



EFFICACIA DI ALCUNE FORMULAZIONI A BASE FENOLICA COME ANTIOSSIDANTI SOSTITUTIVI DELL'SO₂ PER LA CONSERVAZIONE DEL VINO SPUMANTE

Alcune forme fenoliche con basso potenziale redox potrebbero essere usate nei vini come additivi antiossidanti sostitutivi della SO₂. Tuttavia, il loro impiego nella sboccatura degli spumanti produce una più rapida intensificazione della tinta gialla del vino e, soprattutto, un aumento della formazione di sotolone, responsabile dell'odore di ossidato.



Di
Antonio Tirelli
Mario Gabrielli
Daniela Fracassetti

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti,
 la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS),
 Università degli Studi di Milano

(Da sinistra nella foto)

INTRODUZIONE

■ Le fasi di sboccatura e tappatura sono critiche per la produzione del vino spumante poiché l'esposizione all'aria può provocare un peggioramento delle caratteristiche sensoriali dovuto alla degradazione degli esteri aromatici (Roussis *et al.* 2007) e la formazione di composti con impatto negativo sull'aroma del vino (Lavigne *et al.* 2008). Tra questi ultimi il sotolone (3-idrossi-4,5-dimetil-2(5)-furanone) assume un ruolo importante a causa della sua bassa soglia di percezione (8-

10 µg/L) e della sua nota aromatica associata al carattere di ossidato (Lavigne *et al.* 2008) tipico di alcuni vini come Madeira, Porto e Sherry (Silva Ferreira *et al.* 2003). La presenza di sotolone nei vini bianchi secchi diminuisce l'intensità delle note fruttate e floreali (Silva Ferreira *et al.* 2003), fenomeno noto come invecchiamento atipico.

■ Il sotolone può derivare dalla degradazione termica dei composti intermedi della reazione di Maillard (Pons *et al.* 2010). Inoltre, gli zuccheri riducenti, l'acido ascorbico, l'acido deidroascorbico, l'acido α-chetobutirrico,

l'acetaldeide e l'etanolo sono suoi precursori (Cutzach *et al.* 1999).

■ La concentrazione di ossigeno, la temperatura e il tempo di conservazione nonché la presenza di composti antiossidanti, in particolare l'anidride solforosa (SO₂) e il glutatone (GSH), possono influenzare la formazione di sotolone in vino. A causa dell'elevato numero di fattori chimici e fisici che ne influenzano la formazione il sotolone può essere considerato un marker chimico della shelf-life del vino bianco (Lavigne e Dubourdieu 2004).

■ La SO₂ comunemente aggiunta in fase di



DOCUMENTO TECNICO

sboccatura e tappatura può essere efficace per rallentare o limitare la formazione di sotolone poiché si ossida rapidamente consumando l'ossigeno disciolto nel vino (Danilewicz, 2011). Tuttavia, l'utilizzo di SO₂ deve essere limitato a causa del suo effetto dannoso per la salute umana (Poza-Bayon *et al.* 2012). Anche l'acido ascorbico consente un rapido consumo dell'ossigeno disciolto, ma la sua ossidazione dà luogo alla formazione di perossido di idrogeno e acido α-chetobutirrico che, in assenza di SO₂, favoriscono la formazione del sotolone (Riberau-Gayon *et al.*, 2006). Il GSH limita la formazione di sotolone durante l'affinamento ossidativo dei vini bianchi in botte o barrique

(Lavigne e Dubourdieu, 2004), ma sono necessarie concentrazioni di GSH molto superiori a quelle comunemente ritrovabili in vino affinché l'effetto antiossidante sia paragonabile a quello di SO₂ (Fracassetti *et al.* 2013).

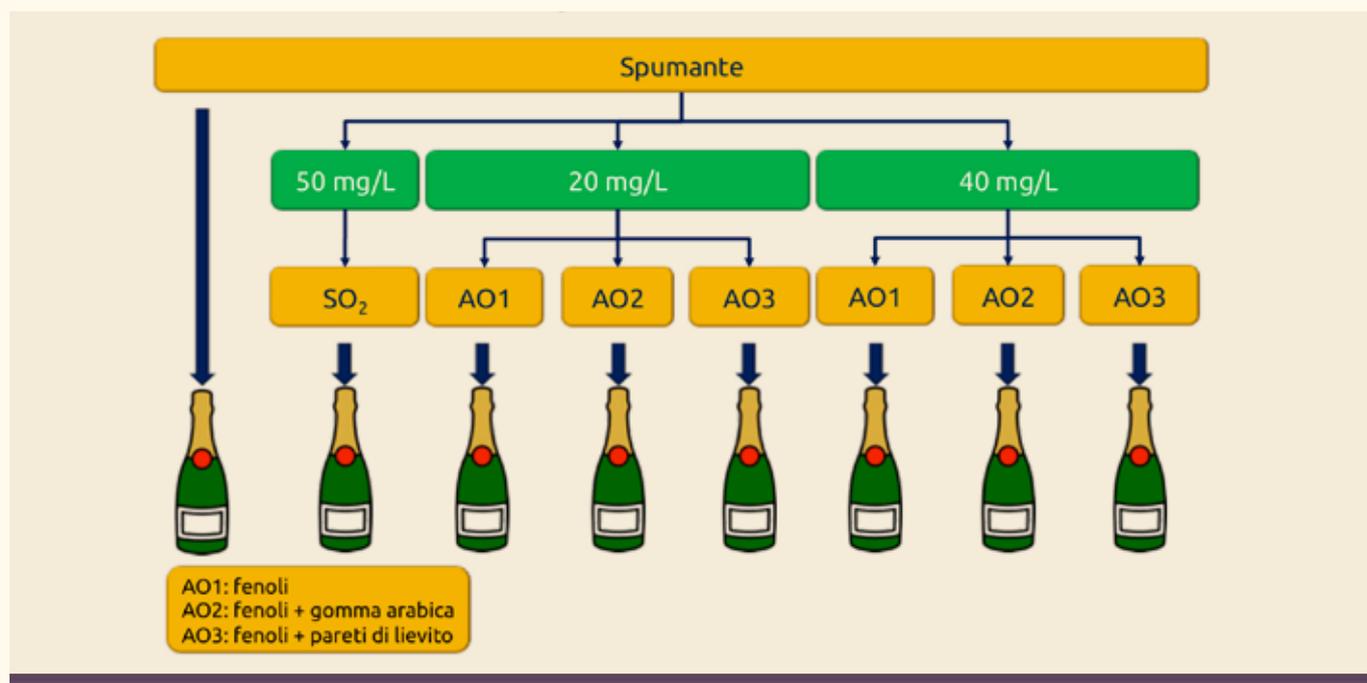
■ Anche i flavanoli, naturalmente presenti nel vino, sono in grado di consumare l'ossigeno grazie al loro basso potenziale redox. I fenoli di natura p-diidrossibenzenica (come catechina e epicatechina) presentano un potenziale redox maggiore rispetto ai fenoli a struttura gallica (galocatechine e fenoli gallati) e necessitano di composti riducenti (SO₂) per rimuovere completamente l'ossigeno presente nel vino. I fenoli gallici, proprio grazie al loro

basso potenziale redox, hanno dimostrato di esaurire completamente l'ossigeno nel vino in assenza di altri composti riducenti (Danilewicz 2012).

■ Il vino bianco contiene generalmente quantità trascurabili di fenoli e l'aggiunta in fase di sboccatura di formulati commerciali a base fenolica potrebbe favorire un maggiore consumo di ossigeno evitando le alterazioni ossidative durante la conservazione. Le conoscenze in merito alla composizione fenolica di queste miscele commerciali sono limitate e, di conseguenza, resta da chiarire quale sia l'effetto che potrebbero avere sul vino.

■ A tal fine, tre diverse formulazioni antios-

Fig. 1 - Piano sperimentale: sboccatura



Tab. 1 - Contenuto di frazioni fenoliche nelle formulazioni antiossidanti. I dati sono riportati come valori medi (n = 3) ± deviazione standard; n.r.: non rilevabile

Polvere	Indice di polifenoli totali	Flavonoidi totali	Non-flavanoli	Proantocianidine	Gruppi catecolici	Gruppi gallici
	g acido gallico/100 g polvere			g cianidina/100 g polvere	%	%
AO1	57.8±3.2	39.48±0.11	37.54±0.11	7.84±0.01	9	91
AO2	50.9±9.5	23.10±0.60	17.69±0.59	19.00±3.97	51.2	48.8
AO3	14.2±3.3	4.86±0.08	4.86±0.08	n.r.	0	100



Tab. 2 - Contenuto di sotolone, glutatione, cisteina libera e sottratta, acido ascorbico, acido deidroascorbico e capacità antiossidante delle formule antiossidanti. I dati sono riportati come valori medi ($n = 3$) \pm deviazione standard; n.r. : non rilevabile. PT: polifenoli totali (vedi Tab. 1).

Polvere	Sotolone	Glutazione	Cisteina		Acido Ascorbico	Acido deidroascorbico	Capacità antiossidante		DPPH/PT	ABTS/PT
			Libera	Sottratta			DPPH	ABTS		
	$\mu\text{g}/100\text{ g}$ polvere	$\text{g}/100\text{ g}$ polvere	$\text{mg}/100\text{ g}$ polvere	$\text{mg}/100\text{ g}$ polvere	$\text{mg}/100\text{ g}$ polvere	$\text{mg}/100\text{ g}$ polvere	M Trolox/100 g polvere			
AO1	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	8776 \pm 650	1660 \pm 109	151.8	28.7
AO2	n.r.	n.r.	n.r.	9.0 \pm 0.28	n.r.	n.r.	5990 \pm 443	1338 \pm 98	117.7	26.3
AO3	n.r.	5.77 \pm 0.18	n.r.	64.5 \pm 2.0	n.r.	n.r.	1768 \pm 131	133 \pm 10	124.5	9.4

sidanti sono state caratterizzate per la loro composizione fenolica e addizionate ad un vino spumante (metodo *Champenoise*) in fase di sboccatura. Sono stati quindi valutati alcuni indici dell'invecchiamento ossidativo (GSH, sotolone, colore) nel corso della conservazione per capire l'influenza delle formulazioni antiossidanti commerciali a base fenolica sulla shelf-life del vino spumante.

MATERIALI E METODI

Preparazioni antiossidanti commerciali.

■ Tre formulazioni antiossidanti commerciali in polvere contenenti rispettivamente fenoli (AO1), fenoli e gomma arabica (AO2), fenoli e pareti di lievito *Saccharomyces cerevisiae* (AO3) sono state caratterizzate qualitativamente e quantitativamente e utilizzate con finalità antiossidante per la conservazione di vino spumante.

Piano Sperimentale.

■ Bottiglie di vino spumante, prodotto con rifermentazione in bottiglia da uve Chardonnay (vendemmia 2010) seguendo le procedure enologiche standard adottate dalla cantina, sono state addizionate in sboccatura (*à la glace*) di formulazioni commerciali contenenti fenoli (AO1, AO2 e AO3) in concentrazione di 20 mg/l o 40 mg/l o di SO₂ (50 mg/l). Alcune bottiglie sono state rabboccate con solo spumante ed utilizzate come controllo (**Fig 1**). La conservazione dei campioni, durata sette mesi, è stata realizzata a 15° C e 25° C.

Controlli analitici.

■ La composizione fenolica dei preparati

antiossidanti è stata valutata determinando l'indice dei polifenoli totali con il reattivo di Folin-Ciocalteu, i flavonoidi totali e i non flavonoidi (Di Stefano *et al.* 1989), le proantocianidine (Bate-Smith 1981), la distribuzione relativa fra fenoli con gruppi catecolici e con gruppi gallici (Ribereau-Gayon 1968).

■ Sono stati inoltre valutati i tenori di GSH, capacità di sequestrare tioli (Tirelli *et al.* 2010), acidi ascorbico e deidroascorbico (Zapata e Dufour 1992) e sotolone (Gabrielli *et al.* 2014), e la capacità antiossidante mediante i saggi con DPPH (Llorach *et al.* 2004) e ABTS (Mena *et al.* 2011).

■ Sui vini sono stati anche valutati il contenuto di acido 2-glutacionil caftarico (GRP) (Frascetti e Tirelli 2015) e l'intensità del giallo mediante assorbanza a 420 nm.

RISULTATI E DISCUSSIONE

■ Le formulazioni antiossidanti valutate hanno mostrato importanti differenze nella loro composizione fenolica sia in termini quantitativi che qualitativi (**Tab. 1**). La formulazione AO1 è risultata la più ricca di fenoli, soprattutto gallici ed equamente ripartiti fra forme flavonoidi e non flavonoidi, nonché di frazioni proantocianidiniche. Queste ultime sono risultate più abbondanti nel formulato AO2, caratterizzato anche dalla pari presenza di fenoli catecolici e gallici. Come atteso, era minore la concentrazione fenolica complessiva per la presenza di polisaccaridi. Particolarmente povero in fenoli, esclusivamente di natura gallica, era il formulato AO3 nel quale erano assenti strutture polimeriche dei flavanoli.

■ Il basso contenuto di fenoli ha reso il formulato AO3 il meno efficace in termini di capacità antiossidante (**Tab. 2**) che mostra diminuire con la concentrazione dei fenoli, dei quali quelli di AO1 sono risultati i più efficaci.

■ Nessuno dei formulati conteneva altri composti antiossidanti eccetto AO3 in cui sono state rilevate quantità trascurabili di GSH equivalenti a circa 1 mg/L aggiunto in vino nelle condizioni sperimentali adottate; una quantità troppo bassa per esercitare un significativo effetto antiossidante. La presenza di GSH in AO3 è coerente con la presenza di frazioni di parete cellulare di lievito (Tirelli *et al.* 2010) come dichiarato dal fornitore. Non era mai presente sotolone. I formulati AO2, e soprattutto AO3, mostravano una significativa capacità di sottrarre composti tiolici, misurata come perdita di cisteina, plausibilmente legata alla presenza di forme chinoniche derivate dall'ossidazione dei fenoli. Tale comportamento può indurre un impoverimento aromatico nei vini caratterizzati da aromi tiolici la cui concentrazione è spesso inferiore al microgrammo per litro.

INFLUENZA DELLE FORMULAZIONI ANTIOSSIDANTI SULLA SHELF-LIFE DEI VINI SPUMANTI BIANCHI

■ I dosaggi dei formulati antiossidanti in sboccatura sono stati valutati per evitare un impatto negativo sulle caratteristiche tecnologiche e sensoriali del vino bianco spumante. L'aggiunta di quantità elevate di



DOCUMENTO TECNICO

Tab. 3 - Concentrazione di glutazione (GSH), acido glutationilcaftarico (GRP), sotolone, e valori di assorbanza rilevati nei campioni di vino bianco spumante conservati in condizioni diverse. I dati sono riportati come valori medi ($n = 3$) \pm deviazione standard; n.r. : non rilevabile.

Antiossidante	Dosaggio mg/L	Temperatura di conservazione °C	Polifenoli totali mg/L	Assorbanza AU _{420 nm}	Glutazione mg/L	GRP mg/L	Sotolone µg/L
-	--	15	118.5±9.5	0.142±0.001	1.33±0.040	0.57±0.018	n.r.
-	--	25	124.5±10.0	0.150±0.001	2.66±0.082	0.41±0.013	n.r.
SO2	50	15	119.7±9.6	0.099±0.001	0.93±0.029	0.50±0.016	n.r.
SO2	50	25	122.8±9.8	0.122±0.002	2.25±0.068	0.47±0.015	n.r.
AO1	20	15	131.4±10.5	0.154±0.001	1.80±0.054	0.54±0.017	n.r.
AO1	20	25	136.1±10.8	0.158±0.000	3.58±0.11	0.41±0.013	< 2
AO1	40	15	143.1±11.4	0.156±0.000	2.13±0.066	0.70±0.021	n.r.
AO1	40	25	147.4±11.8	0.160±0.000	3.38±0.10	0.61±0.020	< 2
AO2	20	15	131.4±10.5	0.157±0.000	1.31±0.041	0.72±0.022	< 2
AO2	20	25	132.5±10.6	0.172±0.000	2.37±0.073	0.53±0.017	< 2
AO2	40	15	133.9±10.6	0.170±0.001	1.39±0.043	0.57±0.017	6.41±0.11
AO2	40	25	145.8±11.2	0.181±0.002	4.26±0.076	0.35±0.011	13.37±0.22
AO3	20	15	119.2±9.5	0.147±0.001	1.57±0.049	0.56±0.016	n.r.
AO3	20	25	121.2±9.7	0.147±0.000	2.51±0.079	0.45±0.014	< 2
AO3	40	15	127.2±9.9	0.141±0.000	1.58±0.049	0.58±0.017	n.r.
AO3	40	25	125.1±10.0	0.155±0.000	3.78±0.12	0.45±0.014	< 2

AO3 potrebbe favorire fenomeni d'intorbidamento a causa del suo elevato contenuto in pareti cellulari di lievito, mentre dosaggi eccessivi di AO1 e AO2 potrebbero conferire astringenza e compromettere le proprietà di schiuma dello spumante poiché costituiti principalmente da polifenoli (Robichaud

e Noble 1990). Pertanto, il vino spumante è stato addizionato in sboccatura di 20 mg/L o 40 mg/L di formulazione antiossidante, come suggerito dal fornitore. I trattamenti non hanno influenzato l'astringenza del vino in quanto l'aggiunta più elevata di fenoli equivale a circa 23.2 mg/L, quantità inferiore

rispetto alla concentrazione di tannini che causa astringenza (Robichaud e Noble 1990). Il contenuto totale di fenoli dei vini variava da 118.5 mg/L a 147.4 mg/L. I vini trattati con AO1 e AO2 presentavano concentrazioni di fenoli significativamente superiori rispetto al campione di vino di controllo e ai campioni



DOCUMENTO TECNICO

addizionati di SO₂ o AO3 (Tab. 3).

■ L'aggiunta di SO₂ si è dimostrata la più efficace nella protezione del vino contro l'ossidazione rispetto agli altri trattamenti poiché non ha dato origine a sotolone e anche l'intensità del colore giallo, misurata come assorbanza a 420 nm, è risultata quella minore ad entrambe le temperature di conservazione (Tab. 3). I valori più elevati di assorbanza a 420 nm sono stati osservati nei campioni aggiunti di formulazioni antiossidanti, soprattutto in presenza di AO2, ad indicare un decorso ossidativo più intenso.

■ Il sotolone è stato rilevato, pur in tracce, in tutti i campioni aggiunti di fenoli e conservati a 25°C. In particolare, nei campioni contenenti 40 mg/L del formulato AO2 ha raggiunto livelli confrontabili o superiori alla soglia di percezione olfattiva anche quando conservati a 15°C. Questo comportamento potrebbe essere dovuto al maggior tenore di fenoli catecolici del formulato AO2 (Tab. 1) che lascia supporre una minor capacità di consumare l'ossigeno rispetto ai fenoli con gruppi gallici (Danilewicz 2011). I dati ottenuti confermano il ruolo della temperatura nella formazione di sotolone (Cutzach *et al.* 2000). Temperature di conservazione elevate possono favorire la reazione di Maillard, i cui prodotti sono fra i responsabili della formazione di sotolone in vino (Hoffman e Schieberle 1996). Oltre a favorire la formazione di sotolone, la presenza di fenoli sembra indurre l'intensificazione del colore giallo per via ossidativa. Il campione di controllo, privo di antiossidanti aggiunti, è quello che ha evidenziato le minori alterazioni in confronto al campione privo di SO₂, evidenziando il ruolo controproducente dell'aggiunta dei fenoli nella protezione ossidativa dei vini bianchi in assenza di solfiti.

■ Il contenuto di GSH è risultato sistematicamente maggiore nei campioni conservati a 25°C e analogamente è risultato minore il contenuto di GRP, il derivato dell'ossidazione del GSH a seguito della reazione con il chinone dell'acido caffeiltartarico. Questi dati lascerebbero supporre una decomposizione termica del GRP in conservazione con conseguente rilascio del GSH ad esso legato (Tab. 3). Le basse quantità di GSH (inferiori a 4 mg/L) ed i dati di sotolone e colore rilevati indurrebbero ad escludere un utile ruolo antiossidante del GSH rilasciato nella conservazione dello spumante.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ Le formulazioni testate sono state inefficaci nella sostituzione della SO₂ ai fini antiossidanti, e mostrano avere un ruolo negativo nel vino spumante la cui shelf-life appare ridursi. La migliore conservabilità dimostrata dal campione privo di antiossidanti, evidenzia come sia indispensabile valutare analiticamente la reale l'efficacia dei formulati a base fenolica nel sostituire la SO₂ al fine di prevenire un danno qualitativo al vino a cui si aggiunge quello economico legato al costo di tali formulati commerciali. ■

BIBLIOGRAFIA

- Bate-Smith E.C. (1981). Astringent tannins of the leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry* 20, 211-216.
- Cutzach I., Chatonnet P., Dubourdieu, D. (1999). Study of the formation mechanisms of some volatile compounds during the aging of sweet fortified wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2837-2846.
- Cutzach I., Chatonnet P., Dubourdieu, D. (2000). Influence of storage conditions on the formation of some volatile compounds in white fortified wines (vins doux naturels) during the aging process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2340-2345.
- Danilewicz J.C. (2011). Mechanisms of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: key role of iron. *American Journal of Enology and Viticulture* 62, 319-328.
- Danilewicz J.C. (2012). Review of oxidative processes in wine and value of reduction Potentials in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* 63, 1-10.
- Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico* 5, 83-89.
- Fracassetti D., Coetzee C., Vanzo A., Ballabio D., du Toit W.J. (2013). Oxygen consumption in South African Sauvignon blanc wines: role of glutathione, sulphur dioxide and certain phenolics. *South African Journal of Enology and Viticulture* 34, 156-169.
- Fracassetti D., Tirelli A. (2015). Monitoring of glutathione concentration during winemaking by a reliable high-performance liquid chromatography analytical method. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 389-395.
- Gabrielli M., Fracassetti D., Tirelli A. (2014). UHPLC quantification of sotolone in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 4878-4883.
- Hofmann T., Schieberle P. (1996). Studies on Intermediates Generating the Flavour Compounds 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Acetyl-2-thiazoline and Sotolone by Maillard-Type Reactions. In *Flavour Science: Recent Developments*; The Royal Society of Chemistry: London.
- Lavigne V., Dubourdieu D. (2004). Affinamento sulle

fecce e freschezza dei vini bianchi. *Vigne Vini* 31, 58-66.

- Lavigne V., Pons A., Darriet P., Dubourdieu, D. (2008).
- Changes in the sotolone content of dry white wines during barrel and bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2688-2693.
- Llorach R., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5109-5116.
- Mena P., García-Viguera C., Navarro-Rico J., Moreno D.A., Bartual J., Saura D., Martí N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1893-1906.
- Pons A., Lavigne V., Landais Y., Darriet P., Dubourdieu, D. (2010). Identification of a sotolone pathway in dry white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 7273-7279.
- Pozo-Bayóna M.A., Monagasa M., Bartoloméa B., Moreno-Arribasa M.V. (2012). Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 31-57.
- Riberau-Gayon P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.
- Riberau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments* (John Wiley & Sons Ltd: Chichester, England).
- Robichaud J.L., Noble A.C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics of wine. *J Sci Food Agric*, 53, 343-353.
- Roussis I.G., Lambropoulos I., Tzimas, P. (2007). Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 274-278.
- Scalbert A., Monties B., Janin G. (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 1324-1329.
- Silva Ferreira A.C., Barbe J.C., Bertrand A. (2003). 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone: a key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4356-4363.
- Tirelli A., Fracassetti D., De Noni, I. (2010). Determination of reduced cysteine in oenological cell wall fractions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4565-4570.
- Zapata S., Dufour, J.F. (1992). Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science* 57, 506-511.

Si ringrazia il Dr. Francesco Iacono e l'azienda "Tenuta Fratelli Muratori" per il supporto tecnico offerto nella preparazione dei campioni oggetto di sperimentazione. Questo studio è stato co-finanziato da un assegno di post-dottorato "Dote Ricerca": FSE, Regione Lombardia.