

L'USO DEI TRUCIOLI DEL LEGNO NELL'INVECCHIAMENTO RAPIDO DEL VINO: LA PRESENZA DELLE ACUTISSIMINE

*Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Parco Gussone, Portici (NA)

INTRODUZIONE

Recentemente si stanno diffondendo sul mercato internazionale alcuni prodotti che si pongono come alternativa all'impiego delle botti in enologia. Ci si riferisce in particolare all'utilizzo di legno di rovere sotto forma di frammenti legnosi di diverse forme e dimensioni e tostati più o meno intensamente. Chips e staves sono le forme più comunemente conosciute. Il loro utilizzo è stato approvato dall'OIV, ed attualmente ne regola l'impiego in enologia il Regolamento (CE) N. 1507/2006. I trucioli di legno sono impiegati allo scopo di accelerare il processo d'invecchiamento, il loro impiego mostra effetti chimici nel vino simili a quelli del legno delle botti. Il contatto di lunga durata con la botte permette al vino, soluzione acida idro-alcolica, di estrarre numerose sostanze, tra cui gli ellagitannini: vascalagina e castalagina, che risultano fra i principali componenti ceduti dal legno(1). Durante l'invecchiamento la catechina e l'epicatechina (sostanze flavonoidi isomere del vino) reagiscono con gli ellagitannini del legno, formando dei tannini complessi chiamati Acutissimine. Queste sostanze appartenenti alla famiglia dei Flavano-Ellagitannini, si caratterizzano per un legame C-C tra l'unità ellagiche e le catechine (2). La reazione della catechina con la vascalagina forma l'Acutissimina A, ed il suo isomero Acutissimina B. La chimica della formazione delle acutissimine è semplice e coinvolge una sostituzione nucleofila S_N-1 , catalizzata in un ambiente acido per la protonazione del gruppo -OH di C-1 della vascalagina o castalagina, seguita dalla formazione del catione benzilico(3-4). Obiettivo della sperimentazione è stato lo studio dell'evoluzione delle Acutissimine formatesi durante l'invecchiamento rapido con listelli di rovere di legno. A tal proposito sono state utilizzate per la sperimentazione soluzioni modello acido alcoliche e vino da tavola.

MATERIALI E METODI

La sintesi dei Flavano-Ellagitannini "Acutissimina A e B" è stata realizzata preparando una soluzione idroalcolica al 12% v/v, tamponata con acido tartarico a pH 3.2 e addizionata di trucioli di legno e catechina. Sono state preparate le seguenti soluzioni di macerazione:

- o Sol. 100 ppm di catechina-5% di Rovere (100/5).
- o Sol. 500 ppm di catechina-5% di Rovere (500/5).
- o Sol. 100 ppm di catechina-10% di Rovere (100/10).

o Sol. 500 ppm di catechina-10% di Rovere (500/10).

L'evolversi della reazione, attraverso l'identificazione delle acutissimine e la valutazione quantitativa della catechina, è stato monitorato per 42 gg mediante HPLC (AGILENT 1100 SERIES, Colonna Phenomenex Gemini C18 150 * 4,6 mm, 5 micron i.d. Rivelatore UV-VIS, DAD). Come fasi eluenti sono state utilizzate una miscela di acqua e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,5% (Sol. A) e una miscela di metanolo allo 0,5% di TFA (Sol. B). Il flusso era di 1ml/min con programma di eluizione: %B(0, 10, 50,55,60,100), tempo: 0, 20, 30, 35, 40, 55, 60 min. La rilevazione degli spettri è stata effettuata a 230, 280, 308 nm (9). È stato inoltre simulato l'invecchiamento rapido di vini rossi da pasto mediante listelli di rovere ad alta tostatura aggiunti in quantità pari alla riproduzione del rapporto superficie volume di una botte di rovere da 225 l. Il monitoraggio dell'invecchiamento è stato valutato per 6 settimane sono stati determinati: polifenoli totali, antociani totali, colore, polifenoli per HPLC e identificazione dei flavano-ellagitannini mediante LC-MS. La separazione e la purificazione delle Acutissimine dal vino è stata effettuata mediante HPLC semi-preparativa e analizzata mediante LC-MS. Le condizioni di lavoro erano: HPLC AGILENT 1100 SERIES, Colonna ZORBAX C18 100 * 2.1 mm, 3.5 μ m i.d. Rivelatore LC-MS ESI-APCI. Il flusso era di 0.2ml/min con programmata di eluzione Acqua-Metanolo-0.5% acido Acetico (60%-40%) in isocratica. Le corse sono state effettuate in modalità SIM.

Condizioni operative dello spettrometro di massa

MSD-Spray chamber: Dryng gas flow= 12 l/min, Nebulizer pressure=60 psi, Dryng gas temperature=300°C, Vaporizer temperature= 250°C, Capillary voltage=2000 V, Corona current=2 μ A, Changing voltage=2000 V.

Ioni qualificatori ricercati per la verifica della presenza delle Acutissimine

m/z=180 = Glucosio

m/z=271 = Acutissimine-Ellagitannini

m/z=291 = Catechina

m/z=754 = Ellagitannini-Glucosio

m/z=914 = Acutissimine-Catechina

m/z=934 = Ellagitannini

m/z=1025 = Acutissimine-Glucosio

m/z=1205 = Acutissimine

L'analisi quantitativa delle singole componenti è stata condotta utilizzando catechina quale standard esterno per la costruzione della retta di calibrazione.

RISULTATI E DISCUSSIONI

In figura 1 viene riportato un tipico cromatogramma HPLC alle tre lunghezze d'onda (230,280,308 nm) di soluzioni idroalcoliche modello dove è possibile osservare il picco della catechina ed altri tre picchi, corrispondenti a prodotti di neoformazione delle sostanze fenoliche presenti nel legno con la catechina durante la macerazione.

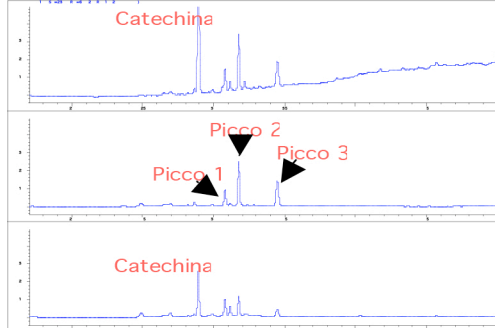


Fig. 1 - Cromatogramma HPLC di soluzioni idroalcoliche macerate con listelli di rovere per 7giorni.

In particolare i picchi n° 2 e n° 3 dall'analisi LC-MS in modalità SIM hanno sviluppato uno spettro di massa con ioni molecolari corrispondenti alle acutissimine, mentre per il picco n° 1 lo spettro corrisponde a rapporti massa/carica caratteristici degli ellagitannini del legno.

Il picco1 nel corso della macerazione si attesta a valori compresi tra i 20,19 ed 37,32 ppm al 42° giorno. I picchi 2 e 3 identificati come gli isomeri Acutissimina A e B presentano un andamento variabile nel corso della macerazione un maggiore rapporto catechina/rovere (SOL100/10-500/10) ha favorito la formazione dell'acutissimine al termine della macerazione. Valori più elevati -30,78 ppm per il picco 2 e 31,68 ppm per il picco3-si ritrovano nella soluzione di macerazione 500/10 (tab. 1-2).

Tab. 1. Concentrazione (mg/l catechina equivalenti) dei picchi di neoformazione nelle soluzioni modello. Media di tre determinazioni±ds.

| Giorni Macerazione | SOL100/5 | | | SOL100/10 | | |
|--------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | Picco1 | Picco2 | Picco3 | Picco1 | Picco2 | Picco3 |
| 7 | 14,00 ±0,002 | 3,45 ±0,012 | 21,71 ±0,012 | 29,61 ±0,012 | 13,89 ±0,02 | 38,34 ±0,04 |
| 14 | 9,72 ±0,005 | 3,02 ±0,005 | 35,96 ±0,005 | 30,10 ±0,013 | 17,95 ±0,05 | 29,96 ±0,05 |
| 21 | 12,56 ±0,007 | 3,88 ±0,007 | 12,26 ±0,007 | 22,91 ±0,004 | 10,18 ±0,07 | 16,49 ±0,01 |
| 28 | 10,36 ±0,004 | 2,52 ±0,014 | 4,30 ±0,014 | 21,48 ±0,015 | 10,16 ±0,04 | 12,62 ±0,05 |
| 35 | 21,34 ±0,006 | 4,54 ±0,006 | 4,56 ±0,006 | 22,30 ±0,006 | 18,23 ±0,05 | 14,85 ±0,08 |
| 42 | 20,19 ±0,007 | 8,87 ±0,007 | 17,02 ±0,007 | 29,66 ±0,005 | 21,20 ±0,06 | 23,11 ±0,09 |

Tab. 2. Concentrazione(mg/l catechina equivalenti) dei picchi di neoformazione nelle soluzioni modello. Media di tre determinazioni±ds.

| Giorni Macerazione | SOL500/5 | | | SOL500/10 | | |
|--------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | Picco1 | Picco2 | Picco3 | Picco1 | Picco2 | Picco3 |
| 7 | 15,04 ±0,4 | 5,25 ±0,12 | 22,55 ±0,02 | 17,65 ±0,002 | 7,84 ±0,05 | 30,50 ±0,05 |
| 14 | 22,02 ±0,005 | 11,49 ±0,005 | 29,96 ±0,05 | 31,06 ±0,005 | 21,06 ±0,06 | 35,02 ±0,06 |
| 21 | 15,75 ±0,007 | 5,82 ±0,007 | 16,49 ±0,07 | 26,86 ±0,007 | 10,76 ±0,07 | 23,84 ±0,07 |
| 28 | 14,31 ±0,004 | 5,98 ±0,004 | 12,62 ±0,04 | 20,87 ±0,004 | 15,38 ±0,1 | 16,87 ±0,1 |
| 35 | 32,44 ±0,006 | 15,52 ±0,01 | 39,80 ±0,05 | 29,01 ±0,006 | 17,45 ±0,05 | 24,23 ±0,05 |
| 42 | 29,66 ±0,007 | 9,25 ±0,02 | 19,94 ±0,06 | 37,32 ±0,007 | 30,78 ±0,10 | 31,68 ±0,10 |

Dall'analisi LC-MS degli estratti di vino invecchiato artificialmente si sono evidenziati frammenti con rapporto massa/carica corrispondente agli Ellagitannini e alle Acutissimine Figura. 4.

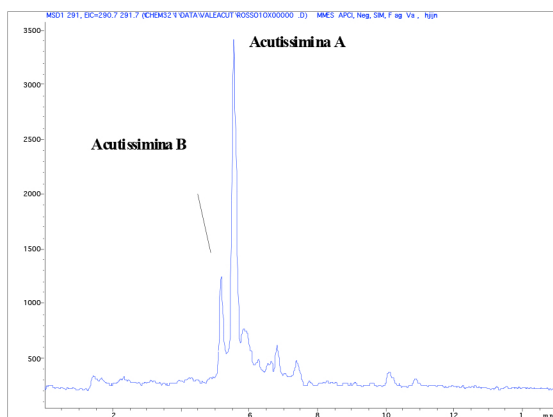


Fig. 4. Flavano-ellagitannini identificati mediante LC-MS nel vino invecchiato rapidamente.

In Tabella 3 è stato monitorato l'andamento delle acutissimine durante l'invecchiamento rapido. La loro presenza nel vino rosso invecchiato con listelli di rovere ad alta tostatura, è stata evidenziata ad una concentrazione intorno ai 2 mg/L.

Tab. 3. Andamento dei flavano-ellagitannini durante l'invecchiamento rapido.

| t | acutissimina A | acutissimina B |
|-----------|----------------|----------------|
| Settimane | mg/l catechina | mg/l catechina |
| 1 | 0,36 ± 0,030 | 0,11 ± 0,021 |
| 2 | 0,33 ± 0,040 | 0,18 ± 0,030 |
| 3 | 0,35 ± 0,045 | 0,16 ± 0,036 |
| 4 | 0,20 ± 0,048 | 0,13 ± 0,039 |
| 5 | 0,19 ± 0,048 | 0,23 ± 0,039 |
| 6 | 0,22 ± 0,051 | 0,15 ± 0,040 |

Durante la fase d'invecchiamento il vino trattato con listelli di rovere subisce una serie di modificazioni molto simili a quelle evidenziate in un vino invecchiato in barrique (5). In particolare i polifenoli totali, inizialmente 437 ppm, aumentano fino a raggiungere un valore di 2126 ppm a fine invecchiamento, in quanto i fenoli presenti aumentano non solo per la formazione degli ellagitannini, ma anche per il graduale rilascio da parte del legno. Va inoltre evidenziata la diminuzione del contenuto in antociani totali che diminuiscono da 178 ppm ad un valore di 63.58 ppm (6). L'avvenuto "invecchiamento" fa sì che il colore del vino vada verso tonalità giallo-arancio, il colore rosso diminuisce dal 77,54% al 10% (Tab. 4).

Tab. 4. Caratterizzazione chimico-fisica del vino invecchiato con listelli di rovere ad inizio e fine invecchiamento.

| Determinazioni | Tempo (gg.) | |
|--|---------------|-----------------|
| | 0 | 42 |
| pH | 3,43 ± 0,08 | 3,38 ± 0,05 |
| Acidità totale (g/l acido tartarico) | 3,45 ± 0,07 | 5,21 ± 0,09 |
| Acidità volatile (g/l acido. acetico) | 0,57 ± 0,06 | 0,90 ± 0,05 |
| Grado alcolico (%v/v) | 11,00 ± 0,19 | 11,00 ± 0,17 |
| Polifenoli totali (mg/l acido gallico) | 713,57 ± 0,22 | 2.126,43 ± 0,44 |
| Antociani totali (mg/l malvidina) | 178,03 ± 0,38 | 63,50 ± 0,35 |
| Intensità colorante (u.a.) | 1,54 ± 0,12 | 1,78 ± 0,12 |
| Tinta (Abs 420/520) | 1,06 ± 0,12 | 1,12 ± 0,16 |
| Purezza del colore rosso (dA%) | 77,54 ± 0,71 | 10,00 ± 0,75 |
| Tonalità (% 420nm) | 37,90 ± 0,23 | 41,00 ± 0,25 |
| Tonalità (% 520nm) | 38,20 ± 0,14 | 49,9 ± 0,21 |
| Tonalità (% 620nm) | 24,93 ± 0,12 | 10,08 ± 0,18 |

CONCLUSIONI

Lo studio del sistema modello ha confermato il verificarsi della sintesi dei flavano-ellagitannini già dal 7° giorno di macerazione. Al termine della macerazione si rilevano concentrazioni maggiori di acutissimine corrispondenti a valori più elevati di catechina, mentre al 7° giorno influisce la quantità di rovere aggiunta.

La determinazione delle acutissimine formatesi nel vino invecchiato con listelli di rovere rappresenta la prima ipotesi verificata di un meccanismo generale di trasformazione chimica degli ellagitannini C-glicosidici nei vini e il punto di partenza per una valutazione quantitativa che possa essere di descrittivo del fenomeno dell'invecchiamento rapido nel vino.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ribereau-Gayon J., Y. Glories, A. Maujean., D. Dubourdieu. (2003) in L'affinamento dei vini rossi in vasche ed in fusti. I fenomeni dell'invecchiamento. Trattato di enologia II. Edagricole, Bologna.
- 2) Meca G. (2006), Le Acutissimine: I Flavano-Ellagitannini che si formano durante l'invecchiamento del vino. Tesi Sperimentale di Laurea, Dipartimento scienza degli alimenti, Università Federico II di Napoli, Facoltà di Agraria.
- 3) Jourdes M., (2004) Tesi di Dottorato: Reactivite, Synthèse, Couleur et Activite Biologique D'Ellagitannins C-Glycosidiques et Flavano-Ellagitannins Laboratorio di Chimica delle Sostanze Vegetali; Centro di Ricerca di Chimica Molecolare Università di Bordeaux 1. Laboratorio di Chimica Applicata, Facoltà di Enologia, Università di Bordeaux 2.
- 4) Quideau S., Feldman K.S. (1996); Ellagitannin Chemistry. Chem. Rev. 96, 475-503.

- 5) Quideau S., Jourdes M., Saucier C., Glories Y., Pardon P., Baudry C. (2003); DNA topoisomerasi inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angewandte chemie international edition* 42, pag. 6012-6014.
- 6) Puech J.L., Mertz C., Michon V., Le Guernevé C., Doco T. Hervé du Penhoat C., (1999); Evolution of Castalagin and Vescalagin in Ethanol Solution. Identification of New Derivatives. *J. Agri. Food Chem.* 47, pag. 2060-2066.
- 7) Vivas N., Laguerre M., Glories Y., Bourgeois G., Vitry C. (1995); Structure simulation of two ellagitannins from *Quercus robus*. *Phytochemistry* 39, pag. 1193-1199.
- 8) Mayer M., Seitz H., Jochims J.C. (1969); Die struktur des castalagins. *Liebigs, Ann. Chem.* 721, pag. 186-193.
- 9) Mayer M., Seitz H., Jochims J.C., Schauerte K., Schilling G., Schilling G., (1971); Struktur des Vescalagins. *Liebigs Ann. Chem.*, 751, pag. 60-68.
- 10) Regolamento (CE) n. 1507/2006 della commissione dell'11 ottobre 2006, *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* 12-10-2006, pag L280/9-11.

RIASSUNTO

I trucioli di legno di rovere sono impiegati in enologia allo scopo di accelerare il processo d'invecchiamento, il loro impiego mostra effetti chimici nel vino, simili a quelli del legno delle botti. Durante l'invecchiamento le catechine del vino reagiscono con gli ellagitannini ceduti dal legno formando dei tannini complessi chiamati "Acutissimine". La sintesi dei Flavano-Ellagitannini "Acutissimina A e B" è stata realizzata in una soluzione idroalcolica al 12% v/v, acida e listelli di legno di rovere americano ed in campioni di vini invecchiati rapidamente per 42 giorni. Questo studio ha mostrato che negli estratti ottenuti per macerazione, con elevata quantità di listelli di rovere (5-10%), si sono rilevati dei picchi di neoformazione con concentrazioni oscillanti tra i 20 e i 30 mg/L. L'analisi LC-MS dei picchi ha evidenziato frammenti con rapporto massa/carica corrispondente agli Ellagitannini e alle Acutissimine. La presenza delle acutissimine, nel vino rosso invecchiato con listelli di rovere ad alta tostatura è stata evidenziata ad una concentrazione intorno ai 2 mg/L.

SUMMARY

Oak chips and staves are used for shortening the aging period of wine. The chemical effects on wine aged in contact with oak chips are similar to a wine aged in oak barrels. Flavano-ellagitannins synthesis as Acutissimins A e B was gained by means idroalcoholic model solutions 12% v/v and wine aged in short time with oaks staves for 42 days. This study have demonstrated that the model solutions containing quantity of oak wood chips (5-10%), had the strongest presence of new compounds by means with concentration between 20 and 30 mg/L. LC-MS analysis underlined fragmentation with m/z ratio corresponding to ellagitannins and Acutissimins. The concentration of Acutissimins in red wine aged with oak chips was about 2 mg/L.