STIMA DELLA MATURITÀ FENOLICA DELLE UVE ROSSE CON IL METODO ITV

Laure CAYLA[1], Romain RENARD[2]
ITV France – [1]Centre de Recherche et d'expérimentation sur les vins rosés – 70 av du Président Wilson – 83550 Vidauban ; [2] Station Régionale Midi-Pyrénées – V'innopôle – BP 22 – 81310 Lisle sur Tarn

La determinazione della data ottimale di raccolta, cioè del momento in cui le uve presentano il potenziale enologico più elevato, resta tutto sommato uno degli obiettivi principali della moderna viticoltura, dal momento che la qualità del vino dipende in modo fondamentale dalla qualità della materia prima. Per aiutare il produttore nella sua scelta dell'istante più propizio, sono stati sviluppati degli strumenti di valutazione della qualità dell'uva basati sulla determinazione di un market qualitativo durante il periodo di maturazione.

I criteri analitici classici, come il tenore in zucchero, l'acidità totale ed il pH, hanno per lungo tempo prevalso come indicatori privilegiati dello stato di maturità, soprattutto in ragione della facilità della loro determinazione analitica. La loro pertinenza è tuttavia messa in dubbio in molte situazioni, in particolare in quelle ove una certa varietà è coltivata in condizioni che non le permettono di esprimersi pienamente. In questi casi si nota una forte discrepanza tra l'informazione fornita e la realtà qualitativa dell'uva (materia colorante, tannini, aromi). Nel caso delle uve rosse, l'osservazione dell'evoluzione dei composti fenolici durante la maturazione s'impone come una tecnica complementare interessante, per non dire necessaria.

L'ITV Francia, attraverso la sua rete di cinque unità regionali dislocate nelle principali regioni vinicole francesi, ha svolto un lungo lavoro di messa a punto e di validazione di un metodo standardizzato per la determinazione della ricchezza polifenolici nelle varietà rosse francesi, con caratteristiche imprescindibili di affidabilità, semplicità, rapidità della procedura (trattamento di un gran numero di campioni), di sicurezza e di economicità. Ad oggi, siamo in grado di proporre ai tecnici un metodo valicato che permette di individuare in modo del tutto soddisfacente la maturità ottimale delle varietà studiate e di vendemmiate nel rispetto dell'annata e del terroir.

1 – Gli antociani e la maturità fenolica: qualche richiamo

Gli antociani ed i tannini sono le principali classi di composti fenolici presenti nell'uva e nei vini rossi. Essi partecipano in modo importante alle loro caratteristiche organolettiche. Gli antociani appartengono alla famiglia dei flavonoidi, caratterizzati da uno scheletro carbonioso del tipo 2-feil.benzopirone (1,2); gli antociani presenti nelle uve rosse di *Vitis vinifera* sono dei monoglucosidi con nucleo flavilio che si differenziano tra loro per il grado di idrossilazione/metossilazione dell'anello laterale e per la natura dell'acido che esterifica il glucosio (acido acetivo, cumarico o caffeico). Attualmente si contano 17 forme di antociani, di cui 5 glucosilate, 3 acetilate, 5 cumaroilate e 2 caffeoilate (3). Le forme aglicone degli antociani sono chiamate antocianidine. Il colore di queste molecole dipende dalla loro struttura chimica, dalle condizioni del mezzo (pH) e dalle loro interazioni con altri costituenti (4,5,6). Queste caratteristiche cromatiche particolari sono state sfruttate nello sviluppo dei principali metodi di dosaggio globale degli antociani. Così, il metodo Stonestreet utilizza la capacità del biossido di zolfo di combinarsi con gli antociani per dare un prodotto incolore, ed il metodo Puissant-Léon si basa sul principio secondo il quale a pH molto acidi la maggioranza degli antociani sono presenti in forma flavilio di colore rosso (7).

Gli antociani sono localizzati nei vacuoli delle cellule della buccia, nei primi strati cellulari dell'ipoderma (8). Essi appaiono nell'uva all'inizio della fase di invaiatura, e subiscono un'evoluzione in tre tappe durante la maturazione: una fase d'accumulo rapida, una fase di stagnazione dove la concentrazione passa per un massimo, ed infine una fase di decremento. Questo modello teorico prevede alcune

eccezioni, ad esempio nei casi di scarso adattamento della vigna al suo ambiente (9). La ripartizione e la qualità dei diversi antociani in *Vitis vinifera* variano in funzione della varietà, delle condizioni pedoclimatiche e delle pratiche colturali. Il 3-glucoside del malvidolo è l'antociano maggioritario e nella varietà Pinot noir non esiste alcun antociani acilato (10, 11). Le quantità globali variano tra 500 e 3000 mg/kg (12).

L'evoluzione dell'accumulo di antociani e dei polifenoli totali durante la maturazione delle uve si è rivelato essere uno strumento interessante per la determinazione della maturità delle uve rosse. Si è potuto osservare che si raggiunge un livello di maturità soddisfacente quando si registra una caduta significativa del tenore in antociani delle uve. In questa fase, la degradazione della parete delle cellule della buccia favorisce la loro diffusione nella fase liquida. Inoltre, si registra nei vinaccioli una caduta importante dei tannini estraibili con forte carattere astringente (13).

Esistono oggi numerosi metodi per la determinazione qualitativa o quantitativa del potenziale fenolico delle uve rosse (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Essi differiscono in rapporto agli obiettivi prefissati (controllo del potenziale fenolico totale o parziale nel corso della maturazione, aiuto all'identificazione della maturità ottimale, stima del potenziale fenolico estraibile e del contributo dei vinaccioli, aiuto alla gestione delle vinificazioni …) ma anche per le tecniche impiegate per il trattamento delle uve. I punti principali di differenziazione delle metodiche sono:

- Il campionamento delle uve in vigna: grappoli interi, porzioni di grappolo, acini singoli;
- Il trattamento del campione: triturazione, centrifugazione, campione utilizzato fresco oppure dopo liofilizzazione;
- L'estrazione dei composti fenolici: da nessuna estrazione aggiuntiva alla triturazione, alla centrifugazione o alla macerazione in diverse condizioni (durata, temperatura, natura della soluzione d'estrazione, agitazione …);
- I metodi di dosaggio delle diverse frazioni fenoliche.

Queste divergenze nella scelta dei principi e delle attrezzature utilizzate hanno un forte impatto sulla semplicità e la rapidità d'esecuzione dell'analisi, sul suo costo e soprattutto sull'informazione che ne deriva.

2 – OTTIMIZZAZIONE DELL'AFFIDABILITÀ DEL METODO ITV STANDARD

Le principali tappe del metodo ITV standard – prelievo, stoccaggio e trattamento delle uve, condizioni di macerazione, metodo di dosaggio degli antociani – sono state oggetto di un lavoro d'ottimizzazione e di verifica da parte delle cinque unità regionali dell'ITV, su diverse varietà d'uva.

2.1 – Scelta di un metodo di campionamento delle uve

Il campionamento delle uve in vigneto non può essere considerato a margine del metodo ITV: è un punto cruciale che merita la dovuta attenzione.

Esistono diversi sistemi di campionamento: grappoli interi, porzioni di grappolo, acini singoli. Il primo metodo è abbastanza distruttivo se si desidera ottenere un campione rappresentativo ad ogni tappa della maturazione. Di conseguenza, nel 1995 e nel 1996 sono stati messi a confronto solamente i metodi che prevedevano raccolta di acini o porzioni di grappolo, utilizzando i seguenti parametri: peso di 200 acini, tenore in zuccheri (o TAVP, titolo alcolometrico volumico potenziale), acidità totale, pH., concentrazione in antociani ed indice dei polifenoli totali. I risultati sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Parametri misurati	Coefficiente di determinazione (r^2) tra i metodi « Porzioni di grappolo » e « acini singoli »
Peso 200 acini (g)	0.94
Zuccheri (TAVP)	0.92
Acidità Totale	0.88
Antociani	0.76
Polifenoli totali (CPT)	0.72

Tabella 1 : correlazione tra i due metodi di campionamento delle uve in vigneto per 5 parametri analitici – annate 1995/1996

Parametri misurati	Ripetibilità dei metodi di campionamento (10 prelievi)					
	« Porzioni di grappolo »			« Acini singoli »		
	Media	Deviazione standard	CV (%)	Media	Deviazione standard	CV (%)
Peso 200 acini (g)	296.3	4.80	1.60	201.5	7.5	3.7
Zuccheri (g/l)	193.3	0.88	0.45	218.8	2.32	1.1
Acidità Totale (g/l)	4.9	0.78	1.59	5.4	0.023	0.4
Antociani (g/kg)	1.6	0.038	2.33	1.8	0.051	2.8
Polifenoli totali (CPT)	5.3	0.16	3.00	9.2	0.24	2.6

Tabella 2 : ripetibilità dei due metodi di campionamento per 5 parametri analitici - 1996

I risultati ottenuti per i 5 parametri analitici misurati sono molto ben correlati tra i due metodi di campionamento (Tabella 1). Le correlazioni sono particolarmente elevate per i criteri analitici classici (zuccheri, acidità) ed il peso degli acini; esse restano soddisfacenti nel caso del tenore in antociani e dei composti fenolici totali.
La ripetibilità dei sistemi di campionamento è stata valutata su 10 lotti di uve prelevati consecutivamente dalla stessa persona. Le differenze osservate tra i campioni per i 5 parametri utilizzati sono scarse, con coefficienti di variazione (CV) che non superano il 4%.

Tali risultati sono stati ampiamente confermati da quelli ottenuti nei Midi-Pyrénées dalla stazione regionale ITV per il metodo “acini singoli” ($CV_{peso\ acini}$ = 3.2 % ; $CV_{antociani}$ = 4 % ; CV_{CPT} = 4.1 %).

Queste osservazioni mostrano che le due modalità di campionamento sperimentate danno un’informazione di tenore ed affidabilità simile (forte correlazione e CV basso). Alla fine, per il metodo ITV standard è stato scelto il sistema di prelievo ad 2acini singoli” a causa della sua semplicità e rapidità.

Abbiamo anche cercato di misurare la riproducibilità del sistema di prelievo ad acini singoli: quando sono rispettate le regole di campionamento (§ 3.1) con un minimo d’attenzione, i coefficienti di variazione per i principali parametri sono inferiori a 5% (peso degli acini, TAVP, AT, antociani, Polifenoli totali).

All’opposto, un campionamento fatto da una persona che non ha preso conoscenza delle regole o che manifesta una scarsa volontà, porta a risultati pochissimo riproducibili, con coefficienti di variazione anche superiori al 15%.

In conclusione, per ottenere risultati attendibili, è auspicabile che tutte le persone destinate al campionamento in vigneto siano sottoposte all'inizio della stagione ad un test di ripetibilità ed in ogni caso è indispensabile che un vigneto sia campionato dalla stessa persona durante l'intera campagna.

2.2 – Il problema dello stoccaggio dei campioni

Si consiglia fortemente di trattare i campioni entro breve tempo dal loro arrivo in laboratorio per ottenere una buona affidabilità del metodo.
Coscienti della difficoltà a rispettare questa regola nella pratica, abbiamo studiato l'influenza di uno stoccaggio prolungato dei campioni sulla qualità dei risultati ottenuti. I campioni sono stati conservati come acini interi o come filtrato dopo macerazione degli stessi (§ 3.3), a temperature controllare (refrigerazione, congelamento) per proporre un trattamento ritardato senza perdita d'informazioni.

2.2.1 – Conservazione degli acini interi per 24 ore a 4°C

Dieci lotti di 200 acini ciascuno sono stati prelevati consecutivamente dalla stessa persona. Cinque lotti sono stati oggetto di un trattamento immediato e gli altri cinque sono stati lavorati dopo 24 ore di stoccaggio in frigorifero a 4°C nel contenitore di prelievo. La composizione degli acini ed il loro peso sono stati modificati dallo stoccaggio. Nelle nostre condizioni è stata registrata una perdita di peso del 12%, un decremento nella concentrazione in antociani del 25%. I composti fenolici non hanno subito variazioni sensibili. Da notare, tuttavia, che tali modificazioni sono relativamente constanti e riproducibili, dal momento che i coefficienti di variazioni registrati dopo 24 ore erano praticamente identici (tabella 3).

2.2.2 – Acini congelati

Quarantatre lotti di 400 acini provenienti da diverse parcelle sono stati ognuno suddiviso in due campioni di 200 acini. La prima porzione è stata trattata appena arrivata al laboratorio, la seconda dopo un periodo di congelamento.

La figura 1 mostra una relazione poco chiara tra i risultati ottenuti sulle uve fresche e quelli ottenuti sul corrispondente campione congelate, relativamente agli antociani ed ai polifenoli totali. Il comportamento non è stabile: in alcuni casi si constata una perdita di antociani a causa del congelamento, in altri casi l'effetto è inverso.

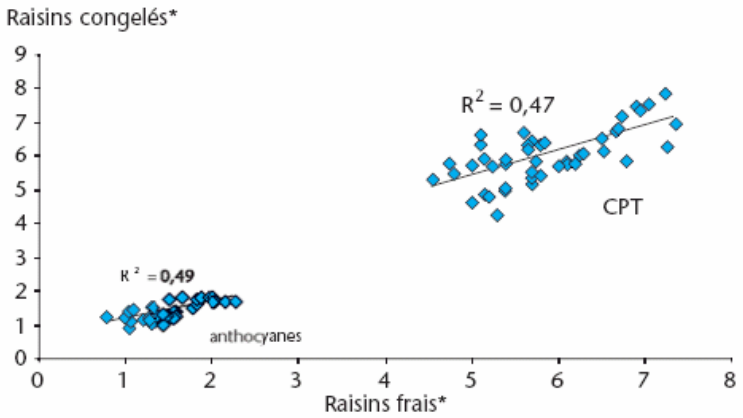

Figura 1- Relazione tra i risultati analitici (antociani e composti fenolici totali) su uve fresche e uve congelate 1994 /1995.

2.2.3 – Conservazione per 24 ore a 4°C dopo triturazione, macerazione e filtrazione

Il metodo ITV standard prevede una tappa di macerazione degli acini dopo frullatura in una soluzione idroalcolica (vedi § 3.3). Il frullato macerato è quindi filtrato su cotone di vetro per recuperare la massa liquida limpida da sottoporre all'analisi. Abbiamo studiato l'evoluzione delle caratteristiche analitiche di questa fase liquida (filtrato) nel caso di uno stoccaggio a 4°C per 24 ore.

I risultati ottenuti per la misura degli antociani e dei composti fenolici totali, prima e dopo la conservazione, mostrano una perfetta correlazione lineare (figura 2). I coefficienti di regressione sono vicini all'unità, il che significa che il filtrato subisce solamente una leggera modifica della sua composizione quantitativa in antociani e composti fenolici totali.

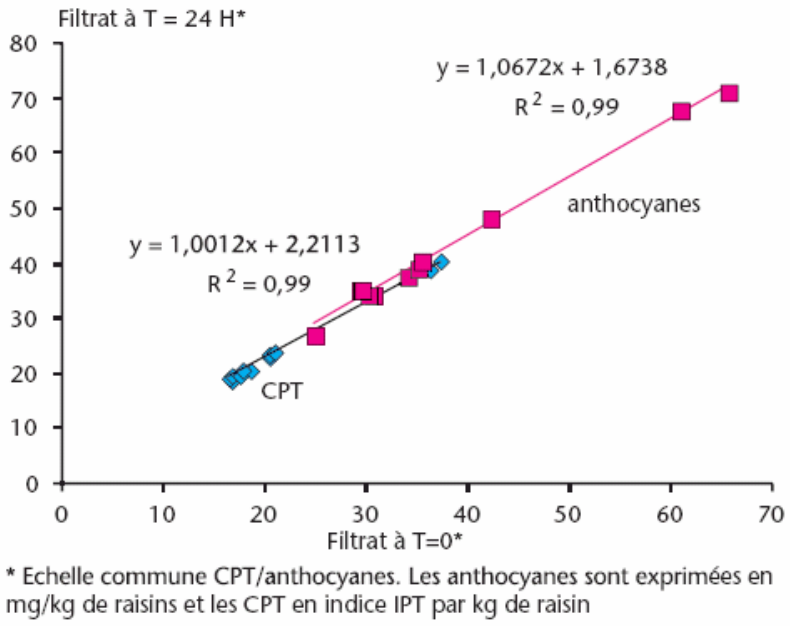

Figura 2- Relazione tra i risultati analitici (antociani e composti fenolici totali) ottenuti su filtrati freschi e dopo stoccaggio a 4°C per 24 ore, 1999

2.2.4 – Conclusioni sulla conservazione dei campioni

Abbiamo visto che le condizioni di conservazione cono molto importanti. Uno stoccaggio non appropriato dei campioni può avere un'influenza molto significativa sul risultato finale.
Il congelamento degli acini prima del trattamento è da evitare, perché porta a risultati poco riproducibili.
La conservazione in frigorifero a 4°C per 24 ore degli acini può essere un'opzione, sapendo che essa provocherà una perdita nei valori di antociani di cui si dovrà tener conto.
Il comportamento del filtrato dopo trattamento del campione è invece molto stabile nell'intervallo di tempo studiato, ma richiede una preparazione tempestiva dei campioni.
In ogni caso, la scelta del sistema di conservazione dei campioni dovrà essere fatta ad inizio stagione ed applicata a tutti i campioni dell'annata.

2.3 – Determinazione dei tempi di macerazione

2.3.1- Macerazione lunga o corta ?

Per identificare il tempo minimo necessario per una totale diffusione degli antociani nelle nostre condizioni operative, abbiamo seguito le cinetiche d'estrazione degli antociani durante macerazione di due ore. Nella risultante figura 3 notiamo che i tenori in antociani non evolvono praticamente più dopo 1 ora di macerazione: il 95% degli antociani diffusibili sono già in soluzione in questo stadio. Non c'è quindi alcuna ragione per prolungare ulteriormente la macerazione. Le misure di ripetibilità della fase di macerazione ci hanno permesso di registrare coefficienti di variazione che non superano il 5% per le misure degli antociani e dei polifenoli totali. Questa tecnica caratterizzata da una resa d'estrazione importante permette una stima affidabile del contenuto in antociani delle uve, indipendentemente dal loro potenziale.

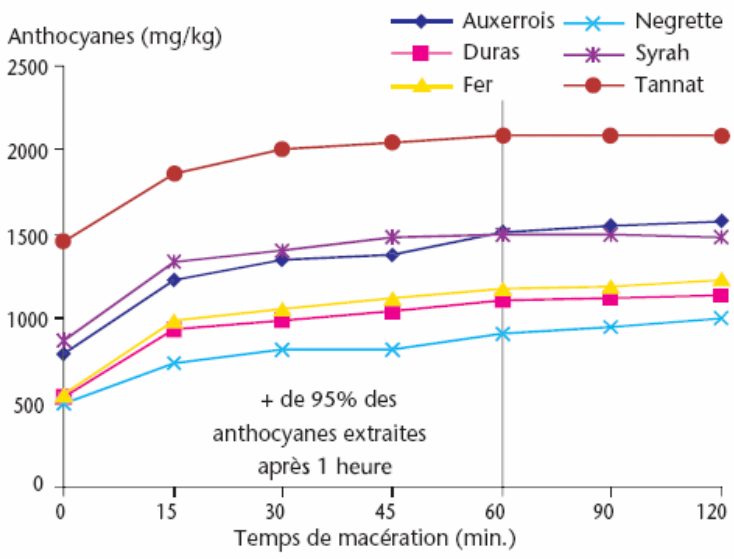

Figura 3- Evoluzione dei tenori in antociani nel corso della macerazione del frullato in una soluzione idroalcolica, Risultati su 6 varietà dei Midi-Pyrénées, 1999

2.3.2 – Si può fare a meno della macerazione ?

Il dosaggio degli antociani e dei composti fenolici totali è stato realizzato anche immediatamente dopo la frullatura. In questa fase, la concentrazione in antociani della fase liquida rappresenta, secondo la varietà, dal 46 al 64% della concentrazione osservata dopo 2 ore di macerazione. La ripetibilità è buona dal momento che è inferiore al 5%. Se è necessario guadagnare tempo nell'applicazione della metodica, è possibile quindi evitare la macerazione. Tuttavia, vista la minore resa nell'estrazione, si consiglia di applicare questa "scorciatoia" solamente sulle varietà con forte potenziale in antociani.

2.4 – Metodi per il dosaggio degli antociani: decolorazione con SO_2 o Puissant-Léon ?

L'ottimizzazione del metodo passa necessariamente attraverso l'adozione di una tecnica di misura degli antociani che sia precisa e rapida. In tale ottica, abbiamo messo a confronto i due principali metodi di dosaggio globale degli antociani per spettrometria nel visibile: il metodo Stonestreet

(decolorazione al diossido di zolfo) ed il metodo Puissant-Léon (acidificazione del mezzo) (20) analizzando l'affidabilità e la ripetibilità dei risultati ottenuti.

2.4.1- Correlazione tra i due metodi di dosaggio

Le osservazioni pluriennali effettuate dalla rete ITV Francia mostrano una relazione molto forte tra le due metodiche di dosaggio degli antociani ($R^2 < 0,95$) (Figura 4). I risultati ottenuti sono comparabili ma non identici in valore assoluto. Il metodo Puissant-Léon sottostima del 20% circa il tenore in antociani, fenomeno che trova spiegazione non nel principio del metodo quanto piuttosto nei coefficienti di conversione dei valori d'assorbanza a 520 nm in quantità d'antociani espressi in mg/l applicati nei due metodi. NB quando si effettuano i dosaggi con il metodo Stonestreet, bisogna sostituire nella formula di calcolo il coefficiente 701 a 870 per ottenere i valori comparabili a quelli del metodo Puissant-Léon. Inversamente, i dati ottenuti da quest'ultimo metodo devono essere aggiustati con il coefficiente 28,25 invece di 22,76 per ottenere valori secondo la scala di Stonestreet).

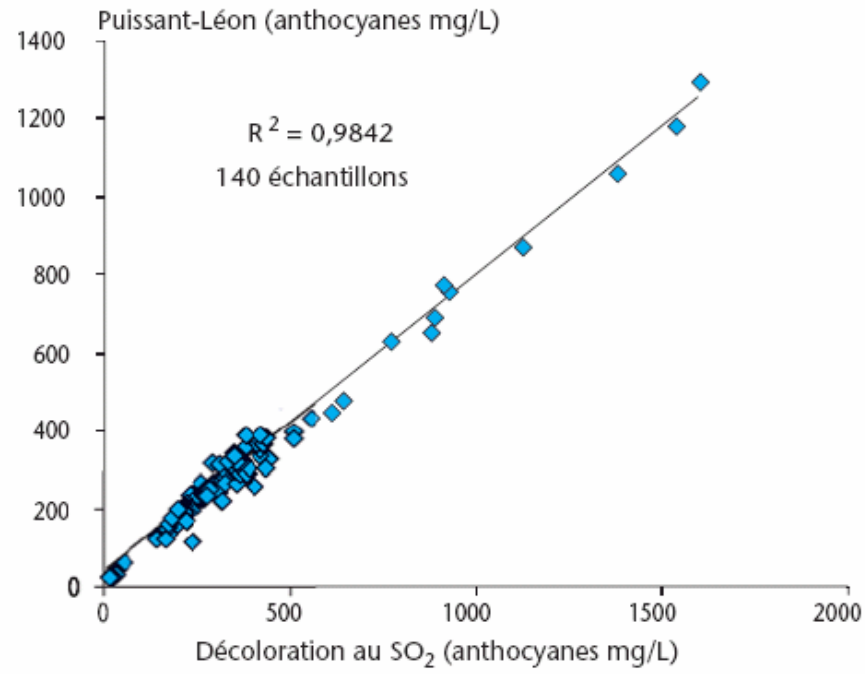

Figura 4- Esempio di relazione tra le misure degli antociani secondo i metodi Stonestreet e Puissant-Léon, 1999

2.4.2 – Ripetibilità del metodo di dosaggio

Nel corso di due annate consecutive è stata saggiata l'affidabilità dei metodi di dosaggio degli antociani. Partendo da una soluzione d'estrazione, abbiamo praticato 10 misure consecutive. Il trattamento dei dati ci ha permesso di stimare la precisione (intervallo di confidenza) ad 95% di probabilità e la variabilità(coefficiente di variazione) dei due metodi. Abbiano riassunto nella tabella 4 i risultati dei dosaggi effettuati su due diversi estratti nel 2000.

		Media (antociani in mg/L)	Deviazione standard	Intervallo di confidenza (in %)	C.V. (in %)
Serie n°1 10 ripetizioni	Puissant-Léon Stonestreet	321.9 438	2.98 9.4	2.2 4.9	1 2.3
Serie n°2 10 ripetizioni	Puissant-Léon Stonestreet	318 439	1.95 10.6	1.4 5.5	0.6 2.5

Tabella 4 – Ripetibilità dei metodi di dosaggio degli antociani - 1999

I due metodi presentano un grado di precisione molto buono, con un coefficiente di variazione che non supera il3%. Il metodo Puissant-Léon sembra tuttavia il più preciso con un intervallo di confidenza più ridotto, compreso tra ± 2 % contro ± 5 %. A parità di precisione ed affidabilità, il metodo Puissant-Léon s'impone in ragione della messa in opera più semplice e più rapida.

2.5 – Automazione del dosaggio degli antociani e dei composti fenolici totali

Nel quadro di un uso routinario del protocollo di stima della ricchezza polifenolici, la gestione delle analisi manuali diventa delicata. Il metodo è stato quindi adattato ed ottimizzato per l'uso di un preparatore di campioni Gibson. L'apparecchiatura automatizzata Gilson realizza la preparazione dei campioni (diluizione a 1/100 e preparazione delle provette per il dosaggio degli antociani) ed assicura il loro posizionamento nel caricatore dello spettrofotometro. Una connessione RS 232 tra lo spettrofotometro ed un software specifico permette l'acquisizione in continuo dei dati che, trasferiti su una tabella, possono essere elaborati con facilità.
L'automazione del metodo permette un guadagno importante di tempo (60 campioni processati in 6 ore) e migliora la precisione delle misure. Un tecnico deve tuttavia sorvegliale le operazioni ed assicurare le relazioni tra le diverse tappe (preparazione dei campioni, lettura delle assorbanze). Tuttavia, il costo dell'attrezzatura necessaria (apparecchio Gibson: 80KF e spettrofotometro 50 KF) non si può pensare se non in caso di analisi di routine.

2.6 – Ripetibilità del metodo ITV nel complesso

Dopo avere passato in rassegna le principali tappe del metodo ITV, abbiamo studiato la sua ripetibilità globale, quindi l'insieme delle fasi dal trattamento delle uve all'arrivo in laboratorio fino al dosaggio dei composti fenolici. Il lavoro è stato realizzato nel corso di due campagne consecutive (1999 e 2000) secondo il seguente protocollo: un lotto di 2000 acini è stato prelevato dalla stessa persona e suddiviso in 10 campioni di 200 acini ciascuno. Ogni campione è stato preparato in modo indipendente nello stesso giorno e dalla stessa persona. Partendo dai risultati del dosaggio degli antociani, abbiamo calcolato la media delle serie, la deviazione standard oltre all'intervallo di confidenza ed al coefficiente di variazione (tabella 5). Questa operazione è stata ripetuta due volte nel 2000.

	1999	2000	
		1° Serie	2°Serie
Campioni di 200 acini	10	10	10
Media (antociani in mg/kg)	315.7	299.1	302.9
Deviazione standard	11.7	8.6	7.9
C.V. %	3.7	3.0	2.7
Intervallo di confidenza % (5%)	8.5	6.9	6.2

Tabella 5 – ripetibilità del metodo ITV standard nel 1999 e nel 2000 per il parametro "antociani"

Si nota che per i principali parametri studiati – tenori in antociani – l'affidabilità del metodo è molto buona risultando inferiore al 5%. La precisione globale del metodo è inferiore al 10%. È da sottolineare che questi valori integrano la variabilità insita nei lotti di 200 acini d'uva. Complessivamente, per un determinato campione, ci si può attendere dal metodo risultati con un buon grado di precisione.

2.7 – Il metodo ITV e le analisi correnti

Sono stati anche messi a confronto, relativamente ai parametri analitici classici (zuccheri, acidità totale e pH) i risultati ottenuti nel mosto in fondo alla vasca (mosto iniziale prima della fermentazione alcolica) con quelli ottenuti da una parte sul succo del frullato (metodo ITV) e dall'altra sul succo di pigiatura (gli acini sono stati schiacciati con una mini-pigiatrice da laboratorio).

La tabella 6 dà un esempio dei risultati ottenuti sulla varietà Mourvèdre.

Zuccheri (g/L)			pH			AT (g H_2SO_4/L)		
Pigiato	Frullato	Fondo vasca	Pigiato	Frullato	Fondo vasca	Pigiato	Frullato	Fondo vasca
225.2	226.4	232.3	3.59	3.97	3.57	4	3.6	4.6
240.3	235.8	246.4	3.5	4.05	3.69	3.6	4	3.6
202.2	204.5	209.1	3.57	3.99	3.60	4.2	3.8	4.4
217.2	224.1	206.8	3.36	3.82	3.51	4.8	3.9	3.8
174.9	180.5	172.6	3.29	3.67	3.28	5.3	4.2	5.8

Tabella 6 : confronto dei valori zucchero, pH ed aciditàtotale sul mosto pigiato, sul succo del frullato e sul mosto di fondo della vasca – 2000

L'effetto più evidente è risultato quello relativo al pH. La pigiatura permette d'avere una buona stima del pH del mosto. La frullatura estrae troppo potassio che aumenta in modo significativo il pH. Il potassio presente nelle bucce reagisce rapidamente con l'acido tartarico della polpa e porta ad una cattiva stima dell'acidità che risente della precipitazione. Un confronto tra le tecniche frullatura e pigiatura su 360 campioni di 200 acini mostra che la frullatura sovrastima i valori di pH del 14% in media e sottostima i valori di acidità totale del 16% medio. Per quanto riguarda gli zuccheri, i risultati delle due tecniche sono simili.

Il metodo ITV non permette dunque di valutare direttamente la maturità della polpa, dal momento che i valori di pH ed acidità totale ottenuti sul frullato sono troppo distanti da quelli constatati sul mosto in vasca. Per potere stimare correttamente l'acidità, dunque, è necessario effettuare le analisi correnti sul succo ottenuto da una pigiatura del campione destinato al metodo ITV.

3 – Pertinenza del metodo ITV standard per la determinazione della maturità fenolica

La determinazione della migliore data di raccolta si basa sull'osservazione dell'evoluzione del tenore in antociani nelle uve durante la maturazione. Si considera che la maturità fenolica è raggiunta all'inizio della fase di surmaturazione delle uve, corrispondente ad una caduta evidente della concentrazione in antociani dopo che hanno raggiunto un massimo. Un grafico dell'evoluzione degli antociani delle uve in funzione del tempo facilita la visualizzazione di questa fase.

Abbiamo voluto verificare la pertinenza del metodo ITV per la determinazione della maturità fenolica seguendo in diverse vigne l'evoluzione degli antociani nel corso della maturazione e praticando varie raccolte successive (5 date) seguite da minivinificazioni standard. I risultati mostrati sono stati ottenuti nel Midi-Pyrénées sulla varietà Duras e Syrah nel 1998.

3.1 – Evoluzione degli antociani durante la maturazione

L'andamento delle curve è simile per le due varietà (Figura 5). Si nota un aumento rapido degli antociani durante i primi 20 giorni di maturazione. Tale aumento continua ancora durante qualche giorno ma non intensità inferiore. A questo stadio il comportamento delle varietà si differenzia: il Syrah impiega 15 giorni a raggiungere la concentrazione massima in antociani, mentre per il Duras sono sufficienti 10 giorni. Successivamente, la caduta degli antociani nel Duras è più rapida che sul Syrah, indicando una maturazione più lenta per quest'ultima. Le cinque date di raccolta sono posizionate nella fase di accumulo degli antociani (D1 e D2), attorno al massimo (D3 e D4) e nella fase di decremento (D5). Analizzando la curva, la maturità fenolica è giudicata ottimale al 22 settembre (D4) per il Duras ed al 6 ottobre (D5) per il Syrah.

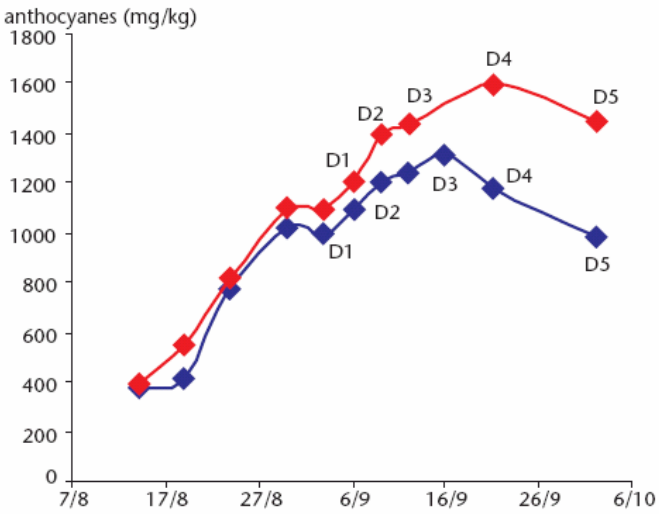

Figura 5 – Evoluzione degli antociani durante la maturazione per due varietà rosse del Midi-Pyrénées (Syrah curva rossa, Duras curva blu), 1999

3.2 – Relazione tra la data di raccolta e le qualità analitiche ed organolettiche del vino

Nelle date di raccolta precoce, esiste una buona correlazione tra la concentrazione in antociani degli acini, stimata con il metodo ITV e quella che si ritrova nel vino ottenuto. Viceversa, se si mettono a confronto i dati relativi alle date di raccolta corrispondenti al massimo d'accumulo in antociani ed alla fase di surmaturazione, le correlazioni tra uve e vino non sono più così evidenti. I vini elaborati a partire da uve in leggera surmaturazione (D4 per il Duras e D5 per il Syrah) presentano tenori in antociani superiori a quelli misurati sui vini ottenuti da vendemmie più precoci che sembravano avere un potenziale in antociani maggiore. Questo fenomeno è da attribuirsi all'evoluzione dell'estraibilità dei pigmenti durante la fase di maturazione del frutto.

Data di raccolta	DURAS			SYRAH		
	Antociani		Classificazione secondo il criterio « qualità globale »	Antociani		Classificazione secondo il criterio « qualità globale »
	Uve (mg/kg)	Vini (mg/L)		Uve (mg/kg)	Vini (mg/L)	
D1	995	543	3	1090	690	4
D2	1200	607	2	1400	840	5
D3	1310	627	3	1430	836	3
D4	1180	685	1	1590	929	2
D5	980	601	4	1450	1058	1

Tabella 7: relazione tra la data di raccolta e le caratteristiche analitiche ed organolettiche dei vini, 1998.

La degustazione dei vini mostra chiaramente il giudizio positivo dei degustatori per i vini derivanti da uve raccolte a maturità ottimale (tabella 7): ad essi sono attribuiti aromi di frutta intensi e piacevoli, un gusto pieno e ben equilibrato, un colore sostenuto. Una raccolta troppo tardiva (Duras D5) sembra nuocere all'espressione aromatica con note di frutta cotta o sciroppata troppo pronunciate. Le raccolte più precoci sono penalizzate da un leggero disequilibrio in bocca e dalla presenza di tannini ruvidi.

4 – Descrizione del metodo

Il metodo ITV standard è basato su una micromacerazione in mezzo idroalcolico acido, a temperatura ambiente, che mima i fenomeni che intervengono in una vinificazione standard. In qualche ora, si stima la quantità totale dei composti fenolici, ma anche la facilità con cui si estraggono dalle bucce.
Un controllo regolare dell'evoluzione dei polifenoli, effettuato attraverso un prelievo settimanale oppure due all'approssimarsi della vendemmia, permette di determinare la fase ottimale di maturità. Teoricamente, essa corrisponde al momento in cui le concentrazioni in antociani nelle uve si riducono in modo significativo dopo avere toccato un massimo.

4.1- Campionamento in vigneto

Si selezionano 100 piante esenti da malattie del legno o da virosi, posizionate in due filari che siano rappresentativi del vigneto. Si prelevano 2 acini per pianta, uno su ogni lato di esposizione, alternando la zona di prelievo in modo da rappresentare l'eterogeneità dell'uva sulla stessa pianta – posizione dell'acino nel grappolo, posizione del grappolo sul tralcio, zona d'inserzione del tralcio sul tronco. I 200 acini così ottenuti deposti in un contenitore tappezzato di carta assorbente. Il trasporto viene effettuato in una borsa termica con ghiaccioli.

4.2 – Preparazione dei campioni all'analisi

4.2.1- Enumerazione, pesata degli acini e frullatura

Se il campionamento è stato fatto dopo una pioggia, gli acini vengono asciugati con carta assorbente ed un asciugacapelli. Gli acini sono quindi contati e pesati in modo preciso per potere esprimere il tenore in antociani per acino o per unità di massa. Gli acini sono quindi frullati con l'aiuto di un mixer del tipo "blender" per due minuti a velocità ridotta.

4.2.2 – Estrazione dei composti fenolici attraverso la macerazione

Si preleva una frazione del frullato – circa 50 g – che si pesa con esattezza e che si mette a macerare in una soluzione idroalcolica (15 ml di alcool a 95%, 85 ml di HCl allo 0,1%) per un'ora a temperatura ambiente con agitazione ogni quarto d'ora. Il frullato macerato è quindi filtrato su lana di vetro o

centrifugato, ottenendone una soluzione limpida, condizione necessaria per le successive misure allo spettrofotometro. La filtrazione su lana di vetro non apporta alcuna modifica al contenuto in polifenoli dell'estratto.

4.3 – Dosaggio degli antociani e misura dell'IPT

I composti fenolici totali sono stimati attraverso la misura dell'assorbanza a 280 nm in una cuvetta in quarzo da 1 cm, dopo aver diluito 1/100 l'estratto. La concentrazione in antociani viene stabilita con il metodo "Puissant-Léon", determinando l'assorbanza a 520 nm in una cuvetta da 1 cm dopo avere acidificato l'estratto con diluizione 1/20 utilizzando HCl all'1% in peso. Il potenziale in antociani viene espresso in mg/kg di uva.

5 – Conclusioni

Il metodo per la determinazione della ricchezza in antociani messo a punto dall'ITV è interessante sotto diversi punti di vista.
Esso è il risultato della collaborazione tra diversi centri ITV, ed è stato messo a punto sulla base di dati che provengono da diverse regioni vinicole e quindi da diverse varietà, condizioni pedoclimatiche e pratiche colturali. Non è quindi uno strumento di muso limitato ad una particolare regione o varietà d'uva.
La procedura d'analisi è rapida e semplice. Tutte le operazioni che potevano permettere un risparmio di tempo sono state ottimizzate in questo senso, facendo tuttavia attenzione a non perdere l'integrità delle informazioni. Di conseguenza, i tempi di necessari per il dosaggio degli antociani e per la macerazione sono stati ridotti alla metà. Inoltre, si può pensare di eliminare del tutto la fase di macerazione nel caso di varietà a forte potenziale in antociani.
Abbiamo dimostrato che l'analisi può essere automatizzata.
Le principali tappe della metodica sono state studiare nel dettaglio per verificare la loro precisione e ripetibilità. Si è giunti così ad un'analisi la cui variabilità globale non supera il 5% nelle normali condizioni operative.
Essa permette di identificare con buon grado d'affidabilità la zona ottimale di maturità fenolica, di ottenere informazioni sul potenziale dell'annata rispetto al dato storico oppure di un vigneto all'interno di una proprietà.
La pigiatura delle uve prima della frullatura fornisce una misura pertinente dell'acidità e del pH del mosto senza la necessità di prelevare più campioni dallo stesso vigneto.
Il metodo ITV non è sostitutivo ai classici di criteri di determinazione della maturità, ma si propone come fonte d'informazioni complementari di grande utilità.

Riassunto

Da alcuni anni l'ITV France lavora su una metodica di stima del potenziale fenolico dell'uva rossa, denominata metodo ITV Standard. Essa fornisce al viticoltore un'informazione pertinente e complementare a quelle normalmente ottenute con il controllo di maturità che riguarda gli zuccheri e l'acidità totale. Attraverso uno studio approfondito delle diverse tappe del metodo è stato possibile ottimizzarlo e renderlo più affidabile.

Le condizioni di campionamento, di trasporto e di stoccaggio dei campioni sono state precisate ; la fase di macerazione delle uve in soluzione alcolica è stata ridotta ad un'ora e nel caso di uve con forte potenziale colorante essa diventa facoltativa ; il dosaggio degli antociani viene fatto con il metodo Puissant-Léon che ha una procedura semplice, rapida, affidabile ed automatizzabile (in modo da potere analizzare 60 campioni in 6 ore). La ripetibilità del metodo, dal campionamento al dosaggio degli antociani, è molto buona, con un coefficiente di variazione inferiore al 5%.

Ringraziamenti
Gli autori desiderano ringraziare le persone che hanno partecipato al programma di ricerca:
C. Liadouze, E. Vinsonneau unità I.T.V. Bordeaux, J. Marsault, F. Etienne unità I.T.V. d'Angers, J. Beguin, A. Bruetchy, P. Poupault unità I.T.V. di Tours, S. Grivot, V. Bouckenooghe unità di Nîmes, J.Y. Cahurel unità I.T.V. di Villefranche sur Saône, B. Barthelemy, F. Davaux, E. Serrano unità I.T.V. di Gaillac, B. Labarbe della SICAREX Beaujolais.
Inoltre, un ringraziamento ai aprtner finanziatori:ANDA, ONIVINS, Conseils Régionaux nel quadro dei contratti Stato/Regioni, Comités interprofessionnels e syndicats viticoles…

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

(1) RIBEREAU-GAYON P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris, 254 p.
(2) FLANZY C., 1998. OENOLOGIE. Fondements scientifiques et technologiques. Editions Tec et Doc, Paris, 1310 p.
(3) LABARBE B., 2000. Le potentiel polyphénolique de la grappe de Vitis vinifera var. Gamay noir et son devenir en vinification beaujolaise. Thèse de doctorat, ENSAm.
(4) CABRITA L., FOSSEN T., ANDERSEN O.M., 2000. Colour and stability of six common anthocyanidin 3-glucosides aqueous solutions. Food Chem., 68, 101-107.
(5) MAZZA G., BROUILLARD R., 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chem., 25, 207-225.
(6) BROUILLARD R., 1982. Chemical structure of anthocyanins. In : Anthocyanins as food colors. Academic Press, New York, p. 1-40.
(7) RIBEREAU-GAYON J. ET P., PEYNAUD E., SUDRAUD P., 1972. Dosage des anthocyanes dans les vins rouges. Sciences et Techniques du Vin. Tome 1, p. 497-499.
(8) AMRANI-JOUTEI K., 1993. Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin. Etude de leur extractibilité. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II.
(9) RIBEREAU-GAYON P., GLORIES Y., DUBOURDIEU D.,
MAUJEAN A., 1998. Traité d'oenologie – Chimie du vin. Stabilisation et traitement. Editions Dunod, Paris.
(10) SOUQUET J.M., CHEYNIER V., SARNI-MANCHADO P., MOUTOUNET M., 1996. Les composés phénoliques du raisin.
J. Int. Sci. Vigne Vin. La viticulture à l'Aube du IIIe Millénaire. N° hors série, 99-107.
(11) LANARIDIS P., BENA-TZOUROU I., 1997. Etude des variations des anthocyanes pendant la maturation des raisins de cinq cépages rouges, cultivés en Grèce. J. Int. Sci. Vigne Vin, 31, N°4, 205-212.
(12) BOURSEIX M., 1974. Les anthocyanes du raisin et du vin. Vignes et vin, N° spécial.
(13) SAINT-CRICQ DE GAULEJAC N., VIVAS N., GLORIES Y., 1998. Maturation phénolique des raisins rouges. Relation avec la qualité des vins. Comparaison des cépages Merlot et Tempranillo. Progrès Agricole et Viticole, 115, N° 13-14.
(14) ARONZAZU, ALONSO, MISTOU, 1996. Etude des conditions d'extraction des anthocyanes et des tanins du Pinot Noir au cours de la maturation. Mise au point d'un indice d'extractibilité. I.U.V.V. Jules Guyot. Laboratoire d'oenologie de Dijon. Mémoire de fin d'étude. Ecole Supérieure d'Agriculture de Barcelone.
(15) DUPUCH V., 1996. Appréciation de la matière phénolique des vins rouges – Application à la détermination de la date de récolte. Chambre d'Agriculture de la Gironde. Service Vigne.
(16) GUNATA Z. ET AL., 1987. Détermination de la qualité de la vendange par sa richesse en composés phénoliques. Applications à la vinification. Revue Française d'OEnologie n°107 p. 7-13
(17) ROSON J.P., 1988. Composition des raisins en anthocyanes et en tanins et qualité de la vendange. Application au vignoble de Cahors – Progrès Agricole et Viticole n°24.
(18) RIOU V., ASSELIN C. Potentiel polyphénolique disponible du raisin. Estimation rapide par extraction partielle à chaud – Compte rendu interne INRA – Centre d'Angers – Unité de recherches sur la vigne et le vin.
(19) VENENCIE C., UVEIRA M-N., GUIET S., 1997. Maturité phénolique du raisin : mise en place d'une méthode d'analyse de routine. Revue Française d'OEnologie n°167.
(20) BLOUIN J., 1992. Techniques d'analyses des moûts et des vins. Ed. Dujardin-Salleron. Paris. p. 199-201.