación. Mundiprensa, Madrid (1990).
- Svennerholm, L., Gangliosides – A new therapeutic against stroke and Alzheimer’s disease. *Life Science*, **55**:2125–2134, (1994).
- Swings, J., The Genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, NY, pp. 2268–2286 (1992).
- Tanaka, F., Morita, K., Mallikarjunan, P., Hung, Y.–C., e Ezeike G. O. I., Analysis of dielectric properties of rice vinegar and sake. *American Society of Agricultural Engineers*, **45(3)**:733–740 (2002).
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., e Huis in’t Veld, J.H.J., Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J. Food Microbiol* **11**:73–84 (1990).
- Tesfaye, W., Morales, M. L., Callejón, R. M., Cerezo, A. B., García-Parrilla, M. C., e Troncoso, A. M. Proposal of a standardized method for Sensory analysis of wine vinegar. *Journal of Food Science* (under consideration), 2008.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., Garcí’a-Parrilla, M.C., e Troncoso, A.M., Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier Science Ltd, **13**: 12–21 (2002).

- Tulasidas, T.N., Raghavan, G.S.V., van de Voort, F., e Girard, R., Dielectric properties of grapes and sugar solutions at 2.45 GHz. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, International Microwave Power Institute (ed.), **30(2)**: 117-123 (1995).
- Ubeda, C., Callejón, R. M., Hidalgo, C., Torija, M. J., Mas, A., Troncoso, A. M., e Morales, M. L., Determination of major volatile compounds during the production of fruit vinegars by static headspace gas chromatography-mass spectrometry method. *Food Research International*, **44**:259–268 (2011).
- Valero, E., Berlanga, T.M., Roldán, P.M., Jiménez, C., García, I., e Mauricio, J.C., Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate. *J. Sci. Food. Agric.*, **85**:603–608 (2005).
- Valero, E., e Millán, C., Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Sci. Food. Agric.*, **83**:830–835 (2003).
- Valles, B. S., Bedrinana, R. P., Tascon, N. F., Garcia, A. G., e Madrera, R. R., Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. *LWT – Food Science and Technology*, **38**:455–461 (2005).
- Venkatesh, M.S., e Raghavan, G.S.V., An Overview of Microwave Processing and Dielectric Properties of Agri-food Materials. *Biosystems Engineering*, **88(1)**:1–18 (2004).
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., e Conte, A., Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, **105**:564–571 (2007).
- Workman Jr, J.J., *Appl. Spectrosc Rev*, **31**:251 (1996).
- Zhang, X.-M., Chan, C.-C., Stamp, D., Minchin, S., Archer, M. C., e Bruce, W. R., Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. *Carcinogenesis*, **14(4)**:773–775 (1993).