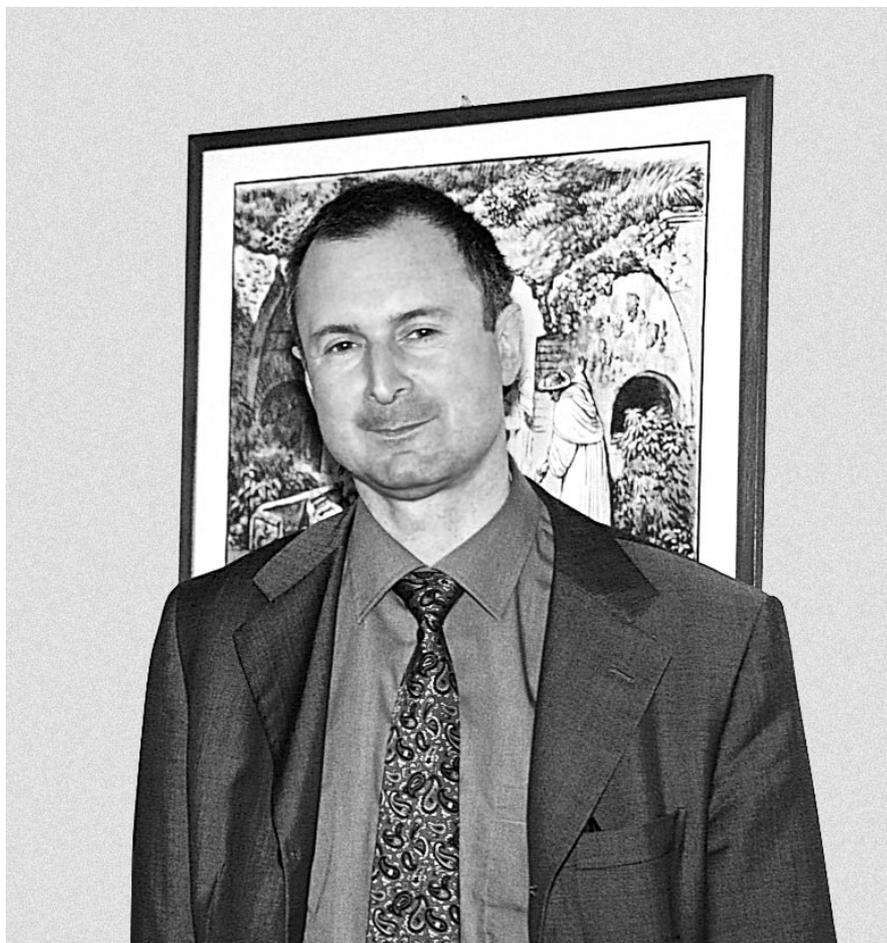


DOCUMENTO
TECNICO

Fulvio Mattivi
Andreas Prast
Giorgio Nicolini
***Leonardo Valenti**

*Istituto Agrario di San Michele,
 Dipartimento Laboratorio
 Analisi e Ricerche,
 San Michele all'Adige*

** Di.Pro.Ve.,
 Università di Milano*



F. Mattivi

IL POTENZIALE POLIFENOLICO DELLE UVE ROSSE E LA SUA APPLICAZIONE IN ENOLOGIA

Viene descritto il metodo per l'analisi del potenziale polifenolico dell'uva, che fornisce una informazione sia sulla quantità che sulla ripartizione nella bacca dei polifenoli estraibili in vinificazione. Alla luce dei risultati ottenuti nella validazione della metodica e nella sua applicazione pluriennale, si suggeriscono i principali campi di applicazione in enologia.

Introduzione

La valutazione del contenuto polifenolico delle uve rosse è da lunghi anni oggetto di intenso studio. E' nota infatti la importanza fondamentale dei composti fenolici per la produzione di vini rossi di qualità, dal momento che essi ne determinano il colore, oltre a contribuire alla struttura gustativa e a regolare la resistenza del vino nei confronti delle ossidazioni. Infine, in tempi più recenti, il contenuto del vino nelle

diverse classi di polifenoli è diventato un importante indice della qualità nutrizionale del prodotto, dal momento che si è evidenziato come il vino rappresenti una tra le più rilevanti fonti di antiossidanti polifenolici nella dieta occidentale, ed in particolare in quella mediterranea.

Numerosi gruppi di ricerca hanno elaborato delle metodiche originali per lo studio di questa classe di composti dell'uva. Una sintesi delle caratteristiche proposte nei lavori più significativi è ri-

portata in Mattivi et al., 2002a. Gli obiettivi che si volevano conseguire con questi lavori erano abbastanza diversificati. Singleton e Draper (1964), Aubert e Poux (1969), Ribéreau-Gayon (1971), Margheri e Tonon (1977), Margheri et al. (1985) e Amrani Joutei e Glories (1994) hanno focalizzato la loro attenzione allo studio di un modello per valutare la estraibilità dei composti fenolici dalle bucce e dai vinaccioli, mentre gli studi di Bourzeix et al. (1975) e



Fig. 1 - Cinetica di estrazione a 30°C degli antociani e delle proantocianidine dalle bucce (in alto) e delle proantocianidine dai vinaccioli (in basso, mg/kg di bacche)

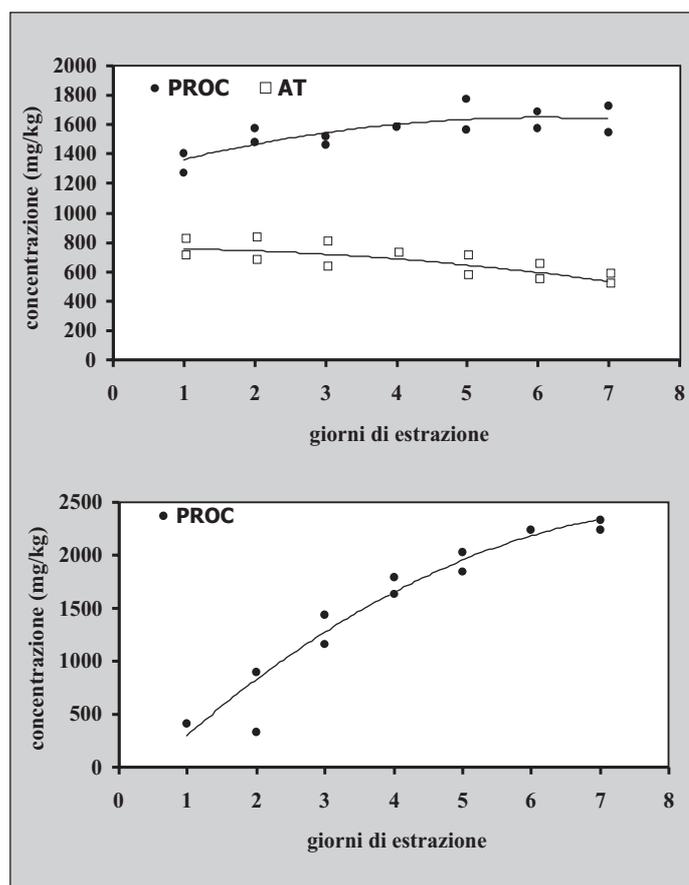
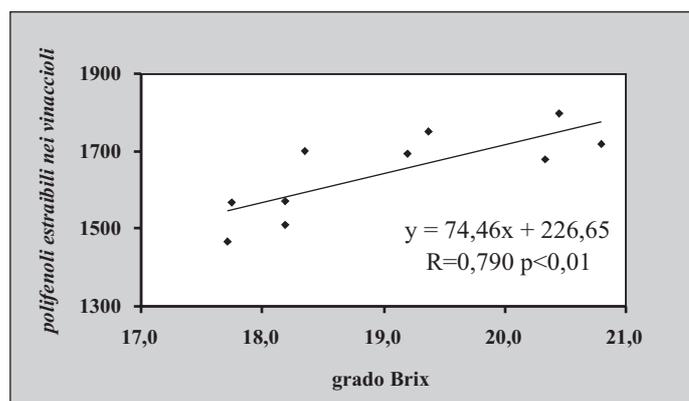


Fig. 2 - Correlazione tra il contenuto di polifenoli estraibili dei vinaccioli (mg/kg di bacche) ed il livello di maturazione dell'uva



Di Stefano e Cravero (1991) erano volti più in generale allo studio dei polifenoli delle uve. Le metodiche di Iland (1987) e Mancini e Bonaccorsi (1990) erano indirizzate ad ottenere una valutazione della qualità delle uve basata sul contenuto in polifenoli. Il lavoro di Gunata et al.

(1987) era invece rivolto a svolgere una ampia comparazione tra le diverse metodiche della letteratura, al fine di mettere a punto una metodica di analisi del contenuto polifenolico delle uve che avesse una capacità predittiva rispetto alla vinificazione.

I ricercatori della Università di Bordeaux (Glories ed Augustin, 1993) hanno introdotto il concetto di "maturazione fenolica", coniugando gli aspetti di estraibilità a quelli connessi allo stato di maturazione della bacca. Hanno quindi codificato un approccio specifico, rispetto ad un problema che era stato oggetto di studio anche in tempi precedenti nello stesso centro (Ribéreau-Gayon, 1971). Dietro a questo obiettivo, condivisibile ed intrigante, si è visto però che le metodiche proposte da Glories ed Augustin (1993) contengono ancora pesanti limitazioni sia di ordine teorico che pratico, che inficiano la utilità e mettono in dubbio il significato reale del dato ottenuto, carenze queste ampiamente messe in evidenza da Di Stefano (2001), che ha anche proposto dei correttivi per ovviare ad alcune delle lacune più importanti.

Parallelamente a questi studi, sono state inoltre elaborate nei diversi istituti di ricerca numerosissime varianti che hanno trovato applicazione locale, che non sono state oggetto di divulgazione su riviste specializzate, ed altre che si basano sull'analisi sensoriale sulla bacca (Rousseau e Delteil, 2000) e che non vengono qui riportate.

Un aspetto metodologico importante, purtroppo spesso sottovalutato da gran parte degli autori, nel proporre e rendere disponibile una nuova metodica analitica, risiede nella precisa definizione degli obiettivi della stessa, e nella sua validazione. Oltre ad una dettagliata descrizione della procedura di campionamento ed analisi, si ritiene infatti che sia indispensabile disporre di una precisa valutazione della incertezza della misura ottenuta. Se la

metodica vuole essere applicata alla valutazione del risultato enologico o della qualità dell'uva ai fini enologici, non può prescindere da una stima della correlazione tra il dato dell'uva e del vino. Infine, è utile disporre di alcuni esempi applicativi, al fine di provare sul campo la bontà della metodica proposta. E' chiaro che quando uno o più di questi elementi sono carenti, si rischia di proporre ad un più vasto pubblico di utilizzatori dei metodi non sufficientemente robusti se non carenti, e spesso di applicazione incerta tanto nelle modalità esecutive quanto nel settore di applicazione.

Correlazione uva/vino

L'esperienza degli autori, suffragata dai risultati di precedenti autorevoli studi (Gunata et al., 1987; Ribéreau-Gayon et al., 1975) indica che il punto più difficile da ottenere è quello della correlazione tra il dato dell'uva e quello del vino. Se infatti, dal punto di vista della riproducibilità del dato, la maggior parte delle metodiche di estrazione proposte in letteratura sono appropriate per ottenere una stima del contenuto polifenolico delle uve, a patto di definire delle condizioni di campionamento adeguate, lo stesso non si può dire per quanto riguarda la capacità di stima della quota di polifenoli estraibili in vinificazione. Va rilevato però che, fatti salvi i due autori ultimi citati, che hanno rilevato una insufficiente capacità di stima, gli altri metodi non sono stati validati per questo specifico obiettivo della vinificazione e dunque il loro utilizzo per predire la qualità delle uve ai fini della trasformazione a vino è quantomeno incerto.

Si deve tenere presente infatti che solo una frazione relativamente modesta dei polifenoli totali è disponibile per la estrazione durante la vinificazione, che è un processo selettivo che dipende,



Fig. 3 - Correlazione tra il contenuto di antociani estraibili della buccia e di proantocianidine estraibili della bacca (mg/kg di bacche) ed il contenuto del vino sperimentale

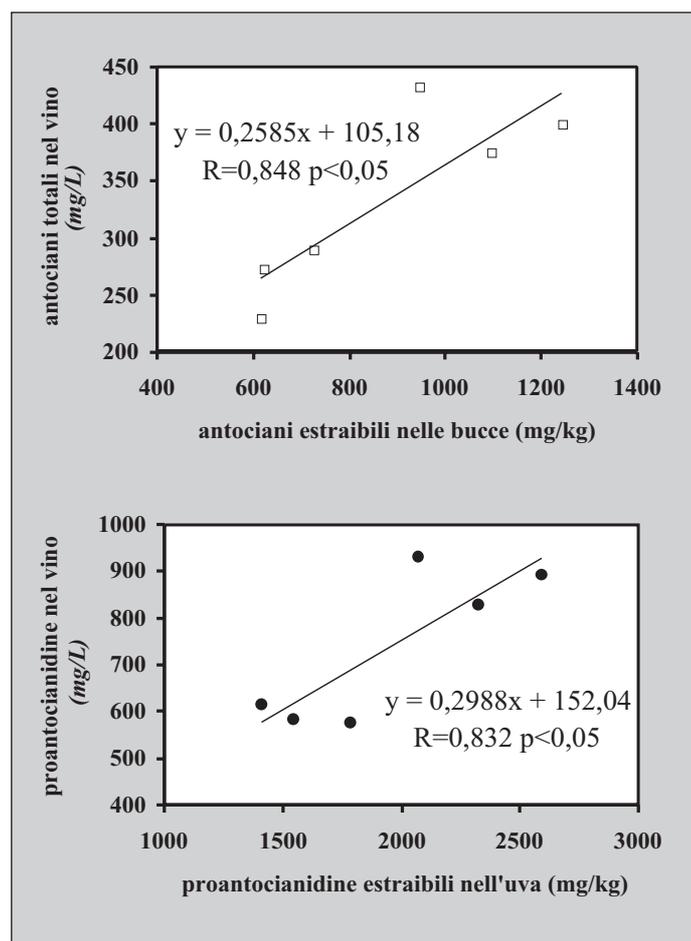
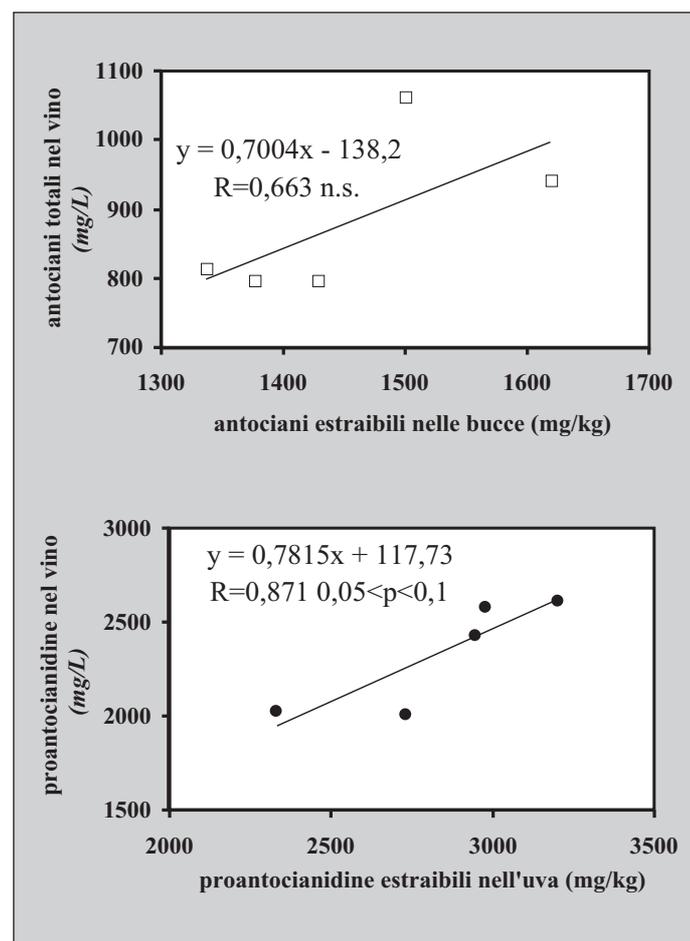


Fig. 4 - Correlazione tra il contenuto di antociani estraibili della buccia e di proantocianidine estraibili della bacca (mg/kg di bacche) e la concentrazione nel vino in scala industriale



oltre che dalle modalità di conduzione e dalla durata della vinificazione, anche dallo stato fisico-meccanico delle parti solide della bacca, bucce e vinaccioli in particolare. Se questo è generalmente vero per gli antociani, che sono composti fenolici altamente idrosolubili presenti allo stato libero nel succo vacuolare, nella buccia, è ancora più evidente per i tannini (Bourzeix et al., 1986). Questi ultimi infatti sono localizzati sia nei vinaccioli, dove sono presenti anche negli strati interni e sono poco estraibili anche a causa della completa o parziale lignificazione e della presenza di una cuticola altamente resistente, sia nella buccia, dove i tannini sono presenti in diverse forme insolubili, sia libere come aggregati molecolari che legate con legame covalente a polisaccaridi parietali

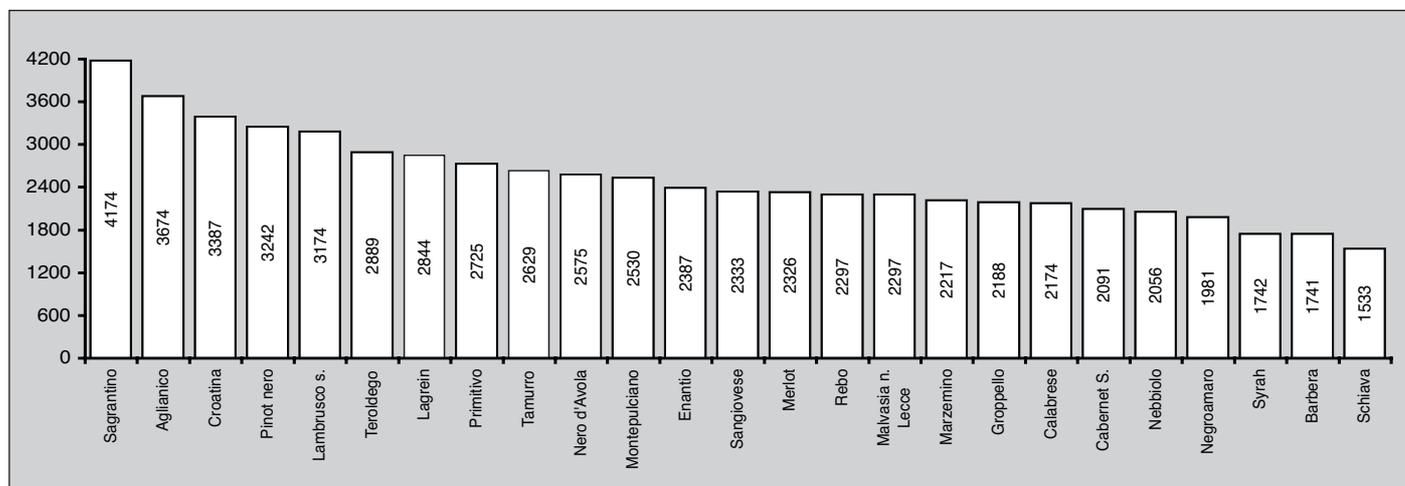
ed a proteine di membrana (Amrani Joutei, 1993; Amrani Joutei e Glories, 1994). La loro selettiva estrazione in vinificazione, in particolare per i tannini, non è facilmente prevedibile ed è lecito dubitare che il dato ottenuto nelle metodiche che prevedono la macinazione fine del campione, con distruzione completa della integrità fisica cellulare, possa in qualche modo ricostruirla. Per la stessa ragione è improbabile che si possa ottenere una eguale selettività modificando in maniera radicale, rispetto alla vinificazione, la natura chimica dell'estrattore, oppure la durata e la temperatura della estrazione. Infatti la chiave della capacità previsionale risiede nel ricostruire e preservare, per quanto possibile, la "selettività" che presiede alla estrazione in vinificazione.

Una nuova metodica

Questo articolo è volto a descrivere una nuova metodica per la stima del potenziale polifenolico delle uve, e la sua validazione.

Obiettivo della metodica è stimare nelle uve rosse il contenuto di polifenoli estraibili durante la vinificazione in rosso, valutato separatamente per le bucce e per i vinaccioli, al fine di fornire anche una informazione quantitativa sulla localizzazione. Alla fine di un ciclo pluriennale in cui la metodica è stata progressivamente affinata e testata, si è ritenuto infatti che essa sia giunta ad un sufficiente grado di sviluppo da poter essere proposta quale metodo di riferimento per un più ampio impiego.



Fig. 5 - Polifenoli estraibili in 25 varietà principali di uva rossa da vino

Dati medi delle singole varietà, espressi come (+)-catechina, mg/kg di uva

Materiali e metodi

Campionamento delle uve. Il campionamento delle uve in campagna viene effettuato con i dovuti accorgimenti per assicurare la rappresentatività. I grappoli sono raccolti da non meno di 10 viti rappresentative delle diverse parti del campo, devono essere almeno 3 kg in peso, e raccolti da diverse parti della vite: in alto, centrale ed in basso rispetto alla chioma.

Nel caso di appezzamenti che presentino delle pronunciate disomogeneità, o per il campionamento delle uve in cantina anziché in campagna, può essere opportuno aumentare le dimensioni del campione, ovvero campionare a racimoli da un numero maggiore di grappoli. Il campione viene chiuso in buste di polietilene, sigillato, e portato immediatamente al laboratorio, in condizioni tali da assicurarne la integrità e da evitarne un eccessivo riscaldamento. Al ricevimento, viene conservato in frigorifero a 4°C, fino all'estrazione, che deve essere avviata entro le 48 ore dalla raccolta.

La riduzione del campione viene effettuata subito prima della estrazione, nel seguente modo: in proporzione al peso relativo delle tre zone superiore, centrale e delle punte del grappolo, si prelevano

complessivamente 15 bacche dalle tre parti, avendo cura di campionare da tutte le direzioni radiali. Questa operazione può essere modificata nel numero e nella posizione, in funzione della forma del grappolo (ad esempio per grappoli di grandi dimensioni oppure alati). Le bacche così separate dal rachide vengono mescolate, e viene scelto a caso un lotto di 200 grammi di acini, pesati su bilancia tecnica e contati (segnare numero acini), che vengono utilizzati per la estrazione.

Il campione rimanente viene ammostato per le analisi routinarie sul mosto (pH, acidità titolabile, °Brix).

Estrazione delle uve. Preparare una soluzione idroalcolica acida, contenente alcol buongusto (aggiunto in volume corrispondente al 12% di alcol), acido tartarico 5 g/L (neutralizzato per 1/3 con NaOH fino a pH 3,2), solforosa 100 mg/L. Tenere conto del titolo dell'alcol e dei volumi, in modo da avere 12% di alcol effettivo.

Separare manualmente le bucce ed i vinaccioli, aiutandosi con delle piccole spatole da laboratorio in modo da separare il più possibile i residui grossolani di polpa dalle bucce e dai vinaccioli. Cercare di lavorare in modo regolare, evitando sia di lasciare eccessivi residui di polpa, sia di danneggiare le

bucce che dovrebbero rimanere ragionevolmente integre.

Le bucce, mano a mano che vengono preparate sono messe in una beuta contenente 250 mL di soluzione idroalcolica di cui è stata fatta la pesata (bottiglia + soluzione) su bilancia tecnica.

In questo modo le bucce non rimangono all'aria per troppo tempo, evitando così fenomeni di ossidazione dei polifenoli. A fine operazione, si ripesa la beuta su bilancia tecnica in modo da calcolare per differenza il peso delle bucce. Successivamente alla pesata si mettono nella beuta alcune gocce di azoto liquido tappando immediatamente con del cotone, dopo qualche secondo si chiude la beuta con del parafilm. Alternativamente, si può inertizzare insufflando CO₂. L'immissione di gas inerte permette di eliminare l'ossigeno dallo spazio di testa limitando in parte le ossidazioni.

I vinaccioli vengono lavati con acqua fredda per eliminare il più possibile i residui di polpa, poi asciugati con carta da laboratorio e quindi pesati con una bilancia tecnica. I vinaccioli vengono messi in una beuta con 250 ml di soluzione idroalcolica, inertizzata e tappata analogamente a quanto già descritto per le bucce.

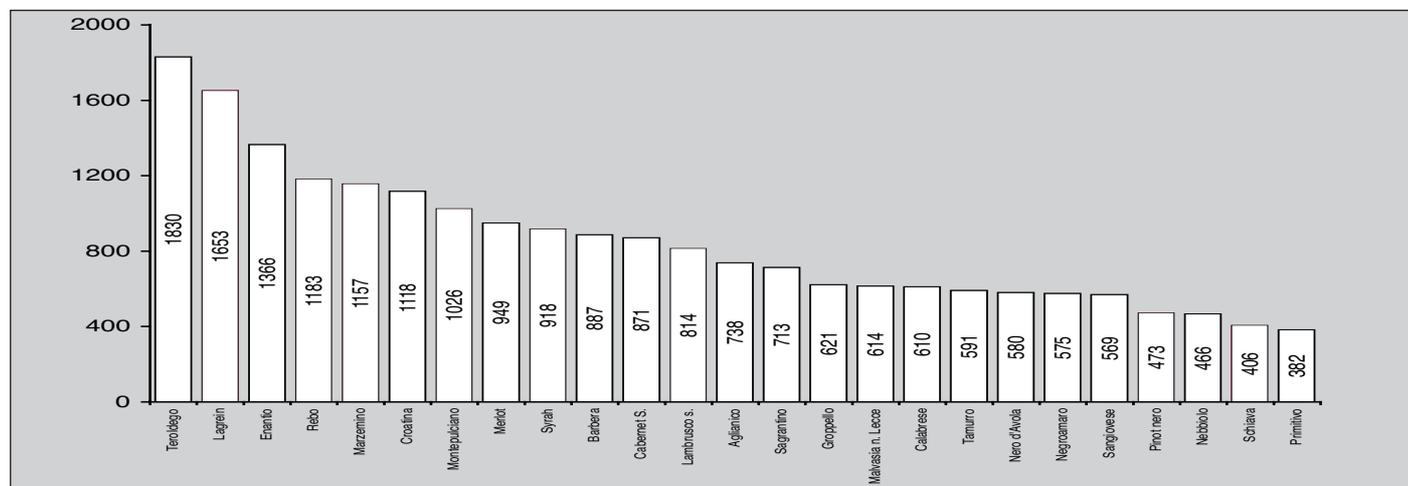
Le beute vengono messe per 5 giorni in una stufa ter-

mostatata alla temperatura di 30°C ed agitate manualmente una volta al giorno. L'agitazione non è una operazione critica, in quanto il rapporto liquido/solido è più favorevole rispetto a quello che si realizza nella vinificazione, mentre lo è la durata dell'estrazione, che non deve essere inferiore a 5 giorni.

A fine estrazione si estraggono le beute dalla stufa e si lasciano raffreddare per almeno 30 minuti. A questo punto si procede alla svinatura. L'estratto dei vinaccioli viene messo, con l'aiuto di un passino a maglie fine e di un imbuto, in un cilindro dove viene se necessario portato a 250 mL con la soluzione idroalcolica, poi viene trasferito in bottiglie da 250 mL riempite completamente e tappate con tappo corona. Nel caso delle bucce, se possibile, pressare leggermente (una pressatura leggera può essere effettuata direttamente nel passino esercitando con il pugno della mano una pressione sufficiente a far asciugare le bucce) e raccogliere l'estratto. L'estratto viene centrifugato a 5000 giri per 8 minuti per eliminare le fecce più grosse. Il liquido centrifugato è portato a volume di 300 mL con soluzione idroalcolica e poi trasferito dentro una bottiglia da 250 ml, riempita completamente. Si chiudono anche queste bottiglie con tappo corona.

Tutti i campioni devono



Fig. 6 - Antociani estraibili in 25 varietà principali di uva rossa da vino

Dati medi delle singole varietà, espressi come malvidina 3-glucoside cloruro, mg/kg di uva

essere conservati al buio in frigorifero, fino all'analisi. Per aumentare la conservabilità nel caso i campioni non vengano analizzati subito, si può considerare di aggiungere altri 30 mg/L di anidride solforosa al momento dell'imbottigliamento.

Metodi di analisi

Metodi di analisi. Le analisi sugli estratti e sui vini sono state condotte tutte sul campione dopo isolamento delle appropriate frazioni su cartuccia SPE Sep-Pak C18, secondo le metodiche spettrofotometriche proposte da Di Stefano (Di Stefano et al., 1989), eseguite nelle condizioni ottimizzate descritte da Rigo et al. (2000).

In particolare, sono stati dosati i seguenti parametri riferiti agli estratti di uva:

i) gli antociani totali in etanolo cloridrico, espressi come malvidina 3-glucoside cloruro, mg/kg di bacche. Il coefficiente di estinzione molare della malvidina 3-glucoside sul massimo di assorbimento nel visibile, in queste condizioni è $\epsilon=30100$ a 542 nm;

ii) i polifenoli totali reattivi al Folin-Ciocalteu, espressi come equivalenti di (+)-catechina, mg/kg di bacche;

iii) le proantocianidine, per trasformazione secondo reazione di Bate-Smith, in

etanolo acido, espresse come equivalenti di cianidina, mg/kg di bacche;

iv) le catechine e proantocianidine reattive alla vanilina, per reazione in HCl a caldo, espresse come equivalenti di (+)-catechina, mg/kg di bacche.

Il dato dei vini e degli estratti è stato ottenuto in maniera analoga ed espresso in mg/L. La concentrazione nell'uva viene convertita da mg/L a mg/kg tenendo conto che nel caso dei vinaccioli, nelle condizioni proposte, da 200 g di bacche si producono 250 mL di estratto da vinaccioli (fattore moltiplicativo 1,25), e 300 mL di estratto da bucce (fattore moltiplicativo 1,5).

Per una discussione più approfondita del significato di questi indici per la valutazione dei polifenoli nel vino si rimanda alla recente letteratura (Vrhovsek et al., 2001).

Cinetica della estrazione.

Per descrivere la cinetica di estrazione nelle condizioni del metodo, è stato realizzato in data 28 agosto 2000 un campionamento di 10 kg di uve della varietà Pinot nero, clone 114 su SO₄. Il vigneto era a pergola semplice, con filari orientati nord-sud, esposizione ovest, densità di impianto 3873 viti/9000 mq. Le uve conferite avevano i seguenti dati compositivi del mosto: °Brix = 18,8, acidità titolabile = 10,1 g/L, pH =

3,09.

Da questo unico vigneto sono state prelevate due serie di 7 campioni di uve per studiare la cinetica di estrazione. Sono state estratte come descritto al precedente punto b), ma svinando un campione per ciascuna serie a cadenza giornaliera.

Grado di incertezza delle misure. La prova di ripetibilità del dato è stata disegnata in accordo alla definizione ISO (AA.VV., 1989). Al fine di valutare l'intera procedura, dal campionamento fino all'ottenimento del dato analitico, sono stati realizzati nello stesso vigneto di Pinot nero 10 campionamenti singoli. L'uva è stata raccolta alla maturità tecnologica, in data 30 agosto 2000. Da ciascun campione sono stati ottenuti due lotti di 200 g di bacche, sottoposti separatamente ad estrazione ed analisi.

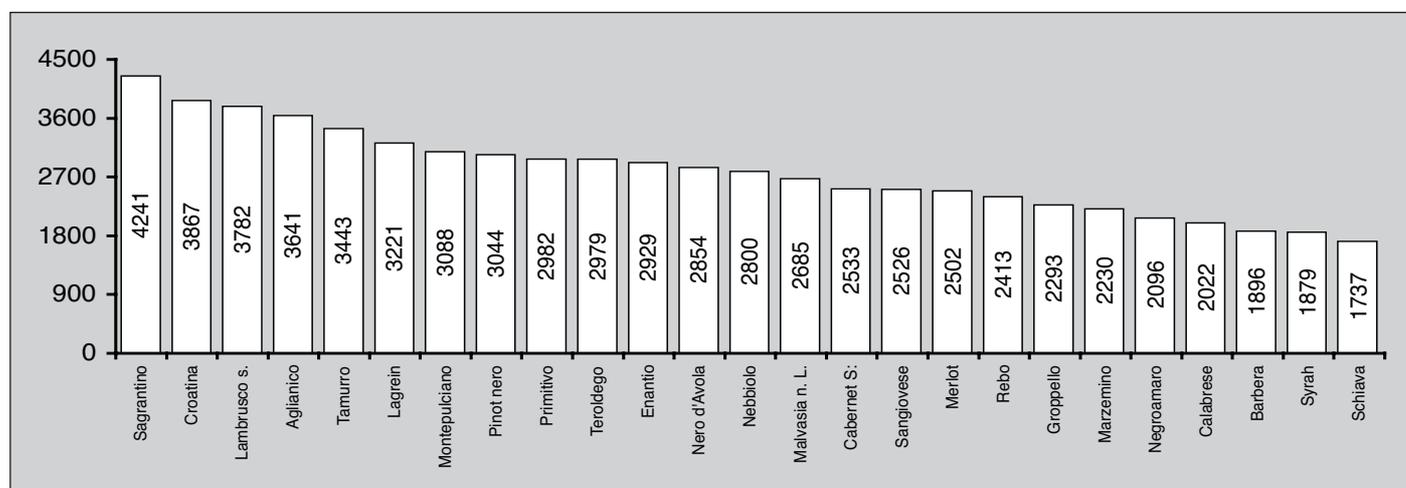
Correlazione tra composizione delle uve e dei vini sperimentali. Nella vendemmia 1998, sono state realizzate sei diverse tesi agronomiche in un unico vigneto di Cabernet Sauvignon (INRA 337 su Gravesac cl. 264), ottenendo sei partite diversificate di uva della stessa varietà. Da ciascuna tesi sono stati selezionati sei filari di circa 25 m, all'interno dei quali alla vendemmia (il 12 ottobre) è stato prele-

vato un campione di almeno un grappolo per pianta, che è stato estratto ed analizzato come sopra descritto.

L'uva raccolta dalle stesse piante, in quantità variabile tra 15,5 e 29,5 kg ed in stato sanitario non ottimale per attacco botritico a seguito di piogge prolungate, è stata microvinificata in rosso in condizioni standardizzate presso la cantina sperimentale dell'Istituto Agrario di San Michele all'Adige, con pigiadirasatura, solfitazione (50 mg/L SO₂), inoculo (Fermivin Cryo, Gist Brocades, 40 g/hL), macerazione di otto giorni con una follatura manuale al giorno. Le vinificazioni sono state ulteriormente completate (travaso, inoculo batteri lattici Viniflora Oenos, Christian Hansen), solfitazione (15 mg/L SO₂), secondo travaso dopo fml, solfitazione finale (60 mg/L SO₂), filtrazione ed imbottigliamento. I vini finiti sono stati sottoposti ad analisi nel mese di marzo del 1999, a circa cinque mesi dalla vinificazione, al fine di comparare i dati ottenuti con quelli delle rispettive uve.

Correlazione tra composizione delle uve e dei vini industriali. La correlazione tra uve e vino è stata indagata anche su vinificazioni condotte in scala reale. L'obiettivo delle vinificazioni industriali, realizzate presso la cantina dell'Istituto



Fig. 7 - Proantocianidine estraibili in 25 varietà principali di uva rossa da vino

Dati medi delle singole varietà, espressi come cianidina, mg/kg di uva

Agrario di San Michele all'Adige, era la produzione di vino rosso Doc di qualità, quindi l'elemento unificante era la finalità della vinificazione, come solitamente accade in condizioni reali, e non la omogeneità della conduzione delle vinificazioni.

Alcune partite delle uve della varietà Cabernet (4 Sauvignon ed 1 Franc) provenienti ciascuna da diversi vigneti del Trentino sono state vinificate separatamente in purezza in scala industriale (4,6-6,2 t), in condizioni sufficientemente paragonabili tra loro da permettere di fare una verifica della correlazione tra i dati delle uve e dei vini. Tutte le uve sono state pigiadiraspate, aggiunte di metabisolfito (60-80 g/t), ed inoculate con lo stesso ceppo di lievito (GAR 26). Quattro delle cinque partite sono state vinificate con macerazione in tank tradizionale per 8-10 giorni. Sono stati effettuati tre rimontaggi al giorno per i primi tre giorni, poi due al giorno fino alla svinatura, ed un delestage nel 4° o nel 5° giorno. Una partita di Cabernet Sauvignon è stata invece vinificata in condizioni analoghe per durata ed entità delle operazioni meccaniche, ma per mezzo di un vinificatore rotativo.

Poco prima della vendemmia, tra il 26 settembre ed il 4 ottobre 2000, sono state campionate, estratte ed ana-

lizzate le uve dai vigneti corrispondenti alle cinque vinificazioni sopra descritte. A metà novembre del 2000, quindi almeno un mese dopo il termine della vinificazione, sono stati prelevati i vini in vasca, e sono stati sottoposti ad analisi al fine di paragonare le composizioni delle uve alla vendemmia con quelle dei rispettivi vini.

Risultati e discussione

Cinetica della estrazione.

La cinetica di estrazione degli antociani dalle bucce è molto veloce (Fig. 1, in alto). La concentrazione massima è ottenuta dopo uno-due giorni di estrazione, dopo i quali il prolungamento del tempo di estrazione porta ad una significativa riduzione della concentrazione di antociani, parallelamente a quanto è stato osservato avvenire anche nel normale processo di vinificazione. La concentrazione di proantocianidine presenta invece una estrazione leggermente ritardata, e raggiunge i valori massimi intorno al quarto/quinto giorno, per poi stabilizzarsi (Fig. 1, in alto). Nel caso del Pinot nero, il tenore complessivo dei polifenoli estraibili rimane grosso modo stabile per tutta la durata della estrazione, mentre il rapporto tra antociani e proantocianidine cambia in

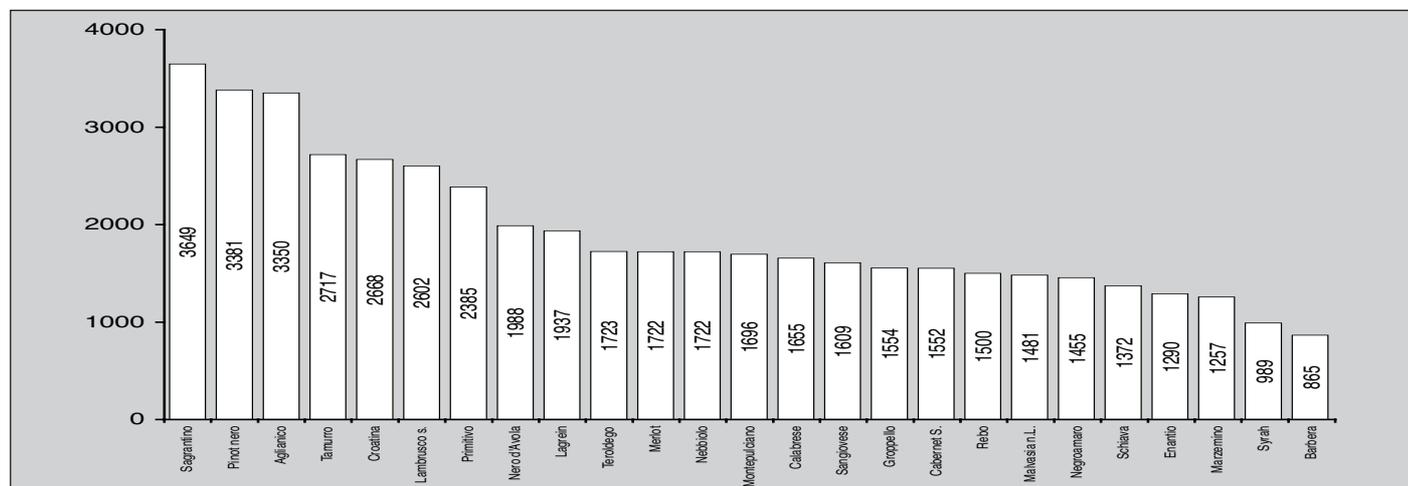
relazione a quanto sopra descritto.

La cinetica di estrazione dai vinaccioli è invece molto lenta (Fig. 1, in basso). Pur in presenza di una soluzione estraente con contenuto di etanolo simile a quello di un vino, nei primi due giorni l'estrazione è minima e variabile, per crescere poi rapidamente fino al quarto giorno e quindi rallentare fino ad arrivare grosso modo a stabilizzarsi sui valori massimi intorno al sesto-settimo giorno.

Questa cinetica di estrazione molto diversa per le bucce rispetto ai vinaccioli implica che, se da un lato è possibile ottenere una stima accettabile del contenuto di polifenoli estraibili dalle bucce in uno-due giorni, è però impossibile avere in tempi brevi un dato significativo del contenuto estraibile dai vinaccioli. Ciò a meno di non macinarli, ma in tal caso scostandosi significativamente dalle condizioni enologiche reali dove i vinaccioli rimangono perfettamente integri.

La scelta di un tempo di macerazione di 5 giorni trova giustificazione nel fatto che a tale tempo si sono completate le estrazioni dalle bucce e quelle dei semi hanno conseguito almeno l'80% del valore teorico. Dal punto di vista enologico, dato che l'alcole è presente fin dalle fasi iniziali nelle con-



Fig. 8 - Indice di vanillina in 25 varietà principali di uva rossa da vino

Dati medi delle singole varietà, espressi come (+)-catechina, mg/kg di uva

dizioni di estrazione, questa scelta temporale dovrebbe simulare una vinificazione dove la fase di macerazione viene proseguita per circa cinque giorni dopo il completamento della fase tumultuosa della fermentazione, che si può considerare una durata abbastanza tipica di una vinificazione in rosso.

Un dato preciso

Grado di incertezza delle misure. La precisione del metodo è buona, considerando tutti i fattori dal campionamento fino alle analisi, infatti per ciascuna delle due serie di 10 ripetizioni il coefficiente di variazione (CV) per i parametri AT, FC, PR e VAN è risultato essere eguale o inferiore a 8,1% per le bucce ed a 13,9% per i vinaccioli.

Per i dati accessori ottenuti sulle stesse bacche, il CV è eguale od inferiore al 2,9% per il peso della bacca, al 4,2% per il peso dei vinaccioli, all'11,0% per peso buccia. Per confronto, i dati routinari sul mosto ottenuto dallo stesso campione (di oltre 3 kg di uva) hanno CV pari a 7,4% sul peso grappolo, 6,1% sui solidi solubili, 3,3% su acidità titolabile e 0,9% sul valore di pH. Quindi i dati meccanici del peso medio della bacca e del peso percentuale dei vinac-

cioli sono molto precisi, con un CV simile a quello della stima della acidità titolabile del mosto. La metodica permette di ricavare anche una stima del peso delle bucce, ma questo dato va preso con cautela in quanto la separazione manuale della buccia comporta un minor grado di precisione.

Si può quindi concludere che la precisione della misura del potenziale polifenolico delle uve è molto buona, in particolare per il contenuto di polifenoli ed antociani estraibili. Infatti la precisione di queste misure risulta essere simile o addirittura migliore di quella ottenuta sul grado Brix del mosto. Inoltre, una analisi della correlazione tra i dati compositivi medi delle due prove ed il contenuto di solidi solubili, evidenzia che sicuramente i polifenoli estraibili dai vinaccioli (Fig. 2, $R=0,790$, $p<0,01$) e forse anche gli antociani estraibili dalle bucce ($R=0,400$, n.s.) sono correlati in maniera positiva al grado di maturazione delle bacche. Questo dato indica che una quota non trascurabile della incertezza della misura non è data da un errore casuale, ma rispecchia la naturale disomogeneità di maturazione tra diversi campioni di grappoli nello stesso vigneto.

In questo vigneto di Pinot nero, le correlazioni individuate stimano un aumento di antociani estraibili pari a 9

mg/kg e di polifenoli estraibili dai vinaccioli pari a 75 mg/kg per aumento unitario del grado Brix. Tale aumento può essere dovuto sia ad un maggiore accumulo di questi composti con la maturazione sia, più probabilmente, ad una maggiore estraibilità degli stessi.

Per le finalità di stima del potenziale polifenolico utile ai fini enologici è sufficiente poter evidenziare differenze compositive di significato tecnologico, per cui la precisione ottenuta con le dimensioni di campionamento proposte, ossia 200 grammi di bacche, rappresentativi di 10 grappoli, è da considerare comunque adeguata.

Qualora ci fosse l'esigenza di una maggiore accuratezza del valore stimato - come può essere il caso, ad esempio, di sperimentazioni e ricerche in campo agronomico - è invece consigliabile aumentare la dimensione del campione. La eventuale esecuzione in doppio riduce il CV a valori eguali od inferiori a 7,4% per tutti gli indici di polifenoli delle bucce ed eguali od inferiori al 6,8% per i semi.

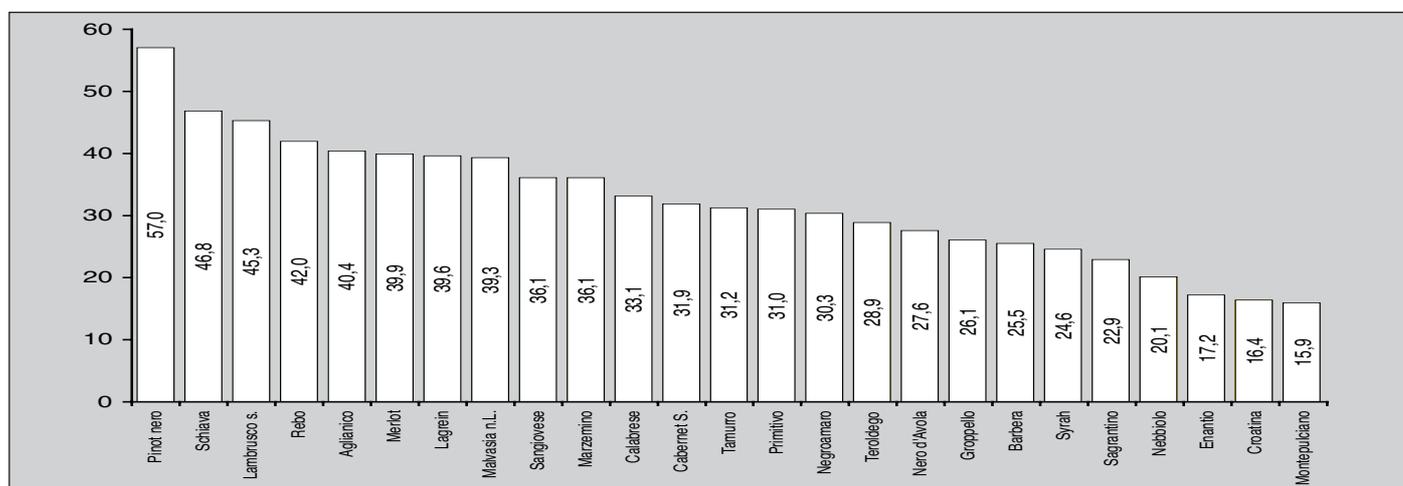
Correlazione tra composizione delle uve e dei vini sperimentali. Il confronto realizzato tra la composizione delle uve e dei rispettivi vini sperimentali analizzati 5 mesi dopo la vendemmia è particolarmente interessante

e probante: Questo perché la materia prima era molto diversa a causa delle differenti condizioni agronomiche e sanitarie originarie, ma in particolare perché le correlazioni studiate, e quindi l'eventuale predittività ricavabile, sono fatte rispetto a vini che avevano superato i primi mesi di rapida evoluzione ed erano pertanto ragionevolmente stabilizzati avendo subito sia la fermentazione malolattica che fasi di conservazione a bassa temperatura, filtrazione ed imbottigliamento.

Le regressioni tra la composizione dell'uva alla vendemmia ed il corrispondente vino dopo stabilizzazione sono risultate significative sia per gli antociani (Fig. 3, in alto, $R=0,848$, $p<0,05$) che per le proantocianidine (Fig. 3, in basso, $R=0,832$, $p<0,05$). Questi risultati confermano quindi sperimentalmente un ragionevole potere previsionale in termini di corrispondenza uva-vino, tanto per gli antociani della buccia che per i tannini complessivi della bacca.

Correlazione tra composizione delle uve e dei vini industriali. Il confronto in oggetto voleva verificare l'applicabilità del metodo in un contesto di normale produzione industriale, ossia in condizioni di vinificazione non rigorosamente standardizzate seppur abbastanza



Fig. 9 - Ripartizione delle proantocianidine estraibili nella bacca di 25 varietà di uva rossa da vino

Il grafico riporta la percentuale localizzata nei vinaccioli, il rimanente è localizzato nella buccia

comparabili in termini di durata della macerazione e modalità della gestione del contatto solido-liquido. I vini sono stati analizzati in questa prova dopo circa un mese dalla produzione. Come si vede dalla Fig. 4, emerge una certa correlazione tra i valori delle uve e dei vini ottenuti. I valori del coefficiente di correlazione sono rispettivamente pari a 0,671 per i polifenoli estraibili e 0,663 per gli antociani (Fig. 4, in alto). Sono valori statisticamente non significativi, anche a causa del basso numero di campioni disponibili, dato che è richiesto $R=0,878$ per $p<0,05$ con soli tre gradi di libertà, ma dal punto di vista pratico possiamo vedere che ad esempio le tre uve meno ricche di antociani hanno prodotto i tre vini meno dotati, ed analogamente il risultato ha buona corrispondenza pratica per i polifenoli totali (dato non riportato). La correlazione migliore si ha per il contenuto in tannini (Fig. 4, in basso), infatti per le proantocianidine la correlazione tra uve e vini è pari a 0,871 ($0,05<p<0,1$). Questi risultati sono in buon accordo con la correlazione sopra discussa tra le uve ed i vini microvinificati, ed in particolare confermano un ottimo potere predittivo della metodica di analisi delle uve per la stima delle proantocianidine estraibili nel vino.

Campo di applicazione

Campo di applicazione del metodo. In considerazione dei risultati riportati, e di una pluriennale esperienza applicativa, si possono suggerire diversi settori di applicazione del metodo proposto che si ritiene ora adeguatamente validato. In particolare i campi di applicazione più interessanti appaiono essere:

i) la stima del potenziale fenolico delle diverse varietà di uve rosse da vino, sul quale si riportano alcuni esempi. Questo tipo di studio è stato già avviato con ottimi risultati, permettendo di classificare 25 varietà italiane ed internazionali rappresentative della vendemmia 2000, mettendo in evidenza gli aspetti tecnologicamente più importanti che sono riportati nei grafici di seguito discussi (Mattivi et al., 2002b). Si può innanzitutto quantificare la diversa ricchezza di polifenoli estraibili in vinificazione delle varietà (Fig. 5) e fare un bilancio relativo al contenuto di antociani e di tannini (Figg. 6 e 7). Per i tannini si sono utilizzati due diversi indici per poter stimare la presenza sia di quelli a maggior grado di polimerizzazione (indice di proantocianidine, Fig. 7), che quelli di più basso peso molecolare

(indice di vanillina, Fig. 8). Infine, si può ottenere una informazione fondamentale per l'enologo, ossia la distribuzione dei tannini tra la buccia ed i semi (Figg. 9 e 10). La conoscenza di questi parametri è fondamentale per il disegno delle modalità ottimali di vinificazione.

ii) L'interpretazione delle cinetiche di estrazione dei polifenoli. La conoscenza della localizzazione dei tannini nella buccia e della cinetica di estrazione di questi dalle bucce e dai vinaccioli, permette di descrivere un modello generale di estrazione, stimando anche l'importanza relativa delle estrazioni precoci dalle bucce, in fase prefermentativa e fermentativa, rispetto alle estrazioni dai vinaccioli, situate in fase più tardiva (Mattivi et al., 2002b). Un esempio è riportato nella Fig. 11.

iii) La valutazione del potenziale polifenolico dei vigneti. La possibilità di stimare il potenziale polifenolico delle uve rosse utile ai fini enologici permette di impostare studi pluriennali mirati alla zonazione. La predittività mostrata dalla metodica permette di abbattere drasticamente i costi ed i tempi rispetto all'approccio tradizionale basato sulla realizzazione di vinificazioni sperimentali, dato che in questo caso la valutazione viene fatta direttamente sull'uva. Il risultato atteso di

questo tipo di studi è quello di identificare le condizioni di interazione vitigno-territorio più idonee alla produzione di vini rossi di qualità, ed a scegliere la destinazione enologica più appropriata per uve a diversa caratteristica compositiva. I risultati acquisiti nei primi anni di applicazione della metodica con questo scopo sono particolarmente incoraggianti (Prast, 2001, Thieme, 2002).

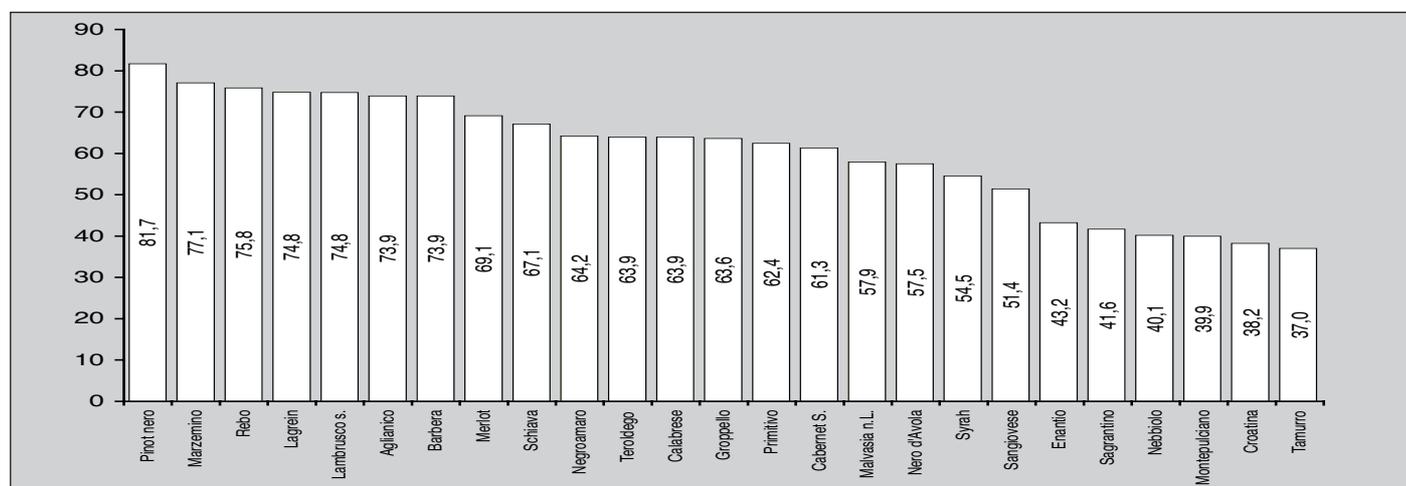
iv) La valutazione della efficienza dei processi estrattivi in cantina (paragone quantitativo uva-vino). La valutazione della efficienza del processo di vinificazione in scala industriale è molto complessa.

In particolare è molto difficile realizzare un disegno sperimentale con le repliche, per la impossibilità di disporre di più partite di uva eguali, e perché spesso non sono disponibili più vasche di fermentazione identiche utilizzabili contemporaneamente. A patto di fare un capillare campionamento sulle uve in ingresso in cantina, è invece possibile valutare la efficienza assoluta delle estrazioni, stimando per i diversi indici di polifenoli (antociani, proantocianidine, etc) la resa da uva a vino con la formula di seguito riportata.

$$R_{\text{estr}} = C_w * R_w / C_g$$

Dove:

R_{estr} = Resa percentuale della estrazione

Fig. 10 - Ripartizione delle catechine e proantocianidine reattive alla vanillina estraibili nella bacca

Il grafico riporta la percentuale localizzata nei vinaccioli, il rimanente è localizzato nella buccia

C_w = Concentrazione nel vino alla svinatura (mg/L)

C_g = Concentrazione nell'uva (mg/kg di bacche)

R_w = Resa percentuale della vinificazione (L di vino per 100 kg di pigiadiraspato, circa 70 L/100kg)

v) Lo studio della variazione del potenziale polifenolico delle uve rispetto a variabili agronomiche quali la tecnica colturale, all'annata, lo stadio di maturazione raggiunto, etc. Anche per questo tipo di lavoro sono già state effettuate diverse sperimentazioni che ne dimostrano l'utilità e la fattibilità (Clauser, 1999; Zangelmi, 1999; Zulian, 1999; Festi, 2001). Se da un lato risulta piuttosto laborioso, e non sempre giustificato dai risultati, seguire l'intera curva di maturazione, può invece essere utile fare una analisi preventiva su un campione prelevato con circa una settimana di anticipo rispetto alla vendemmia, al fine di ottenere una stima preventiva del contenuto in polifenoli delle uve. Dato che le variazioni indotte dall'annata sono molto forti, ma si ripercuotono in maniera simile sui vigneti di una stessa zona (Mattivi et al., 1997), con alcune misure preventive su vigneti rappresentativi è possibile produrre una valutazione mirata a focalizzare le caratteristiche peculiari dell'annata, utile per impostare le vinificazioni.

Considerazioni conclusive

La metodica "ideale" per la valutazione del potenziale polifenolico delle uve rosse dovrebbe auspicabilmente possedere i seguenti requisiti: i) capacità di produrre un dato ben correlato al risultato ottenibile con una vinificazione in rosso in condizioni tipiche; ii) capacità di individuare differenze compositive di importanza tecnologica (precisione); iii) limitata durata e complessità (e di conseguenza, costo) della misura.

Le prime due caratteristiche sono indispensabili per avere un metodo di riferimento che sia applicabile per lavori di studio (zonazione, comparazione di biotipi/cloni, studi agronomici, studio della maturazione fenolica, etc).

La terza caratteristica è necessaria per produrre informazioni appena prima della vinificazione, e quindi per una applicazione estensiva in enologia, a patto sempre che le informazioni prodotte siano effettivamente predittive e quindi soddisfino i requisiti i) e ii). La metodica Iasma per la valutazione del potenziale polifenolico delle uve rosse soddisfa i requisiti di accuratezza, precisione e potere predittivo, in particolare per i tannini che sono i più problematici da stimare, ed inoltre fornisce anche informazioni

accessorie sulla localizzazione dei tannini e sulle caratteristiche meccaniche del grappolo. Infine, va sottolineato che può essere realizzata con una strumentazione estremamente semplice ed economica.

Non sono invece completamente soddisfatti dal metodo i requisiti relativi al punto iii) in quanto la preparazione del campione fino alla messa in stufa è molto laboriosa (60-90 min per campione) e richiede una certa manualità per separare bene ed in modo costante le bucce senza danneggiarle.

Inoltre, la necessità di lavorare uve fresche (<48 h) limita il numero di campioni lavorabili e la durata complessiva (minimo di 6 giorni o superiore) non permette di fornire tempestivamente indicazioni prima della vinificazione per ciascuna partita di uve, in particolare in contesti nei quali la evoluzione di alcuni composti, quali ad esempio gli antociani, possa essere molto rapida in prossimità della data di raccolta.

In conclusione, si può dire che si ritiene pienamente conseguito l'obiettivo di disporre di una metodica di riferimento per la valutazione del potenziale polifenolico delle uve, proponibile in un vasto campo di applicazioni e come termine di confronto per l'ulteriore sviluppo di metodi alternativi, mentre rimane obiettivo importante per la ri-

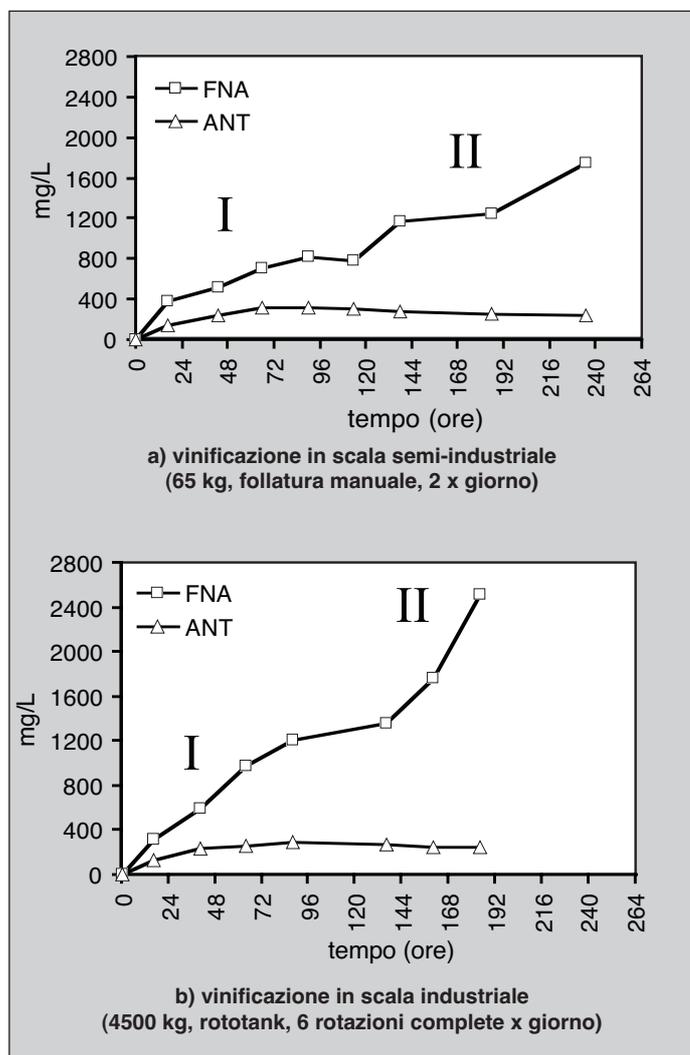
cerca sviluppare un metodo rapido per la valutazione routinaria, ma sempre accurata, del potenziale polifenolico delle uve rosse da vino. ■

Si ringraziano vivamente Massimo Bertamini, Enrico Paternoster, Umberto Pichler, Mauro Varner e Daniele Zangelmi per il fondamentale contributo alla realizzazione delle prove di validazione del metodo, Cesare Bosio, Francesco Cisani, Angelo Divittini, Piero Donna, Marco Tonni e Christian Zulian per la collaborazione allo studio delle diverse varietà. Si ringraziano infine Giuliano Cova e Carla Sanchez per la valida collaborazione tecnica.

Bibliografia

- AA.VV. (1989). Statistical methods. ISO Standard Handbook 3. Genève, Swiss
- Amrani Joutei K. (1993). Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin etude de leur extractibilité.- Thèse n°238 pour le doctorat de l'Université de Bordeaux II, UFR d'oenologie, Bordeaux, France
- Amrani Joutei K., Glories Y. (1994). Étude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. J. Int. Vigne et Vin, (28, 4): 303-317.
- Aubert S., Poux C. (1968). Corrélation entre la constitution

Fig. 11 - Esempio di cinetica di estrazione dei tannini (flavonoidi non antocianici) e degli antociani durante la vinificazione del Pinot nero



Il Pinot nero, che presenta oltre il 55% delle proantocianidine e circa l'82% dei tannini reattivi alla vanillina localizzati nei vinaccioli. Le due zone contrassegnate come I e II corrispondono rispettivamente alle estrazioni dalle bucce e dai vinaccioli

en composés phénoliques des vins, la température de vinification et les caractéristiques générales de l'année. Ann. Technol. Agric. 1968, 17 (4), 299-313.

Auberts S., Poux C. (1969). Extraction des composés phénoliques du raisin. Ann. Technol. Agric., 1969, (18, 2): 93-127.

Bourzeix M., Dubernet M.O., Heredia N. (1975). Sur l'extraction de divers constituants phénoliques des raisins et de leurs rafles. Industries alimentaires et agricoles, (9-10): 1057-1064.

Bourzeix M., Weyland D., Heredia N. (1986). Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. Bulletin de L'O.I.V., (669-670): 1171-1254.

Clauser E. (1999). Influenza

della peronospora (*Plasmopara viticola*) sulla composizione fenolica della bacca. Tesi di Diploma Corso di Studi Superiori in Viticoltura ed Enologia, San Michele all'Adige, Italia.

Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. L'Enotecnico, (5): 83-89.

Di Stefano R., Cravero M.C. (1991). Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. Riv. Vitic. Enol., (44, 2): 37-45.

Di Stefano R. (2001). Significato e metodi di determinazione dello stato di maturità dei polifenoli dell'uva. Atti Seminario, Maturità fenolica: significato, metodi di determinazione, risultati pratici sperimentali. Milano, A.E.E.I. ed., Milano, Italia.

Festi A. (2001). Evoluzione

durante la maturazione dei polifenoli nelle bucce e nei vinaccioli delle varietà Marzemino e Lagrein in Vallagarina (Trentino). Tesi di Diploma Corso di Studi Superiori in Viticoltura ed Enologia, San Michele all'Adige, Italia.

Glories Y., Augustin M. (1993). Maturité phenolique du raisin, conséquences technologiques: application aux millésimes 1991 et 1992. Actes du colloque: Journée technique du C.I.V.B., 21 Janvier 1993, Bordeaux, 56-61.

Glories Y. (1998). Maturation du raisin, contrôle de la macération et de l'élevage des vins rouges. Atti di seminario, 30 Gennaio, Università di Udine.

Gunata Z., Pinau J., Cordonnier R. (1987). Détermination de la qualité de la vendange par sa richesse en composés phénoliques. Applications à la vinification. R.F.O.E. (107): 7-13.

Iland P.G. (1987). Predicting red wine colour from grape analysis. The Australian Grape-grower and Winemaker, The Roseworthy Report, 29.

Mancini P., Bonaccorsi R. (1990). Valutazione qualitativa delle uve rosse in Toscana in relazione al tenore dei composti polifenolici. L'Enotecnico, (3): 81-86.

Margheri G., Tonon D. (1977). Le sostanze polifenoliche dell'uva, del vino e dei sottoprodotti della vinificazione in rosso. Riv. Vitic. Enol., (9): 3-13.

Margheri G., Tonon D., Pellegrini R., Sartori G. (1985). Correlazione tra la composizione biochimica dell'uva, le tecniche di vinificazione e la qualità dei vini. L'Enotecnico, (21, 11): 1129-1134.

Mattivi F., Nicolini G., Falcetti M. (1997). La composizione polifenolica del vino Marzemino trentino. In: Il Marzemino Trentino D.O.C. L'ambiente, la vite, il vino. Falcetti M e Camprostrini F. ed., Consorzio Tutela del Marzemino Trentino, 135-150.

Mattivi F., Prast A., Nicolini G., Valenti L. (2002A). Validazione di un nuovo metodo per la misura del potenziale polifenolico delle uve rosse e discussione del suo campo di applicazione in enologia. Riv. Vitic. Enol., 2/3, 55-74.

Mattivi F., Zulian C., Nicolini G., Valenti L. (2002b). Wine, biodiversity, technology and antioxidants. In: Alcohol and Wi-

ne in Health and Disease, Annals NYAS, 957, 37-56.

Prast A. (2001). Valutazione del contenuto in polifenoli estraibili nelle uve rosse della vendemmia 2000 in Trentino. Tesi di Diploma Corso di Studi Superiori in Viticoltura ed Enologia, San Michele all'Adige, Italia.

Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.

Ribereau-Gayon P. (1971). Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. I. Expérimentation 1969. Connaiss. Vigne Vin, 247-261.

Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovsek U., Mattivi F. (2000). Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. J. Agric. Food Chem., (48, 6): 1996-2002.

Rousseau J., Delteil D. (2000). Présentation d'une méthode d'analyse sensorielle des raisins. Principe, méthode et grille d'interprétation. Revue Française d'œnologie, 183, 10-13.

Singleton V.L., Draper E.D. (1964). The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. Am. J. Enol. Vitic., (14): 34-40.

Vrhovsek U., Mattivi F., Waterhouse A.L. (2001). Analysis of red wine phenolics: comparison of Hplc and spectrophotometric methods. Vitis (40, 2): 87-91.

Thieme A. (2002). Lagerbewertung von Teroldego- und Cabernet Sauvignon- Weinbergen anhand der extrahierbaren Polyphenole. Diplomarbeit, Fachhochschule Wiesbaden, Fachbereich Weinbau und Gärtechniktechnologie. Wiesbaden, Germania.

Zangelmi D. (1999). Effetto del microclima dei grappoli sull'accumulo dei polifenoli nelle uve della varietà Cabernet Sauvignon. Tesi di Diploma Corso di Studi Superiori in Viticoltura ed Enologia, San Michele all'Adige, Italia.

Zulian C. (1999). Influenza esercitata dalla forma di allevamento della vite sull'ecofisiologia della pianta, sulla produttività, la composizione dei mosti e sul contenuto fenolico dei vini. Tesi di Laurea in Scienze Agrarie, Università degli Studi di Padova, Italia.