

speciale vino e ossigeno

FULVIO MATTIVI*, ADELIO RIGO**,
STEFANO DI BLASI***,
ALESSANDRA BIONDI BARTOLINI***,
DOMENICO MASUERO*,
DANIELE PERENZONI*,
URSKA VRHOVSEK*

I diffusori per la micro-ossigenazione (nella foto un diffusore ceramico di forma piatta, Parsec Srl) devono portare alla formazione di bolle finissime e omogenee in grandezza, che favoriscano la completa diffusione nel vino dell'ossigeno erogato.

UNA VISIONE OLISTICA DELLA MICRO- OSSIGENAZIONE

QUESTO PROCESSO È IN GRADO DI INFLUENZARE UN NUMERO ELEVATO DI COMPOSTI DEL VINO: MOLTI DEI QUALI ANCORA DA CARATTERIZZARE

L'ossigeno gioca un ruolo fondamentale, e spesso controverso, nella vinificazione. E se uno tra i primi a sottolinearne l'importanza fu Louis Pasteur, già nel 1873, attualmente è ampiamente accettato il fatto che un'esposizione ben controllata e limitata all'ossigeno sia indispensabile per l'ottimale invecchiamento dei vini rossi. Nessuno dubita dell'importanza di un esatto dosaggio della giusta quantità di ossigeno, mentre qualche dubbio è stato sollevato sulla reale importanza della velocità con cui questa quantità viene somministrata. Quando l'ossigeno è a contatto con il vino, la reazione di Fenton – catalizzata dai metalli – è stata dimostrata essere la principale via di ossidazione dell'etanolo. Vengono prodotte specie fortemente ossidanti, che si ritiene possano reagire direttamente con l'insieme dei costituenti del vino, bypassando il pool dei polifenoli. Peraltro, la maggior parte degli studi sull'ossigeno sono stati condotti per definire sistemi modello semplificati, oppure si sono limitati a seguire un numero molto limitato e specifico di prodotti di reazione attesi. L'attenzione quindi si è focalizzata finora soprattutto sulla reattività di alcuni composti chiave.

IL PROGETTO DI RICERCA

La possibilità di provare un approccio non convenzionale allo studio dell'interazione vino-ossigeno è stata data dal progetto *SFR (Stable free radicals), composizione e attività antiossidante nel vino rosso e ossigenazione*. L'attività di questo progetto, svolto in collaborazione tra la Fondazione Edmund Mach, l'Università di Padova e il Consorzio Toscana, si è focalizzata sulla micro-ossigenazione del Sangiovese. È stato scelto per la prova un vino Sangiovese della vendemmia 2009, ottenuto presso la cantina sperimentale Toscana. La micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione alcolica e si è completata subito prima della fermentazione malolattica.

Il vino (240 ettolitri) è stato diviso in 24 vasche in acciaio da 10 ettolitri ciascuna e sottoposto a 7 settimane di micro-ossigenazione controllata in 8 diverse condizioni, ciascu-



Vasche con impianto per la micro-ossigenazione controllata presso la cantina sperimentale del Consorzio Toscana.

na delle quali realizzata in triplicato. Le variabili investigate sono state la quantità di ossigeno (quattro livelli, 0-5-10-15 mg per litro e per mese) e la concentrazione di metalli (ferro, due livelli, 1.5 e 2.0 mg/l). Tutte le altre condizioni sono state strettamente standardizzate e monitorate. Sia durante sia dopo le prove di micro-ossigenazione sono state misurate la composizione del vino e le caratteristiche sensoriali. Tra i parametri di processo più strettamente monitorati figurano la concentrazione di ossigeno, sia disciolto sia nello spazio di testa di ciascun serbatoio – attraverso misura diretta per oxo-luminescenza con lo strumento PreSens (Nomacorc) – e la concentrazione dell'acetaldeide nei vini, per via gascromatografica, oltre a un controllo sui livelli effettivi di metalli in ciascuna vasca a inizio e fine prova.

L'EVOLUZIONE DEI PARAMETRI OLFATTIVI

Nella fase di micro-ossigenazione precedente alla fermentazione malolattica, si sono eseguiti tre test (dopo 15, 30 e 60 giorni dall'inizio della prova) di analisi sensoriale, con l'obiettivo di applicare un controllo organolettico ad alcuni parametri olfattivi suscettibili di variazione.

In modo particolare ci si è concentrati nella descrizione dell'evoluzione dei parametri olfattivi di fruttato, ridotto (descrittore idrogeno solforato) e ossidato (descrittore acetaldeide/mela sovratura).

I test analitico-descrittivi si sono svolti sottoponendo a un panel composto da 7 giudici addestrati ed esperti una scheda semplificata, nella

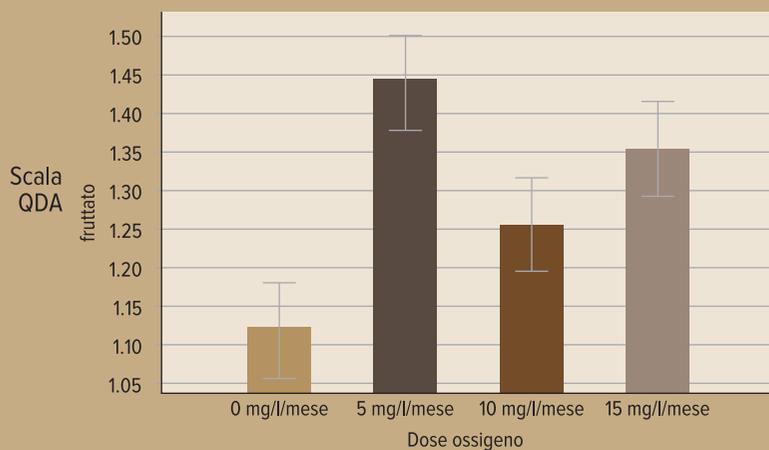
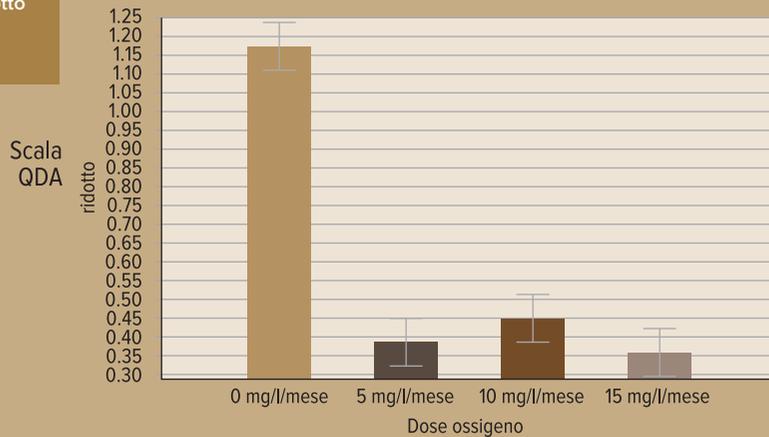
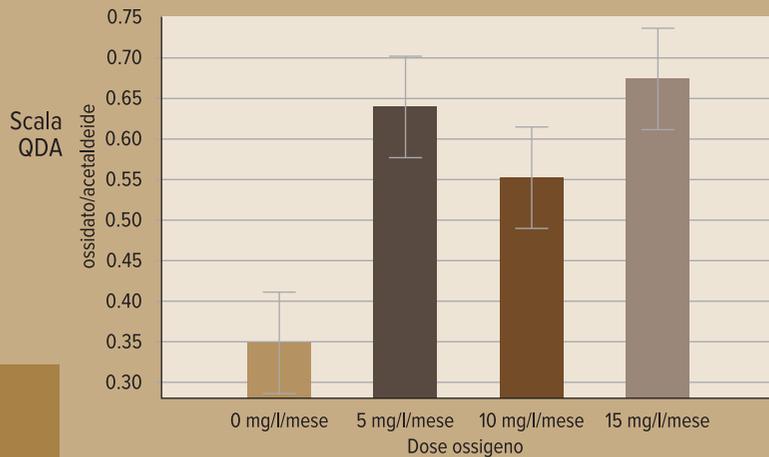
quale veniva chiesto di dare una valutazione su una scala strutturata da 0 a 3 ai tre parametri del profilo olfattivo sopra descritti.

I risultati sono stati analizzati con il test ANOVA e hanno permesso di mettere in evidenza come la dose di ossigeno porti a differenze significative su tutti e tre i parametri analizzati (fruttato, ossidato inteso come sentore di acetaldeide e ridotto; grafico 1) mentre il contenuto in metalli porta a differenze significative nella percezione del carattere di mela matura/acetaldeide. Per quanto riguarda l'evoluzione dei parametri valutati nel tempo di trattamento, si osservano interazioni significative tra la data e il contenuto in metalli per il fruttato e tra la data e la dose di ossigeno per il carattere di ridotto.

L'ANALISI METABOLOMICA

L'esperimento condotto è del tipo *guidato dai dati*, ossia finalizzato a misurare l'effetto del trattamento su tutti i composti organici di basso peso molecolare misurabili nel vino nelle condizioni di misura utilizzate. Tale impostazione è esattamente contraria a quella adottata negli esperimenti *guidati dall'ipotesi*, in cui si vanno a cercare specificamente quei composti (solitamente pochi) che ci si aspetta possano essere direttamente influenzati dall'esperimento. La ragione di questa nostra scelta non convenzionale è cercare di avere una visione *olistica* dell'insieme della composizione del vino, che ci permetta di effettuare osservazioni più inclusive, quindi più idonee a descrivere l'effetto di insieme del trattamento.

OSSIGENO E PARAMETRI OLFATTIVI



Graf. 1 - Influenza della dose di ossigeno sui parametri olfattivi di ossidato (acetaldeide), ridotto e fruttato.

L'analisi dei vini è stata effettuata sullo spettrometro Synapt UPLC-Q-TOF (Waters), con interfaccia elettrospray e operante sia nelle condizioni positive sia in quelle negative. La separazione, in 60 minuti, viene effettuata in gradiente acqua-metanolo, entrambi contenenti 0.1% acido formico, su colonna in fase inversa C18 (HSST3, 2.1x150 mm). Il numero di caratteristiche (ossia coppia univoca di tempo di ritenzione e massa accurata) ottenibili in ciascun singolo esperimento varia da >3000 in modalità negativa a >4000 in modalità positiva, per l'iniezione diretta del vino tal quale, filtrato sotto azoto. Con una preparazione del campione su cartuccia in fase inversa, tralasciando i composti maggiormente idrofili non trattenuti, e una leggera concentrazione, il numero di caratteristiche compositive estraibili da ciascun esperimento sale a >6000 in modalità negativa e >8000 in modalità positiva (grafico 2). Dopo l'allineamento dei dati e il processamento con il s/w MarkerLynx (Waters), è stata prodotta una prima lista di possibili biomarker della micro-ossigenazione del vino in presenza di livelli variabili di ferro e ossigeno. Per questa analisi si sono considerati i due livelli di ferro (1.5 e 2.0 mg/l) e i due livelli estremi di ossigeno (basso = 0-5; alto = 10-15 mg per litro e per mese). Da questa prima lista di possibili marcatori del trattamento emerge chiaramente che esso influenza in maniera significativa la composizione di un numero importante di sostanze del vino (stimato in >100). Il numero di parametri estraibili da questo singolo esperimento eccede largamente il numero di composti oggi conosciuti e indica che le nostre conoscenze sulla chimica del vino, apparentemente molto sofisticate, sono in realtà ancora molto lontane dal conseguire una copertura apprezzabile della complessità del vino.

MICRO-OSSIGENAZIONE, FERRO E AFFINAMENTO

Una prima esplorazione dei biomarker estratti ci permette di osservare innanzitutto come tanto l'ossigeno quanto il ferro inducano una variazione non trascurabile nella concentrazione di un numero elevatissimo di composti.



Misurazione dell'ossigeno disciolto per oxo-luminescenza.

I punti forti della sperimentazione

Gli aspetti salienti della prova qui presentata si possono così sintetizzare:

- scala di vinificazione, durata della prova e intervallo di concentrazioni dei fattori studiati rappresentativi delle condizioni reali di cantina;
- stretto monitoraggio chimico e sensoriale di tutte le fasi della lavorazione;
- disegno sperimentale con adeguato numero di repliche;
- misura degli effetti attraverso esperimenti di metabolomica basati sulla spettrometria di massa.

L'analisi in modalità ESI-positivo indica come gli antociani siano sistematicamente i composti più fortemente influenzati dai trattamenti. L'analisi ANOVA sulle concentrazioni dei cinque maggiori antociani nei campioni di vino analizzati in doppio sui campioni tal quali, con il trasferimento del campione da bottiglia ai vials per l'analisi effettuato in condizioni inerte, conferma un'elevata significatività statistica dell'effetto complessivo dell'ossigeno ($p=0,000007$), ma non del metallo e dell'interazione. L'analisi univariata su questo set di dati è significativa per quattro dei

cinque antociani, esclusa la sola malvidina 3-glucoside, per la quale risulta significativo ($p=0,038$) l'effetto dell'interazione tra ossigeno e ferro. Nei vini concentrati l'effetto complessivo dell'ossigeno risulta meno significativo ($p=0,054$). Quest'ultimo risultato potrebbe derivare anche dalla manipolazione del campione, critica quando si vogliono misurare effetti di minute quantità di ossigeno.

Nei vini trattati con alte dosi di ossigeno si osservano in generale concentrazioni più basse dei pigmenti nativi dell'uva (in ordine decrescente, malvidina 3-glucoside, petuni-

dina 3-glucoside, peonidina 3-glucoside, delphinidina 3-glucoside e cianidina 3-glucoside) rispetto ai vini testimone. Non era scontato che si comportassero tra loro in maniera simile; si ricorda ad esempio che è stato osservato come, a pH fisiologico, la reattività degli antociani del vino nei confronti dei lipidi perossidi sia sostanzialmente differente, in quanto la malvidina 3-glucoside veniva rici-

clata in presenza di catechina. Anche al pH acido del vino l'analisi univariata suggerisce che la malvidina 3-glucoside possa avere un comportamento parzialmente diverso rispetto agli altri antociani. Le differenze di reattività con l'ossigeno sembrano però meno marcate di quelle evidenziate in letteratura a pH neutro.

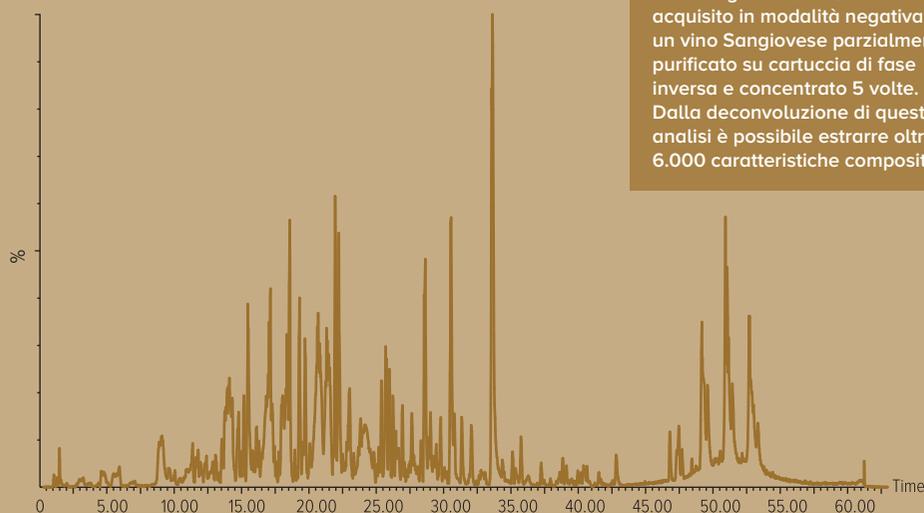
Nei vini con diverso livello di ferro si osserva una certa variabilità nelle concentrazioni di alcuni antociani ma gli effetti complessivi non appaiono statisticamente significativi. Complessivamente quindi l'effetto del ferro sugli antociani, a queste concentrazioni, sembra trascurabile.

Questi fenomeni si accompagnano, solo nel caso dei vini trattati con ossigeno, alla contemporanea formazione di diverse classi di nuovi pigmenti, quali vitisin A, vitisin B e un prodotto di addizione tra malvidina 3-glucoside ed etilcatechina. Viene così confermata la formazione nel vino, in diretta dipendenza dal trattamento con l'ossigeno, di tre diverse famiglie di pigmenti:

- la carbossipirano-antocianina, derivante dalla reazione della malvidina 3-glucoside con acido piruvico (vitisin A);
- la pirano-antocianina, derivante dalla reazione della malvidina 3-glucoside con l'acetaldeide (vitisin B);
- i pigmenti violacei, derivanti dall'addizione tra malvidina 3-glucoside e catechina mediata dalla acetaldeide.

È importante osservare in conclusione che

UN ESEMPIO DI CROMATOGRAMMA



Graf. 2 - Esempio di cromatogramma UPLC-Q-TOF acquisito in modalità negativa di un vino Sangiovese parzialmente purificato su cartuccia di fase inversa e concentrato 5 volte. Dalla deconvoluzione di questa analisi è possibile estrarre oltre 6.000 caratteristiche compositive.

Misurazione dell'ossigeno nello spazio di testa per oxo-luminescenza.

Sperimentazione su scala semi-industriale

Per svolgere ricerca applicata i cui risultati siano utili e fruibili da parte delle aziende, il Consorzio Toscana ha messo a punto e validato, nelle sue linee sperimentali, un metodo di lavoro che coniuga la realtà operativa della scala industriale con il rigore dei piani sperimentali e del controllo di tutti i fattori in gioco propri della ricerca scientifica. Per la linea sperimentale sulla tecnica della micro-ossigenazione la Cantina Sperimentale del Consorzio Toscana ha attrezzato 24 delle vasche termocondizionate da 10 ettolitri con un impianto di micro-ossigenazione SAEN 5000 (Parsec Srl) dotato di 18 posizioni (il numero di tesi micro-ossigenate previste dal piano sperimentale). La scala semi-industriale delle vasche ha consentito di ottenere dati reali di quanto avviene nella micro-ossigenazione dei vini. Le dimensioni del contenitore nel quale si applica la micro-ossigenazione infatti devono essere tali da consentire all'ossigeno erogato di distribuirsi omogeneamente ed essere consumato prima che le micro-bolle raggiungano la superficie del vino. Per questo motivo la sperimentazione di questa tecnica su scala di micro-vinificazione avrebbe presentato forti limitazioni. Per facilitare la distribuzione delle micro-bolle nella massa di vino si sono scelti diffusori di forma piatta, più adatti a contenitori di piccole dimensioni. Inoltre le vasche sono state attrezzate con un sistema di saturazione con gas inerte (argon) in modo da eliminare qualsiasi contaminazione da ossigeno esterna e diversa dall'ossigeno dosato previsto dal piano sperimentale.



questo nuovo esperimento conferma come uno degli effetti maggiori della micro-ossigenazione sia quello di indurre la formazione di nuovi pigmenti a partire dagli antociani presenti nel vino, formazione almeno in parte mediata dalla produzione di acetaldeide a conseguenza della ossidazione dell'etanolo. In parallelo si evidenzia però che questo è solo uno e certamente non l'unico dei meccanismi salienti. Infatti un numero molto elevato di composti del vino, ancora in larga parte da caratterizzare, è influenzato in maniera statisticamente significativa da questo processo. Accanto agli antociani, esaminando le liste dei possibili biomarker di entrambi i trattamenti, estratti nelle due modalità ESI-positiva e negativa, appaiono infatti ripetutamente una serie di composti attesi (diversi flavanoli,

sia monomeri sia dimeri, acido caftarico, acidi fenolici, alcuni flavonoli...) assieme a diverse decine di composti, attualmente in corso di validazione e identificazione.

DALL'EMPIRISMO AL PIENO CONTROLLO

L'esperimento in questo momento prosegue con una seconda fase di micro-ossigenazione dopo la fermentazione malolattica e l'omogeneizzazione della massa. Questa seconda fase è necessaria perché corrisponde al secondo momento in cui questo trattamento viene usualmente eseguito in cantina. Ci si attende che con il suo completamento essa possa aiutare l'ulteriore conferma dei possibili marcatori del processo, contribuendo così a dimostrare la fattibilità e importanza di condurre esperimenti di metabolomica per migliorare ulterior-

mente il nostro grado di comprensione della chimica del vino, e di conseguenza per meglio controllare processi oggi ancora governati essenzialmente da conoscenze empiriche, quali la micro-ossigenazione dei vini rossi. ■

La Bibliografia può essere richiesta a costanza.fregoni@tecnichenuove.com

*Fondazione Edmund Mach, Centro Ricerca ed Innovazione, Area Alimentazione - San Michele all'Adige (TN)

**Università di Padova - Dipartimento di Chimica Biologica

***Consorzio Toscana - Firenze

Ringraziamenti: a Manuel Pieri, Elisa Martelli e Andrea Degli Innocenti (Consorzio Toscana) per la collaborazione alle prove di cantina; Mario Malacarne e Sergio Moser (Centro Trasferimento Teconologico, Fondazione Mach) per le analisi di laboratorio.