



**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE**  
**MILANO**

Dottorato di ricerca in  
**BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI**

ciclo XIX  
S.S.D: AGR/15-ING-IND/25

**STUDIO DELLA PRESENZA DI  
POLICLOROFENOLI E POLICLOROANISOLI  
NEL SUGHERO PER USO ENOLOGICO**

**Tesi di Dottorato di Luana Maggi**

Matricola: 3280007

Anno Accademico 2005/2006





**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE  
MILANO**

Dottorato di ricerca in  
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

Ciclo XIX  
S.S.D: AGR/15-ING-IND/25

**STUDIO DELLA PRESENZA DI  
POLICLOROFENOLI E POLICLOROANISOLI  
NEL SUGHERO PER USO ENOLOGICO**

**Coordinatore: Ch.mo Prof. D. Marco De Faveri**

**Tesi di Dottorato di Luana Maggi**

Matricola: 3280007

Anno Accademico 2005/2006

## *RINGRAZIAMENTI*

Ringrazio di cuore tutte le persone che mi hanno aiutato ed hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi.

Desidero esprimere la mia gratitudine all'Istituto di Enologia e Ingegneria agro-alimentare, in particolare al Prof. D. Marco De Faveri, coordinatore del Corso di dottorato, e alla Prof. Valeria Mazzoleni, che mi hanno permesso di portare a termine questi tre anni di dottorato.

Ringrazio inoltre l'azienda DANI Instruments S.p.A. per la collaborazione ed il supporto strumentale e tecnico.

Desidero ringraziare la Prof. M<sup>a</sup> Rosario Salinas e tutto il gruppo della Cátedra de Química Agrícola de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos di Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha) per avermi messo a disposizione i mezzi necessari per terminare la tesi di dottorato ed avermi fatto sentire come a casa. Un grazie particolare ad Ana e ad Antonio.

# **INDICE**

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Cenni storici sul sughero</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Processo di elaborazione del sughero</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Il sughero e il vino</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1. Interazione chimiche tra sughero e vino - Il gusto di tappo</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2. Policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero</b>	<b>20</b>
<b>1.4. La determinazione di policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero - Test analitici e sensoriali</b>	<b>24</b>
<b>1.5. Caratteristiche di TCA e TCP</b>	<b>28</b>
<b>1.5.1. 2,4,6-Tricloroanisolo</b>	<b>28</b>
<b>1.5.2. 2,4,6-Triclorofenolo</b>	<b>30</b>
<b>1.6. Aspetti microbiologici del sughero</b>	<b>31</b>
<b>2. OBIETTIVI</b>	<b>37</b>
<b>3. PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Valutazione dell'impatto sensoriale del TCA in differenti tipologie di vini</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Messa a punto del metodo di estrazione e di analisi del TCA nel sughero, mediante estrazione solido-liquido e determinazione per GC/ECD</b>	<b>56</b>
<b>3.3. Confronto tra SBSE e SPME per la determinazione di policlorofenoli e policloroanisoli in vino con analisi gas cromatografica e l'uso in tandem dello spettrometro di massa (GC/MS/MS)</b>	<b>65</b>
<b>3.4. Caratterizzazione di microrganismi naturalmente presenti nel sughero in base alle loro capacità di degradare TCP e formare TCA</b>	<b>77</b>
<b>4. CONCLUSIONI GENERALI</b>	<b>89</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>92</b>

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. Cenni storici sul sughero**

Gli alberi di sughero hanno costituito senza dubbio buona parte delle foreste in parecchie zone del mondo per molte migliaia di anni. Grazie ad alcune proprietà peculiari del sughero, per secoli questo materiale ha avuto varie applicazioni: gli antichi Greci e Romani avevano notato che il sughero galleggiava così lo utilizzarono per costruire imbarcazioni, galleggianti e boe per le reti da pesca.

Il sughero veniva usato anche come suola per i sandali, le scarpe invernali erano interamente fabbricate con questo materiale per la sua caratteristica di isolante termico (Maga et al., 2005; Magalit, 1997).

Anche l'utilizzo del sughero per la chiusura dei recipienti vinari risulta essere molto antico: il più lontano reperto è rappresentato da un'anfora chiusa con sughero scoperta in Atene e risalente al V secolo a.C. Esistono inoltre notizie del suo impiego da parte dei Greci e dei Romani che lo usavano per la tappatura delle anfore durante il trasporto di vino e di olio.

A partire dal III secolo d.C., le anfore furono sostituite con recipienti fatti in legno e questo fece sì che il sughero fosse dimenticato fino alla seconda metà del XVII secolo quando cominciò ad essere utilizzato nel distretto di Reims (Francia), pare a seguito dell'invenzione dello Champagne da parte del monaco benedettino Dom Pérignon. Si racconta che il monaco ebbe l'idea di sostituire i vecchi pezzi di legno avvolti di canapa oliata osservando i pellegrini spagnoli che visitavano l'Abbazia D'Hautvillers: essi infatti usavano il sughero per chiudere le loro borracce.

Il sughero come materiale di chiusura venne reintrodotta dopo la nascita della bottiglia da vino moderna risalente all'inizio del XVII secolo (con l'invenzione da parte

dell'inglese Sir Kenelm Digby, nel 1630), mentre la prima fabbrica di tappi in sughero fu fondata nel 1750, presso il confine franco-spagnolo.

Il ricorso alle bottiglie di vetro e al sughero ha consentito una chiusura ermeticamente sicura ed ha rappresentato una vera e propria rivoluzione in campo enologico: infatti bottiglie e tappi hanno permesso di allungare la vita del vino, che fino ad allora era una merce deperibile e che obbligava i commercianti a liberarsene il più presto possibile.

A partire da allora il sughero è stato utilizzato in maniera continua ed industrializzata per la chiusura dei vini e di altre bevande alcoliche e non, grazie alle sue straordinarie caratteristiche quali la bassa densità, la flessibilità, l'impermeabilità e la durata nel tempo.

Attualmente l'industria europea del sughero produce 340000 tonnellate di sughero ogni anno, per un valore di due milioni e mezzo di euro, dando lavoro a 30000 persone. I tappi di sughero per uso enologico rappresentano solo il 15 % dell'utilizzo del sughero in peso, ma ben il 70 % del business (<http://blauweiderich.de.xanax-order.be>).

## **1.2. Processo di elaborazione del sughero**

Il sughero utilizzato per la fabbricazione dei tappi è il tessuto esterno della quercia da sughero (*Quercus Suber L.*), che protegge i tessuti vivi contro il disseccamento e le condizioni ambientali dannose pur non intervenendo nelle funzioni attive di vegetazione.

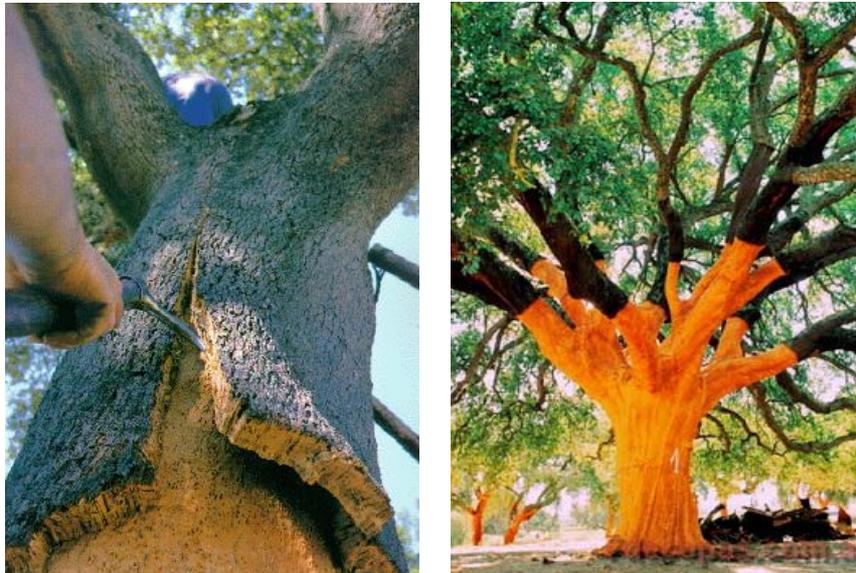
Le caratteristiche chimico-fisiche e strutturali del sughero sono molto variabili e possono essere modificate durante il processo di trasformazione in seguito all'applicazione di differenti tecnologie ed attrezzature. Già in origine la natura del

sughero viene determinata dalla regione di produzione, ma anche dalla foresta e dall'albero dal quale proviene (Caldentey, 1994).

La prima decortica della pianta si fa a 18-25 anni e si ottiene il cosiddetto “sughero maschio”, un materiale molto grossolano; dopo di che la quercia inizierà a produrre un nuovo strato di sughero sulla superficie rimasta scoperta. Viene così prodotta una nuova corteccia con caratteristiche più adatte alla fabbricazione dei tappi di sughero, che viene chiamata “sughero femmina” e si ottiene con una frequenza di 9-10 anni. I turni di decortica sono funzione fondamentale del calibro raggiunto dalla massa sugherosa, costituita da una serie di strati o anelli di accrescimento di diverso spessore (Colagrande, 1996).

In Figura 1 sono mostrate alcune immagini relative alla fase di decortica.

*Figura 1 – Fase di decortica.*



Il sughero appena raccolto possiede un'umidità naturale piuttosto elevata che varia da un minimo del 10-12 % ad un massimo del 40-45 %; questa umidità è contenuta quasi interamente nell'ultimo anello suberoso.

Dopo la raccolta il sughero viene sottoposto ad un periodo di stagionatura all'aria della durata di 6-24 mesi (Figura 2); con l'esposizione all'aria il sughero si essicca, fino ad equilibrarsi con l'umidità dell'ambiente intorno a valori variabili tra l'8 e il 10 %. Durante questa fase, per fenomeni di contrazione ed espansione, perde gran parte della polvere rossa contenuta nelle lenticelle, migliorando le caratteristiche tecnologiche ed in particolare la morbidezza e l'elasticità.

*Figura 2 – Fase di stagionatura.*



Segue la fase di bollitura (Figura 3), che dura circa un'ora e mezza, con lo scopo di ridurre la flora microbica, estrarre le sostanze idrosolubili (tannini, sali minerali) e migliorare le caratteristiche fisiche (Rosa et al., 1990).

*Figura 3 – Fase di bollitura.*



Dopo la bollitura, alcune industrie sugheriere hanno introdotto un processo di disinfezione ed estrazione di composti volatili associabili al “gusto di tappo” (vedere capitolo 1.3.1). Il processo consiste nell’autoclavaggio delle plance per 18-20 minuti, a 130 °C ed alla pressione di 180 kPa. Nel primo autoclavaggio si estrae il 46.4 % dei composti volatili; nel secondo autoclavaggio l’efficienza cresce ma aumenta anche la formazione di composti indesiderati: furani, benzaldeide e alcool benzilico (prodotti della degradazione della lignina), 1-ottanolo (probabilmente formato alla degradazione termica di alcuni acidi grassi). Poichè il trattamento termico prolungato può causare modificazioni chimiche al polimero suberoso, viene consigliato un solo autoclavaggio (Rocha et al., 1996).

Le plance di sughero vengono poi suddivise nelle diverse categorie di qualità e conservate in ambiente aerato e asciutto. Non esistono norme precise per cui la classificazione viene effettuata in maniera diversa, puramente soggettiva nei vari paesi produttori e gli scambi commerciali avvengono sulla base di campioni di materia prima. La qualità più apprezzata e ricercata è quella densa, liscia, omogenea, senza nodi, senza ineguaglianze, senza fori né crepe (Colagrande, 1996).

In Tabella 1 sono schematizzate le fasi di lavorazione della plancia grezza.

Tra i trattamenti elencati, la bollitura è particolarmente importante ai fini del comportamento fisico del tappo, in quanto provoca l'espansione della cellula suberosa soprattutto nella direzione radiale, poichè diminuisce l'ampiezza della corrugazione delle pareti cellulari laterali. Esse infatti, imbibendosi di acqua calda, si ammorbidiscono e, sotto la pressione delle cellule contigue, si distendono perdendo in parte le ondulazioni che le caratterizzano prima della bollitura (Rosa et al., 1990).

*Tabella 1 – Fasi di lavorazione della plancia grezza.*

<b>PLANCIA GREZZA</b>		
<b>Fase di lavorazione</b>	<b>Accorgimenti pratici</b>	<b>Effetti del cattivo trattamento</b>
SUGHERO SULLA PIANTA	Evitare trattamenti delle foreste con prodotti fitosanitari contenenti clorofenoli.	Formazione di composti clorurati (gusto di tappo).
DECORTICA DELLA PIANTA (ogni 9-10 anni)	Selezione delle plance scartando quelle difettose (attaccate da <i>Armillaria mellea</i> , verdonate o perforate da formiche o altri insetti).	Gusto di tappo. Scarsa tenuta del tappo (colosità) con conseguente ossidazione del vino.
STAGIONATURA (6-24 mesi all'aria aperta)	Evitare il contatto con il terreno; sufficiente areazione.	Possibile sviluppo di microrganismi.
1° BOLLITURA (in acqua per 1-1.5 ore)	Controllo della purezza dell'acqua di bollitura (residuo tannico, ecc.). Ricambio frequente dell'acqua.	Cessione di sostanze tanniche al vino (gusto di sughero).
IMMAGAZZINAMENTO (non più di 2-3 settimane)	In ambiente ad umidità ed aerazione controllate per evitare che le muffe sviluppate sulla superficie penetrino all'interno del tessuto suberoso.	Gusto di muffa.

Dopo questo processo le plance perdono la forma ricurva originaria che presentavano sull'albero.

Nella fase di immagazzinamento, è stato anche proposto di inoculare le plance di sughero con i ceppi antagonisti della microflora responsabile delle anomalie gusto-olfattive (Hoffmann et al., 1997).

In Figura 4 sono mostrate alcune immagini relative alle fasi di produzione del tappo.

*Figura 4 – Fasi di produzione del tappo.*



In Tabella 2 sono schematizzate relative le principali fasi di produzione del tappo.

Il lavaggio è un'altra fase critica del processo di trasformazione e deve essere efficace tanto in superficie quanto all'interno delle lenticelle ma deve rispettare l'integrità naturale del sughero. I lavaggi troppo aggressivi distruggono la tessitura superficiale ed esercitano un'azione traumatizzante nell'interno della massa suberosa, alterando le qualità naturali ed intrinseche del sughero quali la comprimibilità, l'aderenza e l'elasticità (Colagrande, 1996).

*Tabella 2 – Fasi di produzione del tappo.*

<b>PRODUZIONE DEL TAPPO</b>		
<b>Fase di lavorazione</b>	<b>Accorgimenti pratici</b>	<b>Effetti del cattivo</b>

		<b>trattamento</b>
2° BOLLITURA	(vedere 1° bollitura-Tabella 1)	(vedere 1° bollitura-Tabella 1)
TIRATURA IN BANDE E FUSTELLATURA	Il diametro dei turaccioli deve essere simile allo spessore delle plance.	Scarsa tenuta.
LAVAGGIO	Effettuare un ultimo lavaggio con acqua per evitare la presenza di residui di lavaggio nei tappi.	Formazione di cloroanisoli (gusto di tappo). Ossidazione dei vini.
ESSICAZIONE	Tenore di umidità finale del 3-6 %	Possibile sviluppo di microrganismi
CLASSIFICAZIONE (in classi di qualità decrescente)	Tenere conto del numero e diametro delle lenticelle, delle parti legnose, della polvere rossa in eccesso, dei sugheri verdonati, delle macchie sospette.	Problemi: - colatura; - ossidazione; - cessione.

Fino agli anni '80 i tappi erano lavati e disinfettati con soluzioni contenenti prodotti ossidanti a base di cloro (generalmente ipocloriti). È in quegli anni che diversi ricercatori hanno messo in evidenza la presenza nei tappi di molecole aromatiche contenenti cloro derivanti dalla reazione del cloro con i composti fenolici del sughero: i composti clorurati ceduti al vino conferiscono odori e sapori anomali (Tanner et al., 1981).

L'uso di perossidi (acqua ossigenata, acido peracetico, perossido di sodio, ecc.) per il lavaggio è di grande efficacia disinfettante (Puerto, 1992); questo tipo di trattamento ha però bisogno di un accurato controllo per evitare la possibile presenza di residui di perossidi nei tappi (Michellod, 1993).

L'azione disinfettante può anche essere ottenuta mediante il trattamento con calore secco a 115 °C per un'ora, che permette di eliminare completamente la microflora nei tappi senza danneggiare la struttura del sughero (Fumi et al., 1988); infatti le alterazioni strutturali e compositive si verificano solo quando il sughero è trattato a temperature di 150-200 °C per lungo tempo (Rosa et al., 1994; Pereira, 1992). Infine l'essiccazione a temperatura relativamente bassa (80 °C), e per un tempo sufficientemente lungo,

consente di estrarre anche l'umidità contenuta all'interno del tappo, portando il tenore di umidità ad una percentuale inferiore al 6-7 %: oltre questo valore si potrebbero sviluppare le muffe.

Infine i tappi vengono sottoposti ad una serie di trattamenti finali (Tabella 3), tra cui la lubrificazione che permette l'estrazione del tappo dal collo della bottiglia e migliora l'impermeabilità del sughero. Il trattamento deve essere scelto in funzione del tipo di vino da imbottigliare, del tempo di conservazione del vino in bottiglia e della zona geografica di destinazione. I prodotti utilizzati devono essere chimicamente inerti, inodori, non tossici e rispettare le normative di legge stabilite per i materiali in contatto con gli alimenti. Esistono numerosi prodotti usati per questa operazione: paraffine, silicone, emulsioni polimeriche, cere naturali, ecc. L'impiego di paraffine rende il tappo più ermetico ed impermeabile, anche se esiste la possibilità della incollatura del tappo al collo della bottiglia, difetto che si può evitare con l'uso di paraffine ad alto punto di fusione. Il trattamento più diffuso è con lubrificanti di natura siliconica, il cui utilizzo non presenta inconvenienti e consente di stappare la bottiglia agevolmente (Lefebvre, 1988).

*Tabella 3 – Fasi relative ai trattamenti finali sul tappo.*

<b>TRATTAMENTI FINALI SUL TAPPO</b>		
<b>Fase di lavorazione</b>	<b>Accorgimenti pratici</b>	<b>Effetti del cattivo trattamento</b>
LUBRIFICAZIONE E TIMBRATURA	Trattamenti superficiali con prodotti di qualità garantita che mantengono le loro proprietà anche con elevati sbalzi termici.	Scarsa tenuta.
STERILIZZAZIONE (con SO <sub>2</sub> , raggi $\gamma$ o $\beta$ )	Evitare trattamenti eccessivi di sterilizzazione con SO <sub>2</sub> o con altri prodotti.	Gusti anomali.
IMBALLAGGIO E SPEDIZIONE	Stoccaggio dei tappi in locali adatti (disinfettati, ventilati, con tenore di umidità di 50-60% e temperatura di 15-20 °C). Utilizzare i tappi entro 12 mesi.	Adsorbimento di sostanze volatili dall'ambiente

Tra i possibili trattamenti dei tappi al confezionamento, l'anidride solforosa (Davis et al., 1982) ha un buon effetto fungicida ma non battericida, inoltre può provocare la degradazione della lignina con menomazioni delle caratteristiche strutturali del tappo (Tanner et al., 1980; Castera-Rossignol, 1983).

Un tempo la sterilizzazione dei tappi veniva fatta anche con ossido di etilene (Garcia, 1979) ma oggi questa sostanza pericolosa è vietata dalle leggi comunitarie (Uijl, 1992); l'irradiazione con raggi UV o con raggi  $\gamma$  o  $\beta$  può essere un'alternativa (Heinzel et al., 1984; Borges, 1985; Marais et al., 1975; Mazzoleni et al., 1999a; Mazzoleni et al., 1999b).

Inoltre è opportuno conservare i tappi nelle loro confezioni originarie sigillate per evitare danni da parte di muffe e batteri: l'irraggiamento permette la sterilizzazione del prodotto già confezionato, evitando il rischio di ricontaminazione durante il confezionamento.

### **1.3. Il sughero e il vino**

La chiusura delle bottiglie con il tappo in sughero ha effetti rilevanti sulle caratteristiche del vino al punto che può potenziare o vanificare le note qualitative che l'enologo ha cercato di esaltare nelle varie fasi della vinificazione. In una bottiglia ben chiusa, si completano i fenomeni di tipo chimico ed enzimatico che coinvolgono diversi gruppi di sostanze già presenti nel mosto o formati nelle fasi di fermentazione e di post-fermentazione e si perfezionano le infinite varietà di sentori che caratterizzano le differenti tipologie di vino. Se il tappo in sughero non chiude perfettamente la bottiglia, si facilita la comparsa di fenomeni indesiderati che provocano un'evoluzione anomala degli aromi del vino.

In ogni caso non bisogna sottovalutare l'aspetto psicologico, in base al quale la chiusura con il tappo di sughero oggi è associata alla qualità del vino. Uno studio effettuato dal Natural Cork Quality Council (<http://www.corkqc.com>) mostra che l'84% dei consumatori abituali di vino e degli addetti alla ristorazione, ha privilegiato l'aspetto della tradizionalità associato alla tappatura con il sughero. Questo aspetto risulta essere molto articolato, visto che deriva da un campione di persone comprese tra i 25 ed i 64

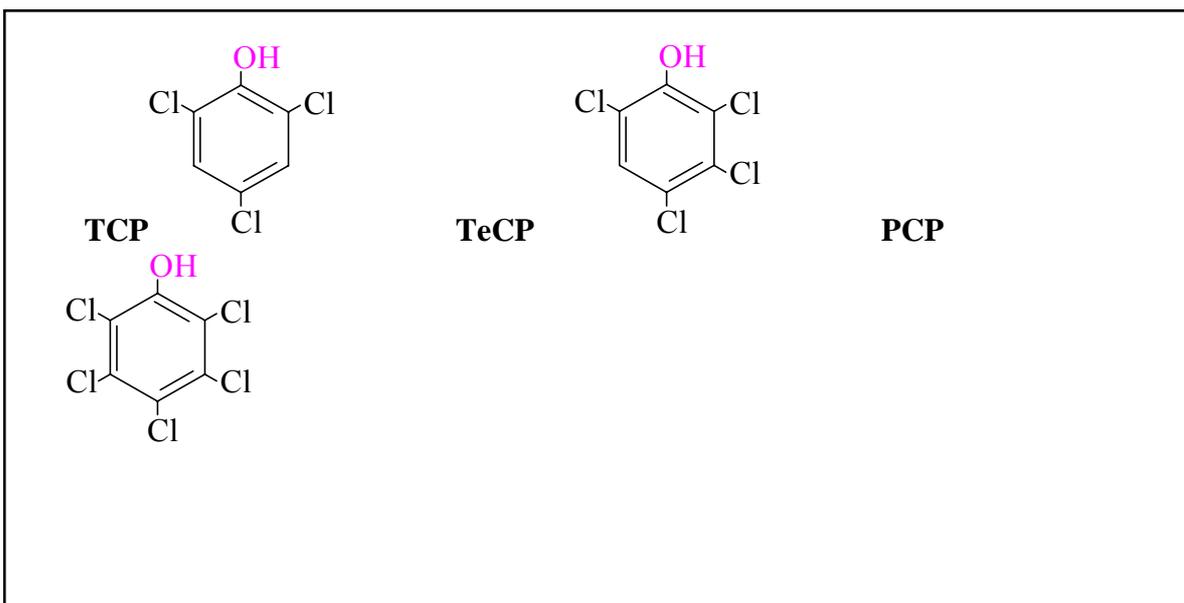
anni, e perciò non è riconducibile solamente al binomio “vecchi ricordi-tradizione”, ma coinvolge anche un’atmosfera di romanticismo e di gusti sofisticati.

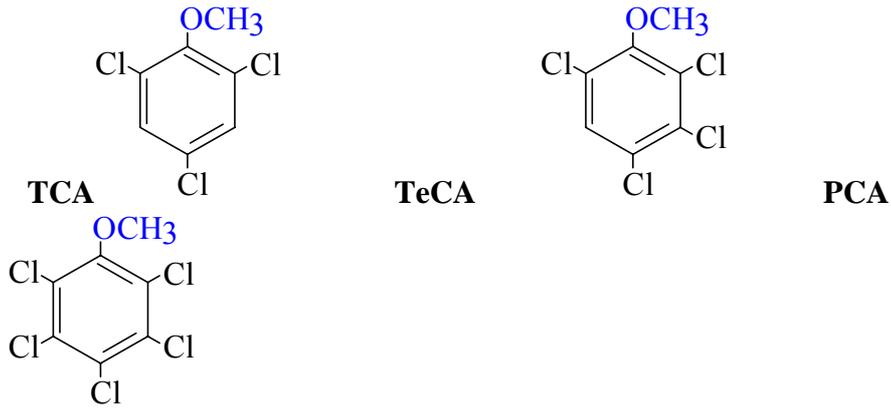
### 1.3.1. Interazioni chimiche tra sughero e vino – Il gusto di tappo

Le interazioni chimiche che avvengono tra il vino e il tappo di sughero sono normalmente trascurabili, sia per la piccola superficie di contatto sia per la difficoltà di diffusione dei costituenti del vino all’interno del tappo, sia perchè i costituenti maggioritari del sughero non hanno affinità chimica con il vino.

In alcuni casi però tali cessioni possono provocare anomalie gusto-olfattive, la più comune delle quali è stata identificata con il cosiddetto “gusto di tappo” (cork taint): i policlorofenoli e, soprattutto, i policloroanisoli (Figura 5) sono tra le principali sostanze responsabili di questo difetto nel vino (Dubois et al., 1981).

Figura 5 - Formula di struttura dei principali policlorofenoli e policloroanisoli responsabili del gusto di tappo.





TCP: 2,4,6-triclorofenolo; TeCP: 2,3,4,6-tetraclorofenolo; PCP: pentaclorofenolo;  
 TCA: 2,4,6-tricloroanisolo; TeCA: 2,3,4,6-tetracloroanisolo; PCA: pentacloroanisolo.

In particolare i policloroanisoli presentano una soglia di percezione molto bassa, soprattutto nel caso del 2,4,6-tricloroanisolo (TCA), e possono provocare la comparsa di un forte odore e gusto di muffa nei vini.

I policlorofenoli presentano un odore dello stesso tipo, ma meno intenso. D'altra parte va considerato che questi composti, a differenza dei cloroanisoli, presentano il rischio di tossicità per l'uomo: il 2,4,6-triclorofenolo (TCP) è stato classificato come agente B2 (probabile cancerogeno per l'uomo) (IRIS, 1998) e livelli pari a 5µg/l nell'acqua potabile vengono indicati come ad alto rischio.

Oltre a queste sostanze ne sono state identificate altre che possono contribuire a rendere difettoso il sughero, quali la geosmina, il guaiacolo, 1-otten-3-one, 2-metossi-3,5-dimetilpirazina. Quest'ultimo composto, secondo un recente studio, è considerato la seconda causa del gusto di tappo dalla maggior parte delle aziende vitivinicole australiane (Simpson et al., 2004).

In Tabella 4 sono riportati i principali composti che, secondo la letteratura, sono responsabili di anomalia gusto-olfattive nel sughero e nel vino, con le relative soglie di percezione e di riconoscimento. La soglia di percezione rappresenta il valore minimo di uno stimolo sensoriale in grado di suscitare una sensazione che però non può essere

identificata. La soglia di riconoscimento rappresenta il valore minimo di uno stimolo sensoriale che permette di identificare la sensazione percepita.

*Tabella 4 - Composti responsabili di anomalie gusto-olfattive e le relative soglie di percezione e di riconoscimento. Le soglie non specificate, nei rispettivi riferimenti bibliografici, sono state indicate come soglia di percezione.*

COMPOSTO	Medium	Soglia Percez. (ng/l)	Soglia Riconosc. (ng/l)	Descrittore	Bibl.
Anisolo	acqua	50000		medicinale, fenolico	g
2-clorofenolo	acqua	1			f
2,4-diclorofenolo	acqua	1000			f
2,4-dicloroanisolo	acqua	400		muffa, frutta dolciastra	g
2,6-diclorofenolo	acqua	1000			f
2,6-dicloroanisolo	acqua	40		muffa, medicinale	g
2,3,6-tricloroanisolo	acqua	0.0004		muffa	r
2,4,6-triclorofenolo	vino bianco fermo	43000		chimico, solvente	b
2,4,6-tricloroanisolo	acqua	0.03			g
	acqua minerale	0.8	1	muffa	b
	vino	1.4			c
	vino bianco fermo	1.5	4.2	muffa	b
	vino bianco secco	4			e
	vino bianco	4-10			h
	vino	10			i
	vino rosso	22			o
	brandy	600			p
2,4,6-tribromoanisolo	acqua	0.02		muffa	s
	vino rosso	7.9		muffa	z
	uva sultanina	2 ng/kg			s
2,3,4,6-tetracloroanisolo	acqua	4			g
	acqua	4		muffa	r
	vino	4-11			m
Pentaclorofenolo	acqua	32000			r
	acqua	30000			n
Pentacloroanisolo	acqua	4000			g
	acqua	4000		muffa	r
1-otten-3-one	vino	20		metallico	d
	vino	20			l

Continua nella pagina successiva  
 Continuazione – Tabella 4

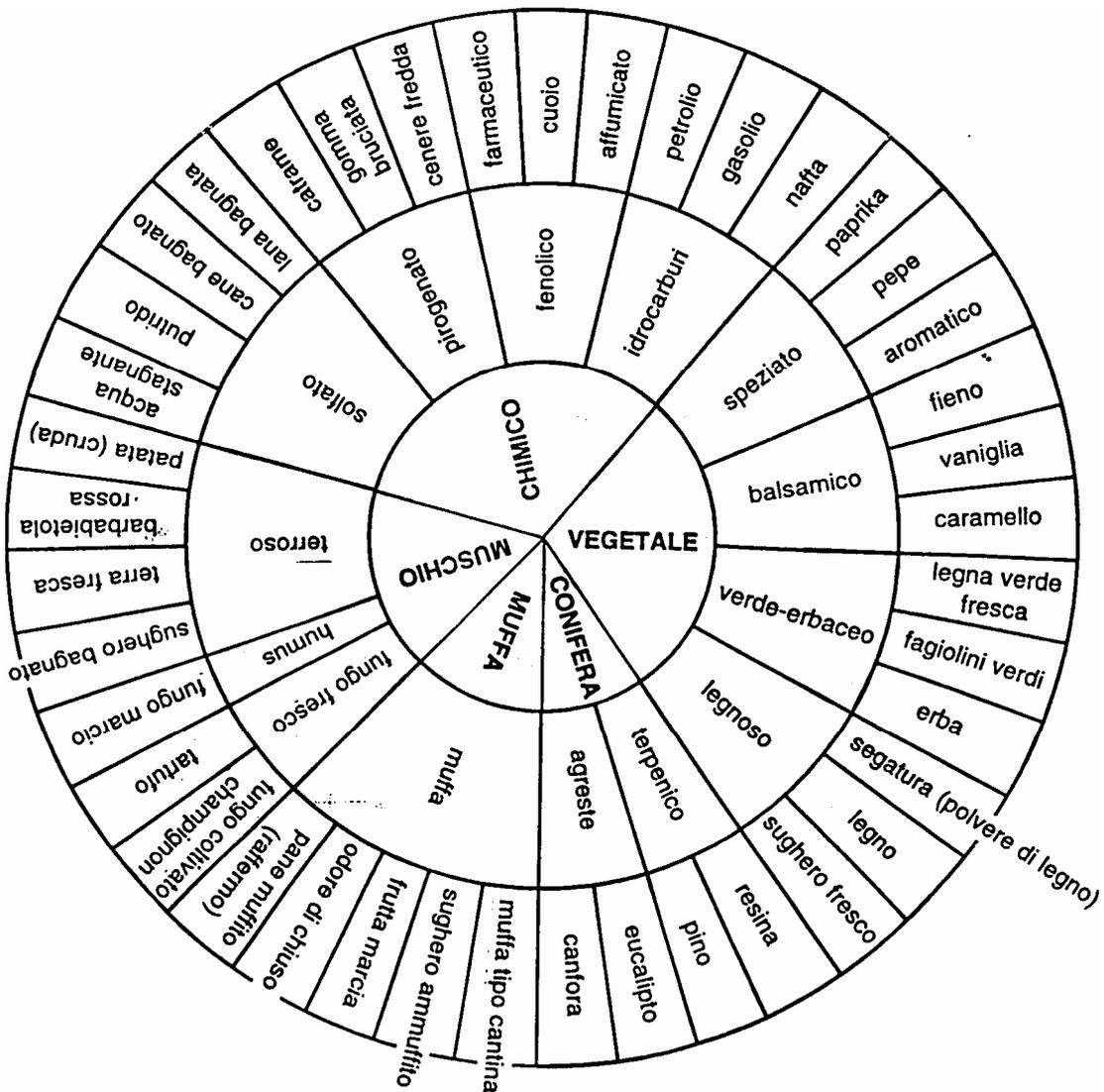
1-otten-3-olo	acqua	1000		fungo	t
	vino	20000		fungo	d
Guaiacolo	vino bianco secco	20000		medicinale, affumicato	a
	vino bianco fermo	15000	200000	eucalipto, affumicato	b
2-metossi-3,5-dimetilpirazina	vino bianco	2,1		fungo, muffa	v
3-metossi-2-isopropilpirazina	vino	0.002		peperone, terra, muffa	u
3-metossi-2-isobutilpirazina	vino	0.002		peperone, terra, patata	u

(a) Simpson et al., 1986; (b) Progetto Quercus, 1996; (c) Simpson, 1990; (d) Amon et al., 1986; (e) Amon et al., 1989; (f) Maarse et al., 1988; (g) Griffith, 1974; (h) Sanvicens et al., 2003; (i) Silva Pereira et al., 2000; (l) Valade et al., 1993; (m) Tanner et al., 1981; (n) Environmental Protection Agency; (o) Alvarez-Rodriguez et al., 2002; (p) Cantagrel et al., 1990; (r) Curtis et al., 1972; (s) Whitfield et al., 1997; (t) Forss, 1972; (u) Colagrande, 1996; (v) Simpson et al., 2004; (z) Chatonnet et al., 2004.

Attualmente il “gusto di tappo” é uno dei problemi piú seri per l’industria del vino e del sughero: ogni anno provoca pesanti perdite economiche e danni all’immagine delle aziende che operano nel settore enologico. Si stima che siano contaminate dall’1 al 5% delle bottiglie in commercio (Sefton et al., 2005).

Per l’importanza economica della filiera del sughero per uso enologico, gli operatori europei dell’industria sugheriera, riuniti nella Confederazione Europea del Sughero (C.E.Liège), in collaborazione con l’Unione Europea, hanno avviato nel 1993 il Progetto Quercus per rafforzare la conoscenza del sughero e dell’interazione sughero/vino (Progetto Quercus, 1996). Una parte considerevole del lavoro ha riguardato la stesura di un elenco di riferimento di descrittori delle anomalie del sughero.

*Figura 6 - Ruota dei descrittori responsabili delle anomalie gusto-olfattive del sughero.*



Si sono delimitate cinque grandi famiglie di gusti che possono essere legate al tappo: vegetale, conifera, muffa, muschio e chimico. Queste famiglie sono state a loro volta suddivise in sottofamiglie che permettono di dettagliare le note organolettiche percepite. I difetti indicati dai consumatori come “gusto di tappo” appartengono soprattutto ai gruppi “muschio/muffa” e, ad un livello inferiore, a quelli “terroso” e “vegetale/legnoso”.

La presentazione sotto forma di ruota (Figura 6) può essere utile ai degustatori per standardizzare l'uso dei descrittori.

### **1.3.2. Policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero**

I composti che tradizionalmente sono considerati causa del gusto di tappo sono TCA e 2,3,4,6-tetracloroanisolo (TeCA) e appartengono al gruppo dei policloroanisoli (Buser et al., 1982; Amon et al., 1989; Chatonnet et al., 1994; Silva Pereira et al., 2000b). Queste sostanze si producono con il metabolismo microbico, fondamentale di funghi filamentosi, per metilazione dei loro precursori clorofenolici. Il pentaclorofenolo (PCP) in presenza di etanolo e umidità relativa alta si trasforma in pentacloroanisolo (PCA), che con il tempo diventa TeCA e successivamente TCA. Questa trasformazione è essenzialmente un meccanismo di detossificazione con il quale i funghi rimuovono dal

loro ambiente i clorofenoli, tossici per la maggior parte di loro (Alvarez-Rodriguez et al., 2002).

I policlorofenoli sono largamente usati nell'ambiente da più di 50 anni e si continuano ad utilizzare nel settore domestico, agricolo e industriale. Essi possono causare contaminazioni accidentali degli alimenti, giacchè i derivati del PCP si impiegano come fungicidi, erbicidi, insetticidi e preservanti del legno (Pollnitz et al., 1996), nonostante l'uso di PCP sia regolato in quasi tutto il mondo, e in alcuni casi proibito, come nel caso dell'Europa (CEE, 1991).

D'altra parte, il sughero naturale contiene come suoi costituenti composti fenolici non clorurati che proteggono l'albero dagli attacchi microbici, e che possono trasformarsi in clorofenoli al contatto con sostanze contenenti cloro, per alogenazione e biometilazione (Maujean et al., 1985; Codina et al., 1993). Per questo motivo, il sughero può contenere clorofenoli nella parte inferiore dell'albero, dove si concentrano i funghi, o zone attaccate da *Amillaria mellea*.

Per quanto detto sopra, il TCA, metabolita fungino con uno sgradevole odore di muffa, può essere presente già nella foresta sul sughero grezzo (*Quercus suber L.*) o può formarsi successivamente in qualunque fase del processo di produzione dei tappi in sughero o durante il trasporto e lo stoccaggio del prodotto finito (Ducan et al., 1997). In Figura 7 sono riportati alcuni dei possibili meccanismi responsabili della formazione di TCA.

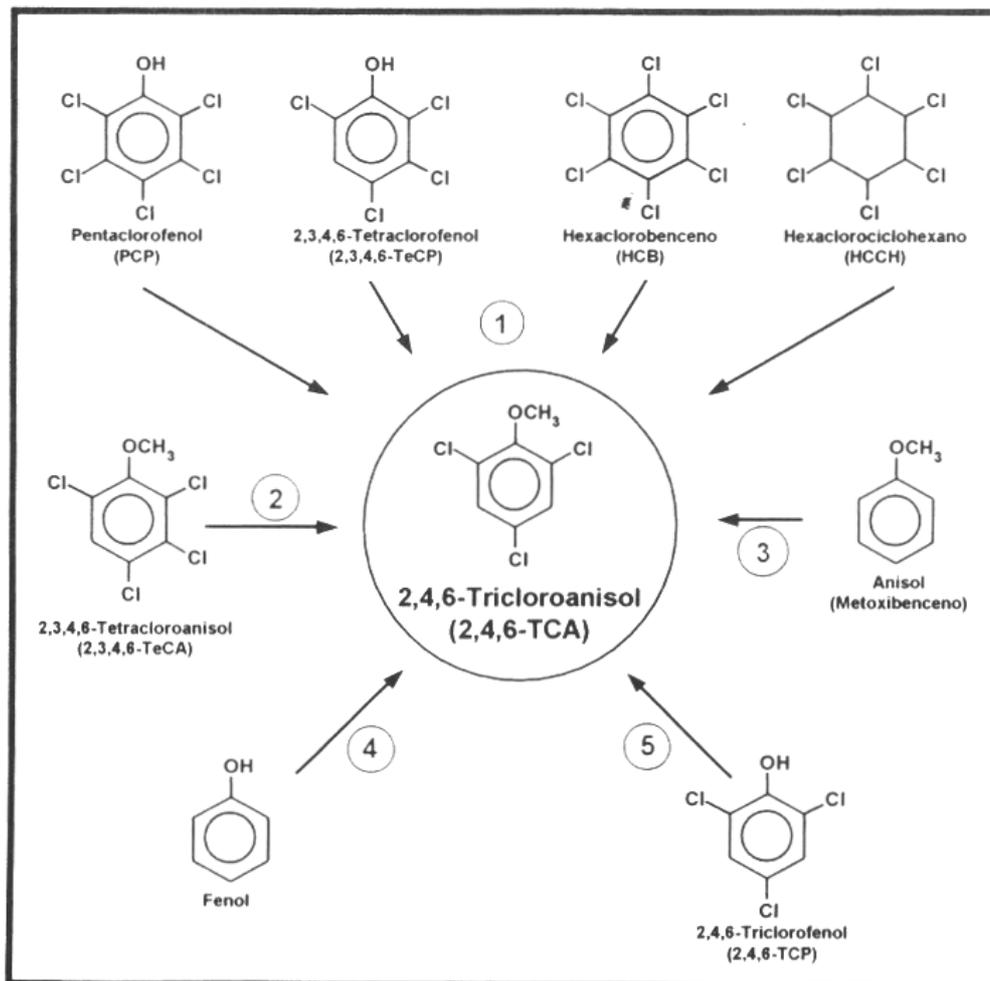
E' stato anche dimostrato da alcuni autori (Tanner et al., 1981) che il TCA può formarsi durante il processo di sbianca del sughero con sostanze clorurate.

Per questa ragione, volendo preservare la qualità del sughero, l'uso di cloro durante il processo di lavorazione è stato fortemente scoraggiato dal "Codice Internazionale delle

Pratiche per la Produzione dei Tappi di Sughero” messo a punto dalla Confederazione Europea del Sughero (C.E.Liège, 5<sup>a</sup> edizione, 2006).

Oltre ad essere presenti nel sughero, i clorofenoli possono anche contaminare l’atmosfera di cantina se sono contenuti in agenti preservanti per il legno, vernici o materiali utilizzati per imballaggi quali pallets, cartoni, film plastici, ecc. In seguito queste sostanze possono passare nei materiali immagazzinati, come coadiuvanti di lavorazione, bottiglie, tappi di sughero, i quali a loro volta entrano in contatto con il vino, causandone così la contaminazione (Barker et al., 2001). Da qui la necessità di controllare l’idoneità dei prodotti impiegati in cantina, oltre alle condizioni igieniche dei locali, in particolare delle zone di immagazzinamento dei materiali enologici.

*Figura 7 – Possibili meccanismi di formazione del 2,4,6-TCA: 1) sintesi per catabolismo di composti conteneti cloro (Maarse et al., 1989; Tanner et al., 1981; Neidlemann et al., 1986; Nicholson et al., 1992; Mohn et al., 1992); 2) sintesi per dealogenazione di anisoli altamente clorurati (Maarse et al., 1989; Tanner et al., 1981); 3) alogenazione dell’anisolo mediante lavaggio del sughero con ipoclorito (Neidlemann et al., 1986; Sponholtz et al., 1994; Maujean et al., 1985); 4) sintesi endogena del nucleo fenolico e successiva alogenazione e biometilazione (Maujean et al., 1985); 5) biometilazione diretta del 2,4,6-TCP (Kun et al., 1989; Silva Pereira et al., 2000a).*



(Tratto da: Informe tecnico "Anisoles y Brettanomyces. Causas, efectos y mecanismos de control"  
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, 2003)

Recentemente Chatonnet et al. (2004) hanno osservato che il 2,4,6-tribromoanisolo (TBA) può essere responsabile del "gusto di tappo" quando non si determinano quantità sufficienti di cloroanisoli. Come per i policloroanisoli e policlorofenoli, il TBA può formarsi dalla degradazione microbiologica del 2,4,6-tribromofenolo (TBP) nell'ambiente di cantina; l'uso di TBP e dei suoi derivati per trattare il legno, in materiali plastici o come agente ignifugo fa temere il rischio di contaminazioni ambientali (Chatonnet et al., 2004). Inoltre il suo utilizzo non è soggetto a restrizioni, come nel caso del PCP.

#### **1.4. La determinazione di policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero e nel vino – Test analitici e sensoriali**

Numerosi studi sono stati dedicati alla messa a punto di metodiche di dosaggio del TCA nel sughero e nel vino, tuttavia non esiste ancora un metodo ufficiale di estrazione e di analisi a cui si possa fare riferimento per il controllo qualità del sughero. I metodi analitici relativi alla determinazione dei policlorofenoli e dei policloroanisoli riguardano soprattutto il vino e sono basati principalmente sull'analisi gas cromatografica con rivelatore a cattura di elettroni (GC/ECD) o con spettrometro di massa (GC/MS), e sull'uso di tecniche di microestrazione in fase solida (SPME) o con spazio di testa (HS-SPME) (Evans et al., 1997; Riu et al., 2002; Lizarraga et al., 2004; Martinez-Urunuela et al., 2004; Insa et al., 2006; Jönsson et al., 2006) oppure con metodo di estrazione con

CO<sub>2</sub> supercritica (SFE) (Taylor et al., 2000), o più recentemente con stir bar sorptive extraction (SBSE) (Zalacain et al., 2004; Lorenzo et al., 2006). Altre tecniche impiegate per questa determinazione sono l'estrazione liquido-liquido (LLE) (Pena-Neira et al., 2000; Buser et al., 1982), l'estrazione liquido-liquido (LLE) combinata con un sistema purge-and-trap (PT) (Campillo et al., 2004), l'estrazione in fase solida (SPE) (Soleas et al., 2002; Martinez-Urunuela et al., 2005). In letteratura sono riportati anche metodi per il dosaggio del TCA nel sughero basati sull'estrazione con solventi organici con successive fasi di concentrazione e analisi GC/MS o GC/ECD (Juanola et al., 2002; Campillo et al., 2004). Come già evidenziato da alcuni autori, il metodo di estrazione con solvente dà buoni risultati sia in termini di riproducibilità sia di ripetibilità; è un metodo semplice e nelle possibilità di molti laboratori (Juanola et al., 2002). Inoltre utilizzando un solvente opportuno (es. soluzione idroalcolica similvino) per estrarre la frazione facilmente rilasciabile di TCA, è possibile la stima della quantità di analita che potrebbe andare successivamente in contatto con il vino, e quindi contaminarlo.

La tecnica di microestrazione in fase solida (SPME) si può impiegare direttamente sul vino e sull'estratto di macerazione del sughero ma non sui tappi, risulta essere un metodo rapido, senza uso di solventi, automatizzabile ma ci possono essere problemi di riproducibilità e quantificazione (Juanola et al., 2002).

L'uso di stir bar sorptive extraction (SBSE) è una tecnica semplice, senza uso di solventi, dà buoni risultati di riproducibilità e di ripetibilità, ma per il momento non risulta essere economico. A differenza dell'SPME si può utilizzare anche per l'analisi diretta del tappo in sughero (Lorenzo et al., 2006).

Invece il metodo di estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica (SFE) utilizza ridotti volumi di solvente ed è una tecnica abbastanza rapida.

L'analisi strumentale del TCA, come metodo sistematico per controllare la qualità del sughero è utilizzata attualmente nelle grandi realtà industriali, sia enologiche, sia sugheriere e anche in molti laboratori privati di analisi.

Nella maggior parte delle realtà produttive medio-piccole è invece diffuso l'uso di test sensoriali sui tappi finiti, anche se le indicazioni che si ottengono sono solo generali. Tale analisi consiste nel valutare la presenza di odori e sapori anomali in tappi mantenuti in contatto con soluzioni come acqua distillata, soluzioni idroalcoliche o vini bianchi neutri per un determinato periodo di tempo (dalle 24 alle 48 ore), a differenti temperature (usualmente a temperatura ambiente o 30°C).

Una recente norma ISO 22308 (2005) riporta i seguenti parametri da seguire per il controllo organolettico dei tappi in sughero: periodo di contatto 24 ore in acqua alla temperatura di  $21 \pm 4$  °C.

Esistono anche altre normative ISO che danno indicazioni sulle modalità con cui dovrebbero essere eseguiti i diversi test sensoriali: la norma ISO 8589 (1994) stabilisce i criteri relativi all'equipaggiamento e all'applicazione di adeguate condizioni ambientali per lo svolgimento delle prove sensoriale; la sensibilità dei degustatori può essere testata seguendo le norme ISO 8586 (1993) e ISO 6658 (2005).

Inoltre nel "Disciplinare sulla produzione ed utilizzo del tappo di sughero in enologia" (1996) sono riportate, oltre ai metodi di analisi dei tappi in sughero, anche le procedure di campionamento dei lotti di tappi. Per l'analisi sensoriale il Disciplinare indica un periodo di contatto di 24 ore del singolo tappo con una soluzione idroalcolica (8 % v/v) alla temperatura di 25 °C. Nonostante la norma ISO 22308 (2005), l'Istituto di Enologia continua ad utilizzare la soluzione idroalcolica, come indicato dal Disciplinare, poiché questo test risulta essere più vicino alle reali condizioni in cui si trova il tappo.

Per comprendere l'effettivo valore delle informazioni fornite da questo tipo di test, è bene puntualizzare alcuni aspetti legati alla valutazione sensoriale del TCA. L'identificazione corretta della presenza di TCA nel vino in base a test sensoriali presenta delle difficoltà soprattutto a basse concentrazioni, perchè la sua percezione è influenzata dalla sensibilità del degustatore che dipende da diversi fattori quali fisiologia ed esperienza dell'individuo, stanchezza degli organi di senso, persistenza temporale della sensazione caratteristica, nonché dalla variabilità della matrice vino (tipo di vino, sistemi di produzione con o senza invecchiamento, ecc.) (Clarke et al., 2004). Tutto ciò può far variare ampiamente la percezione olfattiva e gustativa del TCA (Mazzoleni et al., 2004).

## **1.5. Caratteristiche di TCA e TCP**

Per fornire un quadro il più completo possibile dei composti che saranno oggetto del presente lavoro di tesi, di seguito sono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche (The Merck Index, 12° ed., 1996) e sensoriali di TCA e TCP.

#### 1.5.1. – 2,4,6-Tricloroanisolo

- *Proprietà chimico-fisiche*

Formula bruta:  $C_7H_5Cl_3O$  (C 39.75%, H 2.38%, Cl 50.30%, O 7.57%)

Peso molecolare: 211.49

Punto di fusione: 60 °C

Punto di ebollizione: 240 °C (a 738.2 mmHg)

Si prepara mediante la reazione tra il 2,4,6-triclorofenolo e il dimetilsolfato. Sublima lentamente a temperatura ambiente. E' volatile con il vapore. Risulta praticamente insolubile in acqua, è invece solubile in metanolo, etanolo, diossano, benzene e cicloesano.

- *Proprietà sensoriali*

Il 2,4,6-tricloroanisolo, come già detto, presenta una soglia di percezione molto bassa. In Tabella 5 sono elencati i dati bibliografici, le diverse soglie di percezione del TCA, in considerazione del panel e dei corrispondenti substrati; tuttavia la procedura di determinazione della soglia del TCA e il tipo di vino spesso non sono chiari. Altri valori di soglia per il TCA nel vino sono riportati da Sefton et al. (2005), che fanno la distinzione tra soglia di determinazione (il minimo valore di uno stimolo sensoriale capace di far percepire una sensazione) e di riconoscimento (il minimo valore di uno stimolo sensoriale che permette di identificare la sensazione percepita). La soglia di determinazione varia da 1.4 a 4.6 ng/l, mentre quella di riconoscimento è nell'intervallo

tra 4.2 e 10 ng/l. Recentemente diversi autori hanno proposto un nuovo approccio per valutare i livelli di TCA che iniziano a rendere un New Zealand Chardonnay un vino inaccettabile per i consumatori, misurando una soglia di rigetto del consumatore “consumer rejection threshold” di 3.1 ng/l (Prescott et al. 2005). Le prove effettuate mostrano che l’uso di questo metodo può fornire le basi razionali per stabilire il reale impatto del TCA nel vino, nonostante sia la varietà dell’uva sia la tipologia del vino possano avere un effetto significativo.

Tabella 5 – Livelli di soglia relativi al TCA in acqua e in vino riportati in letteratura.

Medium	Livello soglia (ng/l)	Bibliografia
Acqua	0.03 <sup>a</sup>	Griffith (1974)
acqua minerale	0.8 <sup>c</sup>	Progetto Quercus (1996)
Vino	1.4 <sup>b</sup>	Simpson (1990)
vino bianco fermo	1.5 <sup>c</sup>	Progetto Quercus (1996)
vino bianco secco	4 <sup>a</sup>	Amon et al. (1989)
vino bianco	4-10 <sup>a</sup>	Sanvicens et al. (2003)
vino	10 <sup>a</sup>	Silva Pereira et al. (2000)
vino rosso	22 <sup>a</sup>	Alvarez-Rodriguez et al. (2002)

Modo di valutazione : (a) orthonasale ; (b) retronasale ; (c) sconosciuto

### 1.5.2. – 2,4,6-Triclorofenolo

- *Proprietà chimico-fisiche*

Formula bruta: C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>O (C 36.49%, H 1.53%, Cl 53.87%, O 8.10%)

Peso molecolare: 197.46

Punto di fusione: 69 °C

Punto di ebollizione: 246 °C (a 760 mmHg)

Si prepara direttamente dalla clorurazione del fenolo. E’ volatile con il vapore ma non in soluzioni alcaline. Solubilità (g/100g di solvente): acetone 525; benzene 113;

tetracloruro di carbonio 37; etere 354; alcool denaturato (formula 30) 400; metanolo 525; toluene 100; acqua < 0.1.

- *Proprietà sensoriali*

La soglia sensoriale del TCP in vino risulta essere di 43 µg/l quindi sono necessarie quantità molto più elevate rispetto a quelle di TCA, perchè questo composto sia rilevato mediante l'analisi sensoriale.

## 1.6. Aspetti microbiologici del sughero

Come attestato dai numerosi lavori riguardanti la microflora presente nel sughero (Tabella 6), questo materiale è associato ad una grande diversità di forme microbiche (Fumi et al., 1985).

*Tabella 6 – Microflora presente nel sughero.*

<b>Microorganismi</b>	<b>Bibliografia</b>
<i>Penicillium:</i>	f, g, i, k, l, n
<i>Frequentans</i>	a, c, d, e, g, k, l, m, o
<i>Spinulosum</i>	a, b
<i>Granulatum</i>	a, b
<i>Citreo-viride</i>	a
<i>Espansum</i>	c, e, g, o
<i>Echinulatum</i>	e
<i>Corylophilum</i>	e

<i>Roqueforti</i>	a, e, g
<i>Glabrum</i>	b
<i>Aspergillus:</i>	f, n, o
<i>Conicus</i>	a, b
<i>Nidulans</i>	c, d, l
<i>Glaucus</i>	a, c, d, l
<i>Fumigatus</i>	c
<i>Repens</i>	g, k
<i>Versicolor</i>	g, k, l
<i>Multicolor</i>	l
<i>Trichoderma:</i>	b, i, n
<i>Viride</i>	a, o
<i>Longibrachiatum</i>	e
<i>Hamatum</i>	e
<i>Monilia:</i>	b, i, n, o
<i>Chysonilia chrysa</i>	e
<i>Mucor</i>	b, i, n, o
<i>Cladosporium</i>	a, b, e, l, n

Continua nella pagina successiva

continuazione - Tabella 6

<b>Microorganismi</b>	<b>Bibliografia</b>
<i>Monodictys sp.</i>	e
<i>Sistotrema sp.</i>	e
<i>Ulocladium</i>	e
<i>Eurotium herbariorum</i>	e, g, k
<i>Botrytis cinerea</i>	e
<i>Bacillus</i>	b, e, i, n
<i>Micrococcus</i>	b, n
<i>Staphylococcus</i>	e
<i>Listeria</i>	i
<i>Rothia</i>	i
<i>Rhodococcus</i>	e
<i>Coryneformi</i>	b, i
<i>Streptomyces</i>	g, k
<i>Candida</i>	b, g, h, i
<i>Rhodotorula</i>	b, g, h
<i>Sporobolomyces</i>	b
<i>Rhizopus</i>	o
<i>Cryptococcus</i>	b, e
<i>Saccharomyces</i>	b, i

(a) Moreau, 1978; (b) Davis et al., 1981; (c) Moreau, 1977; (d) Moreau et al., 1976; (e) Castera-Rossignol, 1983; (f) Marais et al., 1975; (g) Lefevbre et al., 1983; (h) Charpentier, 1977; (i) Davis et al., 1982; (k) Riboulet, 1982; (l) Schaeffer et al., 1979; (m) Neradt, 1982; (n) Fumi et al., 1985; (o) Codina et al., 1993.

Questa microflora trova nel sughero, materiale naturale con un elevato tasso di umidità, le condizioni ottimali per il suo sviluppo. Esiste una flora microbica naturale, già presente nel sughero sulla pianta, che si sviluppa all'interno del tessuto suberoso, principalmente nelle cavità lenticolari che presentano una maggiore umidità. Altri microorganismi si sviluppano durante la stagionatura delle plance, il ciclo di lavorazione e lo stoccaggio dei turaccioli.

Muffe appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysonilia* (*Monilia*), *Mucor*, *Cladosporium* sono state molto spesso isolate dai sugheri, anche se la loro frequenza e distribuzione varia molto a seconda dell'origine, qualità, tenore di umidità e condizioni di lavorazione del sughero.

In Tabella 7 viene riportato l'andamento della carica microbica sul sughero durante le diverse fasi di lavorazione, dalla foresta al tappo pronto per l'utilizzo.

*Tabella 7 – Andamento della carica microbica sul sughero durante le varie fasi di lavorazione.*

FASE DI LAVORAZIONE	Plancia grezza	Plancia bollita	Plancia essiccata	Tappi grezzi	Tappi lavati	Tappi essiccati	Tappi pronti per l'uso
<b>MUFFE (UFC/g)</b>	$2 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^5$	$\leq 10$
<b>BATTERI (UFC/g)</b>	$5 \cdot 10^3$ - $7 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$ - $3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^2$ - $5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$ - $2 \cdot 10^3$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10$

Alcuni lavori riportano che le muffe in un mezzo liquido hanno differente capacità di metilare TCP e produrre TCA, attraverso un processo di detossificazione (Silva Pereira 2000a). Tuttavia l'abilità di alcuni funghi nel produrre TCA in presenza di TCP fu dimostrata da diversi autori (Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Silva Pereira et al., 2000a).

In un precedente studio, differenti ceppi di microorganismi isolati dal sughero furono identificati e fu testata la loro capacità di produrre composti volatili sia in mezzo sintetico sia sul sughero ma nessun ceppo testato mostrò l'abilità di produrre TCP o TCA da precursori naturali (Caldentey et al., 1998).

Per quanto riguarda la presenza di lieviti e batteri, i sugheri presentano tenori molto variabili. I batteri ritrovati più frequentemente sono *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*. I lieviti comprendono fondamentalmente il genere *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Candida*.

Alcuni tipi di microorganismi, che si sviluppano a spese del sughero o su colle, siliconi possono produrre sostanze volatili odoranti che possono poi essere cedute al vino provocando alterazioni sensoriali. Ciò ha spinto numerosi autori ad interessarsi alle possibili vie microbiche di formazione di questi metaboliti, come già illustrato nel capitolo 1.3.2 del presente lavoro.

Già nel 1900 Mathieu aveva ipotizzato che i difetti sensoriali ritrovati nei vini e definiti come gusto di tappo o gusto di muffa, avessero un'origine microbica (Mathieu, 1900).

Numerose specie fungine sono state ritenute responsabili di queste anomalie sensoriali nel sughero, senza che sia ancora stata dimostrata una chiara ed univoca relazione tra microorganismo inquinante e metabolita prodotto.

*Penicillium frequentans*, *Penicillium multicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sono stati isolati in tappi di sughero responsabili di difetti sensoriali nei vini (Moreau et al., 1976; Moreau et al., 1978; Schaeffer et al., 1979; Castera-Rossignol, 1983).

Anche alcuni lieviti e batteri sono stati segnalati come responsabili di queste anomalie (Bureau et al., 1974; Charpentier, 1977; Davis et al., 1981). Lieviti del genere *Rhodotorula* e *Candida* sono stati frequentemente isolati in tappi difettosi.

I lavori di Lefevre et al. (1983) confermano l'esistenza nei tappi di sughero grezzi di questi lieviti e di muffe del genere *Penicillium*, i quali danno luogo ad odori di terra e di muffa, però segnala l'*Aspergillus versicolor* come il vero responsabile del tipico odore di tappo.

Tabella 8 – Composti volatili prodotti da differenti microrganismi isolati dal sughero grezzo.

COMPOSTO	FREQUENZA SU 11 CEPPI TESTATI
Clorobenzene	11
Ottan-3-one	8
Anisolo	11
1,3-diclorobenzene	11
1-otten-3-olo	5
A-santalene	1
Cariofillene	8
A-bergamotene	11
B-bergamotene	10
Isocariofillene	11
A-curcumene	8
B-bisabolene	10

Uno studio condotto sui composti volatili prodotti da microrganismi isolati dal sughero grezzo ha mostrato che i ceppi fungini si sviluppano con difficoltà sul sughero sterilizzato e solo 12 composti vengono con certezza metabolizzati dagli stessi microrganismi, visto che queste sostanze sono presenti solo dopo l'accrescimento sul sughero (Tabella 8). Questi composti volatili sono formati dalla maggior parte dei ceppi fungini provati e più della metà appartengono alla famiglia dei sesquiterpeni. Il numero delle sostanze prodotte dall'accrescimento su sughero risulta molto limitato se confrontato con la quantità di composti formati (più di 60 sostanze identificate) dagli stessi microrganismi su mezzo sintetico (Caldentey et al., 1998). Il sughero è quindi un

substrato piuttosto povero, anche per i microrganismi che fanno parte della microflora naturalmente presente su questo materiale. Lo studio rivela che l'incidenza dei tappi difettosi causati dai funghi è piuttosto ridotta se relazionata alla loro presenza, che è documentata in tutte le fasi di lavorazione del tappo.