

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1 Il sughero nella storia..... | 3 |
| 1.2 Cenni sulla produzione | 5 |
| 1.3 Il tappo di sughero e le diverse tipologie | 9 |
| 1.4 Ricevimento, immagazzinamento e conservazione in cantina dei tappi di sughero..... prima dell'utilizzo..... | 13 |
| 2. AZIENDA DI STAGE | 14 |
| 2.1 Azienda..... | 14 |
| 2.2 Organizzazione aziendale..... | 14 |
| 2.2.1 Laboratorio chimico..... | 14 |
| 2.2.2 Laboratorio analisi sensoriali | 15 |
| 2.2.3 Laboratorio microbiologico | 16 |
| 2.2.4 Ufficio enologico | 16 |
| 2.2.5 Ufficio viticolo..... | 17 |
| 3. OBIETTIVO | 18 |
| 4. CONTROLLO QUALITÀ DEI TAPPI IN SUGHERO | 19 |
| 4.1 Odori e sapori anomali nel tappo di sughero..... | 19 |
| 4.1.2 Modalità di campionamento..... | 22 |
| 4.1.2.1 Piano di campionamento semplificato proposto dall' azienda Sinergo | 23 |
| 4.1.3 Classificazione visiva di tappi e rondelle..... | 24 |
| 4.1.4 Esame olfattivo..... | 25 |
| 4.1.5 Controllo dimensionale | 26 |
| 4.1.6 Umidità con stufa | 27 |
| 4.1.7 Resistenza alla bollitura | 28 |
| 4.1.8 Cessione dei perossidi..... | 29 |
| 4.1.9 Cessione dei solfiti | 30 |
| 4.1.10 Migrazione globale | 32 |
| 4.1.11 TCA (2,4,6- tricloroanisolo), TBA (2,4,6- tribromoanisolo), GEOSMINA E MIB | |
| (metilisoborneolo)..... | 34 |
| 4.1.12 Controllo microbiologico | 37 |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 4.1.13 Criteri di accettabilità | 39 |
| 4.2 Risultati conseguiti..... | 40 |
| 5. CONCLUSIONI | 44 |
| BIBLIOGRAFIA | 45 |
| SITOGRAFIA..... | 47 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 48 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Il sughero nella storia

Il sughero viene estratto dalla pianta della quercia da sughero (*Quercus Suber L.*, Fig.1), il cui tronco, di forma irregolare, può raggiungere un'altezza di 20 metri ed un diametro di 1 metro. La peculiarità di questa pianta è la rigenerazione della sua corteccia tutte le volte che viene staccata quando raggiunge uno spessore di 4-5 centimetri (operazione effettuata manualmente ogni 10 anni).

Alcuni studi datano l'origine della quercia da sughero nell'Era Terziaria, in quanto sostengono che essa esista dall'epoca della formazione del bacino Mediterraneo, risalente a circa 60 milioni di anni fa.

Più di 10 milioni di anni fa, un frammento fossile di sughero, che si depositò nel fondale del fiume Tago, è stato ritrovato attestando la primordiale presenza della quercia di sughero in Portogallo.

Altre tappe storiche salienti della nascita del sughero sono state datate nei seguenti secoli:

- III secolo A.C., in Francia sono state scoperte diverse anfore risalenti a tale epoca che conservano del vino ancora in buono stato;
- IV secolo A.C., nella Civiltà Romana il sughero veniva utilizzato come isolante termico nei tetti, come chiusura per anfore e nelle solette per calzature;
- XIII A.C., nell' Antico Egitto il sughero veniva utilizzato per la fabbricazione di utensili domestici, nell'arte della pesca e per la chiusura di contenitori;
- XV e XVI secoli, in Portogallo il sughero è stato usato per le caravelle che hanno condotto i nostri navigatori alla scoperta del mondo. Ancora oggi, come migliaia di anni fa, il sughero è utilizzato nei salvagenti e nei galleggianti per reti da pesca;
- XVII secolo, in Francia Don Pierre Pérignon trovò nel sughero la soluzione ideale per tappare i suoi vini provenienti dalla famosa regione dello Champagne nel nord della Francia. Sarà da questo momento in poi che avrà inizio l'industrializzazione del tappo di sughero, in quanto il suo ruolo fu determinante nell'affermazione di questo vino così pregiato;
- XIX secolo, si è assistito a un grande sviluppo nell'industria del tappo di sughero. La piallatrice, prima macchina industriale, risale al XX secolo;

- XX secolo, il sughero ha conquistato il cuore delle industrie più esigenti come quelle automobilistiche, aeronautiche e aerospaziali.

Uno dei più grandi obiettivi per il sughero nel XXI secolo è rafforzare la sua presenza nelle innovazioni e nelle applicazioni.



Fig. 1- Quercia da sughero

1.2 Cenni sulla produzione

Il sughero utilizzato per la fabbricazione dei tappeti è il tessuto esterno della quercia da sughero, il quale protegge i tessuti interni contro il disseccamento e le condizioni ambientali dannose, pur non contribuendo alle funzioni attive di vegetazione.

Durante tutto il suo periodo di vita, la quercia da sughero può essere decorticata dalle 15- 18 volte, con intervalli di 9 anni.

La prima decortica avviene intorno a 25 anni e si ottiene il cosiddetto "sughero maschio", un materiale molto grossolano non idoneo per la produzione di tappeti a causa della sua durezza e della sua struttura irregolare; dopodiché la pianta inizierà a produrre un nuovo strato di sughero, chiamato "sughero femmina", con le proprietà ideali per la produzione di tappeti.

In Figura 2 sono mostrate alcune immagini relative alle decortica.



Fig. 2- Fase di decortica

Dopo la raccolta, il sughero viene sottoposto ad un periodo di stagionatura all'aria della durata di 8-12 mesi (Fig. 3), dove si essicca, perde parte della polvere rossa contenuta nelle lenticelle e migliora alcune delle sue caratteristiche tecnologiche quali morbidezza ed elasticità.



Fig. 3- Fase di stagionatura

Segue la fase di bollitura (Fig. 4), che dura circa 1-1,5 ore, con lo scopo di diminuire la carica microbica, estrarre le sostanze idrosolubili come tannini e sali minerali e migliorare le caratteristiche fisiche.



Fig. 4- Fase di bollitura

Le plance di sughero vengono poi suddivise nelle diverse categorie di qualità e conservate in ambiente aerato e asciutto.

Non esistono norme precise a cui fare riferimento, per cui la classificazione è puramente soggettiva. La qualità maggiormente ricercata e apprezzata è quella densa, liscia, omogenea, senza nodi, senza ineguaglianze e senza crepe.

Le plance più spesse vengono utilizzate per la produzione dei tappi monopezzo mentre quelle più sottili per la produzione di rondelle.

Nella Tabella 1 sono schematizzate le principali fasi di produzione del tappo.

Tabella 1- Principali fasi di produzione del tappo

| FASE DELLA LAVORAZIONE | RACCOMANDAZIONI | EFFETTI DEL CATTIVO TRATTAMENTO |
|--|--|---|
| 2° bollitura (in acqua 1-1,5 ore a T intorno a 100 °C) | Controllare la presenza di sostanze nell'acqua di bollitura. Cambiare frequentemente l'acqua | Cessione di sostanze tanniche al vino (gusto di tappo) |
| Tiratura in bande e fustellatura | Il diametro dei turaccioli deve essere il vicino possibile allo spessore delle plance | Scarsa tenuta |
| Lavaggio | Effettuare l'ultimo lavaggio con acqua per evitare la presenza di residui di lavaggio nei tappi | Formazione di cloroanisoli ed ossidazione del vino |
| Essiccazione | Umidità finale massima del 6-7 % | Possibile sviluppo di microrganismi |
| Lubrificazione e timbratura | Trattamenti superficiali con prodotti di qualità garantita che mantengono le loro proprietà anche con elevati sbalzi termici | Scarsa tenuta e difficoltà alla stappatura |
| Imballaggio e spedizione | Stoccaggio in locali adatti (disinfettati, ventilati, U.R. 50-70 %, temperatura 15-20 °C) | Utilizzare i tappi entro 12 mesi. Assorbimento di sostanze volatili dall'ambiente |

In Figura 5 sono rappresentate alcune fasi della produzione dei tappi.



Fig. 5- Fasi della produzione

1.3 Il tappo di sughero e le diverse tipologie

Il sughero, grazie alle sue caratteristiche fisiche, rappresenta sin da secoli la scelta migliore per preservare la qualità del vino, in quanto è capace di proteggerlo e preservarlo da diverse anomalie che potrebbe subire durante la conservazione.

Le caratteristiche elastiche del sughero assicurano infatti una perfetta tenuta nel tempo, mentre la particolare struttura dello stesso favorisce una corretta evoluzione e conservazione del vino in bottiglia.

Ogni bottiglia ha uno specifico tappo adatto per conservare ed esaltare il prodotto.

I tappi in sughero reperibili sul mercato italiano vengono classificati in:

- Tappi naturali: sono realizzati mediante la macinazione di un unico pezzo di sughero, esistono forme cilindriche o coniche e varie dimensioni.



Fig.6- Tappi naturali

- Tappi naturali multipezzo: sono ricavati da due o più pezzi di sughero naturale incollati tra loro mediante un adesivo idoneo al contatto con gli alimenti.



Fig.7- Tappo naturale multipezzo

- Tappi naturali colmatati: sono tappi di sughero naturali i cui fori, detti lenticelle, sono riempiti da polvere di sughero ottenuta dalla finitura dei tappi naturali.



Fig.8- Tappi naturali colmatati

- Tappi agglomerati: sono realizzati con granuli di sughero ottenuti dai sottoprodotti derivanti dalla lavorazione dei tappi naturali.



Fig. 9- Tappi agglomerati

- Tappi microagglomerati: hanno un corpo formato da granuli di sughero agglomerati fini con dimensione media approssimativa di 1 mm.



Fig. 10- Tappo microagglomerato

- Tappi tecnici: sono formati da un corpo denso di sughero agglomerato con delle rondelle di sughero naturale incollate all'estremità superiore o in entrambe le estremità.



Fig. 11- Tappi tecnici

- Tappi per champagne: appartengono alla famiglia dei tappi tecnici in quanto sono formati da un corpo di granuli di sughero agglomerato, a cui una, due o tre rondelle di sughero naturale selezionato sono incollate a una delle estremità.



Fig. 12- Tappo per champagne

- Tappi incapsulati: sono formati da un corpo di sughero naturale e da una parte superiore generalmente in legno, PVC, porcellana, metallo, vetro o altri materiali.



Fig.13- Tappi incapsulati

La scelta del tappo viene fatta prendendo in considerazione alcuni parametri quali:

- caratteristiche come la lunghezza, il diametro, le classi visive ed altre;
- sovrappressione interna della bottiglia: tappo in sughero naturale di qualsiasi tipologia per i vini fermi; tappo agglomerato per vini fermi, frizzanti e spumanti; tappo agglomerato con rondelle 0+1 o 1+1 per vini fermi, con rondelle posizionate sulla faccia del tappo che sarà all'interno della bottiglia per vini frizzanti e spumanti;
- linea di affondamento rispetto alla bocca della bottiglia: tappatura a raso bocca, con un affondamento di 1 mm, per vini fermi e frizzanti; tappatura a fungo, nel quale il tappo sporge per circa la metà dell'altezza della bocca della bottiglia assumendo la tipica forma a fungo grazie alla gabbietta di ancoraggio, per vini frizzanti e spumanti.

1.4 Ricevimento, immagazzinamento e conservazione in cantina dei tappi di sughero prima dell'utilizzo

La scelta dell'acquisto del tappo più idoneo per la tappatura viene fatta attenendosi ad alcuni fattori quali: tipologia di vino, pressione del vino, condizioni di trasporto, profilo del diametro interno del collo della bottiglia e indicazioni date dal fornitore.

Dopo che i tappi arrivano in cantina, devono essere verificati i seguenti parametri:

- condizioni del mezzo di trasporto utilizzato, il quale deve essere asciutto, privo di odori e non deve trasportare contemporaneamente altri materiali che possano inquinare i tappi
- stato delle confezioni, che devono essere chiuse, integre ed asciutte
- corrispondenza tra il materiale consegnato e quello ordinato per quanto concerne la tipologia, la timbratura e la quantità
- verifica del livello di qualità concordato tra il fornitore e il cliente.

L'immagazzinamento viene fatto in appositi locali interni, i quali devono presentare determinate caratteristiche:

- locali asciutti, areati, puliti e privi di odori che possono contaminare il prodotto;
- temperatura ottimale di 15-25 °C ed un'umidità relativa del 50-70 %;
- locali utilizzati possibilmente solo per i tappi;
- puliti con detergenti che non contengano cloro;
- esenti da parti in legno o materiali legnosi (pellet, assi, ecc.);
- effettuare periodicamente le analisi dell'aria del locale per verificare la presenza di eventuali inquinanti chimici (alofenoli e aloanisoli);
- verniciare le pareti con materiali resistenti allo sviluppo di muffe e che non rilasciano sostanze responsabili di anomalie sensoriali.

2. AZIENDA DI STAGE

2.1 Azienda

La SINERGO è una società di servizi fondata nel 1993 per prestare assistenza ai viticoltori.

Per far fronte a questi fabbisogni, la società ha riunito nel proprio organico professionisti qualificati come: agronomi, enologi, chimici, economisti, esperti ambientali, esperti del marketing che forniscono tutta l'assistenza di cui un'azienda può avere bisogno.

2.2 Organizzazione aziendale

2.2.1 Laboratorio chimico

L'azienda possiede strumenti e attrezzature di laboratorio che permettono di effettuare tutte le principali analisi (acidità, solforosa, metalli, zuccheri, alcol, ecc), e anche le più particolari (pesticidi, ftalati, TCA, fenoli volatili, studio del profilo aromatico, ecc.) in modo preciso e veloce.

Nel 1996 il Laboratorio della SINERGO ha ottenuto dal Ministero dell'Agricoltura l'autorizzazione all'emissione di certificati di analisi validi ai fini della commercializzazione ed esportazione dei vini; dal 23/01/1998 il sistema qualità della SINERGO è conforme ai requisiti della normativa UNI EN ISO 9001:2008 e dal 2001 è accreditato da Accredia (Ex Sinal - Sistema Nazionale per l'accREDITamento di Laboratori) con n. 326 secondo la norma UNI CEI EN 17025.



Fig.14- Laboratorio chimico

2.2.2 Laboratorio analisi sensoriali

Il laboratorio di analisi sensoriali è costituito da un locale di esame, un locale di preparazione, un ufficio e i servizi igienici.

Il locale di esame, progettato secondo la normativa UNI ISO 8589, è attrezzato con singole cabine, destinato all'assaggio e, al contempo, permette ai degustatori di riunirsi; è perfettamente isolato per non ricevere rumori ed odori dall'esterno; è provvisto di un dispositivo per la filtrazione dell'aria condizionata. L'umidità relativa è tenuta mediamente tra il 55% e il 80%; la temperatura si aggira sui 20-23°C; l'illuminazione è diffusa e uniforme in modo da non suscitare ombre; i colori delle pareti e dell'arredo della sala oscillano tra una tonalità di bianco e grigio pallido.

L'azienda ha un gruppo di giudici (panel), formato da personale sia interno che esterno, il quale svolge test sul vino e sui tappi di sughero.



Fig. 15- Laboratorio analisi sensoriali

2.2.3 Laboratorio microbiologico

Nel laboratorio microbiologico dell'azienda vengono effettuate analisi sia sul vino che su matrici alimentari, in particolare su prodotti da forno. Le analisi che vengono effettuate con maggiore frequenza sono: scatole Petri ed epifluorescenza su vini; tamponi superficiali in cantina; controlli microbiologici su matrici alimentari.



Fig. 16- Laboratorio microbiologico

2.2.4 Ufficio enologico

La consulenza enologica che l'azienda offre spazia dalle operazioni vendemmiali, proseguendo per lo stoccaggio e l'imbottigliamento, fino alle sperimentazioni applicate.

Nella fase della vendemmia, gli enologi, in relazione alle analisi delle curve di maturazione, alla disponibilità della manodopera e all'andamento meteorologico, decidono insieme al titolare la tempistica della raccolta; controllano che le modalità di raccolta vengano eseguite rispettando l'integrità del prodotto al fine di garantirne la qualità e consigliano per la conduzione di un corretto processo fermentativo.

Nello stoccaggio annuale e nell'invecchiamento del vino si occupano di verificare il buon affinamento del prodotto controllandone la sanità e l'evoluzione della maturazione, e se è necessario definiscono le chiarifiche e gli assemblaggi da fare

Prima dell'imbottigliamento controllano la stabilità chimica e microbiologica delle partite e definiscono i trattamenti fisico-chimici più opportuni. In base alla tipologia di vino stabiliscono i metodi di imbottigliamento più adeguati e le aggiunte finali in funzione delle

caratteristiche desiderate. Inoltre attuano prove dimostrative, prove di sperimentazione applicata, prove di taratura agronomica e di metodologie enologiche importate.

2.2.5 Ufficio viticolo

L'attività di consulenza viticola è strutturata in due fasi principali:

1. riunioni periodiche con la direzione aziendale con il quale vengono definiti gli obiettivi e il mezzo per raggiungerli
2. sopralluoghi tecnici relativi alla stagione e alle fasi vegetative del vigneto.

La consulenza fornita comprende:

- consulenza per l'impianto di un nuovo vigneto: la scelta del portinnesto, della concimazione di impianto, delle forme di allevamento e dei materiali da utilizzare (pali, fili, tutori, ecc.);
- controllo durante l'esecuzione delle operazioni di gestione invernale del vigneto: stabilire le migliori modalità di potatura di produzione al fine di avere un buon equilibrio vegeto-produttivo;
- studio di un'ottimale concimazione di produzione in funzione della vigoria del vigneto e della produzione ottenuta;
- studio preventivo di una linea di difesa idonea: scelta del momento di intervento e dei principi attivi da utilizzare; controlli in campo dello stato sanitario della vegetazione e della produzione;
- controllo durante l'esecuzione delle operazioni di gestione estiva del vigneto: individuazione del momento idoneo e delle modalità di esecuzione della potatura verde, valutazione di una corretta gestione del suolo: lavorazioni, inerbimenti, controllo delle infestanti con mezzi chimici o meccanici.

Inoltre il suddetto l'ufficio presta assistenza su: domande di estirpo e reimpianto vigneti; relazioni tecnico agronomiche; pratiche inerenti a contributi agricoli e misure agroambientali; dichiarazione vitivinicola; gestione del fascicolo aziendale; denunce di giacenza; iscrizione dei vigneti alla DOC; richiesta di idoneità DOC / DOCG; tenuta dei registri di cantina.

3. OBIETTIVO

Il lavoro svolto durante il periodo di stage presso il laboratorio "SINERGO - CENTRO STUDI, RICERCA E SERVIZI - SOC. COOP" di Nizza Monferrato, ha avuto come obiettivo l'approfondimento delle conoscenze sul controllo qualità dei tappi in sughero per uso enologico.

L'attività si è svolta prendendo in esame diversi aspetti:

- aspetto sensoriale: valutazione di tipo olfattiva;
- aspetto analitico: valutazione visiva, valutazione dimensionale, umidità con stufa, cessione sostanze ossidanti, cessione solfiti, determinazione del 2,4,6-tricloroanisolo (TCA);
- aspetto microbiologico: valutazione della presenza di colonie di microrganismi viventi (lieviti, muffe e batteri).

4. CONTROLLO QUALITÀ DEI TAPPI IN SUGHERO

4.1 Odori e sapori anomali nel tappo di sughero

Il vino è il prodotto alimentare che si conserva più a lungo nel tempo. Proprio per questa sua peculiarità, al fine di non subire alterazioni, necessita una corretta chiusura.

Il materiale utilizzato per tappare le bottiglie e, quindi, a garantire inalterato il corpo e il profumo del vino, ha costituito da sempre un aspetto molto delicato.

Attualmente la chiusura più utilizzata è il tappo di sughero, il quale grazie alle sue caratteristiche fisiche, si dimostra da secoli la scelta migliore per preservare la qualità di un buon vino poiché è capace di proteggerlo.

Non bisogna dimenticare però le interazioni chimiche che avvengono tra il vino e il tappo, normalmente trascurabili, ma in alcuni casi possono cedere delle sostanze che provocano anomalie gusto-olfattive.

La più studiata tra le sostanze anomale è il 2,4,6-tricloroanisolo (TCA), una delle cause più frequenti del gusto di tappo, la cui presenza è stata rilevata nelle plance grezze, nelle diverse fasi di lavorazione del sughero, nel tappo, nel vino imbottigliato e anche in vini conservati in vasca.

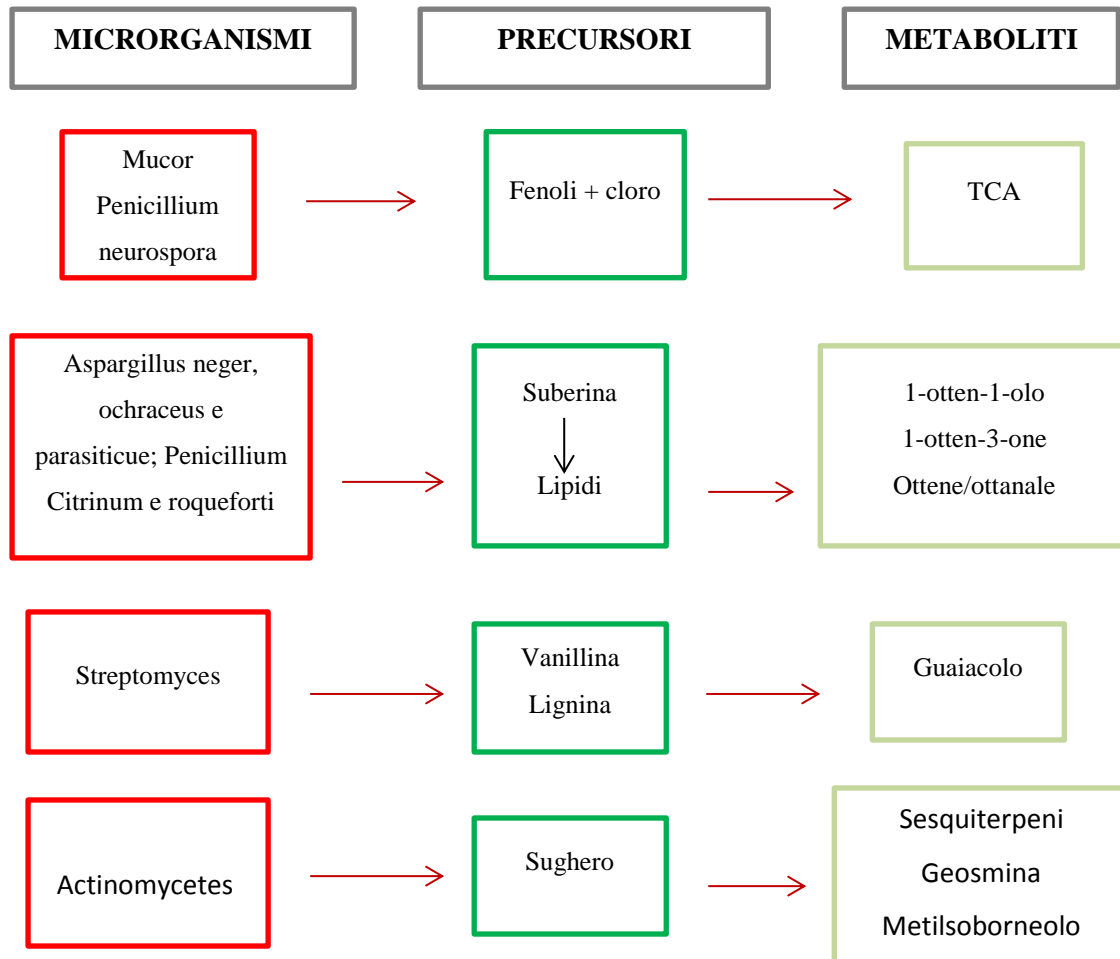
I cloroanisoli presentano una bassissima soglia di percezione, soprattutto il TCA, mentre i clorofenoli (sono i loro precursori) sono meno odoranti (Tab.2). Il 2,4,6-tricloroanisolo è stato indicato come il responsabile del gusto di tappo mentre il 2, 3,4,6-tetracloroanisolo sarebbe responsabile del gusto di muffa.

Le possibili origini delle sostanze contaminanti sono riconducibili a:

- **ORIGINE MICROBIOLOGICA**

La maggior parte di questi microrganismi può sopravvivere su substrati disidratati e svilupparsi rapidamente alla minima variazione delle condizioni ambientali (temperatura e umidità) utilizzando per il suo sviluppo i costituenti del sughero (polisaccaridi, lipidi, fenoli, tannini, ecc) e le sostanze impiegate nei trattamenti di rifinitura dei tappi (paraffina, silicone, coloranti, colle, ecc). Si formano così dei metaboliti che, se vengono ceduti al vino, possono conferirgli caratteristiche organolettiche più o meno sgradevole e non sempre definibili.

Nello schema 1 si possono osservare le vie metaboliche proposte per la formazione di sostanze inquinanti nel sughero.



Schema 1- Vie metaboliche proposte per la formazione di sostanze inquinanti nel sughero

- ORIGINE ESOGENA**

Il sughero può assorbire dall'ambiente certe molecole allo stato gassoso (fenolo, naftalene, ecc.) che successivamente possono essere cedute al vino quando il tappo è inserito nel collo della bottiglia.

Riscontri sperimentali hanno dimostrato che, a volte, l'origine del TCA non è il sughero ma il vino o l'ambiente di cantina, per esempio tappi e bottiglie vuote conservati in un'atmosfera artificialmente contaminata con TCA sono in grado di captare la molecola e di cederla al vino dopo essere stati messi in bottiglia, a un livello sufficiente per produrre odore di muffa.

I cloroanisoli possono formarsi nell'atmosfera delle cantine, nel caso in cui sono presenti contemporaneamente i tetra- e/o i pentaclorofenoli, utilizzati ad esempio per i trattamenti fungicidi del legno, e i microrganismi in grado di trasformare questi fenoli. Possono essere contaminanti la bentonite ed altri coadiuvanti enologici oppure il materiale di imballaggio e trasporto (cartoni, sacchi, pallet di legno). Quindi la contaminazione dei tappi e dei vini è fortemente correlata all'uso corretto degli impianti e delle strutture di cantina.

- **ORIGINE TECNOLOGICA**

Riguarda tutte le fasi di lavorazione del tappo in cui la microflora naturale del sughero trova condizioni adatte al suo sviluppo nella stagionatura o al periodo di immagazzinamento.

Per quanto riguarda il trattamento di disinfezione e sbiancatura dei tappi grezzi mediante soluzioni clorate, è nota la possibilità che questo trattamento provochi la formazione di clorofenoli (e poi di cloroanisoli per successivo intervento microbico).

Anche i trattamenti dei tappi con dosi elevate di anidride solforosa potrebbero essere fonte della comparsa di anomalie, in quanto darebbero luogo alla formazione di acidi lignin-solfonici (dovuti all'interazione tra lignina e SO₂), che possono reagire con i componenti dei vini formando composti come la 2-metil-3-etilpirazina e la 2,5-dimetilpirazina dall'odore di muffa.

Infine pare che specifiche lavorazioni dei tappi grezzi o del granulato di sughero possano far diminuire il livello di TCA e probabilmente di altri inquinanti.

La bollitura stessa, se condotta con particolari accorgimenti di ricambio e di purificazione delle acque utilizzate, può abbassare il contenuto di TCA nelle plance.

Va precisato che l'efficacia dei trattamenti dipende dal grado di inquinamento iniziale e dalla localizzazione della sostanza anomala all'interno del tappo o della plancia.

Tabella 2- Sostanze responsabili di odori e sapori anomali nel sughero o loro precursori

| COMPOSTI | ODORE | SOGLIA DI PERCEZIONE (NG/L) |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 2,4,6-tricloroanisolo | Muffa, cartone, bagnato | 4 |
| 2,3,4,6-tetracoloroanisolo | Muffa | 4--11 |
| Pentacloroanisolo | Muffa | 4000* |
| 2,4,6-troclorofenolo | Chimico, solvente | 43000 |
| Pentaclorofenolo | Chimico | 32000* |
| 1-otten-3-olo | Fungo, metillico | 20000 |
| 1-otten-3-one | Fungo, metillico | 20 |
| Guaiacolo | Affumicato, fenolico | 20000 |
| 2-metilisornorneolo | Terroso, fungo | 30 |
| Geosmina | Terroso, fungo | 25 |

(*) Soglia determinata in acqua

4.1.2 Modalità di campionamento

Per il campionamento si fa riferimento alla norma **UNI ISO 2859 (1993) "Procedimento di campionamento nel collaudo per attributi"**.

Il piano di campionamento previsto da questa norma tiene conto della numerosità dei lotti in esame e, in base a questa, prevede le diverse numerosità dei campioni da sottoporre ad analisi. L'azienda Sinergo propone un piano di campionamento semplificato concordabile con il cliente in base alle diverse esigenze.

4.1.2.1 Piano di campionamento semplificato proposto dall' azienda Sinergo

Nella seguente tabella viene indicato il numero minimo di tappi da sottoporre ad analisi in base alla numerosità del lotto da controllare per ciascuna tipologia di controllo:

| DIMENSIONE LOTTO IN ESAME (n° tappi) | CONTROLLO | TAPPI DA PRELEVARE |
|--------------------------------------|---|--------------------|
| Lotti fino a 50.000 tappi | Controllo sensoriale | 50 |
| | Controllo dimensionale, umidità, classificazione visiva | 5 |
| | Cessione sostanze ossidanti (perossidi) | 5 |
| | Cessione solfiti | 5 |
| | Controllo microbiologico | 8 |
| | Resistenza alla bollitura | |
| | • Distacco rondelle | 5 |
| | • Disaggregazione agglomerato | 5 |
| | Sostanze chimiche rilasciabili (TCA) | 50 |
| Da 50.000 a 500.00 | Controllo sensoriale | 100 |
| | Controllo dimensionale, umidità, classificazione visiva | 10 |
| | Cessione sostanze ossidanti (perossidi) | 10 |
| | Cessione solfiti | 10 |
| | Controllo microbiologico | 16 |
| | Resistenza alla bollitura | |
| | • Distacco rondelle | 10 |
| | • Disaggregazione agglomerato | 10 |
| | Sostanze chimiche rilasciabili | 50 |
| Oltre 500.00 | Controllo sensoriale | 200 |
| | Controllo dimensionale, umidità, classificazione visiva | 20 |
| | Cessione sostanze ossidanti | 20 |
| | Cessione solfiti | 20 |

| | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| | Controllo microbiologico | 32 |
| | Resistenza alla bollitura | |
| | • Distacco rondelle | 20 |
| | • Disaggregazione agglomerato | 20 |
| | Sostanza chimiche rilasciabili | 100 (2 campionature da 50 tappi) |

Tabella 3

4.1.3 Classificazione visiva di tappi e rondelle

L'aspetto che deve essere maggiormente considerato è quello dei cosiddetti "difetti critici", ossia di quelle mancanze che non permettono al tappo, sia esso monopezzo che tecnico, di adempiere alla sua principale funzione che è quella di chiudere.

Campo di applicazione

La classificazione visiva si effettua su tappi in sughero naturali, tappi tecnici, classificati in categoria A-B-C-D, e tappi per spumante.

Reattivi

Per l'esecuzione di questa prova non sono previsti reattivi.

Apparecchiature ed accessori

Il test è eseguito da personale addestrato utilizzando standard fotografici sia per i difetti che per le diverse classi di qualità.

Procedimento

La prova viene effettuata campionando 100 o 200 pezzi dal campione in analisi a seconda della dimensione del lotto (100 pezzi per lotti fino a 150.000 tappi, 200 pezzi per numerosità superiore).

Si verifica la presenza di difetti gravi tramite confronto con fotografie digitali a disposizione in laboratorio.

In caso di assenza di difetti gravi, si esegue la suddivisione dei tappi in 4 classi di qualità superficiali, utilizzando i riferimenti fotografici standard.

Espressione dei risultati

Si riportano i numeri dei tappi appartenenti alle varie classi e la relativa percentuale.

4.1.4 Esame olfattivo

Il controllo si basa su una valutazione soggettiva di tipo olfattiva effettuato da panel esperti. L'analisi viene eseguita confrontando i campioni messi a contatto con vino bianco con il testimone esente da anomalie.

Campo di applicazione

Il controllo di analisi olfattiva si può applicare a tutti i tipi di tappi in sughero.

Reattivi

Vino bianco neutro.

Apparecchiature ed accessori

- Contenitori in plastica da 75 ml e da 125 ml monouso dotati di coperchio
- Normale attrezzatura da laboratorio.

Preparazione del campione

L'esame olfattivo si esegue su 50 tappi o multipli.

Procedimento

- Porre il tappo intero o la rondella nell'apposito contenitore di plastica da 75 ml,
- Riempirlo con vino bianco fino ad immergere completamente il tappo e chiuderlo con il coperchio. Per i tappi a fungo si utilizzano i contenitori da 125 ml con 75 ml di vino al fine di immergere solo parzialmente il tappo.
- Lasciare a riposo a temperatura ambiente per circa 4 giorni.
- Togliere il coperchio dai contenitori, eliminare il tappo ed effettuare l'esame olfattivo.

Tramite l'utilizzo di un test a scala (MA-129) il panel indica i campioni percepiti anomali e per ognuno attribuisce un valore d'intensità da 0 a 100 del sentore percepito.

Espressione dei risultati

Viene indicato il numero di tappi "difettosi" con anomalie riconducibili a sentore di: tappo, terra/ muffa, vegetale o altro, sul totale dei tappi analizzati. Per ogni campione risultato non conforme viene indicato il valore medio e lo scarto tipo dei valori d'intensità percepita dai panel.

4.1.5 Controllo dimensionale

Il metodo si basa sulla misura del diametro, della lunghezza, della ovalizzazione, della massa e della densità del tappo.

Campi di applicazione

Il controllo dimensionale si può applicare a tutti i tipi di tappi.

Reattivi

Per l'esecuzione di questa prova non sono necessari reattivi.

Apparecchiatura ed accessori

- Calibro a corsoio con indicatore della forza di misurazione: campo 0-175 mm
- Divisione da 0,05 mm
- Bilancia analitica con divisioni da 0,1 mg
- Normale attrezzatura di laboratorio.

Preparazione del campione

Il controllo dimensionale viene effettuato su 5 tappi o multipli.

Procedimento

- Eseguire per ogni tappo la misura della lunghezza e del diametro a metà altezza (in realtà due diametri perpendicolari)
- Pesare ogni singolo tappo sulla bilancia
- Riportare i dati relativi a: lunghezza, misura di due diametri a 90° eseguita a metà della lunghezza del tappo, la media dei due diametri e la differenza tra i due diametri (ovalizzazione), il peso, la densità (mediante calcolo).

Espressione dei risultati

Diametro e altezza sono espressi in millimetri con una cifra decimale.

L'ovalizzazione è la differenza tra due misure, perpendicolari fra loro, del diametro del tappo.

È ammissibile una differenza massima di 0,5 mm fra le due misurazioni del diametro.

La massa, espressa in grammi con due cifre decimali, viene determinata dalla lettura diretta del valore nella bilancia.

La densità è calcolata a partire dal diametro, lunghezza e massa del tappo, ed espressa in mg/cm³ con due cifre decimali secondo la seguente espressione:

$$\text{densità (mg/cm}^3\text{)} = \frac{P \times 10^6}{r^2 \times 3,14 \times h}$$

dove: P è il peso (g) del tappo

r è il raggio (mm) del tappo calcolato come la metà del diametro

h è la lunghezza (mm) del tappo

diametro, lunghezza, massa, ovalizzazione e densità vengono indicate sul rapporto di prova come la media di tutte le misurazioni effettuate con due cifre decimali.

4.1.6 Umidità con stufa

Il metodo si basa sulla determinazione della differenza tra il peso del tappo prima del controllo e il peso dopo l'essiccazione in stufa.

Campo di applicazione

Il metodo si può applicare a tutti i tipi di tappi.

Reattivi

Per l'esecuzione di questa prova non sono necessari reattivi.

Apparecchiatura ed accessori

- Bilancia analitica con divisone da 0,1 mg
- Stufa a circolazione d'aria con termostato regolata a 103 ± 2 ° C
- Essiccatore
- Normale attrezzatura di laboratorio.

Preparazione del campione

La determinazione dell'umidità viene effettuata su 5 tappi o multipli.

Procedimento

- Porre i tappi già numerati, utilizzati per il controllo dimensionale, nella stufa a 103 ° C per 24 ore
- Sistemarli nell'essiccatore per 30 minuti per farli raggiungere la temperatura ambientale
- Ripesare i tappi.

Espressione dei risultati

L'umidità viene espressa come percentuale con due cifre significative, calcolata secondo la seguente espressione:

$$\text{umidità \%} = \frac{P_1 - P_2}{P_2} \times 100$$

dove: P_1 è il (g) del tappo prima del trattamento

P_2 è il peso (g) del tappo dopo 24 ore di stufa a 103 ° C

L'umidità, nel rapporto di prova, viene espressa come il valore medio di tutte le determinazioni effettuate con due cifre decimali.

4.1.7 Resistenza alla bollitura

RESISTENZA ALLA BOLLITURA (test sulle rondelle) - Il metodo si basa nel verificare la resistenza alla bollitura e conseguentemente la capacità di adesione esercitata dal collante sulle rondelle.

RESISTENZA ALLA BOLLITURA (test sull'agglomerato) - Il metodo si basa nel verificare la resistenza alla bollitura e conseguentemente la capacità di aggregazione esercitata dal collante sul materiale.

Campo di applicazione

I metodi di resistenze alla bollitura (test sull'agglomerato e sulle rondelle) sono applicabili ai tappi in sughero agglomerato con rondelle ed ai tappi per spumante.

Reattivi

Per l'esecuzione di questa prova non sono necessari reattivi.

Apparecchiatura ed accessori

Normale attrezzatura di laboratorio.

Procedimento

- Porre i tappi in un becker da 1 litro contenente un volume di circa 400-500 ml di acqua ultrapura, in modo che risultino completamente immersi
- Portare ad ebollizione l'acqua
- Dopo 10 minuti si verifica la tenuta delle rondelle (test sulle rondelle).
- I tappi vengono estratti dalla soluzione e valutati visivamente senza esercitare alcuna forza
- Dopo 1 ora viene verificata la tenuta dell'agglomerato (test sull'agglomerato).

Espressione dei risultati

L'esame dei risultati è di tipo visivo, e viene espresso come:

- TEST SULLE RONDELLE - Assenza o presenza di distacco completo delle rondelle (difetto bloccante ed in caso di presenza anche di un solo tappo con distacco della rondella, il campione è da considerarsi non conforme).
- TEST SULL'AGGLOMERATO - Assenza o presenza di disaggregazione dell'agglomerato (difetto bloccante ed in caso di presenza anche di un solo tappo con disaggregazione dell'agglomerato, il campione è da considerarsi non conforme).
- Presenza di fessurazioni gravi lungo l'interfaccia rondella-agglomerato sono considerate gravi se le fessurazioni presentano una lunghezza > 5 mm ed una profondità $>$ di $1/3$ del diametro del tappo in analisi; tali fessurazioni sono ammesse con una percentuale massima di accettabilità pari al 2%.

4.1.8 Cessione dei perossidi

Il controllo si basa nella rilevazione dei perossidi ceduti in soluzione dal tappo. La loro presenza viene determinata iodometricamente facendo reagire la soluzione stessa con un eccesso di ioduro in soluzione di acido acetico, utilizzando come indicatore l'amido. I perossidi presenti vengono titolati con sodio tiosolfato.

Campo di applicazione

Il metodo di cessione dei perossidi si può applicare a tutti i tipi di tappi.

Reattivi

- Potassio Ioduro
- Amido solubile
- Acido acetico glaciale
- Acido solforico diluito 1:5
- Sodio tiosolfato 0.01 N.

Apparecchiature ed accessori

- Contenitori in plastica da 125 ml monouso dotati di coperchio
- Normale attrezzatura di laboratorio.

Preparazione del campione

La cessione dei perossidi viene effettuata su 5 tappi o multipli.

Procedimento

- Sciogliere, in un litro di acqua ultrapura bollente, 20 g di amido solubile

- Dopo aver raggiunto la temperatura ambiente, aggiungere 20 g di potassio ioduro e 2 ml di acido acetico glaciale
- Porre il tappo intero nel contenitore di plastica, riempire con la soluzione e chiudere con il coperchio
- Preparare una prova in bianco senza porre nel contenitore il tappo di sughero
- Trascorso questo tempo togliere i tappi e verificare la comparsa di colorazione.
- La prova in bianco deve rimanere incolore, in caso contrario ripetere l'analisi.
- Se la soluzione rimane incolore la prova è negativa, in caso di comparsa di colorazione (grigio scuro, nero) la prova è positiva. Se si vuole quantificare, procedere con la titolazione.
- Aggiungere 3 ml di acido solforico e titolare, agitando con la soluzione di sodio tiosolfato 0.01 N fino al viraggio dell'indicatore evidenziato dalla variazione netta di colore da nero a incolore.

Espressione dei risultati

La quantità di perossidi, espressi in mg di ossigeno per tappo, viene determinata con la seguente formula:

$$\text{perossidi (mg di } O_2) = 0,16 \times n$$

dove: n sono i ml di sodio tiosolfato 0.01 N utilizzati per la titolazione della soluzione contenente il tappo

4.1.9 Cessione dei solfiti

Il metodo si basa nella determinazione dei solfiti dopo l'estrazione in una soluzione acetica. Questo metodo permette la determinazione, in modo rapido e semi-quantitativo, sia della presenza di residui solfiti e tiosolfati sotto forma di sali, che di anidride solforosa aggiunta in forma gassosa ai tappi in sughero.

Campi di applicazione

Il metodo della cessione di solfiti può essere applicato a tutti i tipi di tappo in sughero.

Reattivi

- Soluzione di 0.2 % di acido acetico glaciale in acqua
- Kit pronto Aquamerck cod. 1.11148.0001 test dei solfiti composti da tre reagenti:

1. N°1 acido solforico,
2. N° 2 soluzione di ioduro di zinco con salda d'amido come indicatore,
3. N° 3 soluzione di iodato di potassio come titolante.

Apparecchiature ed accessori

- Pipette graduate, classe A, 5 ml con precisione di ± 0.03 ml
- Normale attrezzatura da laboratorio.

Procedimento

- Versare 160 ml di soluzione acetica in un flacone con tappo a vite e introdurre 5 tappi
- Preparare un flacone per la prova in bianco
- Chiudere i flaconi ed agitare per 30 minuti
- Prelevare 5 ml della soluzione di estrazione e introdurla in un becker
- Aggiungere 2 gocce del reagente N° 1 e 2 gocce del reagente N° 2 ed agitare
- Riempire il tubo contagocce, in dotazione con il kit, con la soluzione di titolazione fino a quando il bordo inferiore del giunto nero non corrisponda al valore della scala 0 mg/l
- Asciugare la punta del tubo contagocce ed aggiungere goccia a goccia la soluzione di titolazione finché il colore della soluzione di estrazione non vira al blu.

Espressione dei risultati

Per la determinazione del contenuto in solfiti leggere la concentrazione della soluzione di estrazione in mg/l di solfito di sodio (Na_2SO_3) sulla scala graduata della pipetta di titolazione e convertirla in mg/l di solfito (SO_3^{2-}) come indicatore nella seguente tabella 4:

| Na_2SO_3 (mg/l) | SO_3^{2-} (mg/l) | Na_2SO_3 (mg/l) | SO_3^{2-} (mg/l) |
|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| 2,5 | 1,6 | 27,0 | 17,6 |
| 5,0 | 3,2 | 30,0 | 19,2 |
| 7,5 | 4,8 | 32,5 | 20,8 |
| 10,0 | 6,4 | 35,0 | 22,4 |
| 12,5 | 8,0 | 37,5 | 24,0 |
| 15,0 | 9,6 | 40,0 | 25,6 |
| 17,5 | 11,2 | 42,5 | 27,2 |

| | | | |
|------|------|------|------|
| 20,0 | 12,8 | 45,0 | 28,2 |
| 22,5 | 14,4 | 47,7 | 30,4 |
| 25,0 | 16,0 | 50,0 | 32,0 |

Tabella 4

La quantità approssimata di solfiti ceduta dai tappi di sughero alla soluzione di estrazione, espressa in mg di SO_3^{2-} per tappo viene data dalla seguente espressione:

$$\text{solfiti (mg } SO_3^{2-} / \text{ tappo)} = \frac{X \times V}{n}$$

dove: X è la concentrazione di SO_3^{2-} della soluzione di estrazione

V è il volume della soluzione di estrazione in litri

N è il numero di tappi per flacone.

4.1.10 Migrazione globale

Questo metodo ha lo scopo di valutare la quantità di sostanze cedute dal materiale (tappo o altro) a un liquido che simula la capacità estrattiva dell'alimento; non identifica cosa sia migrato ma misura la quantità totale delle sostanze cedute dal materiale nelle condizioni del test.

Campo di applicazione

Questo controllo è applicabile a tutti i tipi di tappo in sughero (naturale, tecnici e per spumanti), sintetici, in plastica e bidull.

Reattivi

Simulante B- soluzione di acido acetico al 3% (p/v)

Simulante C- soluzione di alcol etilico al 20% (v/v), nel caso del vino come alimento a contatto.

Apparecchiature ed accessori

- Bilancia analitica con divisioni di 0,1 mg
- Capsula di platino
- Evaporatore ad infrarossi
- Stufa a circolazione d'aria con termostato regolata a $103 \pm ^\circ C$
- Normale attrezzatura di laboratorio.

Preparazione del campione

Per il campionamento del materiale necessario si deve tener presente che ciascuna analisi va effettuata almeno in triplo e che potrebbe essere necessario ripetere la prova.

La determinazione della migrazione viene effettuata per immersione totale nel simulante.

- Ogni tappo viene immerso nella soluzione simulante (effettuare tre prove per ogni campione in ciascun simulante, nel caso delle bidull metterne 20 per prova)
- Mantenere i campioni a contatto con i simulanti ad una temperatura di 40 ° C per 10 giorni
- Terminato il contatto materiale/simulante, il simulante viene posto in capsula di quarzo (preventivamente pesate - P_1) e fatto evaporare in evaporatore ad infrarossi
- Completata l'evaporazione, le capsule contenenti il residuo vengono poste a raffreddare nell'essiccatore e poi pesate fino a peso costante (P_2).

Espressione dei risultati

La quantità di sostanze cedute viene calcolata per differenza tra le due pesate e poi rapportata alla superficie di contatto del materiale.

Nel caso dei tappi, considerando:

A= differenza tra le due pesate in mg ($P_2 - P_1$)

B= superficie totale del tappo in dm^2 , calcolata come: $(d_{mm} \times h_{mm} \times \frac{3.14}{1000}) + (3,14 \times r_{mm}^2 \times 0,0002)$

C= superficie di contatto nelle reali condizioni di impiego (rondelle), calcolata come: $3,14 \times r_{mm}^2 / 10000$.

Le migrazioni globali (mg ceduti/litro di prodotto alimentare nelle effettive condizioni di impiego) sono calcolate con la seguente espressione:

$$\text{migrazione globale} = \frac{A \times C}{B \times 0,750} \text{ ppm}$$

In caso di determinazione di migrazioni globali in materiali diversi dai tappi, la cessione verrà calcolata di volta in volta a seconda della superficie di contatto e delle condizioni di utilizzo.

Per le bidull e per i tappi in plastica cavi all'interno la formula è la seguente:

$$\text{migrazione globale} = 1000 \times (m \times a_2) / (a_1 \times 750) = m \times 0,667 \text{ ppm (essendo per le bidull } a_2 = a_1)$$

dove: m= mg ceduti/20 (sono state immerse 20 bidull per condizione di prova)

Parametri qualitativi

Il valore massimo di sostanza ceduta nelle reali condizioni di impiego è fissato a 60 ± 6 mg/l di liquido di contatto (art. 9 bis del DM n°34 del 21/03/1973 e successivi aggiornamenti e modifiche)

4.1.11 TCA (2,4,6- tricloroanisolo), TBA (2,4,6- tribromoanisolo), GEOSMINA E MIB (metilisoborneolo)

Il principio del metodo si basa sull'estrazione di TCA, TBC, GEOSMINA E MIB presenti nei tappi o nel vino mediante la tecnica SPME, facendo assorbire queste molecole sulla fibra. Posteriormente la fibra si fa assorbire all'interno dell'iniettore del gascromatografo e le sostanze rilasciate verranno analizzate con il detector di massa utilizzando la tecnica SIM (select ion monitoring).

Campi di applicazione

Questo metodo si applica ai tappi in sughero e al vino.

Reattivi

- Sodio Cloruro
- Metanolo
- Soluzione di Model Wine: in un matraccio di 1 l, contenente circa 300 ml di acqua ultrapura, aggiungere 7 g di acido tartarico, 35 ml di sodio idrossido 1 N e 100 ml di etanolo puro al 100 %; portare a volume con acqua ultrapura
- 2,4,6- Tribromoanisolo. CAS 607-99-8
- 2,4,6- Tricloroanisolo. CAS 87-40-1
- Geosmina. CAS- 19700-21-1
- Metil Isoborneolo. CAS- 507-70-0
- IS-2,3,6- Tricloroanisolo. CAS 50375-10-5
- ISTD: soluzione a 2 µg/l in metanolo.

Apparecchiature ed accessori

- Bilancia analitica con divisore da 0,1 mg
- Pipetta con doppia tacca, classe A, da 5, 1 e 0,2 ml con una precisione di $\pm 0,015$, $\pm 0,007$ e $\pm 0,002$ ml

- Agitatore magnetico con piastra riscaldante
- Vials con la tecnica SPME con tappo a ghiera e setto adatto a questa tecnica
- Ago per tecnica SPME dotato di una fibra rossa da 100 μm di diametro in polydimethylsiloxane
- Sistema di misura GC-MS corredato di:
 1. Iniettore Splitt-Splittles
 2. Forno
 3. Colonna capillare HP-5 Crosslinked 5% PHMe Siloxane (lunghezza 30 m, diametro interno 0,25 mm e spessore della pellicola 0,25 μm)
 4. Rilevatore quadrupolo di massa 5975 C
 5. MSD Chemstation G1701EA E.02.00.493
- Normale attrezzatura di laboratorio.

Preparazione del campione

Pesare 20 tappi di sughero e metterli a macerare (T ambiente per 24 ± 2 ore) in un volume noto di model wine in maniera tale che rimangano coperti dalla soluzione.

Per i tappi da spumante, tagliare il tappo ad un'altezza di 1 cm sopra la rondella per eliminare la parte del corpo agglomerato.

Per i campioni di vino, questo viene utilizzato tal quale facendo attenzione a non lasciarlo a contatto con l'aria in quanto i suddetti composti sono molto volatili e si possono verificare perdite di quantità.

Procedimento

- In un vial per SPME, pesare 3 g di sodio cloruro,
- Pipettare (con una pipetta monouso per evitare inquinamento incrociato tra i campioni) 10 ml di campione
- Aggiungere 100 μl (0,1 ml) di IS (2,4,6-tricloroanisolo a 2 $\mu\text{g/l}$),
- Inserire un' ancoretta magnetica e sistemare nel becker di acqua a 35 ° C posto sull'agitatore magnetico
- Fare l'estrazione in Headspace inserendo l'ago e facendo uscire la fibra mantenuta in continua agitazione
- Lasciare in agitazione per 15 minuti
- Fare rientrare la fibra nel corpo dell'ago e togliere l'ago dal vial.

- Impostare il metodo "TCATBASim4.m" sullo strumento: nella parte superiore dello schermo selezionare la casella sample name, inserire i dati relativi al campione e cliccare "OK and Run Method" per avviare la procedura di ricezione dati dopo l'iniezione. Controllare sulla tastiera del GC 7890° che sia accesa la luce di pre Run ed aspettare che si spenga la luce rossa con l'indicazione "Not ready" sulla tastiera del GC. Inserire l'ago nell'iniettore, premere "Start" sulla tastiera del GC 7890° e fare uscire la fibra del corpo dell'ago. Aspettare 5 minuti, fare rientrare la fibra e togliere l'ago (è pronto per iniziare la preparazione del campione successivo).

Le condizioni gascromatografiche sono le seguenti:

- Temperatura iniziale del forno 50 °C
- Tempo iniziale: 4 minuti
- Programmare la temperatura a 25 °C/min fino a 100 °C, poi a 5 °C/min fino a 200 °C e a 25 °C/min fino a 260 °C dove si ferma 2 minuti
- Tempo di equilibrio: 1 minuto
- Iniezione in Splittless. Temperatura dell'iniettore: 250 °C
- Temperature impostate nel detector di massa: MS source 230 °C, MS quad 150 °C, AUX2 280 °C
- Gas di trasporto: elio

Tempo di analisi è di 25,6 minuti.

I composti vengono identificati in base a:

1. Tempo di ritenzione e tempo di ritenzione relativo ($RT_{composto}/RT_{IS}$)
 - MIB.- RT= 9,0 min; RRT= 0,78
 - 2,4,6-TCA.- RT= 10,8min; RRT= 0,95
 - IS: 2,3,6-TCA- tr= 11,4 min
 - Geosmina.- RT= 12,1 min; RRT= 1,05
 - 2,4,6-TBA.- RT= 15,6 min; RRT= 1,36
2. Ioni di massa caratteristica
 - MIB.- ioni di massa 953108
 - 2,4,6-TCA.- ioni di massa 195 e 197
 - IS: 2,3,6-TCA.- ioni di massa 210 e 212
 - Geosmina.- ioni di massa 112 e 125

- 2,4,6-TBA.- ioni di massa 344 e 346

Espressione del risultato

Lo strumento fornisce l'area degli ioni di massa corrispondenti a ogni composto. La concentrazione dei composti, espressa in ng/l senza cifre decimali, viene calcolata in base al rapporto tra l'area del composto e quella dello standard interno (2,3,6-TCA) utilizzando l'equazione della retta di taratura relativa.

Se sono stati utilizzati tappi in sughero, trasformare il quantitativo fornito dallo strumento nell'unità di misura "ng/l" in "ng/Kg" mediante la seguente operazione:

$$Y \text{ (ng/Kg)} = X \times A / B$$

dove: Y= concentrazione di TCA in ng/Kg di sughero

X= concentrazione del TCA in ng/l fornita dallo strumento

A= volume (ml) di MW utilizzato per macerare il sughero

B= peso (g) del sughero sottoposto a macerazione.

4.1.12 Controllo microbiologico

Il metodo si basa sulla conta diretta di colonie di microrganismi viventi (lieviti, batteri e muffe) tramite estrazione in soluzione isotonica, utilizzando la procedura di filtrazione su membrana . Questo controllo viene effettuato per monitorare il prodotto e per rilevare il livello di inquinamento della partita al fine di valutare la quantità del processo.

Campo di applicazione

Il controllo microbiologico può essere applicato a tutti i tipi di tappo.

Reattivi

- Plate Count Agar (PCA) Merck
- Malt Extract Aar (MEA) Merck
- Tetraciclina diidrato
- Soluzione Ringer

Apparecchiature ed accessori

- Bilancia analitica con divisore 0,1 mg
- Microscopio a luce bianca
- Sistema di filtrante sotto vuoto
- Cappa a flusso laminare sterile (deve essere accesa qualche minuto prima)

- Membrane filtranti con diametro di poro di 0,45 µm e di 47 mm di diametro
- Scatole Petri dotate di setto poroso
- Normale attrezzatura di laboratori.

Preparazione del campione

Il controllo viene effettuato su 4 tappi o multipli.

Procedimento

- Porre in due flaconi, contenenti ciascuno 100 ml di soluzione Ringer sterile, 4 tappi per flacone in modo che essi risultano immersi nella soluzione
- Mantenere in agitazione meccanica costante per 1 ora a 25 °C

DETERMINAZIONE DELLA CARICA BATTERICA TOTALE

- Prelevare e filtrare su membrane separate 1 aliquota da 50 ml di soluzione e 1 aliquota da 5 ml
- Porre separatamente le due membrane sulla superficie di coltura del terreno PCA in piastre Petri
- Incubare le piastre a 37 ± 1 °C per 2 giorni
- Effettuare la conta delle colonie per ogni piastra.

DETERMINAZIONE DI MUFFE E LIEVITI

- Procedere come descritto per il PCA utilizzando MEA come substrato
- Incubare le piastre di MEA a 22 ± 1 °C per 3 giorni
- Al termine determinare il numero di muffe e lieviti totali.

È consigliato controllare lo sviluppo di colonie su MEA ogni 24 ore ed effettuare la conta delle colonie presenti per ogni piastra.

Preparare un saggio di controllo (bianco) per controllare l'assenza di contaminazioni durante l'allestimento della prova. Per ogni terreno di coltura, può essere utile l'osservazione al microscopio ottico di alcune colonie prese casualmente, a conferma dell'appartenenza al gruppo microbico atteso.

Espressione dei risultati

Finito il periodo di incubazione si effettua la conta delle colonie sviluppatesi; qualora risultasse impossibile contare le colonie derivanti dalla filtrazione dei 50 ml di soluzione estraente, prendere in considerazione quelle da 5 ml. In base al numero dei replicati, calcolare il numero medio delle UFC.

$$\frac{(\text{volume di soluzione di estrazione} \times n^{\circ} \text{ medio UFC})}{\text{volume filtrato (50 o 5 ml)} \times n^{\circ} \text{ tappi analizzati}} = \text{UFC/tappo}$$

4.1.13 Criteri di accettabilità

Nella tabella che segue sono elencati i criteri per l'accettabilità della fornitura, nonché i valori come ottimali.

Tabella 5- Criteri di accettabilità

| CONTROLLO | PARAMETRO | TIPO DI TAPPO | VALORI OTTIMALI | ACCETTABILITÀ FORNITURA |
|---------------------------|--|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Controllo sensoriale | Controllo sensoriale | Tutti | 0 | ≤2 |
| Controllo dimensionale | Lunghezza (mm) | Tutti | L ± 0.4 | L ± 0.6 |
| | Diametro (mm) | Tutti | D ± 0.3 | D ± 0.5 |
| | Ovalizzazione (mm) | Naturale | 0 – 0.5 | - |
| | | Tecnico | 0 – 0.3 | - |
| | Massa volumica apparente (Kg/m ³) | Naturale | 160 – 220 | 130 – 225 |
| | | Tecnico | 250 – 290 | 230 – 310 |
| Umidità in stufa | Umidità % | Tutti | 4 - 7 | 3 - 8 |
| Resistenza alla bollitura | Test di bollitura | Distacco rondelle | 0 | Assente |
| | | Disaggregazione agglomerato | 0 | Assente |
| Cessione perossidi | Cessione perossidi (mg O ₂ / tappo) | Tutti | 0 | < 0.2 |

| | | | | |
|--------------------------|---------------------|-------|---|------|
| Controllo microbiologico | Muffa (UFC/tappo) | Tutti | 0 | < 10 |
| | Batteri (UFC/tappo) | Tutti | 0 | < 30 |
| | Lieviti (UFC/tappo) | Tutti | 0 | < 10 |

4.2 Risultati conseguiti

Durante il periodo di stage sono stati analizzati 10.825 tappi (Grafico 1) di cui il 98,65 % non presentava difetti mentre nell'1,35 % sono stati riscontrati diverse anomalie (Grafico 2).

L'analisi sensoriale, effettuata da 8 panel, ha dato informazioni relative alla loro sensibilità all'olfatto e al gusto di "tappo". Le anomalie riscontrate sono state: TAPPO, PIRAZINA (vegetale), GEOSMINA (muffa/terra) e ALTRO (Grafico 3).

Grafico 1- Numero di tappi analizzati

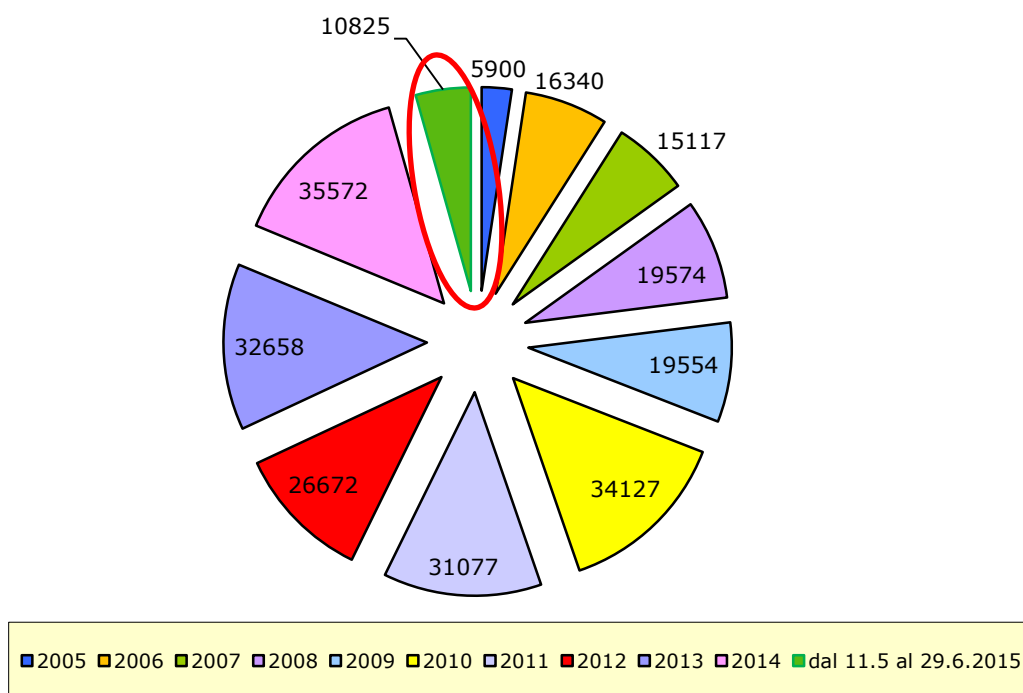


Grafico 2- Percentuale di tappi conformi e non

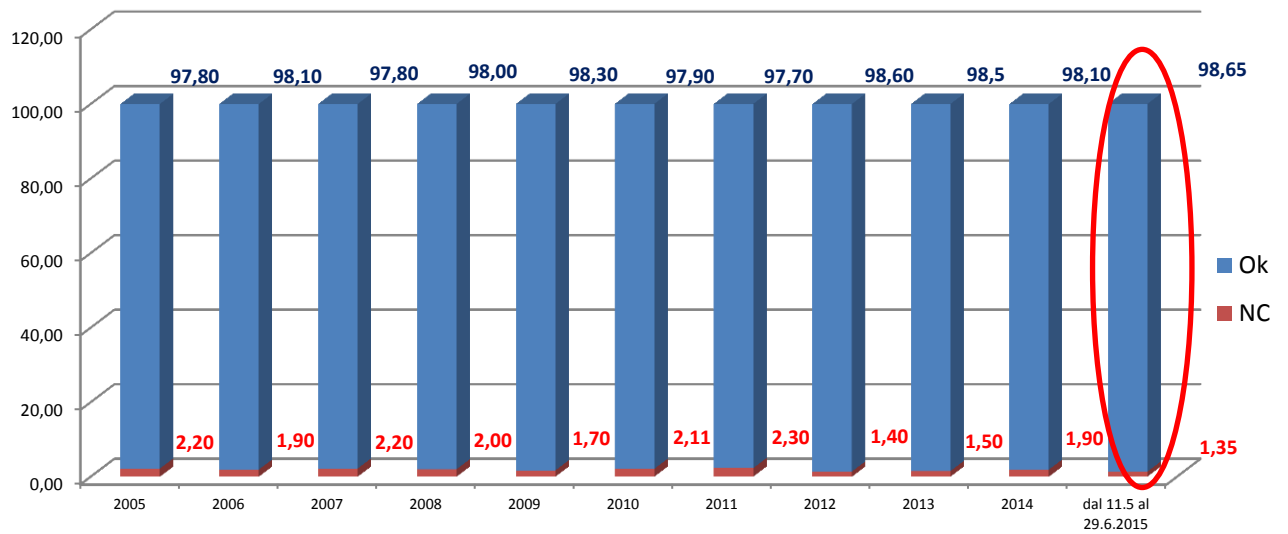
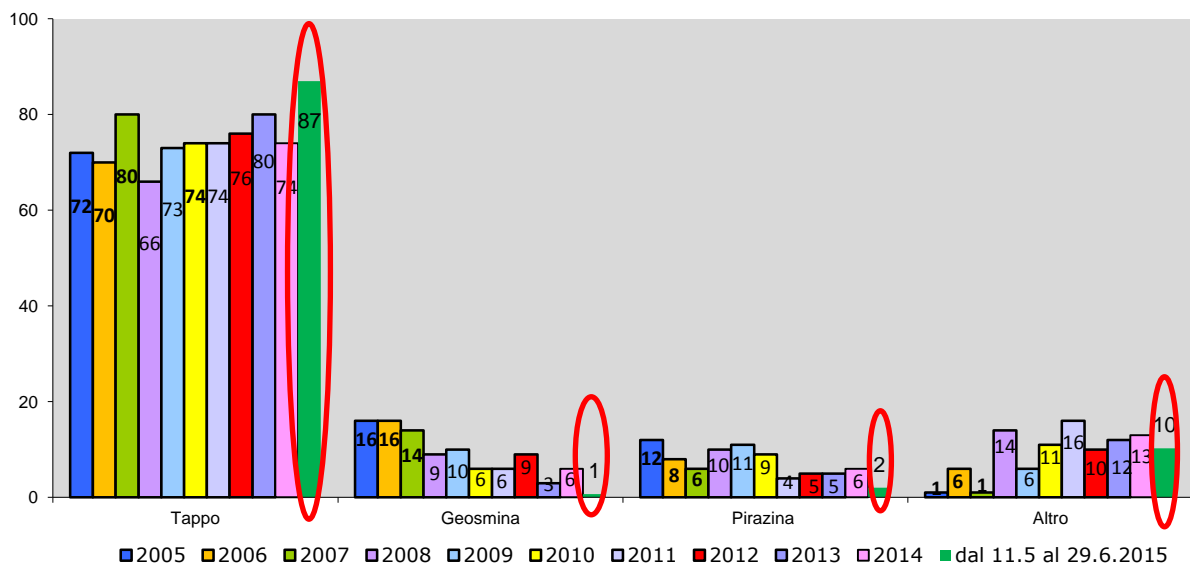


Grafico 3- Anomalie riscontrate



Dall'analisi del 2,4,6-tricloroaniloso effettuata su alcuni campioni sono emersi i seguenti risultati (Tab. 6):

Tabelle 6- Risultati del TCA

| CODICE CAMPIONE | NOME ANALISI | VALORE (ng/Kg) |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 3526 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 2,7 |
| 3674/01 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 0,8 |
| 3852/01 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3852/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/01 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/03 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/04 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/05 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/06 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/07 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/08 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/09 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/10 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/11 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3892/12 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 4130 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 4222/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 4235/01 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 15-R4235/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 4235/03 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 0,6 |
| 4347 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3577 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 3,5 |
| 3578/01 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 3578/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 0,6 |
| 3674/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 4,1 |
| 3786 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 2,8 |
| 3959/01 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 7,14 |
| 3959/02 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 1,55 |
| 4129 | 2,4,6-Tricloroanisolo | Inf a LOD |
| 4417 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 1,4 |
| 4494 | 2,4,6-Tricloroanisolo | 3 |

Inf a LOD= inferiore al limite rilevabile

Nella tabella 6 vengono riportati i risultati del controllo microbiologico.

Tabella6- Risultati controllo microbiologico

| CODICE CAMPIONE | MUFFE UFC/tappo | LIEVITI UFC/tappo | BATTERI UFC/tappo |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 3613/01 | 1 | 1 | 7 |
| 3613/02 | NR | NR | NR |
| 3613/03 | NR | NR | NR |
| 3660 | 1 | 1 | 7 |
| 3786 | 3 | 1 | 3 |
| 3797/01 | NR | 5 | 11 |
| 3797/02 | 1 | NR | 1 |
| 3797/03 | 1 | 1 | 8 |
| 3971/01 | 0 | 0 | 4 |
| 3971/02 | 2 | 0 | 3 |
| 3971/03 | 7 | 2 | 5 |
| 3971/04 | 0 | 0 | 2 |
| 3971/05 | 0 | 1 | 2 |
| 3971/06 | 1 | 0 | 2 |
| 4108 | 2 | 1 | 3 |
| 4127 | 1 | 1 | 4 |
| 4130 | 7 | 2 | 4 |
| 4381 | 6 | 3 | 2 |

NR= non rilevabile

5. CONCLUSIONI

Dall'insieme dell'attività di stage, riportato in questo elaborato finale, si evince che nell'esame olfattivo i degustatori hanno percepito maggiormente anomalie riconducibili al sentore di "TAPPO", mentre quelle attribuite a sentori di "GEOSMINA" e "PIRAZINA" presentano una percentuale trascurabile.

Nei controlli analitici, la migrazione globale, la cessione di perossidi e di solfiti hanno fornito tutte esito negativo. Il 2,4,6-tricloroanisolo, ricercato su alcuni lotti di tappi, ha presentato, per la maggior parte dei campioni, valori inferiori al limite di rilevabilità strumentale.

Dal controllo microbiologico, invece, è emerso che nei terreni di coltura impiegati per lo sviluppo di muffe, lieviti e batteri non c'è stata una crescita microbica significativa tale da considerare il prodotto non conforme.

BIBLIOGRAFIA

Corticeira Amorim, S.G.P.S., S.A.- L'arte del Sughero- 2° edizione: luglio 2014. 2-4.

Il sughero- Manuale tecnico per il corretto utilizzo dei tappi, 2012.

Mazzoleni V., Zironi R., Campisi B.- Manuale d'uso sulle tecniche di tappatura delle bottiglie di vino, 2001. Numero 14. 14-33.

Manuale tecnico-Tappi. CULTURA, NATURA, FURUTO. Cork. 2011.

Nuovo disciplinare sulle metodiche analitiche per il controllo del tappo di sughero per uso enologico. Gennaio 2011.

Pes A. Il sughero in cantina- Il turacciolo, il tappo a fungo, il tappo di sughero agglomerato, 1995. La Nuovissima Tempio Pausania.

SINERGO S.c.a.r.l- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-96. Tappi, vini e mosti.- TCA (2,4,6-tricloroanisolo), TBA (2,4,6-tribromoanisolo), GEOSMINA E MIB (metil isoborneolo). Emissione 4. Modifica 2.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-139. Tappi. – Esame olfattivo. Emissione 4. Modifica 2.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-140. Tappi. – Cessione di perossidi. Emissione 4. Modifica 0.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-142. Tappi. – Controllo dimensiona. Emissione 4. Modifica 0.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-143. Tappi. – Umidità. Emissione 4. Modifica 0.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-145. Tappi. – Controllo microbiologico. Emissione 4. Modifica 1.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-148. Tappi. – Resistenza alla bollitura. Emissione 4. Modifica 0.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-150. Tappi. – Cessione di solfiti. Emissione 4. Modifica 0.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Manuale delle procedure di emissione. MA-183. Tappi. – Migrazione globale. Emissione 4. Modifica 0.

SINERGO Soc. Coop.- CENTRO STUDI, RICERCHE E SERVIZI. Protocollo di comportamento proposto da Sinergo per il controllo qualità dei tappi in sughero. Edizione 9. Revisione 0.

SITOGRAFIA

<http://www.collaefresu.com/>

<http://www.demariataps.com/it/processi-lavaggio-sughero.html>

<http://www.easyviaggio.com/portogallo/la-quercia-da-sughero-2908>

<http://ecoquarta.blogspot.it/>

<http://www.enologiavite.it/>

<http://www.ferrarisugheri.it/Index.asp>

<http://it.freepik.com/index.php?goto=2&searchform=0&k=tappi+sughero>

<http://www.livingcap.com/it/chiusure-in-sughero>

<http://rifarecasa.bricoportale.it/lavori-in-casa/pavimentare/pavimentare-senza-demolire/pavimento-in-sughero>

<http://www.sinergoservizi.com/>

http://www.sugherosardo.it/gallery_search.asp?page=6&ver=it

http://www.syfar.it/syfar/ciclo_produzione.html

<http://www.tecnosugheri.it/approfondimento/diffusione-della-quercia-e-origine-del-sughero/>

<http://www.winetops.it/italiano/produzione/>

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Direttore del laboratorio Paola Manera e tutto il personale per avermi accolta all'interno del suo organico e permesso di elaborare la tesi. Un grazie va alla dottoressa Elisa Bianco.

Inoltre, desidero ringraziare la dottoressa Milena Lambri coordinatore del master e relatrice del mio elaborato.