

L'AGGIUNTA PREFERMENTATIVA DI TANNINO D'UVA PUÒ DETERMINARE QUANTITÀ ADDIZIONALI DI 3-MERCAPTOESANOLO E DEL SUO ACETATO NEL VINO.

PRE-FERMENTATIVE SUPPLEMENTATION WITH GRAPE TANNIN CAN GIVE AN EXTRA AMOUNT OF 3-MERCAPTOHEXANOL AND ITS ACETATE IN WINE.

Roberto Larcher^{1,a}, Loris Tonidandel¹, Tomás Román Villegas¹, Tiziana Nardin¹, Bruno Fedrizzi² e Giorgio Nicolini¹

¹ FEM Fondazione Edmund Mach, via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, TN, Italy

² Wine Science Programme, The University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, New Zealand

*Email: roberto.larcher@fmach.it

ABSTRACT

Tannins are widely used in winemaking (classified by the International Organisation of Vine and Wine as clarification agents for protein stabilisation of musts and wines; COEI-1-TANNINS: 2009) and for food and beverage production (recognised by the European Commission as flavourings and food ingredients; EC No 1334/2008, EU Regulation No. 872/12). Recently, for the first time relevant amount of the S-glutathionylated and S-cysteinylylated precursors (GSH-3MH and Cys-3MH) of 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) have been identified in commercial grape tannins (Larcher et al., 2013). This evidence suggested new opportunities of technological use of these adjuvants for improving the exotic-fruit flavour profile of wine after fermentation.

This hypothesis was experimentally investigated fermenting 17 Mueller Thurgau (MT) and 15 Sauvignon Blanc (SB) grapes according to 2 lab-scale distinct protocols: TAN and REF (respectively, with and without addition in the juice of a selected grape tannin particularly rich in GSH-3MH and Cys-3MH). Wines obtained from must added of grape tannin were significantly richer in the total content of the 2 thiols (expressed as sum of the molar concentrations; Tukey's test, $p < 0.001$) with median contents of 12.6 nmol/L in TAN vs. 5.16 nmol/L in REF for MT, and 11.3 nmol/L vs. 2.69 nmol/L for SB wines. The addition of precursors rich tannin produced wines with increased free thiols contents. The concentration of 3MH in MT (Tukey's test: $p < 0.001$) and in SB ($p < 0.001$), and that of 3MHA in MT ($p < 0.001$) and in SB ($p < 0.05$) was significantly higher in the TAN wines. Conversion yields and absolute concentrations of the free thiols seem to support this hypothesis and are in agreement with those reported in the literature for these precursors (for MT was 1.85% and 1.37% and for SB 0.36% and 0.85%, for REF and TAN samples, respectively) (Larcher et al., 2014).

INTRODUZIONE

L'aggiunta del tannino in vinificazione con dosaggi che solitamente arrivano anche a 200 mg per litro di mosto [1] è in grado, anche in funzione della specifica origine botanica, di promuovere la stabilizzazione proteica, correggere i fenomeni di surcolaggio, ridurre i contenuti di metalli pesanti, rimuovere gli odori filici, stabilizzare il colore, proteggere dalle ossidazioni, e molto altro. Recentemente, inoltre è stata evidenziata per la prima volta la presenza nel tannino commerciale dei precursori dei cosiddetti tioli varietali, cisteinil- e glutatilonil-3-mercaptoesanoilo [Cys-3MH, GSH-3MH] [2]. Contenuti importanti sono stati riscontrati in particolare nel tannino estratto dall'uva (buccia d'uva: min. = 0.232, max. = 10.1 max. = 138 mg/kg di GSH-3MH e 0.33, 9.1, 200 mg/kg di Cys-3MH; vinaccioli: 0.01, 0.61, 33.6 mg/kg di GSH-3MH e 0.01, 0.40, 6.2 mg/kg di Cys-3MH, rispettivamente). La presenza dei precursori del 4MMP è risultata invece sempre sotto i limiti di quantificazione (0.01 mg/kg). I tannini d'uva possono quindi essere considerati come una fonte esogena autorizzata di precursori solforati, capaci, in chiave tecnologica, di supplementare adeguatamente mosti naturalmente poveri al fine di esaltare la produzione nei vini di note da frutta tropicale. Parliamo di molecole come 3-mercaptoesanoilo [3MH; pompelmo], 3-mercaptoacetato [3MHA; frutto della passione /bosso /ginestra] e 4-mercapto-4-metil-pentanone [4MMP; gemme di ribes nero, 'pipi de chat'] tutti caratterizzati da soglie di percezione sensoriale alquanto bassa (da frazioni a poche decine di nanogrammi per litro) [3].

In questo lavoro viene indagata la capacità di questi coadiuvanti di aumentare attraverso l'aggiunta ai mosti il contenuto di tioli liberi dei vini così ottenuti.

MATERIALI E METODI

Reattivi e materiali.

L'acqua ultrapura era prodotta con un sistema Arium Pro UV Di Ultrapure Water (Sartorius, Göttingen, Germany). Acido formico e acetone di grado LC-MS, potassio metabisolfito $\geq 97\%$, acido L-ascorbico $\geq 98\%$, glutatone ridotto $\geq 98\%$ (GSH), etilpiropilato (ETP), dimetilcarbonato anidro $\geq 99\%$ e 1-esantiole (1HT) erano forniti da Sigma-Aldrich (Milan, Italy), 3-mercaptoesanoilo (3MH) da Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), 3-mercaptoacetato (3MHA) da Endeavour (Davenport, UK), d3-(R/S)-3-S-cisteinylhexan-1-ol, d3-(R/S)-glutathionylhexan-1-ol, e i relativi composti non deuterati (Cys-3MH and GSH-3MH) erano forniti da Buchem B.V. (Apeeldoorn, The Netherlands).

Campioni

Trentadue uve (17 Mueller-Thurgau, MT; 15 Sauvignon blanc, SB) della vendemmia 2012 in Provincia di Trento (Italy) sono state raccolte manualmente al raggiungimento della maturazione tecnologica (MT, min = 15.4 °Bx, max = 20.5 °Bx; SB, 17.9 - 22.8 °Bx). Ogni campione è stato quindi preparato suddividendo i grappoli in racemi da 2-3 acini e rimuovendo le bacche eventualmente danneggiate, e creando per ognuno di essi due aliquote omogenee da 2 kg ciascuna poste in sacchetti di polietilene 40x40 cm. La prima aliquota di ciascun campione, individuata come REF, è stata quindi sottoposta ad un protocollo che prevedeva l'aggiunta sull'uva di 160 mg di acido L-ascorbico e 160 mg di potassio metabisolfito prima dello schiacciamento, e una macerazione in contatto con le bucce per 24 ore a 20°C sotto atmosfera inerte di argon. Il succo ottenuto per spremitura manuale è stato quindi raccolto in bottiglia di vetro, inoculato con 50 g/hL di lievito VIN13 (Anchor Wine Yeast, Stellenbosch, South Africa), e fermentato a 17-19 °C sino a consumo degli zuccheri fermentescibili (< 2 g/L, < 20 giorni di fermentazione). Dopo un'aggiunta di 200 mg/L di dimetilcarbonato anidro il vino è stato lasciato sedimentare per 5 giorni a 2-4 °C sino a illimpidimento e quindi trasferito sotto argon in bottiglie di vetro da 250 mL tappate con capsula metallica dotata di guarnizione in polietilene. La seconda aliquota degli stessi campioni, individuata come TAN, è stata sottoposta ad un protocollo del tutto simile, salvo l'aggiunta sull'uva prima della spremitura di 0.8 g/kg di un tannino d'uva (Epitan, Perdomini, Italy) di cui era stata precedentemente misurata la concentrazione di precursori solforati. Ogni campione di mosto prima dell'analisi LCMSMS è stato quindi diluito 1:5 con metanolo, aggiunto degli standard interni (d3-GSH-3MH e d3-Cys-3MH, entrambi a 35 µg/L, filtrato 0.22 µm (Millex-GV, Millipore) e posto in vial di vetro da 2 mL con tappo in teflon.

Analisi dei precursori solforati

La quantificazione dei precursori dei tioli è stata effettuata utilizzando un UPLC Acquity Waters accoppiato con lo Xevo TQ MS mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, USA). La separazione è stata realizzata iniettando 5 µL di campione sulla colonna Acquity UPLC HSS T3 C18 column (1.8 µm film thickness, 2.1 mm x 100 mm; Waters). Il flusso era fissato a 0.45 mL/min e la temperatura di colonna a 40°C. L'analisi è stata condotta in diluizione isotopica operando in positive ion mode (capillary voltage, 2.5 kV) e con un flusso di argon di 0.20 mL/min (collision gas) e azoto di 1000 L/h (desolvation gas). Cone voltage potential, collision energy e le altre specifiche strumentali sono quelle riportate in Larcher et al., 2013 [4].

Analisi dei solforati liberi

La quantificazione dei tioli è stata realizzata adattando il metodo proposto da Herbst-Johnstone et al. [5]. A 50 mL di vino sono stati aggiunti, sotto agitazione continua di 2 minuti, 0.5 mL di 1-esantiole (0.25 mg/L) e 1 mL di ETP (100 mM in soluzione etanolica). Si è corretto il pH a 10.0 ± 0.1 con NaOH 10N e si è ripreso a mescolare per altri 10 minuti, quindi si è centrifugato a 6000 rpm. La frazione liquida è stata caricata su una cartuccia SPE C18 (DSC-18 SPE Tube, Supelco, Bellefonte, CA) già precedentemente attivata con 10 mL di metanolo e lavata con 10 mL di acqua. La cartuccia è stata quindi lavata con 10 mL di acqua. I tioli sono stati quindi raccolti passando 10 mL di diclorometano. La fase organica è stata seccata con Na2SO4 anidro e portata a piccolo volume sotto un leggero flusso d'azoto. La quantificazione è stata realizzata utilizzando un Varian 450 gas chromatograph (Middelburg, Netherlands) accoppiato con un Varian 300 triple quadrupole mass spectrometer (Walnut Creek, CA). La colonna analitica era una 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm DB5-MS capillary (J&W, Agilent Technologies Italia, Milan, Italy). Il volume di iniezione, in splitless mode per 1 minuto, era di 1 µL, la temperatura dell'iniettore era 250 °C. La programmata di temperatura del forno era: a 70 °C per 3.5 minute, fino a 210 °C a 10 °C/min, a 300 °C a 15 °C/min, quindi mantenuta a 300 °C per 2 minuti. Lo spettrometro di massa operava in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode, con energia di ionizzazione a 70 eV, utilizzando l'argon come collision gas (1.8 mTorr).

Analisi statistica

Le elaborazioni grafiche e i test statistici sono stati ottenuti utilizzando STATISTICA v. 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).



RISULTATI E DISCUSSIONE

Precursori solforati nei mosti

Il tannino utilizzato per il trattamento ha mostrato una concentrazione di 150 mg/kg di GSH-3MH e 36 mg/kg di Cys-3MH, e l'aumento di precursori (GSH-3MH: 177±13 µg/L; Cys-3MH: 38±4 µg/L) per ogni copia TAN-REF è risultato coerente con l'apporto dovuto al tannino. Le piccole differenze osservate sono spiegabili tenendo conto di una possibile non perfetta solubilizzazione del tannino aggiunto in polvere direttamente sull'uva e delle differenze di resa in mosto delle uve dovute alla pigiatura manuale. I contenuti di entrambi i precursori, prima e dopo il trattamento, sono comunque risultati significativamente diversi per entrambe le varietà (Sign and Wilcoxon Matched Pairs tests; $p < 0.001$).

Precursori solforati nei mosti

Il tannino utilizzato per il trattamento ha mostrato una concentrazione di 150 mg/kg di GSH-3MH e 36 mg/kg di Cys-3MH, e l'aumento di precursori (GSH-3MH: 177±13 µg/L; Cys-3MH: 38±4 µg/L) per ogni copia TAN-REF è risultato coerente con l'apporto dovuto al tannino. Le piccole differenze osservate sono spiegabili tenendo conto di una possibile non perfetta solubilizzazione del tannino aggiunto in polvere direttamente sull'uva e delle differenze di resa in mosto delle uve dovute alla pigiatura manuale. I contenuti di entrambi i precursori, prima e dopo il trattamento, sono comunque risultati significativamente diversi per entrambe le varietà (Sign and Wilcoxon Matched Pairs tests; $p < 0.001$).

L'aumento di contenuto medio per i tioli liberi corrispondeva per il 3MH a 19 unità di Odour Activity Value (OAV= concentration/sensory threshold) nei SB e a 16 nei MT, mentre per il 3MHA a 4 OAV nei SB e a 2 nei MT.

La conversione molare dai precursori (Cys-3MH + GSH-3MH) alle forme libere (3MA + 3MHA) si è confermata bassa: per i MT del 1.9% nei REF e 1.4% nei TAN, e per i SB, 0.36% e 0.85%, rispettivamente [10, 11].

Tabella 1. Contenuto di tioli liberi in vini Mueller-Thurgau (MT) e Sauvignon blanc (SB), con (TAN) e senza (REF) aggiunta di tannino ai mosti.

Treatment	REF			TAN		
	Min	Median	Max	Min	Median	Max
MT (17)						
3MH (µg/L)	0.11	0.69	1.17	0.64	1.67	3.28
3MHA (µg/L)	<0.01	0.01	0.02	<0.01	0.02	0.06
SB (15)						
3MH (µg/L)	0.23	0.34	1.32	0.46	1.5	2.09
3MHA (µg/L)	<0.01	0.01	0.05	0.01	0.03	0.11

CONCLUSIONI

Il lavoro ha messo in evidenza, per la prima volta, le interessanti potenzialità di impiego pre-fermentativo del tannino d'uva per incrementare per via esogena la dotazione di precursori solforati nei mosti, al fine di ottenere vini con maggiori contenuti di tioli liberi, olfattivamente più ricchi di note fruttate tropicali.

A fronte di queste interessanti possibilità d'impiego, occorre tuttavia sottolineare come non esista ancora una compiuta consapevolezza nei produttori di tannino delle condizioni produttive necessarie ad una massimizzazione e standardizzazione dei contenuti (es: varietà delle bucce d'uva, interventi tecnologici in conservazione e lavorazione della vinaccia, procedure fisiche di estrazione...).

REFERENCES

- N. Vivas, N. Vivas De Gaulejac, M. F. Nonier, Bulletin de l'O.I.V., 75, 175-185 (2002)
- R. Larcher, L. Tonidandel, G. Nicolini, B. Fedrizzi, Food Chem., 141, 1196-1202 (2013)
- A. Roland, R. Schneider, A. Razungles, F. Cavellier, Chem. Rev., 111, 7355-7376 (2011)
- R. Larcher, G. Nicolini, L. Tonidandel, T. Román Villegas, M. Malacarne, B. Fedrizzi, Aust. J. Grape Wine R., 19, 342-348 (2013)
- M. Herbst-Johnstone, F. Piano, N. Duhamel, D. Barker, B. Fedrizzi, J. Chrom. A, 1312, 104-110 (2013)
- D. L. Capone, M. A. Sefton, D. W. Jeffery, J. Agric. Food Chem., 59, 4649-4658 (2011).
- B. Fedrizzi, G. Versini, I. Lavagnini, G. Nicolini, F. Magno, Anal. Chim. Acta, 596, 291-297 (2007)
- A. Roland, J. Vialaret, A. Razungles, P. Rigou, R. Schneider, J. Agric. Food Chem., 58, 4406-4413 (2010)
- T. Tomimaga, M. L. Murat, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem., 46, 1044-1048 (1998)
- M. Subileau, R. Schneider, J.-M. Salmon, E. Degnyse, J. Agric. Food Chem., 56, 9230-9235 (2008)
- G. Winter, T. van der Westhuizen, V. J. Higgins, C. Curtin, M. Ugliano, Aust. J. Grape Wine R., 17, 285-290 (2011)