

IL PRIMO APPROCCIO METABOLOMICO PER LO STUDIO DELLA MICRO-OSSIGENAZIONE

F. MATTIVI¹; P. ARAPITSAS¹; A. BIONDI BARTOLINI²; S. DI BLASI²; D. PERENZONI¹; A. RIGO³; U. VRHOVSEK¹.

¹Centro Ricerca ed Innovazione IASMA, Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, Italia

²Consorzio Toscana, Firenze

³Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova; Padova

Lavoro presentato alla 7^a edizione di Enoforum, Arezzo, 3-5 maggio 2011

Introduzione

Uno dei principali obiettivi della moderna ricerca enologica è lo studio della micro-ossigenazione dei vini per riuscire ad indirizzare al massimo possibile le sue azioni. Nessuno dubita ormai che il moderato impiego di questa tecnica influisca in modo estremamente positivo in diversi parametri qualitativi del vino, aumentando la stabilità e l'intensità del colore, accelerando la morbidezza, ed offrendo un carattere olfattivo più fruttato e speziato e meno erbaceo.



Figura 1. Impianto di micro-ossigenazione della cantina sperimentale Toscana

Anche se sono già conosciuti alcuni dei composti marker responsabili di questi cambiamenti, si sa ancora poco sui loro meccanismi metabolici. La maggior parte degli studi si limita ad analizzare il modo in cui reagiscono i composti polifenolici durante l'impiego della micro-ossigenazione, mentre una parte più piccola si focalizza sui composti volatili. In generale, le conclusioni delle varie ricerche hanno evidenziato che fra i fattori che hanno l'influenza più significativa ci sono il dosaggio dell'ossigeno e la presenza di metalli come il ferro e il rame.

D'altra parte negli ultimi anni la metabolomica è diventata una "tecnologia abilitante" in diversi settori scientifici, dalla diagnosi delle malattie fino alla tecnologia degli alimenti. Si tratta di un approccio scientifico innovativo, che punta ad analizzare tutti i metaboliti, o ampi gruppi di metaboliti, come un insieme. In letteratura finora ci sono pochi studi metabolomici, ancora pionieristici, applicati al settore enologico e focalizzati alla valutazione dell'origine geografica del vino, della cultivar del vitigno e dell'annata. Ad oggi non ci risulta siano mai stati tentati studi metabolomici sull'influenza della pratica enologica della micro-ossigenazione.

In questo studio sono state valutate le modifiche compositive che avvengono in un vino Sangiovese durante due cicli di micro-ossigenazione, pre- e post-fermentazione malo-lattica, impiegando diversi dosaggi di ossigeno e ferro.

Il progetto di ricerca

L'attività di questo progetto, svolto in collaborazione tra la Fondazione Edmund Mach, il Consorzio Toscana e l'Università di Padova, si è focalizzata sulla micro-ossigenazione del Sangiovese.

Vinificazione

In base alla valutazione analitica delle partite disponibili, effettuata nel 2009, è stato scelto per la prova un vino Sangiovese della vendemmia 2009, ottenuto presso la cantina sperimentale Toscana. La prima fase di micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione alcolica e si è completata subito prima della fermentazione malo-lattica. Il vino (240 hl) è stato diviso in 24 vasche di acciaio da 10 hl e sottoposto a 7 settimane di micro-ossigenazione controllata in 8 diverse condizioni, ciascuna condotta in triplicato. Le variabili investigate sono state la quantità di ossigeno (quattro livelli, 0-5-10-15 mg per litro per mese) e la concentrazione di ferro (due livelli, ~1.5 e ~2.0 mg/l). La seconda fase di micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione malo-lattica e, come la precedente, è stata attuata su 24 vasche permettendo di testare, in triplicato, l'effetto di 4 differenti dosaggi di ossigeno (0-1-2-3 mg per litro per mese) in presenza di due livelli di ferro (~1.7 contro ~2.6 mg/L), durante tre mesi di trattamento.

Metabolomica

Si è provveduto ad analizzare i campioni di vino provenienti dalle varie fasi del processo di micro-ossigenazione, utilizzando una metodica che registra il profilo metabolomico dei campioni, appositamente messa a punto presso i laboratori della Fondazione Mach. Ogni campione dei 24 serbatoi è stato analizzato sia tal quale che concentrato cinque volte, dopo un'estrazione in fase solida (SPE) con cartuccia ENV+. Le analisi sono state effettuate con un sistema cromatografico Waters Acquity UPLC accoppiato con uno spettrometro di massa Synapt HDMS Q-TOF, controllato dal software MassLynx 4.1. Le modalità di lavoro sono quelle tipiche degli esperimenti "data-driven", ma condotto in condizioni tali da includere nell'analisi anche un ampio numero dei composti che si suppone siano influenzati dal trattamento, secondo la corrente letteratura, per permettere di verificare le ipotesi attualmente accettate sul chimismo della micro-ossigenazione.

Il campione viene separato in cromatografia UPLC in fase inversa e l'eluato è analizzato nello spettrometro di massa operante ad alta risoluzione ed accuratezza, generando dei file grezzi che contengono l'informazione chimica generata dalla frammentazione di tutti i composti organici ionizzabili presenti nella matrice. L'elaborazione dei dati permette di estrarre un elevato numero di features, ossia di coppie univoche di tempo di ritenzione e massa accurata, che sono riconducibili con esperimenti di annotazione al composto che ha generato il segnale.

La separazione cromatografica è stata ottimizzata su una colonna Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μ m, 2.1 x 150 mm), di durata 62 minuti, a flusso 0.3 mL/min ed il volume iniettato era 10 μ L. Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando la tecnica di ionizzazione ESI (electrospray ionization) sia in modalità positiva che negativa (ottenuta con corse cromatografiche separate), ed a due livelli di energia (bassa ed alta) per ciascuna delle due modalità, operando in un intervallo di massa (m/z) da 50 fino a 3000 amu. Tutte le analisi sono state realizzate in duplicato. I cromatogrammi sono stati processati ed analizzati in un primo livello dal software XCMS ed esportati per la successiva elaborazione verso R-package, Statistica, CAMERA e MatlabTM.

Risultati e Discussione

Numero di features

Dopo l'allineamento dei dati ed il loro processamento tramite XCMS sono stati identificati un elevato numero di features. Per "feature", come sopra riportato, si intende una coppia univoca di valori di massa accurata e di tempo di ritenzione. Viene usata negli esperimenti di metabolomica perché in questo modo si acquisiscono e conservano le informazioni rispetto a tutti i composti rilevabili, ossia

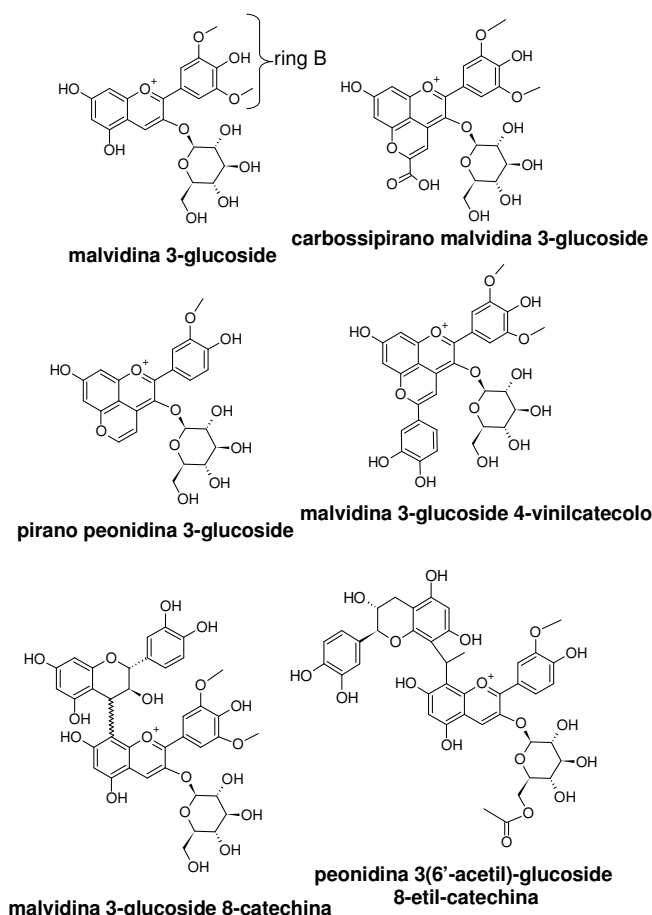
che possono lasciare una traccia nelle condizioni della analisi, inclusi quelli, e sono la maggior parte, ad oggi non ancora identificati. Questo genera dei dati estremamente completi e complessi da analizzare, che contengono una quantità di informazione incomparabilmente superiore di quella proveniente dai consueti esperimenti su composti target. In questi ultimi infatti, l'informazione che riguarda i composti non specificamente cercati viene preventivamente rimossa, o dove acquisita va comunque persa durante l'estrazione del dato.

Come ci si aspettava, il numero di features era maggiore nella analisi dei vini della seconda fase. Cioè, i campioni che hanno subito la micro-ossigenazione dopo la fermentazione malo-lattica avevano ~ 9000 features, mentre i campioni della prima fase dell'esperimento (subito dopo la fermentazione alcolica e prima della fermentazione malolattica) avevano avuto nelle stesse condizioni di analisi fra le 5600 e 8500 features. Questo risultato non era presumibilmente dovuto al trattamento di micro-ossigenazione, che provoca cambiamenti più significativi se applicato prima della fermentazione malo-lattica, ma molto più probabilmente è causato dai metaboliti generati dalla fermentazione malo-lattica. In ogni caso, il numero di features era elevato, più che sufficiente per la analisi di sistema. Questa ricchezza di informazioni permette di osservare un elevatissimo numero di composti (di gran lunga superiore a quelli oggi conosciuti) ed in conseguenza di estrarre un elevato numero di biomarker.

Annotazione dei picchi

In base a queste features sperimentali sono stati tentativamente identificati nei vini più di 200 composti, tramite il doppio confronto della loro frammentazione e tempo di ritenzione con quelli di

Figura 2. Strutture di alcuni pigmenti identificati in questo studio



appositi standard. Dalla modalità ESI positiva sono stati identificati più di 150 composti, e dalla modalità ESI negativa più di 140 composti (diversi composti erano identificati in entrambe le modalità). Per l'identificazione dei composti, le analisi dei campioni dopo SPE sono state di grande utilità dato che gli spettri registrati erano di migliore qualità se ottenuti dopo la concentrazione e con la eliminazione degli interferenti. Del resto questa è una delle ragioni principali del vasto impiego di tecniche SPE per la preparazione dei campioni per le analisi target. I composti identificati nei vini fanno parte di numerose categorie di metaboliti primari o secondari come polifenoli (pigmenti, flavonoidi, tannini, stilbeni, acidi fenolici, acidi cinnamici etc.), carboidrati, bioammine, acidi organici, amino acidi, acidi grassi, esteri, etc.

Target metabolomics

Tutti i composti identificati sono stati integrati separatamente e la loro tendenza nei vari esperimenti è stata valutata considerando i vari livelli di ossigeno e metallo. Da questa procedura sono stati individuati alcuni composti marcatori la cui concentrazione è risultata, negli esperimenti condotti, influenzata dall'ossigeno o/e dal metallo.

In letteratura i composti che principalmente sono indicati essere fortemente influenzati dalla micro-ossigenazione sono i pigmenti. Infatti questa tecnica viene utilizzata principalmente per favorire la stabilizzazione del colore dei vini rossi. Gli antociani quando sono in forma libera (e.g. malvidina 3-glucoside - Figura 2) hanno una bassa stabilità e tendono con il tempo a degradarsi, con risultati negativi sulla tenuta del colore del vino.

Durante la micro-ossigenazione, ed in generale l'invecchiamento dei vini, gli antociani partecipano in diverse reazioni chimiche e biochimiche con formazione di prodotti tra i quali dei pigmenti più stabili, come:

- a) reazioni fra antociani ed acidi organici (i.e. acido piruvico), o aldeidi (e.g. acetaldeide) o acidi cinnamici (e.g. acido caffeico) per dare pigmenti della serie delle vitisine (e.g. carbossipirano malvidina 3-glucoside - Figura 2) e pinotine (e.g. malvidina 3-glucoside 4-vinilcatecolo - Figura 2).
- b) reazioni fra antociani e flavanoli mediante aldeidi (e.g. acetaldeide) che generano pigmenti antociano-etil-flavanolo del tipo della peonidina 3-(6' acetil)-glucoside 8-etil-catechina (Figura 2).
- c) reazioni dirette fra antociani e flavanoli (monomeri, dimeri, trimeri etc di catechina e/o epicatechina), che generano pigmenti come la malvidina 3-glucoside 8-catechina (Figura 2).

Infatti, anche in questo esperimento di metabolomica non-target è stato possibile ricostruire con precisione come le varie dosi di ossigeno e metallo influiscano in modo positivo o negativo sulla concentrazione dei diversi tipi di pigmenti.

Per la maggior parte dei casi, le variazioni delle concentrazioni dei pigmenti dovute alla micro-ossigenazione dei vini, sono state molto più significative per l'esperimento realizzato prima della fermentazione malo-lattica (pre-MLF). Anche questa osservazione è in accordo con l'esperienza pratica, e con i dati bibliografici, essendo stata dimostrata una variazione più significativa se la micro-ossigenazione avviene dopo la fermentazione alcolica e subito prima di quella malo-lattica. Anche perché in questa fase il vino è in grado di combinare dosi maggiori di ossigeno.

Nello specifico, i semplici glucosidi degli antociani presentano una tendenza a diminuire nel tempo in presenza di maggiori dosi di ossigeno, ed in più la cianidina 3-glucoside sembra essere l'unico pigmento dell'uva la cui stabilità è influenzata positivamente dalla presenza di concentrazioni superiori di ferro. Questa caratteristica è verosimilmente dovuta alla struttura della cianidina, dove all'anello B si trovano due ossidrili in posizione orto, un parametro chimico-fisico che favorisce la formazione di complessi con i metalli più stabili rispetto a quelli che si formano con gli antociani senza ossidrili in posizione orto nell'anello B.

I pigmenti della classe delle vitisine (che ricomprende pirano e carbossipirano antociani) in pre-MLF hanno la tendenza ad aumentare, mentre in micro-ossigenazione post-MLF hanno la tendenza a diminuire. Questo andamento è tipico per le vitisine, di essere tra i primi pigmenti a formarsi in condizioni di micro-ossigenazione, mentre in seguito la loro concentrazione inizia a diminuire con il proseguire del trattamento.

Fra gli altri pigmenti studiati, tra i quali le pinotine, le combinazioni flavano-antociani ed i pigmenti antociano-etil-flavanoli, diversi hanno presentato un effetto bifasico, cioè non lineare, con delle concentrazioni minimi o massime in alcune delle condizioni testate in questo esperimento. E' un aspetto questo particolarmente interessante considerando che ci attendiamo, almeno per alcune delle reazioni osservate, un effetto bifasico dell'ossigeno apportato. E' importante notare che questo si è osservato nonostante le dosi di ossigeno testate in questi due esperimenti (pre-MLF e post-MLF) fossero in un ristretto intervallo di concentrazioni, tipici della vinificazione reale di vini Sangiovese e senza aggiungere per scopi sperimentali nessun valore estremo che esuli da quelli utilizzabili in

cantina. Quelle classi di composti che seguono questo andamento sono dei possibili marcatori di processo che potrebbero aiutarci a capire quando la dose somministrata è ottimale.

Una altra classe di composti influenzati dalla micro-ossigenazione sono i derivati della catechina, in accordo con la letteratura in quanto da una parte reagiscono con gli antociani e aiutano così la stabilità del colore dei vini rossi; e dall'altra reagiscono tra di loro e/o con altri composti, creando dei polimeri i quali migliorano il gusto e la struttura dei vini. La correlazione del profilo di questi composti con l'ossigeno è stata riscontrata anche nel nostro esperimento. Vale la pena sottolineare che per i bassi oligomeri delle procianidine, l'andamento di questi composti appare nell'esperimento principalmente influenzato dalla struttura della unità terminale, e quelli in cui questo è la catechina presentavano nell'esperimento un andamento opposto rispetto a quelli che hanno l'epicatechina.

Un-target metabolomics

La prima parte della analisi dei dati di metabolomica ha dimostrato come questo metodo sia in grado di ritrovare ipotesi già note, in accordo con la letteratura sull'argomento, provando in ultima analisi come la metabolomica sia una tecnica affidabile. La seconda parte della analisi, ovvero quella non-target, ha permesso di evidenziare le enormi potenzialità di questa tecnica.

Accanto agli antociani ed ai derivati della catechina, sono stati identificati anche altri composti, possibili marcatori del trattamento di micro-ossigenazione. In specifico, composti come gli acidi grassi ed i loro esteri, alcuni amminoacidi, ma anche ammine, acidi fenolici, etc, assieme a diverse decine di composti, attualmente in corso di validazione e identificazione. Questi possibili marcatori provengono da tutte e due le modalità di ionizzazione (positiva e negativa) e alcuni sono influenzati significativamente dalle dosi di ossigeno mentre altri dalle dosi di metallo.

La analisi statistica dei dati attraverso un innovativo metodo Support Vector Machine ha generato ~ 650 features con un comportamento significativamente influenzato dai due livelli di metallo nei vari esperimenti (pre-FML e post-FML). Il numero delle features influenzate dalla dose di ossigeno, nei vari esperimenti, sono stati ~ 1250. Il numero di composti influenzati dal trattamento evidenzia che il numero di meccanismi chimici e biochimici, che vengono attivati dal processo dalla micro-ossigenazione nei vini, è davvero elevato. Molto più elevato di quello che si pensava finora. Va inoltre evidenziato che queste features sono distribuite in tutta la corsa cromatografica, dal primo minuto fino all'ultimo (62 min), ed in varie valori m/z (da 50 fino 2239). Ossia che influenza composti appartenenti alle più diverse classi chimiche e in un ampio intervallo di polarità, dai composti completamente idrofili ai lipofili. Questa parte del lavoro è in corso di validazione e ci si attende che potrà generare numerose nuove ipotesi sul chimismo della micro-ossigenazione.

Conclusioni

In conclusione, questa sperimentazione ha dimostrato che una analisi senza nessun tipo di preparazione dei campioni e veloce, basata sulle applicazioni della metabolomica ci ha permesso di valutare l'effetto combinato di ossigeno e metallo durante la micro-ossigenazione, prima e dopo la fermentazione malo-lattica, di un vino Sangiovese. È stato possibile identificare e descrivere con precisione gli andamenti di diversi metaboliti primari e secondari già noti per la loro importanza in questa tecnica e allo stesso tempo di generare nuove ipotesi, avendo portato alla luce elementi sperimentali nuovi, non emersi da esperimenti precedenti condotti con tecniche convenzionali. Il potenziale di questo approccio è estremamente promettente e si ritiene che questa possa essere la strada maestra per generare nuove ipotesi utili a studiare fenomeni biochimici particolarmente complessi, come la micro-ossigenazione del vino.

Letteratura consigliata

LC-MC based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimization. Theodoridis, G., Gika, H., Franceschi, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Mausero, D., Wehrens, R., Vrhovsek, U. e Mattivi, F.; *Metabolomics*, [pubblicazione online in attesa di stampa] DOI 10.1007/s11306-011-0298-z.

A Review on micro-oxygenation of red wine: claims, benefits and the underlying chemistry. Gomez-Plaza, E. e Cano-Lopez, M.; *Food Chemistry* 125 (2011) 1131-1140.

Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. Danilewicz, J.C.; *American Journal of Enology and Viticulture* 54:2 (2003) 73-85.

Ringraziamenti

A Manuel Pieri (Consorzio Toscana) per la collaborazione alle prove di cantina;

Riassunto

La metabolomica, che punta ad analizzare tutti i composti organici come un insieme, è diventata una tecnologia abilitante in diversi settori scientifici, dalla medicina fino alla tecnologia degli alimenti. Il vino contiene un elevato numero di metaboliti primari e secondari, le concentrazioni ed i rapporti tra i quali ne determinano la qualità ed il carattere. In letteratura finora ci sono pochi, pionieristici studi metabolomici applicati al settore enologico, focalizzati alla valutazione della origine geografica del vino, della cultivar, del vitigno e dell'annata.

In questo studio sono state valutate le modifiche compositive che avvengono in un vino Sangiovese durante due cicli di micro-ossigenazione, pre- e post-fermentazione malo-lattica, impiegando 4 differenti dosaggi di ossigeno ed in presenza di due livelli di ferro. I vini sono stati oggetto di accurati controlli sia analitici che sensoriali ed analisi metabolomica mediante UPLC-ESI-Q-TOF. Questa ha permesso di identificare migliaia di features, dalle quali sono stati identificati oltre 200 composti studiati più in dettaglio. Oltre a confermare l'importanza dei vari tipi di pigmenti, tannini, acidi grassi e loro esteri, fortemente influenzati da questa tecnica, sono stati identificati anche numerosi gruppi di composti finora mai correlati alla micro-ossigenazione, come varie ammine ed alcaloidi e decine di composti a struttura ignota. Il chimismo della micro-ossigenazione è ben più complesso di quanto finora ipotizzato.