

AGROTUR



BIOAKTIVNE SPOJINE TERANA

Simpozij AGROTUR

Ljubljana, 28. november 2012

Zbornik prispevkov simpozija

www.agrotur.si

LE SOSTANZE BIOATTIVE DEL TERRANO

Simposio AGROTUR

Ljubljana, 28 novembre 2012

**Atti del congresso –
pubblicazioni scientifiche**

www.agrotur.it



2007-2013
cooperazione territoriale europea
programma per la cooperazione
transfrontaliera
Italia-Slovenia
evropsko teritorialno sodelovanje
program čezmejnega sodelovanja
Slovenija-Italija



Investiamo nel
vostro futuro!

Naložba v vašo
prihodnost!

www.ita-slo.eu

Progetto cofinanziato dal Fondo europeo di
sviluppo regionale
Projekt sofinancira Evropski sklad
za regionalni razvoj

Organizator

Kmetijski inštitut Slovenije
Università degli Studi di Trieste
Univerza v Novi Gorici
Università degli Studi di Udine
Združenje Konzorcij kraških pridelovalcev terana
Consorzio Tutela Vini Collio e Carso

Izdal in založil

Kmetijski inštitut Slovenije
Ljubljana, Hacquetova ulica 17
Urednik dr. Klemen Lisjak
Vsi prispevki v zborniku so recenzirani

Recenzenti prispevkov

doc. dr. Andreja Vanzo
dr. Dejan Bavčar
dr. Paolo Sivilloti

Naklada 500 izvodov

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

663.222(082)

AGROTUR simpozij. 1 (2012 ; Ljubljana)

Bioaktivne spojine terana : zbornik prispevkov simpozija =
Le sostanze bioattive del terrano : raccolta di saggi del simposio
/ 1. Agrotur simpozij = 1. simposio Agrotur, Ljubljana 2012 ;
[organizator Kmetijski inštitut Slovenije ... [et al.] ; urednik
Klemen Lisjak]. - Ljubljana : Kmetijski inštitut Slovenije, 2012

ISBN 978-961-6505-62-8

1. Gl. stv. nasl. 2. Vzp. stv. nasl. 3. Lisjak, Klemen 4. Kmetijski
inštitut Slovenije
264318208

Zbornik prispevkov s simpozija je nastal v sklopu projekta Agrotur, ki je sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 iz Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev. Gli atti del presente simposio sono stati realizzati nell'ambito del progetto Agrotur, progetto finanziato dal Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013, dal Fondo europeo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali.

Za vsebino pričujoče publikacije so odgovorni izključno projektni partnerji. Vsebina publikacije ne odraža nujno stališča Evropske unije. Il contenuto della presente pubblicazione è di esclusiva responsabilità dei partner progettuali e non rispecchia necessariamente le posizioni ufficiali dell'Unione europea.



BIOAKTIVNE SPOJINE TERANA



Simpozij AGROTUR

Ljubljana, 28. november 2012

Zbornik prispevkov simpozija

www.agrotur.si



LE SOSTANZE BIOATTIVE DEL TERRANO



Simposio AGROTUR

Ljubljana, 28 novembre 2012

**Atti del congresso –
pubblicazioni scientifiche**

www.agrotur.it

Ljubljana 2012

Kazalo vsebine

Biološka uporabnost in aktivnost pigmentov grozdja pri živalih: implikacije za zdravje ljudi

S. Fornasaro, F. Tramer, L. Žiberna, S. Passamonti

Odkrivanje učinkov vinogradniških tehnologij pri sorti refošk

P. Sivilotti, L. Butinar, A. Jež, J. Tronkar, M. Turk, A. Vanzo, K. Lisjak

Polifenolni potencial terana

A. Vanzo, K. Šuklje, M. Jenko, F. Čuš, D. Bavčar, K. Lisjak

Transport flavonoidov kot indikator zrelosti grozdja sorte refošk

A. Bertolini, E. Petrusa, E. Braidot, C. Peresson, M. Zancani, U. Rajčević, P. Sivilotti, A. Vanzo, K. Lisjak, A. Vianello

Spojine, ki jih v vinu ne želimo

H. Baša Česnik, Š. Velikonja Bolta, V. Žnidaršič Pongrac, F. Čuš, L. Butinar, A. Rakar, R. Žabar, P. Trebše, M. Franko, K. Lisjak

Tabella dei contenuti

Disponibilità e attività dei pigmenti dell'uva negli animali: implicazioni per la salute umana

S. Fornasaro, F. Tramer, L. Žiberna, S. Passamonti

Effetti della gestione della chioma sulla produttività delle uve refošk

P. Sivilotti, L. Butinar, A. Jež, J. Tronkar, M. Turk, A. Vanzo, K. Lisjak

Potenziale polifenolico del terrano

A. Vanzo, K. Šuklje, M. Jenko, F. Čuš, D. Bavčar, K. Lisjak

Trasporto di flavonoidi quale indicatore di maturazione nell'uva refosk

A. Bertolini, E. Petrusa, E. Braidot, C. Peresson, M. Zancani, U. Rajčević, P. Sivilotti, A. Vanzo, K. Lisjak, A. Vianello

Sostanze che non vogliamo nei vini

H. Baša Česnik, Š. Velikonja Bolta, V. Žnidaršič Pongrac, F. Čuš, L. Butinar, A. Rakar, R. Žabar, P. Trebše, M. Franko, K. Lisjak



Biolška uporabnost in aktivnost pigmentov grozdja pri živalih: implikacije za zdravje ljudi

1, 2, 3, 4 Oddelek za
življenjske znanosti,
Univerza v Trstu,

Fornasaro (1) dr.,
via L. Giorgieri 1,
34127 Trieste

Tramer (2) dr., prav tam

Žibera (3) dr., prav tam

Passamonti (4) prof. dr.,
prav tam

Stefano FORNASARO¹, Federica TRAMER², Lovro
ŽIBERNA³, Sabina PASSAMONTI⁴

Izvleček

Čeprav so antociani prisotni v velikih količinah v sadju in zelenjavi, so v krvni plazmi in tkivih prisotni le v sledovih in zgolj kratek čas po zaužitju. Kljub temu imajo močan vpliv na celično presnovo in delovanje organov. Obstajajo številni klinično-epidemiološki dokazi, ki podpirajo njihovo vlogo pri krepitvi zdravja. Iz omenjenih razlogov lahko antociane v hrani obravnavamo kot mikrohranila.

Ključne besede: antociani, dieta, flavonoidi, mikrohranila

Bioavailability and activity of grape pigments in animals: implications for human health

Abstract

Even though anthocyanins are abundant in fruits and vegetables, they are found in plasma and tissues only in trace amounts and transiently after their intake. However, they profoundly affect cellular metabolism, organ functioning, and have epidemiological evidence supporting their health-promoting effects. For these reasons, dietary anthocyanins might be seen as micronutrients.

Keywords: anthocyanins, diet, flavonoids, micronutrients

Uvod

Antociani so največja skupina vodotopnih pigmentov v rastlinah, ki daje sadju, zelenjavi, cvetju in žitom različne barvne odtenke, od rdeče do modre. Prisotni so v hrani, ki se široko uporablja, npr. borovnicah in rdečih pomarančah, in v pijači, kot so sadni sokovi ter rdeča vina. Te molekule najdemo v izobilju tudi v industrijskih pripravkih hrane in pijače, kjer so dodani kot naravna barvila (E163 N) ter prehranska dopolnila. V kislih pH-pogojih imajo antociani optimalno kemijsko stabilnost.



Antociani so relativno velike molekule, ki tehtajo okoli 500 Da, so izrazito hidrofilnega značaja ter tvorijo obsežno skupino flavonoidov iz približno 400 sorodnih spojin. Njihova osnovna kemijska struktura sestoji iz poliaromatskega osnovnega skeleta z različno stopnjo hidroksilacije ali metoksilacije ter z različnim vzorcem pritrjenih sladkorjev na osnovni aglikon (antocianidin). Antocianski pigmenti, prisotni v rdečem vinu, sestojijo iz diglukozidov, monoglukozidov, aciliranih monoglukozidov in aciliranih diglukozidov peonidina, malvidina, cianidina, petunidina in delfinidina.

Ocenjujemo, da se dnevni vnos antocianov pri ljudeh giblje med 3 in 215 mg/dan, vendar novejša študije kažejo na povprečni vnos 57–69 mg/dan.

Leta 1988 je Haslam ponovno ovrednotil vlogo polifenolov v rastlinah, ki so bili predhodno obravnavani kot sestavine v živilih brez hranilne vrednosti. Od te študije dalje so polifenoli deležni precejšnje pozornosti zaradi svojega zaščitnega delovanja na zdravje. Dokazi iz raziskav na celicah in živalih kažejo, da imajo antociani in/ali njihovi presnovki pozitiven vpliv na številne kronične bolezni, kot so srčno-žilne bolezni, nevrodegenerativne bolezni in rakava obolenja.

Biološka aktivnost

Kljub zgoraj omenjenim ugodnim lastnostim, ki jih imajo antociani kot sestavine prehrane, so po zaužitju v plazmi in urinu prisotni le v nizkih koncentracijah. Najdemo jih lahko intaktne ali v metilirani, glukuronidirani in/ali sulfatirani obliki.

Večina raziskav je pokazala, da je absorpcija antocianov v črevesnem traktu zelo hitra ; (približno 0,25–2 uri), njihovo izločanje iz telesa pa je zaključeno v 6–8 urah. Najvišje izmerjene koncentracije skupnih antocianov v plazmi pri ljudeh so bile v razponu 1–100 nM, kadar so bili zaužiti odmerki v območju 7–1618 μmol . Pri laboratorijskih živalih se navadno izloči v urinu manj kot 1 % zaužitega odmerka hrane, bogate z antociani, medtem ko so vrednosti pri ljudeh višje, med 1,5 in 5,1 %. Kakor koli že, morebitni obstoj neidentificiranih presnovkov in razgradnih produktov antocianov lahko pomeni, da trenutno podcenjujemo biološko uporabnost antocianov.



Omenjene farmakokinetične lastnosti so določene na podlagi biokemijskega delovanja gastrointestinalnega epitelija. Absorpcija antocianov poteka pretežno v želodcu, z aktivnim transportom preko prenašalcev, kot sta bilitranslokaza (Passamonti et al., 2003) in glukozni prenašalec SGLT1 (Felgines et al., 2008), ter se nadaljuje v tankem črevesu (Talavera et al., 2004). Antociani niso substrati glikozidaz v ščetkastem obrobku črevesnih celic (enterocitov), ki sicer delujejo na druge flavonoidne glikozide. Na luminalni (apikalni) strani enterocitov so prisotni prenašalni proteini, specifični za prenos antocianov, kot je bilitranslokaza, medtem ko na bazolateralni strani ni drugih sekretornih prenašalcev za prenos antocianov iz enterocitov v kri. Na in vitro celičnem modelu črevesnega epitelija Caco-2 celic so ugotovili, da transport intaktnih antocianov črnega ribeza poteka v veliko večjem obsegu preko apikalne membrane kot preko bazolateralne membrane.

Antociani potujejo po črevesnem traktu, dokler ne dosežejo debelega črevesa. Tukajšna črevesna bakterijska flora zagotavlja encime, ki lahko hitro cepijo glikozilne skupine in ustvarjajo aglikone, ki so kemijsko nestabilni, hkrati pa so tudi substrat ostalih encimov, kar vodi do tvorbe preprostih fenolnih derivatov. Presnova s črevesno mikrofloro je pomemben dejavnik, ki nadzoruje biološko uporabnost antocianov.

Ko jih apliciramo intravensko, da bi se izognili presnovi v črevesnem traktu, ugotovimo, da presenetljivo hitro izginejo iz sistemskega krvnega obtoka. Izločajo se preko ekskretornih organov, preko jeter in ledvic, kjer se presnavljajo s pomočjo metilacije in se potem aktivno izločajo z žolčem in urinom.

Dva glavna farmakokinetična dejavnika prispevata k nizki biološki uporabnosti: I) nizek prehod iz črevesnega lumna v kri (slaba absorpcija), II) visok prehod iz krvi v telesne organe (velika porazdelitev).

Eksperimenti v pogojih in vitro so pokazali, da imajo antociani močno biološko aktivnost. Na celičnih kulturah imajo izraženo antioksidativno delovanje pri zelo nizkih koncentracijah (<1 nM); ; na izoliranih aortnih obročkih povzročijo vazodilatacijo v μM -koncentracijskem območju ; na modelu ishemično-reperfuzijske poškodbe na izoliranem srcu delujejo kardioprotektivno do koncentracije 200 nM, višje koncentracije pa izkazujejo koncentracijsko-odvisno kardiotoksičnost, kar kaže na hormetično delovanje



antocianov. Hormeže nismo opazili na celičnih modelih, kar kaže na pomen izvajanja toksikoloških testov, ne samo na preprostih celičnih modelih, ampak po možnosti tudi v kompleksnejših sistemih, kot so izolirani organi.

Trenutno velja, da so za antioksidativno delovanje antocianov znotraj celic odgovorni drugi mehanizmi in ne njihovo delovanje kot neposredni lovilci prostih kisikovih radikalov. Njihova znotrajcelična koncentracija ne dosega stehiometričnega nivoja prostih radikalov, ki nastajajo endogeno v procesu celičnega dihanja ali v poskusih z dodatki snovi, ki tvorijo radikale. Najverjetnejša razlaga je, da delujejo kot znotrajcelični antioksidanti preko številnih mehanizmov, ki jih je treba ovrednotiti glede na tip celic. Dejansko se lahko prevladujoči mehanizem razlikuje po biološki funkciji vpletenih celic. Na primer, v in vivo poskusih na podganah, ki so prejele intravenski bolus cianidin 3-glukozida, je presnova te spojine povzročila blago intrahepatično holestazo zaradi medsebojne kompeticije med peonidin 3-glukozidom (metiliranim derivatom cianidin 3-glukozida) in žolčnimi solmi v procesu izločanja v žolč. Holestaza je kompenzatorno povzročila refluks tauroholata (žolčne soli) v kri, kar je imelo za posledico celično retencijo reducirane oblike glutationa, ki je tekmoval s tauroholatom za sekretorne prenašalce. Končni učinek je povečano znotrajcelično razmerje med reducirano obliko glutationa/oksidirano obliko glutationa, kar pomeni večje znotrajcelično endogeno antioksidativno delovanje.

Ti rezultati lahko razložijo tudi opažanja pri ljudeh. Nedavno so Lionetto in sod. ocenili antioksidativno delovanje vsakodnevnega uživanja ekstrakta antocianov, pridobljenega iz jagodnih kožic rdečega grozdja, na podganah. Njihovi rezultati so pokazali, da so antociani okrepili skupno antioksidativno kapaciteto krvnega seruma, tako v normalnem fiziološkem stanju kot tudi med povečanim oksidativnim stresom, kar kaže na to, da so antociani preventivno sredstvo za zmanjšanje razvoja bolezni srca in ožilja.

Podobna raziskava je pokazala, da uživanje rdečega vina v odmerku 400 ml/dan v obdobju 2 tednov značilno poveča antioksidativni status in zmanjša oksidativni stres pri mladih ter starejših osebah. Ugodni biološki učinki so verjetno posredovani preko več biokemijskih poti in signalnih mehanizmov, ki delujejo samostojno ali sinergistično.

Tsuda in sod. so prvi dokazali zaviralni učinek antocianov na kopičenje telesnih maščob. Določeni flavonoidi ali grozdni sok zavirajo agregacijo in aktivnost trombocitov. Povečana občutljivost na agregacijo trombocitov prispeva k začetku in napredovanju ateroskleroze ter k pojavom trombotičnih dogodkov. Zvišane plazemske vrednosti LDL-holesterola, trigliceridov in znižane vrednosti HDL-holesterola so neodvisno povezane s povečanim tveganjem za razvoj srčno-žilnih bolezni. V nedavni študiji so pokazali, da uživanje visokih odmerkov antocianov (trikrat več kot navadno) normalizira vrednosti HDL-holesterola pri dislipidemičnih posameznikih.

Manjša incidenca različnih kroničnih bolezenskih stanj, kot so npr. srčno-žilne bolezni, je povezana z večjim uživanjem grozdja in njegovih proizvodov (grozdni sok in vino).

Zaključek

Čeprav je antocianov veliko v sadju in zelenjavi, se pojavljajo v plazmi in tkivih le v sledovih. Kljub temu pa imajo močan vpliv na celično presnovo in tako pomembno prispevajo k ravnovesju med zdravjem in boleznijo. Zaradi teh značilnosti lahko antociane obravnavamo kot mikrohranila.

Zahvala

Podprto s strani Evropskega sklada za regionalni razvoj, Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007–2013 (standardni projekt AGROTUR).

Literatura

- Beking, K., and Vieira, A. (2011). An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *Int J Food Sci Nutr* 62(1), 17–9.
- Bornsek, S. M., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrih, N. P., Abram, V., Tramer, F., and Passamonti, S. (2012). Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry* 134(4), 1878–1884.
- Chun, O. K., Chung, S. J., and Song, W. O. (2007). Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137(5), 1244–52.
- Dávalos, A., Bartolomé, B., and Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry* 93(2), 325–330.
- Dohadwala, M. M., and Vita, J. A. (2009). Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr* 139(9), 1788S–93S.

- Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2003). Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr* 133(5), 1296–301.
- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2002). Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J Nutr* 132(6), 1249–53.
- Forester, S. C., and Waterhouse, A. L. (2009). Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *J Nutr* 139(9), 1824S–31S.
- Haslam, E. (1988). Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense –A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14(10), 1789–1805.
- Iriti, M., and Faoro, F. (2009). Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat Prod Commun* 4(5), 611–34.
- Kay, C. D., Mazza, G. J., and Holub, B. J. (2005). Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr* 135(11), 2582–88.
- Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., and Kanner, J. (1998). Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As Detected in Human Urine†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10), 4297–4302.
- Lionetto, M. G., Giordano, M. E., Calisi, A., Erroi, E., De Nuccio, F., and Schettino, T. (2011). Effect of the daily ingestion of a purified anthocyanin extract from grape skin on rat serum antioxidant capacity. *Physiol Res* 60(4), 637–45.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(1), 230S–42S.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., and Holub, B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 50(26), 7731–7.
- McGhie, T. K., and Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 51(6), 702–13.
- Micallef, M., Lexis, L., and Lewandowski, P. (2007). Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 6, 27.
- Passamonti, S., Terdoslavich, M., Franca, R., Vanzo, A., Tramer, F., Braidot, E., Petrusa, E., and Vianello, A. (2009). Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of biliranslocase in animal and plant organisms. *Curr Drug Metab* 10(4), 369–94.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett* 544(1–3), 210–3.
- Prior, R. L., and Wu, X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res* 40(10), 1014–28.

- Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., Cao, L., and Ling, W. (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 90(3), 485–92.
- Selma, M. V., Espin, J. C., and Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* 57(15), 6485–501.
- Shipp, J., and Abdel-Aal, E. S. M. (2010). Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal* 4, 7–22.
- Steinert, R. E., Ditscheid, B., Netzel, M., and Jahreis, G. (2008). Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in using type chambers. *J Agric Food Chem* 56(13), 4995–5001.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2003). Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Stomach in Anesthetized Rats. *J Nutr* 133(12), 4178–4182.
- Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D. P., Steward, W. P., and Gescher, A. J. (2009). Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother Pharmacol* 64(1), 201–11.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., and Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr* 133(7), 2125–30.
- Vanzo, A., Vrhovsek, U., Tramer, F., Mattivi, F., and Passamonti, S. (2011). Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *J Nat Prod* 74(5), 1049–54.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., and Spencer, J. P. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr* 3(3-4), 115–26.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., and Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 54(11), 4069–75.
- Yang, Y., Shi, Z., Rehemian, A., Jin, J. W., Li, C., Wang, Y., Andrews, M. C., Chen, P., Zhu, G., Ling, W., and Ni, H. (2012). Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases. *PLoS One* 7(5), e37323.
- Ziberna, L., Lunder, M., Moze, S., Vanzo, A., Tramer, F., Passamonti, S., and Drevensek, G. (2010). Acute Cardioprotective and Cardiotoxic Effects of Bilberry Anthocyanins in Ischemia–Reperfusion Injury: Beyond Concentration-Dependent Antioxidant Activity. *Cardiovasc Toxicol* 10(4), 283–294.
- Ziberna, L., Tramer, F., Moze, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F., and Passamonti, S. (2012). Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Radic Biol Med*.



Odkrivanje učinkov vinogradniških tehnologij pri sorti refošk

1,2,3,4, Univerza
v Novi Gorici, Center za
raziskave vina

5,6 Kmetijski Institut
Slovenije, Centralni
laboratorij

Sivilotti (1) dr.,
Vipavska c. 13, 5270
Ajdovščina

Butinar (2) doc. dr.,
prav tam

Jež (3), dr., prav tam

Tronkar (4), prav tam

Turk (5), prav tam

Vanzo (6), doc. dr.,
Hacquetova ulica 17,
1000 Ljubljana

Lisjak (7) dr., prav tam

Paolo SIVILOTTI¹, Lorena BUTINAR², Anastazija JEŽ³,
Jan TRONKAR⁴, Mitja TURK⁵, Andreja VANZO⁶, Klemen
LISJAK⁷

Izvleček

Ključni faktor za doseganje optimalne kakovosti grozdja in posledično vin je ravnovesje med listno površino in maso pridelka. S tega vidika sta bila v letu 2012 zastavljena dva poskusa, s katerima smo želeli preveriti učinek agrotehničnih in ampelotehničnih ukrepov na maso pridelka in kakovost grozdja sorte Refoš. Iz prvih rezultatov je razviden jasen vpliv na zmanjšanje mase pridelka ali povečanje soodvisnosti med listno površino/maso pridelka. Med drugim so ukrepi pozitivno vplivali tudi na vsebnost polifenolov.

Ključne besede: refošk, redčenje grozdov, defoliacija v fazi pred cvetenjem, soodvisnost med listno površino/maso pridelka, polifenoli

Discovering the effects of canopy management on Refosk grapes

Abstract

The equilibrium between leaf area and yield has to be considered crucial in order to optimise grape and wine quality. For this reason, in the season 2012 two trials have been carried out aiming to ascertain the effects of different canopy management techniques on yield and grape quality of Refoš grape. Looking at the first results, a clear influence of yield reduction or leaf area-to-yield increase on grape production and quality was observed. Moreover, polyphenols content was found to be positively affected by treatments.

Keywords: Refosk, cluster thinning, pre-flowering leaf removal, leaf area-to-yield rate, polyphenols



Uvod

Refošk predstavlja avtohtono sorto, ki je bila deležna le malo zanimanja s strani raziskovalcev. Zadnji se namreč osredotočajo na maloštevilne mednarodno razširjene sorte. Z vinogradniškega in enološkega vidika žal specifično znanje o Refošku ne obstaja.

Ključni faktor za doseganje optimalne mase pridelka in kakovosti grozdja je ravnovesje rastline same. Kliewer in Dokoozlian (2005) sta izpostavila, kako listna površina od 0,7 do 1,4 m² za kg pridelanega grozdja predstavlja razpon optimalnih variacij za veliko večino vinogradniških tehnologij in načinov gojenja trte. Pri nekaterih izmed posebno produktivnih vinskih sort se ravnovesje dosega s korektivnimi posegi, saj naravno rastlina sama ne sodi v razpon, ki predstavlja optimalno razmerje med listno površino in maso pridelka (Bravdo in sod., 1985; Reynolds, 1989; Guidoni in sod., 2002; Dami in sod., 2006). Prav gotovo je redčenje grozdja ampelotehnični ukrep, po katerem se v vinogradništvu posega najpogosteje, saj omogoča doseganje dobre stopnje uravnoveženosti med maso pridelka in kakovostjo grozdja. Vsekakor pa se enake rezultate lahko doseže z defoliacijo v fazi pred cvetenjem, o kateri obstajajo obširne razprave v bibliografiji (Tardaguila in sod. 2008; Poni in sod., 2009; Sternad Lemut in sod., 2011; Palliotti in sod., 2012). Zaradi stresa, ki ga rastlini povzroči defoliacija številnih fotosintetično učinkovitih listov pred fazo cvetenja, se trta odzove z oploditvijo. Končni rezultat ampelotehničnih ukrepov je grozd z bistveno redkejšimi jagodami.

Četudi so to zgolj preliminarni rezultati, je iz prvih podatkov o eksperimentih na območju Krasa v letu 2012 razvidna vloga uravnovešenega razmerja med listno površino in maso pridelka na produktivnost ter kakovost grozdja sorte refošk.

Materiali in metode

V letu 2012 je bil v okviru projekta AGROTUR/Kraški agroturizem opravljen sklop eksperimentalnih poskusov na kraškem območju. S pomočjo vinogradniških poskusov smo želeli preučiti učinek nekaterih ampelotehničnih del v vinogradu na ravnovesje med listno površino in maso pridelka ter posledice, ki jih ta imajo na kakovost grozdja sorte refošk.

V prvem poskusnem vinogradu, na območju Dutovelj, je bila zastavljena primerjava med naslednjimi ukrepi: K: kontrolna skupina; D: defoliacija (odstranitev 4 do 5 bazalnih listov na vsaki trtni mladiki) pred cvetenjem (25. 5. 2012); R: redčenje grozdja (odstranitev drugega grozda na vsaki trtni mladiki) v fazi obarvanja jagod (2. 8. 2012).

V drugem poskusnem vinogradu na območju Komna je bil zastavljen faktorski poskus, pri katerem se je primerjalo prirezovanje na dveh različnih višinah (brez vršičkanja – 14 listov; vršičkanje – 10 listov na trtno mladiko) z dvema različnima masama pridelka (celotno število grozdov; redčenje grozdov). Oba ampelotehnična ukrepa, sicer prirezovanje listja in redčenje grozdja (odstranitev drugega grozda na vsaki trtni mladiki) sta bila izvedena v fazi zorenja (1. 8. 2012). Opravljena je bila primerjava med ukrepi: FCFB (brez vršičkanja – vsi grozdi); FCHB (brez vršičkanja – zredčeni grozdi); HCFB (vršičkanje – vsi grozdi); HCHB (vršičkanje listje – zredčeni grozdi).

Oba faktorska poskusa sta bila naključno postavljena, s 4 ponovitvami na posamezni ukrep v poskusnem vinogradu v Dutovljah in s 3 ponovitvami na posamezni ukrep v poskusnem vinogradu v Komnu.

V poletnem času je bila določena listna površina, pri čemer so bile glavne mladike skrbno ločene od zalistnikov in je bila opravljena defoliacija v fazi pred cvetenjem. Ob trgatvi so bile opravljene meritve mase pridelka in števila grozdov na posamezno trto.

Vzorčenje se je začelo s fazo polnega zorenja (14. 8. 2012). Do zaključka dozorevanja je bilo ob štirih različnih dneh zbranih od 5 do 6 grozdov na rajon. S stiskanjem se je iz vsakega vzorca pridobilo grozdni mošt, pri katerem je bila izvedena analiza suhe snovi (°Brix), skupnih kislin in pH vrednosti.

Za vsak ampelotehnični ukrep je bilo naključno vzorčeno 200 grozdnih jagod, ki so se zmrznile (-20 °C). Nadalje se je iz vzorca jagod v mešalniku pripravilo grozdno kašo, ki je bila ekstrahirana takoj po odtalitvi. Nato se je z metodo po Gloriesu (1978) določilo stopnjo fenolne zrelosti. Dva 25 g alikvotna dela sta bila nadalje ekstrahirana. Postopek ekstrakcije je bil v prvem primeru izpeljan z dodajanjem 25 ml raztopine s pH-vrednostjo 1,0 (0,1 N HCl, razredčene v destilirani vodi), v drugem primeru pa z dodajanjem 25 ml raztopine s pH vrednostjo 3,2 (5 g vinske kisline in 22 ml NaOH, razredčene v 1 l destilirane vode). Po 4-urnem



postopku ekstrakcije so bili vzorci precejeni in pripravljeni za spektrofotometrične meritve optične gostote pri valovni dolžini 280 nm (vsebnost skupnih polifenolov, VSP) in vsebnosti skupnih izločljivih antocianov (Glories, 1978).

Pri drugem vzorcu so bile kožice in pečke 200 g naključno vzorčenih grozdnih jagod iz reprezentativnega vzorca ločeno izluževane 5 dni pri 30 °C v raztopini vode in etanola. Ekstrakti so bili preprihani z dušikom in shranjeni na 4 °C do spektrofotometričnih analiz, s katerimi so bile določene vsebnosti skupnih antocianov ter taninov z nizko (LMWP - Low Molecular Weight Proanthocyanidins) in visoko (HMWP - High Molecular Weight Proanthocyanidins) molekulsko maso (Rigo in sod., 2000).

Dobljeni rezultati so bili statistično obdelani z z analizo variance (ANOVA test) in nato s pomočjo Student-Newman-Keuls poskustesta ($p < 0,05$).

Rezultati in razprava

Redčenje grozdov in defoliacija pred cvetenjem

Kot je omenjeno v uvodu, se lahko s pomočjo redčenja grozdov ter defoliacijo pred cvetenjem zmanjša maso pridelka. Tudi v primeru poskusa, ki je bil opravljen na sorti Refoš, je bilo doseženo znatno zmanjšanje mase pridelka v primerjavi s kontrolno skupino, pri kateri ni bil uporabljen nobeden od obravnavanih ampelotehničnih ukrepov (Preglednica 1). V primeru redčenja grozdov je bila zmanjšana masa pridelka predvsem posledica manjšega števila grozdov, medtem ko je bila pri defoliaciji pred cvetenjem zmanjšana masa pridelka posledica nižje mase grozdov.

Razlike v listni površini primerjanih ampelotehničnih ukrepov niso bile izrazite niti na začetku rastne sezone (pred defoliacijo; podatki niso podani) niti pri dozorevanju (Tabela 2). Z defoliacijo je bilo dne, 25. 5. 2012, odstranjenih 38 % listja, pri trgatvi pa je bila obnovljena listna površina skoraj v celoti primerljiva s kontrolno skupino. Navadno je odziv rastlin na defoliacijo pred cvetenjem takojšen, pri čemer začnejo te spodbujati rast zalistnikov (Poni in sod., 2008; Tardaguila in sod., 2010). V primerjavi s kontrolno skupino in skupino, v kateri je bilo opravljeno redčenje grozdov, iz opravljenih poskusov ni razvidna povečana

rast zalistnikov pri replikah, na katerih je bila opravljena defoliacija. Zelo verjetno je obdobje suše, ki je zaznamovalo letino, negativno vplivalo na razvoj vegetacije.

Razmerje med listno površino in maso pridelka je bilo uravnoteženo pri kontrolni skupini in ampelotehničnem ukrepu defoliacije, skladno z navedbami Kliewerja in Dokoozliana (2005), medtem ko se je vrednost pri redčenju grozdja nagibala proti vrhu (Preglednica 2), zaradi česar je posledično grozdje začelo dozorevati prej.

Preglednica 1 – Vpliv redčenja grozdov in vpliv defoliacije pred cvetenjem na maso pridelka.

Ukrep	Število grozdov	Masa pridelka (kg/rastlino)	Povprečna teža grozda (g)
K	14,6	4,30 a	292 a
D	15,2	2,59 b	187 b
R	9,67	2,57 b	269 a
<i>Sign. F</i>	<i>n.s.</i>	*	*

K-kontrola, D-defoliacija, R-redčenje

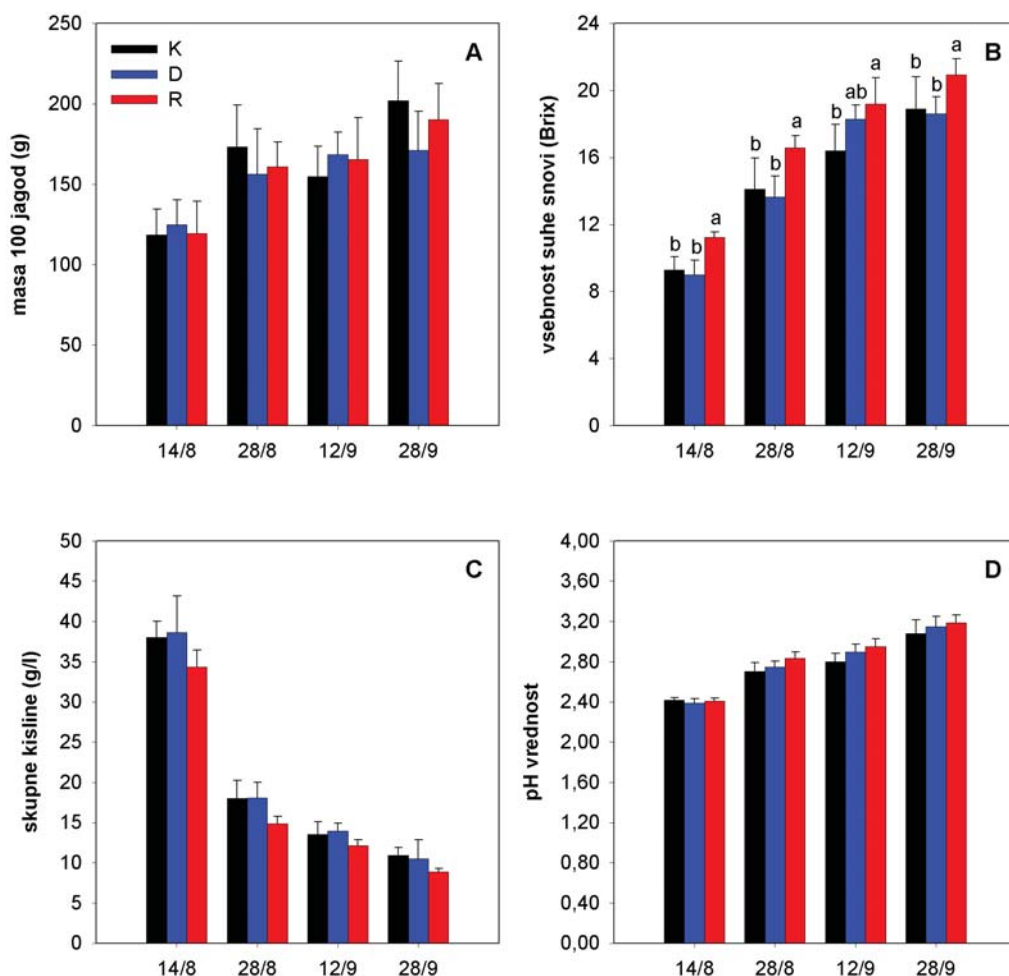
Preglednica 2 – Vpliv redčenja grozdov in defoliacije pred cvetenjem na komponente listne površine.

Ukrep	Glavne mladike	Zalistniki	Skupna listna površina (m ²)	LA / Y1 (m ² /kg)
K	2.24	1.71	3.95	1,22
D	2.18	1.74	3.92	1,46
R	2.68	1.69	4.37	1,99
<i>Sign. F</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

1LA / Y: razmerje med listno površino in maso pridelka

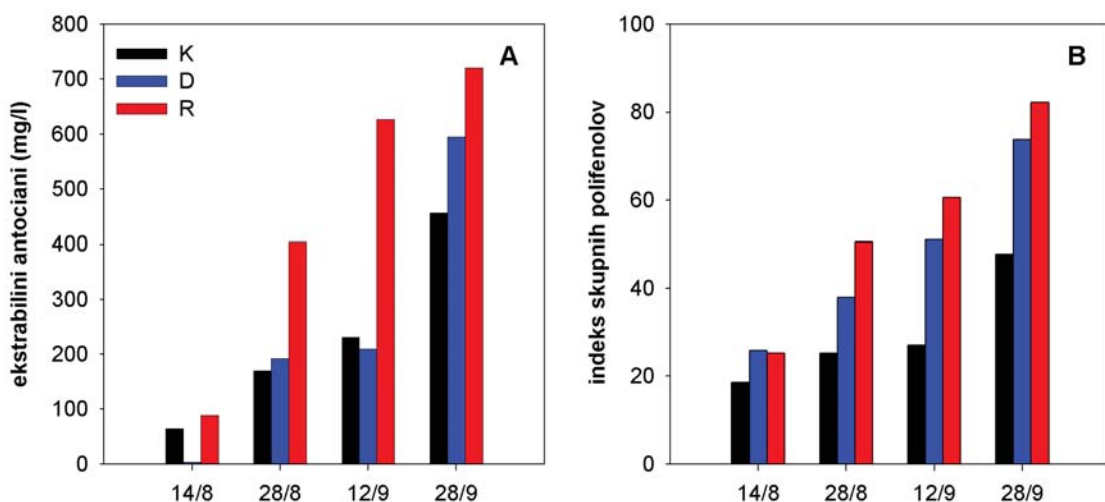
K-kontrola, D-defoliacija, R-redčenje

Razlike med obravnavanjenjema so se pokazale tudi pri kemijski sestavi grozdja. Vsebnost suhe snovi (°Brix) se je povečala v primeru redčenja grozdov, medtem ko so bile vrednosti pri kontrolni skupini in mladikah, na katerih je bila izvedena defoliacija pred cvetenjem, precej podobne (Slika 1B). Večje razmerje med listno površino in maso pridelka je pozitivno vplivalo na vsebnost suhe snovi v grozdnih jagodah iz skupine trt, na katerih je bil izveden ampelotehnični ukrep redčenja. Ampelotehnični ukrepi niso statistično značilno vplivali na vsebnosti skupnih kislin in pH-vrednosti (Slika 1C in 1D).



Slika 1 – Spreminjanje mase 100 jagod in glavnih parametrov tehnološke zrelosti grozdja od začetka dozorevanja do trgatve. K-kontrola, D- defoliacija pred cvetenjem, R-redčenje grozdov v fazi obarvanja jagod

Kot se je pokazalo pri tehnoloških parametrih, so tudi parametri fenolne zrelosti pokazali podobne rezultate. Najzanimivejši rezultati so bili dobljeni pri ampelotehničnem ukrepu redčenja grozdov, tako z vidika vsebnosti skupnih antocianov (Bertolini in sod., 2012), kot tudi z vidika vsebnosti ekstrabilnih skupnih antocianov (Slika 2A). Ravno tako je indeks skupnih polifenolov (Slika 2B) višji v primeru ampelotehničnega ukrepa redčenja grozda. Rezultati, pridobljeni z ampelotehničnim ukrepom defoliacije pred cvetenjem niso bili nižji: predvsem z vidika podatkov o vsebnosti skupnih antocianov ob zadnjem datumu vzorčenja (Slika 2A in Bertolini in sod., 2012). Pri opazovanju spreminjanja ekstrabilnih antocianov (Slika 2A), je bila ob prvih treh datumih vzorčenja zabeležena podobna vsebnost antocianov pri ampelotehničnem ukrepu defoliacije pred cvetenjem in pri kontrolni skupini. Ob datumu trgatve pa je bil delež ekstrahiranih antocianov bistveno višji pri ampelotehničnem ukrepu defoliacije pred cvetenjem. Če se pridobljene podatke primerja z ampelotehničnim ukrepom redčenja grozdov, je mogoče sklepati, da je grozdje počasneje dozorevalo, kar bi lahko bil vzrok za nižjo koncentracijo tako suhe snovi kot tudi antocianov. Ravno tako bi lahko nizko koncentracijo antocianov, ki jih je mogoče ekstrahirati med dozorevanjem, razložili z večjo trdnostjo jagodne kože (upočasnjena celična rast).



Slika 2 – Spreminjanje vsebnosti ekstrabilnih antocianov (A), in indeksa skupnih polifenolov (B) od začetka dozorevanja do trgatve. K-kontrola, D- defoliacija pred cvetenjem, R-redčenje grozdov v fazi obarvanja jagod

Hipoteza je bila potrjena z rezultati selektivne ekstrakcije polifenolnih spojin, ki so potrdili višjo vsebnost tako antocianov kot tudi proantocianidinov oz. taninov (Preglednica 3). Vsebnost nizkomolekularnih taninov v jagodnih kožicah je bila precej podobna pri ampelotehničnem ukrepu redčenja grozdov ter pri kontrolni skupini, medtem ko je vsebnost nizkomolekularnih taninov bila višja v jagodnih kožicah pri ampelotehničnem ukrepu defoliacije. Tudi vsebnost nizkokomolekularnih taninov iz grozdnih pečk je bila višja pri ampelotehničnem ukrepu defoliacije. Vsebnost visokomolekularnih taninov v jagodnih kožicah je bila podobna pri ampelotehničnem ukrepu redčenja grozdov in defoliaciji. V primeru nizko in visokomolekularnih taninov iz grozdnih pečk pa je vsebnost obojih bistveno višja pri ampelotehničnem ukrepu defoliacije. Dobljeni rezultati dodatno potrjujejo verodostojnost hipoteze o upočasnjem dozorevanju trsov, na katerih je bil izveden ampelotehnični ukrep defoliacije pred cvetenjem.

Prav v primeru sorte Refošk je lahko višja vsebnost taninov v grozdju (tako iz kože kot iz pečk) ključnega pomena, saj je za dotično vinsko sorto značilna nizka vsebnost taninov, ki lahko poslabša življenjsko dobo vin.

Preglednica 3 – Vpliv redčenja grozdov in defoliacije pred cvetenjem na vsebnost polifenolov v jagodni kožici in grozdnih pečkah.

	Kožice grozdne jagode (mg/kg)			Pečke grozdne jagode (mg/kg)	
	LMWP	HMWP	Skupni antociani	LMWP	HMWP
K	132	757	1558	221	170
D	231	1764	2571	661	663
R	131	1570	2027	439	386

LMWP: nizkomolekularni tanini - HMWP: visokomolekularni tanini

K-kontrola, D-defoliacija, R-redčenje

Razmerje med listno površino in maso pridelka

Uravnovešenost med listno površino in maso pridelka je ključnega pomena za doseganje dobre kakovosti grozdja ob trgatvi, vendar so lahko, kot že rečeno, razlike med sortami tako nedoumljive, da jih je treba podrobno analizirati.

Po ampelotehničnem ukrepu redčenja grozdov (FCHB in HCHB) je bilo ob trgatvi na posameznem trsu manj grozdov (Preglednica 4). Četudi je mogoče opaziti občutno nižjo maso pridelka in povečano povprečno maso grozda, ki je posledica kompenzacije, zaradi obsežne raznolikosti v samem vinogradu, ni bilo mogoče ugotoviti bistvenih razlik med posameznimi ampelotehničnimi ukrepi.

Če primerjamo nevršičkani tretiranci (FCFB in FCHB), z vršičkanimi (HCFB in HCHB), lahko opazimo, kako se z vršičkanjem bistveno zmanjša listna površina (Preglednica 5). Iz podatkov o soodvisnosti med listno površino in maso pridelka so razvidne višje vrednosti v primeru ukrepov, pri katerih je listje ostalo neokrnjeno (FCHB), in nižje v primeru vršičkanja (HCFB). Dobljeni rezultati se nahajajo znotraj vrednosti, ki sta jih objavila Kliewer in Dokoozlian (2005), z izjemno ukrepa FCHB, pri katerem je redčenje grozdov povzročilo prekoračitev zgornje meje vrednosti.

Preglednica 4 – Učinek razmerja med listno površino in maso pridelka na maso pridelka ob trgatvi.

Ukrep	Število grozdov	Masa pridelka (kg/rastlino)	Povprečna teža grozda (g)
FCFB	14.6 a	4.31	297
FCHB	9.44 b	3.14	327
HCFB	15.8 a	4.68	288
HCHB	8.56 b	3.06	363
<i>Sign. F</i>	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

FCFB (brez vršičkanja – vsi grozdi); FCHB (brez vršičkanja – zredčeni grozdi); HCFB (vršičkanje – vsi grozdi); HCHB (vršičkanje listje – zredčeni grozdi).

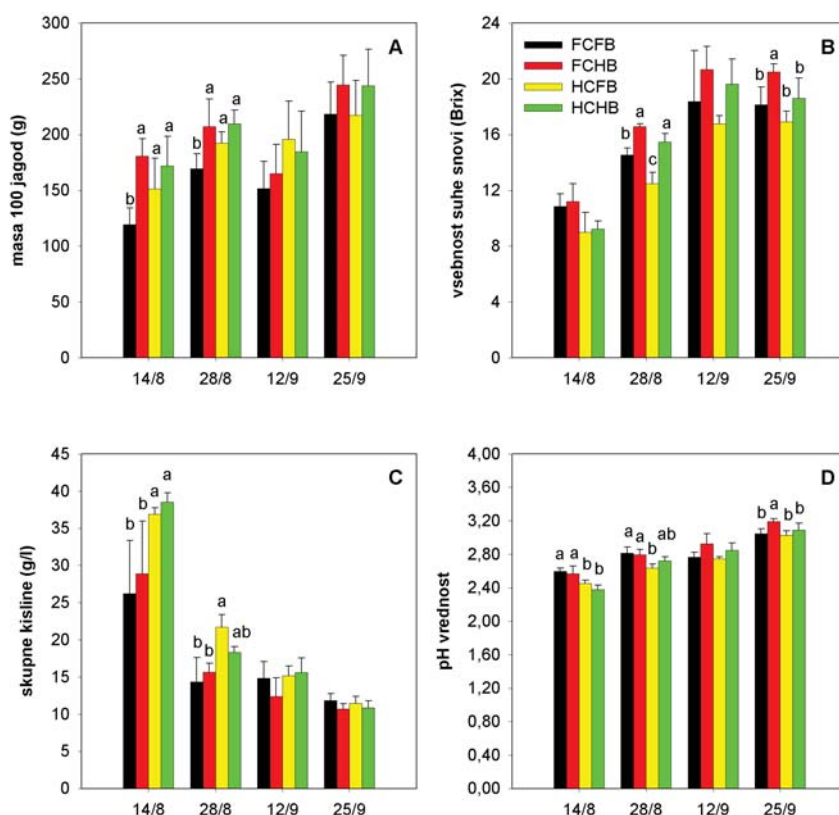
Preglednica 5 – Učinek razmerja med listno površino in maso pridelka na komponente listne površine.

Ukrep	Glavne mladike	Zalistniki	Skupna listna površina (m ²)	LA / Y1 (m ² /kg)
FCFB	3.61 a	2.31 ab	5.91 a	1.62
FCHB	3.16 ab	2.78 a	5.94 a	2.75
HCFB	2.74 b	1.17 c	3.91 b	1.10
HCHB	2.24 c	1.65 bc	3.89 b	1.40
<i>Sign. F</i>	**	**	**	<i>n.s.</i>

1LA / Y: razmerje med listno površino in maso pridelka

FCFB (brez vršičkanja – vsi grozdi); FCHB (brez vršičkanja – zredčeni grozdi); HCFB (vršičkanje – vsi grozdi); HCHB (vršičkanje listje – zredčeni grozdi).

Zmanjšana masa pridelka je pri ukrepih FCHB in HCHB sprožila kompenzacijski učinek tudi na povprečni masi grozdne jagode (Slika 3A), ki se je posledično zvišala. Bistvene razlike pri masi so bile dobljene zgolj ob prvih dveh datumih vzorčenja.



Slika 3 – Spreminjanje mase 100 jagod in glavnih parametrov tehnološke zrelosti grozdja od začetka dozorevanja do trgatve. FCFB (brez vršičkanja – vsi grozdi); FCHB (brez vršičkanja – zredčeni grozdi); HCFB (vršičkanje – vsi grozdi); HCHB (vršičkanje listje – zredčeni grozdi).

Vsebnost skupnih kislin je bila različna ob prvih vzorčenjih (Slika 3C), pri katerih so bile dobljene višje vrednosti v primeru vršičkanja. pH-vrednost je bila občutno višja pri ukrepih FCFB in FCHB, ob trgatvi pa je bila opažena najvišja vrednost v primeru ukrepa FCHB (Slika 3D).

Posledica redčenja grozdja je bilo kopičenje polifenolov in antocianov v grozdnih jagodah (Preglednica 6).

Pri ukrepih, ki so vključevali vršičkanje, sta bila indeks skupnih polifenolov in delež taninov iz grozdnih pečk (Mp) višja. Kot je bilo že objavljeno, lahko povišanje vsebnosti polifenolov ob ampelotehničnih ukrepih (predvsem taninov) postane zanimivo predvsem v primeru sorte Refoš, saj je za to vinsko sorto značilna manjša vsebnost taninov.

Preglednica 6 – Učinek razmerja med listno površino in maso pridelka na vsebnost polifenolov v grozdni jagodi ob trgatvi (25. 9. 2012).

	Skupni antociani (mg/L)	Indeksskupnih polifenolov	Mp
FCFB	1202	52,2	21,1 %
FCHB	1440	67,4	30,8 %
HCFB	1078	50,8	20,9 %
HCHB	1491	59	26,4 %

FCFB (brez vršičkanja – vsi grozdi); FCHB (brez vršičkanja – zredčeni grozdi); HCFB (vršičkanje – vsi grozdi); HCHB (vršičkanje listje – zredčeni grozdi).

Mp-delež taninov v peškah

Zaključki

Rezultati obeh poskusov, ki sta bila izvedena na sorti Refošk, so ponovno pokazali vpliv nekaterih ampelotehničnih ukrepov na spreminjanje mase pridelka in kvalitativni profil sestave grozdja. Dobri rezultati so bili doseženi tako z redčenjem grozdja kot tudi z defoliacijo v fazi pred cvetenjem, vendar bo treba te rezultate potrditi z nadaljnjimi raziskavami.

Zahvale

Zahvaljujemo se domačiji Lisjak iz Dutovelj in podjetju Vinakras za sodelovanje pri poskusih.

Predmetno eksperimentalno delo je del dejavnosti, ki jih predvideva projekt AGROTUR/Kraški agroturizem, sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007–2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in iz nacionalnih sredstev.

Bibliografija

Bertolini, A.; Petrusa, E.; Braidot, E.; Peresson, C.; Zancani, M.; Rajčević, U.; Sivilotti, P.; Lisjak, K.; Vianello, A., 2012. Transport flavonoidov kot indikator zrelosti grozdja sorte refošk In Vinarski dan 2012. D. Bavčar et al. (Eds.). Ljubljana, Slovenija.

Bravdo, B.; Hepner, Y.; Loinger, C.; Cohen, S.; Tabacman, H., 1985. Effect of Crop Level and Crop Load on Growth, Yield, Must and Wine Composition, and Quality of Cabernet Sauvignon. American Journal of Enology and Viticulture, 36: 125–131.

Dami, I.; Ferree, D.; Prajitna, A.; Scurlock, D., 2006. A Five-year Study on the Effect of Cluster Thinning on Yield and Fruit Composition of 'Chambourcin' Grapevines. *HortScience*, 41: 586–588.

Glories, Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. 195 pp. Thèse Doctorat d'Etat, Université Bordeaux II.

Guidoni, S.; Allara, P.; Schubert, A., 2002. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 224–226.

Kliewer, W. M.; Dokoozlian, N. K., 2005. Leaf Area/Crop Weight Ratios of Grapevines: Influence on Fruit Composition and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 170–181.

Palliotti, A.; Poni, S.; Berrios, J. G.; Bernizzoni, F., 2010. Vine performance and grape composition as affected by early-season source limitation induced with anti-transpirants in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16: 426–433.

Poni, S.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Libelli, N., 2009. Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15: 185–193.

Reynolds, A. G., 1989. Impact of pruning strategy, cluster thinning, and shoot removal on growth, yield, and fruit composition of low-vigor de Chaunac vines. *Canadian Journal of Plant Science*, 69: 269–275.

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

Sternad Lemut M.; Trošt K.; Sivilotti P.; Vrhovšek U., 2011. Pinot Noir wine color related phenolics as affected by leaf removal treatments in Vipava Valley. *J. Food Comp. Anal.* 24: 777–784.

Tardáguila, J.; Diago, M. P.; Martinez de Toda, F.; Poni, S.; Vilanova, M., 2008. Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of cv. Grenache grown under non irrigated conditions. *Journal International de la Science de la Vigne ed du Vin*, 42: 221–229.



Polifenolni potencial terana

1,2,3,4,5,6 Kmetijski
inštitut Slovenije

1 doc. dr., Hacquetova
ulica 17, Ljubljana

2 univ. dipl. inž. agr.,
prav tam

3 univ. dipl. inž. živ.
tehnol., prav tam

4 doc.dr., prav tam

5 dr., prav tam

6 dr., prav tam

Andreja VANZO¹, Katja ŠUKLJE², Mojca JENKO³, Franc
Čuš⁴, Dejan BAVČAR⁵, Klemen LISJAK⁶

Izvleček

Teran PTP je vino, pridelano iz grozdja sorte Refošk na absolutnih vinogradniških legah slovenskega vinorodnega podokoliša Kras. Terrano D.O.C. je vino, pridelano na italijanskem Krasu v provinci Gorica in provinci Trst. Na obeh straneh meje je to vino prepoznavno po izraziti vijolično-rdeči barvi, ki odraža visoko vsebnost rdečih barvil – antocianov, in srednje bogati taninski sestavi. Z namenom preučiti polifenolni potencial ter značilnosti posameznih vinogradniških leg, smo analizirali vsebnost in sestavo ekstrabilnih polifenolov iz grozdja Refošk in vsebnost polifenolov v vinih Teran PTP in Terrano D.O.C. letnika 2011. Vzorci grozdja in vina iz Slovenije in Italije so v povprečju vsebovali: 2090 mg/kg-grozdje oz 1943 mg/l-vino skupnih polifenolov; 1528 mg/kg in 936 mg/l skupnih antocianov; 492 mg/kg in 865 mg/l nizkomolekularnih proantocianidinov (taninov) ter 2213 mg/kg in 2413 mg/l visokomolekularnih taninov. Potrdili smo, da je Refošk sorta grozdja z nadpovprečno visoko vsebnostjo antocianov, kar daje vinu Teran PTP in Terrano D.O.C. izrazito barvo ter velik prehranski potencial. Ravno tako smo določili, da je povprečna porazdelitev nizkomolekularnih proantocianidinov med kožicami:pečkami v razmerju 28:72 in povprečna porazdelitev visokomolekularnih proantocianidinov med kožicami:pečkami v razmerju 68:32. To pomeni, da s podaljšano maceracijo lahko izlužujemo tanine iz pečk ter na ta način obogatimo taninsko strukturo vina. Primerjava osnovnih kemijskih parametrov v čezmejnih vinih je potrdila skladnost s slovenskim Pravilnikom o vinu z oznako PTP teran za 66 % analiziranih vzorcev vina.

Ključne besede: antociani, polifenoli, proantocianidini-tanini grozdja, resveratrol, Teran PTP, Terrano D.O.C



Polyphenol potential of teran

Abstract

Teran PTP is wine produced from grape Refosk on absolute vineyard locations in Slovenian vineyard sub-district Karst. Terrano D.O.C. is wine produced on Italian Karst in province of Gorizia and province of Trieste. Cross border Teran wine is known for its intense red-violet color - high content of red grape pigments-anthocyanins, and medium tannin content. The objective of this study was to investigate the polyphenol potential of Teran wines and to evaluate the properties of wines from different vineyards at Karst. For the vintage 2011 the content of each polyphenol group was determined in both, grapes Refosk and wines Teran PTP and Terrano D.O.C. Grape and wine samples from Slovenia and Italy had on the average the content of: total polyphenols 2090 mg/kg-grape and 1943 mg/l-wine; total anthocyanins 1528 mg/kg and 936 mg/l; low molecular weight proanthocyanidins (tannins) 492 mg/kg and 865 mg/l and high molecular weight proanthocyanidins 2213 mg/kg and 2413 mg/l, respectively. It was confirmed that Refosk is a grape variety having the content of anthocyanins above the average, what resulted in a strong color of Teran wines and a huge nutritional potential of those wines. It was also found that the ratio of low molecular tannins between skin:seeds was on the average 28:72 and the ratio of high molecular tannins between skin:seeds was 68:32, respectively. It could be postulated that by using long post-fermentation maceration, additional tannins from seeds could be extracted and improve the tannic structure of wine. The results of basic chemical properties of cross border Teran wines have been confirmed the consistency to Slovenian Regulative for Wine labeled PTP Teran for 66 % of analyzed wines.

Keywords: anthocyanins, polyphenols, proanthocyanidins-grape tannins, resveratrol, Teran PTP, Terrano D.O.C.

Uvod

Polifenoli so ena najbolj zastopanih skupin sekundarnih metabolitov rastlin in so pomembni parametri kvalitete grozdja in vina. Vplivajo na stabilnost in senzorične lastnosti vina. Odgovorni so za rdečo barvo (antociani), okus grenkobe (nizkomolekularni proantocianidini - nizkomolekularni tanini grozdja) in zaznavo trpkosti

(visokomolekularni proantocianidini - visokomolekularni tanini grozdja). Polifenoli vplivajo na zaznavo telesa vina, imajo stabilizacijski vpliv in so osnova za staranje vina. Poleg vpliva na kvaliteto vina, so pomembni tudi za človekovo zdravje kot biološko aktivne učinkovine, ki so v vinu že izlužene ter stabilizirane z alkoholom.

Flavonoidi predstavljajo glavnino polifenolov rdečega vina in se izlužujejo iz kožic ter pečk grozdne jagode med maceracijo in hkratno alkoholno fermentacijo. Tekom alkoholne fermentacije se sladkor pretvarja v alkohol, ki je dobro topilo za izluževanje flavonoidov predvsem iz pečk grozdne jagode. Najbolj zastopani skupini flavonoidov rdečega vina sta flavanoli in antociani. Flavanoli zajemajo enostavne monomerne spojine (katehine, epikatehine itd.) in tudi monomerne enote povezane v nizko in visokomolekularne proantocianidine. Oboji se nahajajo v kožicah in pečkah grozdne jagode. Antociani so rdeča barvila, ki se pri *Vitis vinifera* L. nahajajo le v kožici grozdne jagode. Med staranjem vina se povezujejo s proantocianidini v barvila višjih molekulskih mas in tako se ohranja barva vina.

Na količino, profil in razporeditev fenolnih spojin v grozdju in kasneje v vinu vplivajo: sorta (kot najpomembnejši dejavnik), klimatske značilnosti letnika, vinogradniška in vinarska tehnologija ter lokacija vinogradov.

Ker Kras zaznamujejo edinstvene geografske, geološke in klimatske značilnosti, je namen raziskav preučiti vpliv lokacije oz. francosko 'terroir-ja' Kras na vsebnost in sestavo polifenolov v grozdju sorte Refošk ter vinu Teran PTP in Terrano D.O.C. Na slovenski strani Krasa je vino Teran PTP zaščiteno kot vino z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja (Pravilnik, 2008). Vino Teran PTP in Izbrani Teran PTP se v Sloveniji pridelujeta le iz grozdja sorte Refošk (*Vitis vinifera* L.) na absolutnih vinogradniških legah, v okviru vinorodnega podokoliša Kraška planota, znotraj okoliša Kras. V Italiji se vino Terrano D.O.C. prideluje na Krasu znotraj province Gorica in province Trst ter vino Terrano Classico D.O.C. le v okviru province Trst (Gazetta, 2011).

V tem prispevku so predstavljeni rezultati analiz letnika 2011, v pripravi je tudi letnik 2012, ki bo za primerjavo predstavljen naslednje leto. V študiji so prvič predstavljeni profili in lokalizacije polifenolov v grozdju sorte Refošk in profili polifenolov v vinu Teran PTP in Terrano D.O.C. iz slovenskega in italijanskega Krasa.



Materiali in metode

Vzorčenje grozdja in vina

Grozdje sorte Refošk smo reprezentativno vzorčili v oktobru 2011 ob času trgatve v 18 vinogradih slovenskega in italijanskega Krasa. V začetku junija 2012 je bilo pri pridelovalcih Združenja Konzorcij kraških pridelovalcev Terana in pri pridelovalcih Consorzio Tutela Vini Collio e Carso vzorčeno 38 vzorcev vina. Vsa vina so bila letnik 2011, od tega je bilo 27 vzorcev Teran PTP (slovenski Kras) in 11 vzorcev Teranno D.O.C. (italijanski Kras).

Ekstrakcija polifenolov iz grozdja

Takoj po vzorčenju smo grozdje ohladili na 4 °C in pripravili selektivne ekstrakte kožic in pečk grozdne jagode. Uporabljena je bila ekstrakcijska metoda, katere namen je simulacija procesa vinifikacije v laboratorijskih pogojih (Mattivi in sod., 2002). Kožice in pečke 200 g naključno vzorčenih grozdnih jagod iz reprezentativnega vzorca, smo ločeno izluževali 5 dni pri 30 °C v raztopini vode in etanola (88:12 v/v), ki je vsebovala 100 mg/l SO₂, 5 g/L vinske kisline in imela pH vrednost 3.2. Ekstrakti so bili preprihani z dušikom in shranjeni na 4 °C do spektrofotometričnih analiz, opravljenih decembra 2011.

Spektrofotometrične analize ekstraktov grozdja in vina

Analize skupnih polifenolov, skupnih antocianov, nizko in visokomolekularnih taninov smo naredili s spektrofotometrom Agilent 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, ZDA) po metodah di Stefano in sod. (1989) pod optimiziranimi pogoji (Rigo in sod., 2000).

Skupne polifenole smo izrazili v mg/kg (+)-katehina sveže mase grozdja v ekstraktih kožic ter pečk (in rezultate seštelili) ter v mg/l (+)-katehina v vinih.

Skupne antociane smo izrazili v mg/kg sveže mase grozdja v ekstraktih kožic oz. mg/l v vinih. Upoštevali smo povprečno absorbanco antocianov, ekstrahiranih iz grozdja sorte Cabernet sauvignon (povprečna molekulska masa 500 g/mol in koeficient ekstinkcije 18800 M⁻¹cm⁻¹ v raztopini 70:30:1 etanol:voda:HCl).

Visokomolekularne proantocianidine smo preko transformacije v cianidin izrazili v mg/kg cianidina sveže mase grozdja v ekstraktih oz. v mg/l cianidina v vinih.

Nizkomolekularne proantocianidine, ki so reaktivni z vanilinom, smo izrazili v mg/kg (+)-katehina sveže mase grozdja v ekstraktih oz. v mg/l (+)-katehina v vinih.

Intenziteto in nianso (ton) barve vina smo izmerili direktno v vzorcih vina na osnovi meritev pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm v kiveti z 1mm optično potjo.

Analize monomernih antocianov vinih s pomočjo visokotlačnega tekočinskega kromatografa z detektorjem z nizom diod (HPLC-DAD)

Antociane v vinih smo analizirali s pomočjo tekočinskega kromatografa visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod (HPLC-DAD) (Agilent Technologies 1100). Razvili in validirali smo metodo z detekcijo pri 520 nm z dobro separacijo vseh 15 antocianov (Vanzo in Vrhovšek, 2005). Posamezne antociane v vinu smo ovrednotili v mg/l ekvivalentov malvidin 3-glukozida s pomočjo linearne umeritvene krivulje za malvidin 3-glukozid v območju med 1 in 500 mg/l s korelacijo 0.99927.

Analize stilbenov (resveratrolov) v vinih s HPLC-DAD

Resveratrole smo analizirali s HPLC-DAD (Agilent Technologies 1100). Metoda je bila razvita za detekcijo *cis- in trans-resveratrola* v prosti obliki in vezanega z glukozo (*cis- in trans-piceid*) (Mattivi in Nicolini, 1997; Vrhovšek in sod., 1995). Vse štiri oblike stilbenov smo ovrednotili v mg/l ekvivalentov *trans-resveratrola*.

Osnovne analize vin

Osnovne fizikalno kemijske parametre smo določili z uradnimi metodami EU (Commission regulation EEC N. 2676/90, EC 335/2005), z izjemo parametrov: reducirajoči sladkor in pepel, ki so bili določeni z internimi metodami. Analize fizikalno-kemijskih parametrov in različnih skupin polifenolov v vinih smo opravili v juliju in avgustu 2012, kar je v času, ko so ta vina pri potrošniku.

Št./11	Lega	Vzg.oblika	(°Brix)	(g/L vinska k.)	g/L	SP ^a (mg/kg(+))catehin)	SA ^b (mg/kg)	NP ^a (mg/kg(+))catehin)	VP ^a (mg/kg cianidin)
1987	Komen1	kordon	21,4	9,5	5,2	3,04	1729	1607	2288
1988	Kreplje	latnik	21,8	9,7	4,9	3,44	2464	1425	2181
1989	Sveto1	latnik	22,0	8,0	2,9	3,52	2392	1883	2538
1990	Sveto2	d.guyot*	22,3	9,0	4,3	3,23	2231	1822	2277
1991	Tublje1	e. guyot**	22,4	7,9	3,4	3,39	1789	1232	2083
1992	Hruševica	d. guyot	21,5	8,6	3,3	3,16	2242	2148	2677
1993	Utovlje	latnik	19,4	9,4	3,4	3,26	1356	1020	1089
1994	Komen2	e.guyot	21,6	9,8	5,1	3,34	2255	1777	4260
1995	Tublje2	e.guyot	21,3	8,9	4,1	3,20	1730	1437	1564
1996	Brestovica	d. guyot	22,1	7,3	2,3	3,44	2272	1491	2059
1997	Sežana	kordon	21,7	8,4	4,0	3,27	2297	1469	2113
1998	Dutovlje	d.guyot	22,6	6,6	3,1	3,35	1929	1114	1981
1999	Kaprica	e. guyot	20,2	8,8	3,4	3,14	2185	1360	2101
2000	Škrbina	e. guyot	22,2	9,3	4,6	3,33	2171	1665	2356
2001	Sepulje	latnik	21,0	11,4	5,9	3,09	2170	1659	2540
2002	Praprot1	ni podatka	22,0	6,9	1,6	3,53	2147	1533	2138
2003	Praprot2	e. guyot	22,5	7,5	4,0	3,60	2207	1218	1852
2004	Repen	d. guyot	22,0	7,6	3,3	3,24	2050	1646	1734
		Povprečje	21,7	8,6	3,8	3,31	2090	1528	2213
		SD***	0,8	1,2	1,1	0,16	280	285	633

Rezultati

Vsebnosti polifenolov v grozdju sorte Refošk letnika 2011

Preglednica 1: Osnovni kemijski parametri v grozdnem soku in vsebnost posameznih skupin polifenolov v grozdnih jagodah sorte Refošk, vzorčenih v času trgatve 2011 na čezmejnem Krasu.

SS - suha snov, SK - skupne kisline, SP - skupni polifenoli, SA - skupni antociani, NP - nizkomolekularni proantocianidini, VP - visokomolekularni proantocianidini

*dvojni guyot, **enojni guyot, ***Standardna deviacija

^aRezultati v mg/kg predstavljajo seštevek vsebnosti ekstrabilnih polifenolov v kožicah in pečkih, preračunanih na maso svežega grozdja.

^bRezultat v mg/kg predstavlja vsebnost skupnih antocianov v kožicah grozdne jagode, preračunanih na maso svežega grozdja.

V študijo je bilo vključeno grozdje sorte Refošk ob času trgatve letnika 2011 iz 18 leg slovenskega in italijanskega Krasa. Grozdni sok je v času trgatve 2011 v povprečju vseboval 21,7 °Brix, 8,6 g/L skupnih kislin ter 3,8 g/L jabolčne kisline, kar kaže na dobro dozorelost grozdja (Preglednica 1). V primerjavi z letnikom 2011 pa lahko omenimo letnik 2012, ki ima v povprečju precej nižje vsebnosti suhe snovi in sicer 18,3 °Brix, pH vrednosti 3.04 ter višje skupne kisline 10,1 g/L (povprečje 29 vzorcev grozdja letnika 2012). Analize polifenolnih profilov letnika 2012 bodo predstavljene na naslednjem simpoziju.

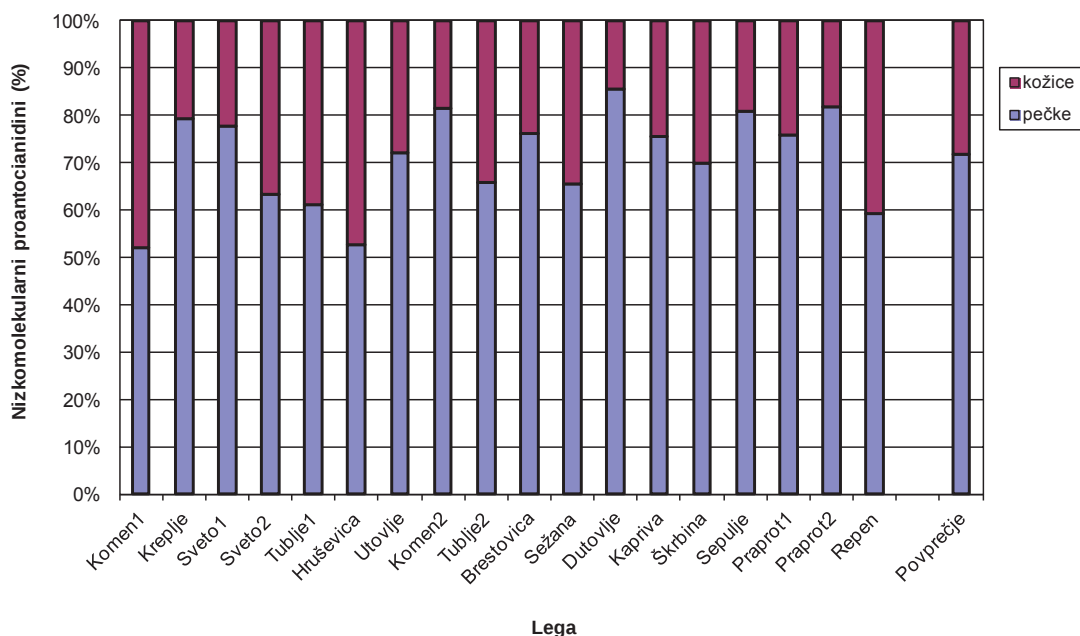
Za optimizacijo pridelave Terana PTP in Terrana D.O.C. iz grozdja Refošk so poleg primarnih metabolitov (sladkorji, kisline) pomembne tudi informacije o polifenolnem profilu te sorte grozdja. Najpomembnejše so vsebnost skupnih antocianov in vsebnost ter porazdelitev tako nizko kot visokomolekularnih proantocianidinov med pečkami in kožicami grozdne jagode. Poleg vsebnosti, ki se spreminjajo glede na leto pridelave, je zelo pomemben podatek, kje v grozdni jagodi se posamezni tanini nahajajo. Ta podatek nam omogoča izbiro ustrezne tehnologije vinifikacije (pravilno odmerjen čas in način maceracije) za proizvodnjo vin boljše senzorične kakovosti.

Rezultati analiz so potrdili, da poleg sorte vpliva na vsebnosti ekstrabilnih flavonoidov v grozdju tudi lega posameznih vinogradov (Preglednica 1). Povprečne vsebnosti ekstrabilnih skupnih polifenolov iz kožic in pečk so bile 2090 ± 280 mg/kg sveže mase grozdja. To je več, kot so v enakem letniku določili v sorti Cabernet sauvignon (1669 mg/kg) pri enaki metodi ekstrakcije in analize v Črni gori (Pajović in sod., 2012). Rezultat je v sorazmerju z veliko vsebnostjo antocianov v grozdju Refošk letnika 2011, saj smo s spektrofotometrično metodo za določanje skupnih polifenolov določili vse fenolne spojine v ekstraktih kožic in pečk.

Grozdje sorte Refošk na Krasu je v letu 2011 vsebovalo v povprečju 1528 ± 285 mg/kg ekstrabilnih skupnih antocianov. Povprečna vsebnost skupnih antocianov letnikov 1999 in 2000 v grozdju Refošk, vzorčenem v vinorodni deželi Primorska, je bila (pri enaki ekstrakcijski in analitski metodi) 1100-1300 mg/kg (Vrhovšek in sod., 2002). Povprečne vsebnosti ob času trgatve v grozdju Cabernet sauvignon, Vranac in Kratošija letnika 2011 v Črni gori pa so bile za skupne antociane 1035 mg/kg, 980 mg/kg in 467 mg/kg (Pajović in sod., 2012). Rezultati potrjujejo dejstvo, da je

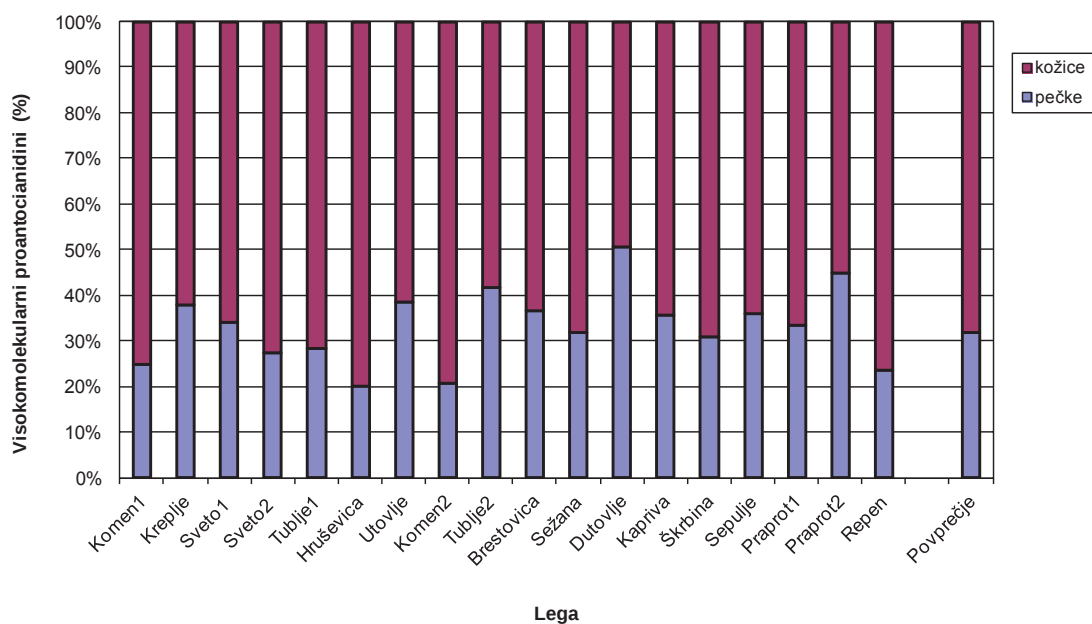
Refošk sorta grozdja z nadpovprečno vsebnostjo antocianov, kar mu daje izjemen barvni in tudi velik prehranski potencial.

Povprečna skupna vsebnost ekstrahibilnih nizkomolekularnih proantocianidinov iz kožic in pečk je znašala 492 ± 107 mg/kg in visokomolekularnih taninov 2213 ± 633 mg/kg. Rezultati za nizkomolekularne proantocianidine so za več kot 100 % manjši od povprečja v grozdju med letoma 1999 in 2000, ko so bili v območju 1000-1300 mg/kg (Vrhovšek in sod., 2002). Rezultati meritev visokomolekularnih proantocianidinov so v povprečju za ca. 23 % večji od povprečja 1400-1700 mg/kg za sorto Refošk v vinorodni deželi Primorska v letih 1999 in 2000 (Vrhovšek in sod., 2002). Večje vsebnosti tako visokomolekularnih proantocianidinov kot antocianov v grozdni jagodi v primerjavi s prejšnjimi letniki nakazujejo, da je bilo leto 2011 ugodno za sintezo polifenolov. Ob primerni izbiri časa trgatve in načina vinifikacije, se je to pozitivno odražalo v zaznavi 'polnosti' in 'telesa' vin Teran PTP in Terrano D.O.C. letnika 2011.



Slika 1: Porazdelitev nizkomolekularnih proantocianidinov med kožicami in pečkami grozdne jagode sorte Refošk, vzorčenih v času trgatve na čezmejnem Krasu.

Nadalje nas je zanimalo, kako so porazdeljene fenolne spojine v grozdni jagodi sorte Refoš. Ugotovili smo, da je povprečna porazdelitev nizkomolekularnih proantocianidinov iz 18 leg med kožicami in pečkami v razmerju 72:28 (Slika 1) in povprečna porazdelitev visokomolekularnih proantocianidinov med kožicami in pečkami v razmerju 68:32 (Slika 2). Sorta grozdja Refoš na Krasu ima približno dve tretjini vseh nizkomolekularnih proantocianidinov v pečkah in dve tretjini vseh visokomolekularnih proantocianidinov v kožicah. Rezultati so zelo podobni povprečju letnikov 1999 in 2000 za grozdje sorte Refoš, vzorčeno v celotni vinorodni deželi Primorska. Takrat je bila določena porazdelitev nizkomolekularnih taninov med kožicami in pečkami v razmerju 25:75 ter porazdelitev visokomolekularnih proantocianidinov med kožicami in pečkami v razmerju 61:39 (Vrhovšek in sod., 2002). Podobni rezultati potrjujejo, da je lokalizacija taninov v največji meri sortna lastnost.



Slika 2: Porazdelitev visokomolekularnih proantocianidinov med kožicami in pečkami grozdne jagode sorte Refoš, vzorčenih v času trgatve na čezmejnem Krasu.

Vsebnosti polifenolov v vinu Teran 2011

V 38 vzorcih vina letnik 2011, od tega 27 vzorcih Terana PTP in 11 vzorcih Teranna D.O.C., smo določili barvne karakteristike (intenziteta in ton) ter več skupin polifenolov, med njimi tudi proste oz. posamezne antociane in resveratrol.

Preglednica 2 prikazuje vsebnost posameznih skupin polifenolov v deset mesecev starih vinih, vzorčenih pri pridelovalcih konzorcijev na čezmejnem Krasu. Vina letnika 2011 so imela zelo intenzivno barvo, v povprečju 23,6 AU, kar je posledica visoke vsebnosti skupnih antocianov. Ton barve označuje razmerje med absorbanco pri 420 nm in 520 nm, in kaže na starost vina. Mlada vina imajo ton barve v območju od 0.2 do 0.3, starejša vina pa v območju 1,2 do 1,4, vendar so številke odvisne tudi od posamezne sorte (Glories, 1984). Ton barve je bil v naših vzorcih v povprečju 0,6, kar kaže, da so vina še relativno mlada. Žal nimamo opravljenih vsakoletnih polifenolnih profilov vina Teran, vendar smo na Kmetijskem inštitutu Slovenije v letu 2007 v primerljivem časovnem intervalu (v 9 mesecev starih vinih) in z enakimi metodami analizirali polifenolne profile 23 vzorcev Terana PTP letnika 2006. Povprečna vsebnost skupnih polifenolov v vinih letnika 2011 je znašala 1943 mg/l (v letniku 2006: 1505 mg/l) in povprečna vsebnost skupnih antocianov 936 mg/l (letnik 2006: 208 mg/L). Povprečna vsebnost skupnih antocianov je bila 4,5 krat večja v letniku 2011. Letnik 2011 je bil ravno tako bogat z viskomolekularnimi proantocianidini, torej tanini, ki dajejo vinu strukturo in trpkost. V povprečju je bila njihova vsebnost 2413 mg/l (v letniku 2006: 1130 mg/l). Povprečna vsebnost nizkomolekularnih taninov, odgovornih za grenkobo vin, je znašala 865 mg/l (letnik 2006: 508 mg/l). Na podlagi analiz polifenolnih profilov in iz primerjave z letnikom 2006, lahko zaključimo, da je bil letnik 2011 nadpovprečen v vsebnostih tako antocianov kot proantocianidinov. Boljše zaključke bomo dobili po primerjavi z rezultati analiz grozdja in vina letnikov 2012 in 2013.

Št. /12	Intenziteta (AU)	Ton	SP (mg/L(+))katehin)	SA (mg/L)	NP (mg/L(+))katehin)	VP (mg/L cianidin)
985	23,3	0,54	1643	1115	377	1643
986	21,8	0,57	1194	829	304	1282
987	27,3	0,60	2199	978	1024	2777
988	22,6	0,60	2227	1035	1044	2569
989	19,7	0,54	1862	947	846	1996
990	22,4	0,51	1549	944	726	1922
991	31,3	0,45	1912	1286	579	2490
992	27,6	0,49	2024	1137	366	2552
993	25,8	0,46	1508	927	451	1956
994	23,1	1,05	1967	1326	725	2661
995	29,5	0,47	1961	1331	850	2166
996	23,3	0,58	1419	865	543	1866
997	32,9	0,56	2098	1091	927	2948
998	30,2	0,54	2177	1114	916	2477
999	30,9	0,51	2326	1096	1312	3444
1000	22,4	0,51	1797	947	546	1938
1001	20,4	0,53	1491	846	463	1777
1002	24,1	0,60	1500	758	511	1692
1003	25,4	0,52	2376	1183	1102	2847
1004	26,4	0,52	1961	1156	823	2168
1005	24,9	0,55	2286	977	1228	2884
1006	20,2	0,55	1898	805	994	2337
1007	25,7	0,54	2652	1095	1120	2842
1008	29,4	0,60	2765	1110	1673	4048
1009	23,0	0,58	2296	701	1019	2576
1010	26,5	0,56	1906	922	901	2525
1011	26,0	0,54	2213	1107	955	3236
1079	15,8	0,67	1435	578	661	1736
1080	15,8	0,58	2005	578	1592	3265
1081	26,1	0,54	1606	822	534	1852
1082	15,1	0,58	1499	833	407	1724
1083	14,6	0,65	1781	601	1072	3159
1084	24,3	0,56	1948	861	764	2208
1085	12,6	0,64	1331	541	792	1240
1086	11,8	0,93	1774	348	798	1466
1087	24,7	0,62	2854	832	1575	3551
1088	24,4	0,61	2204	808	1488	3234
1090	24,5	0,55	2188	1124	872	2634
Povprečje	23,6	0,58	1943	936	865	2413
SD**	5,1	0,11	393	225	355	668

Preglednica 2: Vsebnost posameznih skupin polifenolov v deset mesecev starih vinih z oznako Teran PTP in Terrano D.O.C., vzorčenih pri pridelovalcih konzorcijev na čezmejnem Krasu.

SP - skupni polifenoli, SA - skupni antociani, NP - nizkomolekularni proantocianidini, VP - visokomolekularni proantocianidini

*Standardna deviacija

Št. /12	Posamezni antociani ^a (mg/L MVgl)						Stilbeni (mg/L <i>t</i> -resveratrol)				
	DPgl	CNgl	PTgl	PNgl	MVgl	VSOTA	<i>t</i> -piceid	<i>c</i> -piceid	<i>t</i> -resv.	<i>c</i> -resv.	VSOTA
985	20	4	39	33	271	367	2,8	2,6	1,5	0,4	7,3
986	15	3	27	17	177	239	1,1	0,9	0,9	0,3	3,3
987	14	4	25	42	165	250	2,1	1,9	1,0	0,4	5,4
988	10	5	20	19	115	170	2,2	2,2	1,0	0,3	5,7
989	16	4	29	28	185	262	2,1	2,2	1,1	0,4	5,8
990	8	3	17	16	128	172	1,0	1,3	1,1	0,4	3,7
991	50	11	71	49	385	567	2,2	1,5	2,5	0,3	6,5
992	25	6	44	37	225	337	3,9	3,0	1,8	0,6	9,3
993	20	5	35	24	184	267	2,2	1,4	2,2	0,4	6,2
994	52	12	63	45	271	444	3,5	2,1	2,3	0,5	8,4
995	47	11	62	48	255	423	4,1	2,6	2,4	0,7	9,8
996	16	5	28	3	142	194	2,0	1,9	0,9	0,5	5,3
997	25	5	32	22	151	235	1,7	1,4	1,0	0,2	4,3
998	25	5	38	20	163	251	1,7	1,4	1,0	0,2	4,2
999	23	6	37	27	208	302	3,1	2,8	1,7	0,4	7,9
1000	17	2	31	21	219	291	4,0	3,0	4,5	1,1	12,6
1001	20	3	37	19	171	251	1,2	1,2	1,4	0,8	4,5
1002	20	4	33	18	154	228	1,5	1,3	2,2	1,1	6,0
1003	19	4	31	25	157	235	3,3	2,5	2,6	1,3	9,8
1004	17	5	30	28	143	223	2,1	1,5	1,8	0,6	6,0
1005	15	5	23	17	101	161	1,9	1,7	1,5	0,5	5,6
1006	19	7	36	39	202	303	1,8	1,3	1,9	1,0	6,0
1007	19	6	36	35	206	303	3,5	2,3	2,6	0,5	8,9
1008	25	7	38	32	193	295	5,1	3,6	2,8	0,9	12,4
1009	4	1	8	5	52	68	2,3	1,8	1,9	0,9	6,9
1011	19	4	28	36	180	266	5,0	3,3	2,3	0,6	11,1
1079	6	2	12	12	96	128	0,2	1,0	0,3	0,7	2,2
1080	16	4	8	5	25	58	2,2	1,2	3,4	1,5	8,2
1081	12	3	66	62	178	321	1,0	1,0	0,4	0,3	2,8
1082	20	5	34	20	311	390	2,5	1,8	2,9	0,8	8,1
1083	7	2	15	13	92	128	0,8	1,3	1,1	0,9	4,1
1084	17	3	29	25	179	254	3,0	2,3	2,9	1,4	9,5
1085	5	2	15	22	124	168	1,4	1,4	3,0	2,0	7,8
1086	0	0	1	2	46	50	0,9	0,8	0,3	1,9	3,9
1087	8	2	19	13	87	129	5,7	3,2	3,5	1,1	13,6
1090	19	6	33	27	184	268	2,9	1,9	2,7	1,5	9,0
Povprečje	19	5	31	26	171	251	2,5	1,9	1,9	0,8	7,2
SD*	11	3	16	14	72	107	1,4	0,8	1,0	0,5	3,0

Preglednica 3: Vsebnost prostih antocianov in vsebnost stilbenov (resveratrolov) v deset mesecev starih vinih z oznako Teran PTP in Terrano D.O.C., vzorčenih pri pridelovalcih konzorcijev na čezmejnem Krasu.

DPgl-delfinidin glukozid, CNgl-cianidin glukozid, PTgl-petunidin glukozid, PN-peonidin glukozid. MVgl-malvidin glukozid, *t*-resv.- *trans*- resveratrol, *c*-resv. – *cis*-resveratrol

*Standardna deviacija

^aEstri očetne in p-kumarne, ki so sicer precej v manjšini, niso v seštevku posameznih, prostih antocianov.



Preglednica 3 prikazuje vsebnost osnovnih petih prostih antocianov in vsebnost stilbenov (resveratrolov) v deset mesecev starih vinih z oznako Teran PTP in Terrano D.O.C. Prosti antociani se že med maceracijo pričnejo povezovati s proantocianidini v pigmente višjih molekulskih mas, zato njihova vsebnost pada med staranjem vina. Glede na to, da smo opravili analize v deset mesecev starih vinih, je povprečna vsebnost prostih antocianov še vedno znašala 251 mg/l, od katerih je 68 % malvidin 3-glukozida. Analize 15 vzorcev Terana letnika 2006 (analiziranih 9 mesecev po maceraciji) so pokazale v povprečju 417 mg/l prostih antocianov (neobjavljeni podatki) ter analize 3 mesecev starih vin Cabernet sauvignon, Refošk, Teran PTP in Merlot letnika 2003 v povprečju 209 mg/l (Vanzo in Vrhovšek, 2005). Poleg tehnološkega pomena antocianov, so raziskave v zadnjih letih potrdile tudi povezavo med uživanjem hrane ali pijače, bogate z antociani, in preventivo pred kroničnimi obolenji, kot so rak, kardiovaskularna in nevrodegenerativna obolenja ter diabetes. Prosti antociani se v nekaj minutah absorbirajo iz želodca sesalcev in vstopajo v krvni obtok (Passamonti in sod., 2003), od koder se nadalje absorbirajo v možgane, jetra, ledvica in druge organe, kjer so biološko aktivni (Passamonti in sod., 2005, Vanzo in sod., 2008).

Resveratrol je fitoaleksin, ki zaščiti jagodno kožico pred razvojem sive plesni in pred agresivnimi UV-žarki. Poleg antocianov je verjetno najbolj znana bioaktivna spojina vina. Po odkritju je postal predmet številnih raziskav, ki so potrdile njegove pozitivne lastnosti v človeški prehrani. Znanstveniki domnevajo, da je resveratrol ena od spojin, zaslužnih za zniževanje števila srčnih obolenj pri ljudeh, ki vino redno uživajo pri obedu. Vsebnost resveratrola v vinu je določena s sorto, vinifikacijo, geografskim poreklom, obliko vzgoje trte in ekološkimi dejavniki. Vrhovšek (1998) je primerjala vsebnosti resveratrola v različnih sortah in letnikih rdečih vin. Največje povprečne vsebnosti vseh štirih oblik resveratrola je določila v vinih Modra frankinja (12,6 mg/L) in Modri pinot (12,2 mg/l). Sledile so sorte: Refošk (11,9 mg/l), Merlot (8,2 mg/l) in Cabernet sauvignon (5,5 mg/l). Povprečna vsebnost vseh štirih oblik resveratrola v Teranih PTP in Terrano D.O.C letnika 2011 je znašala 7,2 mg/l (v letniku 2006: 5,0 mg/l). Rezultati so skladni s podatki ostalih študij, kjer poročajo o povprečnih vsebnostih vseh štirih oblik resveratrola v rdečih vinih med 5 in 7 mg/l (Mattivi 1993, Vrhovšek 1995).

Osnovni parametri vina Teran PTP in Terrano D.O.C letnik 2011



Namen raziskav je bil tudi določiti vrednosti osnovnih kemijskih parametrov v vinih pod oznako Teran PTP in Terrano D.O.C. Njihova določitev je omogočila primerjavo podobnosti in razlik med vini, pridelanimi na Krasu na obeh straneh meje. Analize so bile opravljene na Kmetijskem inštitutu Slovenije, zato smo ugotavljali skladnost vseh vin s Pravilnikom o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran (Ur. list RS 16/2008), ki velja sicer samo za Slovenijo.

Št. /12	alkohol (vol. %)	ekstrakt (g/L)	SK (g/Lvinska)	HK (g/Locetna)	pr. SO2 (mg/L)	sk. SO2 (mg/L)	pH	Relativna gostota	MK (g/L)	r. sladkor (g/L)	pepel (g/L)
985	11,67	27,6	7,4	1,09	20	55	3,30	0,99528	1,5	1,9	2,28
986	12,21	27,8	7,2	0,53	14	48	3,34	0,99470	2,1	1,9	2,23
987	12,16	33,6	6,9	0,85	14	38	3,44	0,99701	2,0	3,9	2,50
988	11,76	33,5	7,0	0,81	14	41	3,44	0,99745	2,1	3,5	2,60
989	11,02	30,2	6,9	0,61	12	39	3,37	0,99701	2,5	2,8	2,14
990	11,63	34,8	8,3	0,7	13	42	3,17	0,99809	2,0	2,9	2,05
991	12,27	29,5	8,0	0,41	11	38	3,22	0,99540	1,9	1,2	2,28
992	12,10	30,0	7,5	0,51	13	39	3,27	0,99567	1,9	2,8	2,27
993	11,79	29,7	8,2	0,51	11	37	3,11	0,99538	1,9	2,1	1,83
994	12,44	33,0	7,4	0,41	17	45	3,30	0,99645	2,4	3,4	2,75
995	12,74	31,3	7,5	0,37	17	40	3,27	0,99575	2,3	2,3	2,81
996	12,51	30,8	7,2	0,75	12	41	3,42	0,99554	2,1	3,0	2,42
997	12,44	31,1	7,4	0,69	10	32	3,41	0,99571	2,1	1,5	2,74
998	12,39	30,5	7,4	0,67	11	45	3,41	0,99556	2,1	1,3	2,71
999	12,53	31,2	7,6	0,52	18	50	3,24	0,99564	2,0	2,4	2,45
1000	12,51	31,3	7,3	0,52	12	42	3,32	0,99572	1,4	2,3	2,42
1001	11,96	28,3	7,1	0,49	13	35	3,33	0,99520	2,5	1,9	2,48
1002	11,73	27,9	7,2	0,55	12	39	3,32	0,99530	2,7	1,9	2,68
1003	13,73*	30,6	7,5	0,53	15	40	3,35	0,99406	2,2	2,8	2,69
1004	12,62	29,0	7,8	0,61	12	36	3,29	0,99470	2,3	1,8	2,30
1005	12,05	31,7	7,7	0,97*	13	44	3,34	0,99641	2,5	2,6	2,61
1006	11,04	29,7	7,5	0,75	15	39	3,37	0,99681	2,6	1,9	2,41
1007	11,8	30,0	7,0	0,75	14	44	3,42	0,99603	2,7	2,9	2,41
1008	13,14*	43,5**	8,8	0,74	12	42	3,70	0,99972	2,1	3,6	4,44**
1009	13,81*	35,1	7,4	0,83	11	38	3,40	0,99567	2,1	3,4	2,48
1010	13,28*	30,5	7,3	0,65	12	44	3,42	0,99447	2,3	2,9	2,50
1011	15,26*	33,9	7,9	0,63	15	42	3,42	0,99363	2,9	3,1	2,65
1079	10,65	26,0	6,8	0,68	9	47	3,39	0,99583	2,6	1,7	2,14
1080	11,74	31,7	9,6	0,54	15	58	3,25	0,99677	0,5*	2,3	2,62
1081	12,41	27,6	8,7	0,61	13	37	3,22	0,99441	1,0	1,8	2,12
1082	13	28,0	7,6	0,45	12	53	3,34	0,99391	1,2	2,3	2,35
1083	12,68	26,0	6,5	0,23	11	33	3,43	0,99347	2,3	2,3	1,89*
1084	11,36	31,8	8,1	0,38	17	58	3,38	0,99724	1,9	2,9	2,57
1085	10,78	28,0	7,0	0,74	11	40	3,49	0,99645	2,3	2,3	2,25
1086	15,51*	33,9	5,4*	0,88	11	34	3,82	0,99339	2,0	4,3	2,71
1087	15,14*	40,9**	8,2	0,69	12	52	3,43	0,99647	0,3*	10,3*	2,53
1088	15,11*	41,5**	8,2	0,79	11	41	3,42	0,99681	0,3*	9,7*	2,53
1090	12,38	29,6	6,2	0,51	20	48	3,50	0,99521	1,8	2,8	2,33
Povprečje	12,01	30,4	7,5	0,62	13	43	3,37	0,99575	2,1	2,5	2,44
SD***	0,60	2,4	0,7	0,17	3	6	0,13	0,00131	0,4	0,7	0,23

Preglednica 4: Osnovni kemijski parametri v deset mesecev starih vinih z oznako Teran, vzorčenih pri pridelovalcih konzorcijev na slovenskem in italijanskem Krasu.

SK – skupne kisline, HK – hlapne kisline, pr. SO_2 – prosti SO_2 , sk. SO_2 – skupni SO_2 , MK – mlečna kislina, r. sladkor - reducirajoči sladkor

* Rezultati izven PTP pravilnika

** Netipični rezultati

*** Standardna deviacija



Z ozirom na povprečne vrednosti vseh analiziranih vzorcev, njihovega porekla (slovenski ali italijanski del Krasa) in števila izstopajočih rezultatov lahko potrdimo podobnost med vini z obeh strani meje pri sledečih kemijskih parametrih, kot so skupni suhi ekstrakt, skupne kisline, hlapne kisline, prosti in skupni žveplov dioksid. Prav tako lahko potrdimo razlike med vini iz obeh strani meje pri naslednjih kemijskih parametrih: dejanskem alkoholu, mlečni kislini, reducirajočem sladkorju in pH vrednostih. Zaradi zahtev tega pravilnika so si vina na slovenski strani po osnovnih kemijskih parametrih med seboj bolj podobna.

Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran v Sloveniji med drugim zahteva:

maksimalno vsebnost dejanskega alkohola 13,0 vol %,

vsaj delni biološki razkis in minimalno vsebnost mlečne kisline v vinu vsaj 1,0 g/L,

maksimalno vsebnost reducirajočih sladkorjev 4,0 g/L.

Lahko zaključimo, da so razlike med vini iz obeh strani meje največje prav zaradi omejitev vsebnosti dejanskega alkohola in obvezi do vsaj delnega biološkega razkisa, ki veljajo v Sloveniji. Pri usklajevanju pravilnikov z namenom poenotiti vina na Krasu bo treba upoštevati tako razlike v vinogradniških kot vinarskih tehnologijah na obeh straneh meje.

Primerjava vin na čezmejnem Krasu je potrdila skladnost s slovenskim Pravilnikom o vinu z oznako PTP teran za 25 vzorcev vina. Za 13 vzorcev (8 s slovenske strani, in 5 z italijanske strani) ali 34 % od skupnega števila vzorcev skladnosti ne moremo potrditi.

Razprava in sklepi

Namen študije, ki se bo nadaljevala v prihodnjih letih, je določiti vsebnost in profil polifenolnih spojin grozdja Refošk in vina Teran PTP ter Terrano D.O.C različnih letnikov na različnih legah. Na ta način bomo ovrednotili tako značilnosti sorte kot značilnosti posameznih leg na slovenskem in italijanskem Krasu. Dobljeni podatki bodo pripomogli k izboljšanju kakovosti vina Teran PTP in Terrano D.O.C, dveh pomembnih tradicionalnih kraških pridelkov.

V študijo letnika 2011 je bilo vključeno grozdje sorte Refošk ob času trgatve iz 18 leg ter 38 vin Teran PTP in Terrano D.O.C iz slovenskega in italijanskega Krasa.



Dobljeni rezultati kažejo, da poleg sorte vpliva na vsebnost ekstrahiranih flavonoidov v grozdju tudi lega vinograda. Povprečne vrednosti skupin polifenolov so bile v letu 2011 večje od primerjanih letnikov za isto sorto. To pomeni, da je bil letnik 2011 na Krasu ugoden za sintezo polifenolov in dozorevanje grozdja Refošk. Ponovno se je izkazalo, da ima grozdje Refošk na Krasu visoke vsebnosti rdečih barvil antocianov, kar daje značilno intenzivno vijolično-rdečo barvo vinu, hkrati pa pozitivno vplivajo na njegovo prehransko vrednost. Pri sorti Refošk, ki je taninsko v povprečju manj bogata kot npr. Cabernet sauvignon, Merlot in Modra frankinja, lahko s podaljšano maceracijo rdeče drozge izkoristimo tudi doprinos taninov iz pečk grozdne jagode. Ker so v primeru nedozorelosti grozdja, tanini iz pečk slabe senzorične kakovosti, je pomembno, da je grozdje v času trgatve primerno zrelo.

Primerjava osnovnih kemijskih parametrov v vinih iz obeh strani meje je potrdila skladnost s slovenskim Pravilnikom o vinu z oznako PTP teran za 25 ali 66 % vzorcev vina, četudi ta pravilnik ne velja na italijanski strani meje. Za 13 vzorcev (8 iz slovenske strani, 5 iz italijanske strani) ali 34 % od skupnega števila vzorcev skladnosti ne moremo potrditi.

Zahvala

Delo na projektu Agrotur je financirano v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in iz nacionalnih sredstev.

Za pomoč pri izvedbi meritev se avtorji zahvaljujemo sodelavkam v Enološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije (Ivi Kmetič Ceglar, Nadi Bizjak in Bernardi Žitko) ter vsem vinarjem Združenja Konzorcij kraških pridelovalcev terana in Consorzia Tutela Vini Collio e Carso, ki so prispevali vzorce za analize.

Literatura

Di Stefano, R., Cravero, M.C., Gentilini, N. 1989. Methods for the study of wine polyphenols. *L'Enotecnico*, 5: 83-89.

Gazzeta n. 239 del 13. ottobre 2011, decreto 20. settembre 2011.

Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation. Partie I. Connaiss. Vigne Vin. 18, 195-217.

Mattivi, F. 1993. Il contenuto di resveratrolo nei vini rossi e rosati trentini del commercio. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 37-45.

- Mattivi, F., Monetti, A., Nicolini, G. 1995. Composizione fenolica e caratterizzazione di vini rossi monovarietali. *L' Enotecnico*, 6: 69-79.
- Mattivi, F., Nicolini, G. 1997. Analysis of polyphenols and resveratrol in Italian wines. *BioFactors*, 6: 445-48.
- Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., Valenti, L. 2002. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 957: 37-56.
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran, Uradni list št. 16, 15. 2. 2008.
- Pajović, R., Raičević, N., Popović, T., Lisjak, K., Vanzo, A. 2012. Polyphenol potential of red grapes and wines from Montenegro. V: Čuš, F. (ur.), Marinček, L. (ur.). *Vinarski dan 2012*, Ljubljana, 28. november 2012. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije: submitted.
- Fast access of some grape pigments to the brain. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7029-7034.
- Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G. 2000. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1996–2002.
- Vanzo, A., Vrhovšek, U. 2005. Antocianini - bioaktivne spojine vina = anthocyanins - bioactive compounds in wine. *Slovenski kemijski dnevi*, Maribor, 22. in 23. September, Glavič, P. in Brodnjak-Vončina, D. (ur.), FKKT, Maribor: str. 8.
- Vanzo, A., Terdoslavich, M., Brandoni, A., Torres, A.M., Vrhovšek, U., Passamonti, S. 2008. Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 10, 1106-1116.
- Vrhovšek, U., Eder, R., Wendelin, S. 1995. The occurrence of *trans*-resveratrol in Slovenian red and white wines. *Acta Alimentaria*, 24, 203-212.
- Vrhovšek, U. 1998. Resveratrol in Slovenian wines. *Sodobno kmetijstvo*, 31, 10: 437-440.

Transport flavonoidov kot indikator zrelosti grozdja sorte refošk

1,2,3,4,5,10 Università di Udine, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Sezione di Biologia vegetale

6 Zavod RS za transfuzijsko medicino

7 Univerza v Novi Gorici, Center za raziskave vina

8,9 Kmetijski Institut Slovenije, Centralni laboratorij

Bertolini (1) dr., Via delle Scienze N.206, 33100 Udine

Petrussa (2) dr., prav tam

Braidot (3) prof., prav tam

Peresson (4) dr., prav tam

Zancani (5) prof., prav tam

Rajčević (6) doc. dr., Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Sivilotti (7) dr., Vipavska c. 13, 5270 Ajdovščina

Vanzo (8), doc. dr., Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

Lisjak (9) dr., prav tam

Vianello (10) prof., Via delle Scienze N.206, 33100 Udine

Alberto Bertolini¹, Elisa PETRUSSA², Enrico BRAIDOT³, Carlo Peresson⁴, Marco Zancani⁵, Uroš Rajčević⁶, Paolo SIVILOTTI⁷, Andreja VANZO⁸, Klemen LISJAK⁹, Angelo VIANELLO¹⁰

Izvleček

Namen raziskave je bil ugotavljati vpliv redčenja grozdja v fazi obarvanja jagod (véraison) (CT) in vpliv odstranjevanja listov pred cvetenjem (PFLR) na nekatere parametre dozorevanja ter kvalitete grozdja sorte Refošk.

Ugotovljena je bila povezava med vsebnostjo polifenolov v grozdju in spreminjanjem v izražanju prenašalnega proteina za flavonoide v jagodni kožici. Prenašalni protein v jagodni kožici je reagiral s protitelesi, usmerjenimi proti bilitranslokazi. Bilitranslokaza je transmembranski prenašalni protein pri sesalcih in je odgovoren za transport rastlinskih polifenolnih spojin preko celične membrane v celicah sesalcev.

Z uporabo teh protitilov z encimsko-imunskim testom (ELISA) se je ugotavljalo prisotnost bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina med različnimi fazami dozorevanja grozdnih jagod sorte Refošk. Ekspresija analognega transportnega proteina se je povečala v fazi véraison in začetku dozorevanja v CT-tretiranju v primerjavi s kontrolo, medtem ko je PFLR-tretiranje pokazalo ravno nasprotni učinek. Ne glede na to, so v času trgatve grozdne jagode kontrolnega vzorca vsebovale signifikantno več prenašalnega proteina v primerjavi s CT- in PFLR-vzorci.

Dobljeni rezultati večjih vsebnosti prenašalnega proteina v kontrolnem vzorcu v času trgatve ne korelirajo striktno z vsebnostjo skupnih antocianov in skupnih polifenolov v grozdni jagodi. Zaradi amplexotehničnih ukrepov: spremenjenega razmerja med fotosintezno površino in reprodukcijskim aparatom, je bila vsebnost skupnih antocianov večja v grozdnih jagodah CT- in PFLR-vzorcev kot v grozdnih jagodah kontrole. Enako so amplexotehnični ukrepi vplivali na večjo vsebnost skupnih polifenolov v času trgatve v PFLR-vzorcih in nekaterih CT-vzorcih grozdnih



jagod. Velja poudariti, da četudi imajo ampelotehnični ukrepi, s katerimi pri grozdju povečamo razmerje »vir/poraba« (»source/sink«), kot posledico zmanjšano izražanje bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina, je bila njegova raven in raven drugih transportnih proteinov dovolj visoka za zagotavljanje primerne medceličnega transporta sekundarnih metabolitov.

Ključne besede: Refošk, redčenje grozdov, zgodnje odstranjevanje listov, transport flavonoidnih spojin, polifenoli, bilitranslokazi podoben prenašalni protein, dozorevanje

Flavonoid transport as a marker in Refosk grape maturation

Abstract

This research was performed with the aim of studying the influence of cluster thinning at véraison (CT) and pre-flowering leaf removal (PFLR) on some maturation and quality parameters of grape Refošk.

Polyphenol content was related to the pattern of a flavonoid transporter present in the skin. This protein cross-reacted with an antibody raised against a sequence of the mammalian bilitranslocase, transmembrane transporter protein involved in cell membrane transport of dietary polyphenols.

This antibody was used in ELISA test to probe the presence of the transporter in ripening Refošk grape berry. The bilitranslocase-like translocator expression was increased at the véraison and the onset of maturation by CT treatment, when compared to untreated grapevines, while PFLR showed the opposite trend. Nevertheless, at harvest, untreated samples showed an increment of protein concentration, which was significantly higher than in the other treatments.

These results seem not strictly related with the total anthocyan content in grape berry, since total pigments increased more in CT and PFLR rather than in control samples, due to a favourable shift in photosynthetic area and reproductive organ balance induced by these agronomic practices. Similarly, also the phenolic potential, specifically evaluated at the harvest stage, showed a positive increase of all the parameters examined in the PFLR samples and of some of them in the CT ones. In conclusion, although the

viticultural practices able to increase source/sink ratio in the cluster lead to a reduced expression of bilitranslocase-like translocator, its level and the one of other transporter proteins would be adequate enough to accomplish secondary metabolite translocation.

Keywords: Refoš, cluster thinning, early leaf removal, flavonoid transport, polyphenols, bilitranslocase-like transporter protein, maturation

Uvod

Jagodna kožica rdečih sort vinske trte se med dozorevanjem progresivno obarva zaradi biosinteze in kopičenja fenolnih spojin, kot so flavonoidi (Famiani s sod., 2000). Pri grozdu opravljajo flavonoidi (antociani, flavonoli, katehini in proantocianidini) ključno vlogo, ker so del številnih fizioloških procesov.

Poleg tega predstavljajo flavonoidi grozdu kvalitativni parameter, ki vpliva na organoleptični profil vina, saj prispevajo k aromatskim in barvnim lastnostim ter nutrijnsko-farmaceutskemu potencialu. Vse večja pozornost glede kakovosti vin zahteva pridobivanje poglobljenega znanja o fenolnem dozorevanju grozdnih jagod in izvajanje ampelotehničnih ukrepov v vinogradu, ki izboljšujejo polifenolni potencial grozdu. V takšnem kontekstu se pojavlja ključna potreba po preučevanju mehanizmov celičnega transporta flavonoidnih snovi. Zadnje se namreč po sintezi kopičijo na različnih mestih v grozdu jagodi.

Nedavno tega je bil v kožici in pulpi grozdnih jagod sorte Merlot in Zeleni sauvignon odkrit protein rastlinskega izvora, ki je precej podoben transmembranskemu prenašalnemu proteinu bilitranslokazi pri sesalcih. Bilitranslokaza je odgovorna za transport rastlinskih polifenolnih spojin preko celične membrane v celicah sesalcev. Bilitranslokazi podoben prenašalni protein je nov prenašalni protein za polifenole v rastlinah, poleg že znanih prenašalnih proteinov (Braidot in učenci, 2008; Bertolini in učenci, 2009). Vsebnost bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina narašča v času fenolnega dozorevanja grozdne jagode in je pogojena s pomanjkanjem vode v zemlji.

Z uporabo bilitranslokaznih protiteles v encimsko-immunskem testu (ELISA) se je ugotavljalo prisotnost bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina v proteinskih ekstraktih kožice grozdnih



jagod sorte Refošk. Analize prenašalnega proteina bodo pripomogle k preučevanju vloge zadnjega pri fenolnem dozorevanju grozdne jagode. Nadalje je bila dokazana povezava med spreminjanjem vsebnosti prenašalnega proteina in koncentracije glavnih polifenolnih spojin. Tovrstna analiza je bila med drugim izvedena na jagodah vinskih sort, pri katerih so bili izvedeni ampelotehnični ukrepi, ki lahko vplivajo na obdobje dozorevanja, in sicer predčasna defoliacija ter redčenje grozdja pri mladikah.

Materiali in metode

Rastlinski material

Analiza izražanja bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina v grozdnih jagodah je bila izvedena na grozdju letnika 2012, v vinogradu z vinsko sorto Refošk, na domačiji Lisjak v Dutovljah (Slovenija). Gojitvena oblika trt je enojni Guyot, na katerem so bili preizkušeni trije različni ampelotehnični ukrepi: kontrola, brez defoliacije (UN, untreated); zelo zgodnja defoliacija 10 dni pred cvetenjem: 4–5 listov/poganjek, 25.5.2012 (PFLR, Pre-Flowering Leaf Removal); redčenje grozdja pred njegovo popolnim obarvanjem: 1 grozd/poganjek, 2. 8. 2012 (CT, Cluster Thinning). Poskus je bil zasnovan naključno, s 4 ponovitvami za vsak posamezen ampelotehnični ukrep.

Ob vsakem datumu vzorčenja je bilo obranih 5–6 grozdov iz vsake vzorčne parcele. Grozdne jagode smo ločili od grozdnih pecljev in jih shranili na -80 °C do nadaljnjih analiz.

Določanje skupne vsebnosti antocianov

Za vsak ampelotehnični ukrep ob štirih datumih vzorčenja je bilo zmletih v mešalniku 200 grozdnih jagod. Pri metodi za ugotavljanje fenolne zrelosti grozdnih jagod, kot jo predlaga Glories (1978), sta bila stehtana dva 25 g alikvotna dela. Vzorca sta bila pripravljena za nadaljnji postopek analiziranja, in sicer v prvem primeru z dodajanjem 25 ml raztopine s pH-vrednostjo 1 (0.1 N HCl, razredčene v destilirani vodi) in v drugem primeru z dodajanjem 25 ml raztopine s pH-vrednostjo 3.2 (5 g vinske kisline in 22 ml NaOH, razredčenih v 1 l destilirane vode). Po 4 urah so bili vzorci prefiltrirani in pripravljeni za spektrofotometrično določanje vsebnosti skupnih antocianov.

Določanje vsebnosti skupnih antocianov in proantocianidov

Takoj po vzorčenju smo grozdje ohladili na 4 °C in pripravili selektivne ekstrakte kožic ter pečk grozdne jagode. Uporabljena je bila ekstrakcijska metoda, katere namen je simulacija procesa vinifikacije v laboratorijskih pogojih (Mattivi in sod., 2002). Kožice in pečke 200 g naključno vzorčenih grozdnih jagod iz reprezentativnega vzorca smo ločeno izluževali 5 dni pri 30 °C v raztopini vode in etanola (88 : 12 v/v), ki je vsebovala 100 mg/l SO₂, 5 g/L vinske kisline in imela pH- vrednost 3.2. Ekstrakti so bili preprihani z dušikom in shranjeni na 4 °C do spektrofotometričnih analiz. Spektrofotometrične analize skupnih polifenolov, skupnih antocianov, proantocianidinov z nizko molekulsko maso (vanilin indeks) in proantocianidinov z visoko molekulsko maso (Bath-Smith) v ekstraktih smo naredili pod optimiziranimi pogoji (Rigo in sod., 2000).

Ekstrakcija skupne vsebnosti proteinov v kožici grozdnih jagod

Za ekstrakcijo skupne vsebnosti proteinov v kožici grozdnih jagod je bilo ob treh vzorčenjih med dozorevanjem grozdja obranih 5–6 grozdov s treh naključnih bioloških ponovitev: ob obarvanju jagod (véraison) (približno 50 % obarvanih jagod, 14. avgusta 2012); ob predčasni dozorelosti (7. septembra 2012); ter ob končni dozorelosti ob času trgatve (28. septembra 2012). Pri vzorcu 20 jagod je bila ločena jagodna kožica, iz katere se je nato ekstrahiralo skupno vsebnost proteina po modificiranih metodah Conlon & Salter (2007) ter Song in sod. (2006), s pomočjo toplega bazičnega pufra ter raztopine acetona in klorovodikove kisline.

Encimsko-imunski testprenašalnega proteina za flavonoide

Z encimsko-imunskim testom (ELISA) je bilo skupno preizkušenih 5 µg proteina v mikrotitrskih ploščicah. Mikrotitrne ploščice so bile prekrte z antigenom (klon IgM 11C9), ki se je tvoril proti peptidu EFTYQLTSSPTC, ki odgovarja sekvenci 235–246 bilitranslokaze sesalcev (Passamonti in sod., 2005). Encimsko-imunski odziv se je izmerilo s pomočjo kolorimetra z alkalno fosfatazo.

Statistična analiza

Na podlagi podatkov, ki so bili pridobljeni s pomočjo testa ELISA, je bila opravljena analiza spremenljivosti (programska oprema STATISTICA, različica 8). Primerjava povprečij je bila opravljena s pomočjo testa Fisher LSD, s statistično značilnostjo $p \leq 0.05$.

Rezultati

Koncentracija bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina za flavonoide se je progresivno povečala v jagodni kožici grozdja sorte Refošk med obdobjem dozorevanja, pri vseh primerjanih ampelotehničnih ukrepih (Slika 1). Iz rezultatov testa ANOVA, ki so prikazani v Preglednici 1, je razvidno, da je datum vzorčenja pri različnih ampelotehničnih ukrepih predstavljal statistično pomemben faktor spremenljivosti ($p < 0.001$). Pridobljeni rezultat potrjuje specifično korelacijo med proteinom in procesom dozorevanja grozdnih jagod, kot je bilo že dokazano pri drugih kultivarjih vinske trte (Braidot in učenci, 2008; Bertolini in učenci, 2009).

Preglednica 1 – Test ANOVA o učinkih posameznih faktorjev, kot sta datum vzorčenja (D) in ampelotehnični ukrep (T), na izražanje bilitranslokazi podobnega prenašalnega proteina v jagodni kožici sorte Refošk.

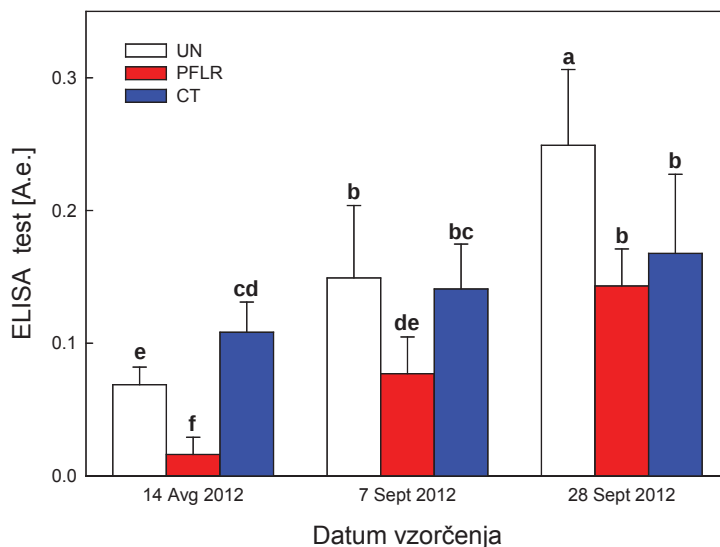
T Test Elisa		D Test ELISA		T x D Test ELISA	
UN	0,16±0,008	14 Avg	0,06±0,008		
PFLR	0,08±0,009	07 Sept	0,12±0,008		
CT	0,14±0,006	28 Sept	0,19±0,007		
F	23,19	F	63,66	F	6,98
p	< 0,001	p	< 0,001	p	< 0,001

Izražanje prenašalnega proteina ($p < 0.001$) je pogojeno s tipom ukrepa in medsebojnim delovanjem med faktorjema: datumom vzorčenja in ampelotehničnim ukrepom.

V primerjavi z ampelotehničnima ukrepoma UN in PFLR se je izražanje prenašalnega proteina bistveno povečalo samo pri grozdju iz vzorca CT, in sicer med fazo véraison (obarvanje jagod). V vseh nadaljnjih fazah se izražanje proteina ni bistveno spreminjalo v primerjavi s kontrolnimi vrednostmi. Ampelotehnični ukrep PFLR je, v primerjavi s kontrolnimi trtami (brez zgodnjega odstranjevanja listov), povzročil bistveno zmanjšanje v količini izraženega proteina v vseh analiziranih fazah dozorevanja.

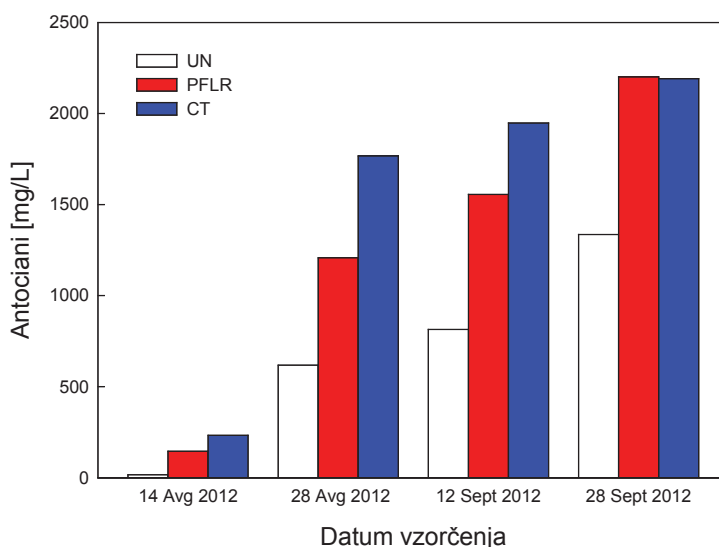
Da bi lahko preučili fiziološko vlogo bilitranslokazi podobnega prenašalnega proteina med fenolnim dozorevanjem grozdja sorte Refošk, smo analizirali skupno vsebnost antocianov in polifenolov v grozdnih jagodah trt, ki so bile izpostavljene trem različnim ampelotehničnim

ukrepom. Izbiri ampelotehničnih parametrov namesto tehnoloških parametrov dozorevanja je botrovalo dejstvo, da zadnje podrobneje prikazujejo kvalitativno sestavo grozdne jagode.



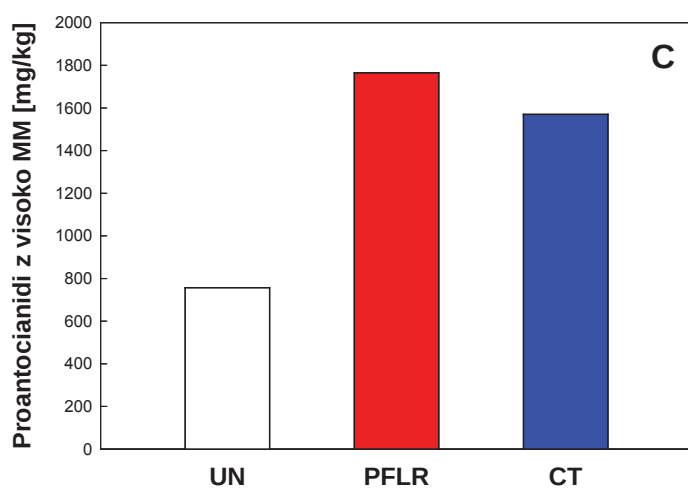
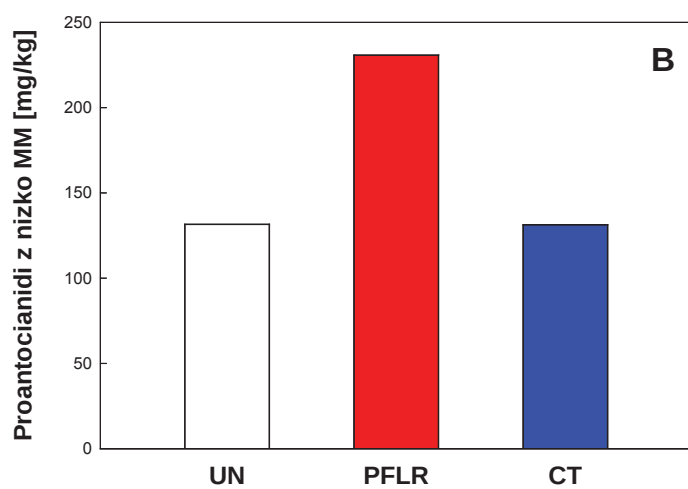
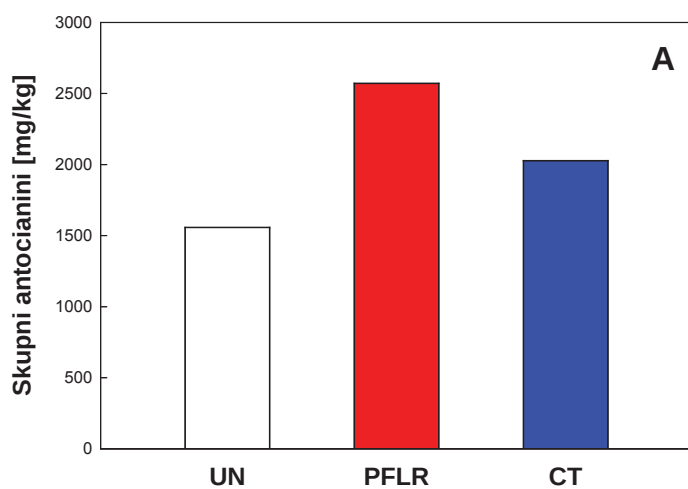
Slika 1: Letnik 2012 – Trend izražanja prenašalnega proteina flavonoidnih spojin, ki so prisotne v jagodni kožici grozdja s trt, na katerih: ni bila opravljena defoliacija (UN), je bila opravljena defoliacija pred fazo cvetenja (PFLR) oziroma je bilo zredčeno število grozdov (CT). Z izbiro različnih črk so prikazane bistvene razlike pri 95 % vrednosti intervala zaupanja.

Vsebnost antocianov se je pri ampelotehničnih ukrepih CT in PFLR, v primerjavi s kontrolno vrednostjo v grozdni jagodi sorte Refoš, povečevala vse od faze obarvanja jagod (véraison), kot tudi v vseh ostalih preučevanih fazah. Ta rezultat je potrdil predčasno dozorevanje grozdne jagode, ki so ga sprožili ampelotehnični ukrepi, tako na ravni tehnoloških kazalnikov (Sivilotti in sod., 2012, Slika 1), kot tudi pri vsebnosti skupnih polifenolov (Sivilotti in sod., 2012, Slika 2) in vsebnosti skupnih ekstrahiranih antocianov. Omenjeni rezultat je bil pričakovan, saj lahko vpliv ugodnejšega razmerja »vir/poraba«, ki je posledica ampelotehničnih ukrepov, povzroči pozitivno spremembo v metabolizmu in kopičenju antocianov ob trgatvi, kar posledično vpliva na kakovost proizvedenega vina.



Slika 2 : Trend skupne vsebnosti antocianov, ekstrahiranih iz grozdnih jagod na trtah, pri katerih ni bila opravljena defoliacija (UN), na katerih je bila opravljena defoliacija pred fazo cvetenja (PFLR) oziroma na trtah, pri katerih je bilo opravljeno redčenje grozdov (CT) letnika 2012.

Kar zadeva polifenolni potencial jagodnih kožic ob času trgatve, velja omeniti, da so bili v primerjavi z UN-trtami nekateri izmed analiziranih parametrov povišani pri grozdnih jagodah s CT- in PFLR- trt, in sicer vsebnost skupnih antocianov ter visokomolekularnih proantocianidinov (Slika 3A, 3C), medtem ko so bili nizkomolekularni proantocianidini višji v grozdju, vzorčenem iz PFLR-trt (Slika 3B). Na podlagi dobljenih rezultatov je mogoče strniti nekaj zaključkov. Med vsebnostjo polifenolov v zreli grozdni jagodi in izražanjem bilitranslokazi podobnega prenašalnega proteina ni direktne povezave, saj se vsebnost antocianov in proantocianidinov bistveno bolj povečuje pri ampelotehničnih ukrepih CT in PFRL, v primerjavi s trtami, kjer nismo opravili opisanih ampelotehničnih ukrepov. Je pa bilo mogoče opaziti ravno v zadnjih povišano vsebnost omenjenega proteina. Vsekakor se je izražanje bilitranslokazi podobnega rastlinskega prenašalnega proteina povečevalo v času vseh faz dozorevanja, kar namiguje na ključno vlogo tega med dozorevanjem grozdne jagode. Vendar je pri tem povsem realna verjetnost, da ampelotehnični ukrepi, ki povečujejo razmerje »vir/poraba« pri grozdu, ugodno vplivajo na izražanje drugih proteinov, odgovornih za sekundarni transport flavonoidnih spojin.



Obravnavanja



Slika 3 : Vsebnost antocianov (A), proantocianidinov z nizko molekulsko maso (B), proantocianidinov z visoko molekulsko maso (C) v jagodni kožici grozdja, vzorčenega ob trgatvi (28. 9. 2012) iz trt, pri katerih ni bila opravljena defoliacija (UN), na katerih je bila opravljena defoliacija pred fazo cvetenja (PFLR) oziroma na trtah, pri katerih je bilo opravljeno redčenje grozdov (CT). Rezultati so izraženi na mg/kg sveže mase grozdnih jagod.

Zaključki

Skladno s podatki, ki so bili predhodno objavljeni (Pastore in sod., 2011), potrjujejo rezultati analiz pozitiven vpliv ampelotehničnih ukrepov, ki povečujejo razmerje »vir/poraba«, na vsebnost polifenolov v grozdni jagodi, kar posledično vpliva na hitrejšo dozorevanje in izboljšanje kakovosti grozdja.

Ampelotehnični ukrepi v vinogradu niso povzročili večje izražanje bilitranslokazi podobnega prenašalnega proteina v jagodni kožici. Pri vseh ukrepih in kontroli je bila raven izražanja v pozitivni korelaciji s fazo dozorevanja. Iz rezultata se lahko sklepa, da regulacija izražanja preiskovanega prenašalnega proteina ni direktno odvisna od biosinteze polifenolnih snovi, vendar ni mogoče izključiti možnosti, da se lahko sekundarni prenašalni proteini drugače modulirajo med fazo dozorevanja jagod, kar bilo predstavljeno nedavno (Pastore in sod., 2011).

Velja poudariti, da bodo predstavljena dognanja prispevala k boljšemu fiziološkemu poznavanju dozorevanja polifenolov v grozdju sorte Refoš. Dobljeni preliminarni rezultati predstavljajo izhodišče za načrtovanje nadaljnjih raziskav, s pomočjo katerih se bo izboljšalo kvalitativno vrednotenje grozdnih jagod v fazi dozorevanja.

Zahvale

Zahvaljujemo se evropskim projektom čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007–2013, in sicer projektu TRANS2CARE (Transregionalno omrežje za inovacijo in prenos tehnološkega znanja za izboljšanje zdravstva – projekt je financiran iz sredstev Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007–2013) ter projektu AGROTUR (Kraški agroturizem – projekt je sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007–2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev).

Bibliografija

- Bertolini, A., Peresson, C., Petrusa, E., Braidot, E., Passamonti, S., Macrí, F., Vianello, A. 2009. Identification and localization of the bilitranslocase homologue in white grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3861–3871.
- Braidot, E., Petrusa, E., Bertolini A., Peresson, C., Ermacora, P., Loi, N., Terdoslavich, M., Passamonti, S., Macrí, F., Vianello, A. 2008. Evidence for a putative flavonoid translocator similar to mammalian bilitranslocase in grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Planta*, 228: 203–213.
- Conlon, H. E., Salter, M. G. 2007. Plant protein extraction. *Methods in Molecular Biology*, 362: 379–383.
- Famiani, F., Walker, R. P., Tecsi, L., Chen, Z. H., Proietti, P., Leegood, R. C. 2000. An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany*, 51: 675–683.
- Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. 195 pp. Thèse Doctorat d'Etat, Université Bordeaux II.
- Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., Valenti, L. 2002. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957: 37–56.
- Passamonti, S., Cocolo, A., Braidot, E., Petrusa, E., Peresson, C., Medic, N., Macrí, F., Vianello, A. 2005. Characterization of electrogenic bromosulphophthalein transport in carnation petal microsomes and its inhibition by antibodies against bilitranslocase. *Febs Journal*, 272: 3282–3296.
- Pastore, C., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Allegro G., Dal Santo S., Valentini G.
- Intrieri, C., Pezzotti, M., Filippetti, I. 2011. Increasing the source/sink ratio in *Vitis vinifera* (cv Sangiovese) induces extensive transcriptome reprogramming and modifies berry ripening. *BMC Genomics*, 12: 631–654
- Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rosetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U., Mattivi, F. 2000. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1996–2002
- Sivilotti, P., Butinar, L., Jež, A., Tronkar, J., Turk, M., Vanzo, A., Lisjak, K. 2012. Effetto della gestione della chioma sulla produzione e sulla qualità delle uve terrano. In *Vinarski dan 2012*. D. Bavčar et al. (Eds.). Ljubljana, Slovenia.
- Song, J., Braun, G., Bevis, E., Doncaster, K. 2006. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis*, 27: 3144–3151.



Spojine, ki jih v vinu ne želimo

1,2,3,4,5 Kmetijski
inštitut Slovenije

6,7,8,9, Univerza v Novi
Gorici

Basa Česnik (1) dr.,
Hacquetova ulica 17,
1000 Ljubljana

Žnidaršič-Pongrac (2)
mag., prav tam

Velikonja Bolta (3) dr.,
prav tam

Čuš (4) doc. dr., prav
tam

Lisjak (10), prav tam

Butinar (5) dr., Vipavska
13, 5270 Ajdovscina

Rakar (6) dr., prav tam

Žabar (7), prav tam

Trebše (8) dr., prav tam

Franko (9) izr. prof. dr.,
prav tam

Helena BAŠA ČESNIK¹, Vida ŽNIDARŠIČ-PONGRAC²,
Špela VELIKONJA BOLTA³, Franc ČUŠ⁴, Lorena
BUTINAR⁵, Andreja RAKAR⁶, Romina ŽABAR⁷, Polonca
TREBŠE⁸, Mladen FRANKO⁹, Klemen LISJAK¹⁰

Izvleček

Pridelava grozdja zahteva ustrezno zaščito vinske trte s sredstvi, ki preprečujejo rast plesni ter drugih škodljivcev trte in grozdja. V integrirani pridelavi se uporablja vrsto dovoljenih fitofarmacevtskih sredstev (FFS), medtem ko je v ekološki pridelavi grozdja dovoljena izključno uporaba bakra in žvepla. Ostanke fitofarmacevtskih sredstev lahko ostajajo na grozdju in deloma prehajajo v vino. Prav tako lahko v mlečnokislinski fermentaciji nastajajo biogeni amini, ki jih tvorijo nezaželeni mlečnokislinski bakterije iz aminokislinskih prekurzorjev. Kvasovke, rodu *Brettanomyces/Dekkera* lahko tvorijo hlapne fenole, ki jih povezujemo z vonjem po konjskem znoju ali zdravilih. V prispevku so predstavljeni rezultati monitoringa nezaželenih spojin pri pridelavi Terana PTP in Terrano D.O.C. (v nadaljevanju Teran) na čezmejnem Krasu. Vzorčenje je potekalo v vinogradih, vključenih v integrirano ali ekološko pridelavo. V grozdju in vinu smo spremljali ostanke fitofarmacevtskih sredstev, v vinu pa vsebnosti kovin, biogenih aminov in hlapnih fenolov. Za analizo ostankov FFS smo uporabili multirezidualno metodo GC/MS in multirezidualno metodo LC/MS/MS. Kovine v vinu smo analizirali z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS, GFAAS). Biogene amine smo analizirali s HPLC/FLD, s predhodno derivatizacijo z ortohtalaldehidom. Za analizo hlapnih fenolov smo uporabili metodo GC/MS, s predhodno ekstrakcijo v organskem topilu. Ostanke FFS v grozdju niso v nobenem vzorcu presegali največjih dovoljenih količin ostankov (maximum residue level = MRL). V grozdju in vinu smo določili le ostanke aktivnih snovi, dovoljenih v integrirani pridelavi grozdja v letu 2011. Izmerjene koncentracije kovin v vinu so bile pod predpisanimi najvišjimi dopustnimi vrednostmi, z izjemo presežene vsebnosti bakra v dveh vzorcih, ki sta verjetno posledica uporabe prevelike količine bakrovega sulfata za odpravljanje napak vina (H₂S). Hlapni fenoli, predvsem 4-etil fenol, v nobenem vzorcu niso presegli praga senzorične zaznave, ki vinu daje neprijetne arome po



konjskem znoju. Terani letnika 2011 nimajo prekoračenih vrednosti spojin, ki jih v vinu ne želimo ali so zdravju nevarne, zato predstavljajo potrošniku varen produkt.

Ključne besede: vino, ostanki fitofarmaceutskih sredstev, kovine, biogeni amini, hlapni fenoli

Unwanted compounds in wines

Abstract

Grape production requires adequate protection of vine with substances that prevent the growth of mold and other vine and grape 'diseases'. In integrated production a number of permitted plant protection products (PPPs) are used, while in the organic production of grapes only use of copper and sulphur is permitted. PPP residues can remain on grapes and they can partly pass into the wine. It is also possible that in lactic acid fermentation, biogenic amines are formed by lactic acid unwanted bacteria from amino acid precursors. Yeasts of the genus *Brettanomyces/Dekkera* can form volatile phenols, which have been associated with the smell of horse sweat or medicines. This paper presents the results of monitoring of undesirable compounds in the production of the Karst wine Teran PTP and Terrano D.O.C. (in text Teran) wine. Sampling was performed in vineyards included in integrated pest management and organic production. In grapes and wine, plant protection product (PPP) residues were monitored. In wine, metals, biogenic amines and volatile phenols were monitored as well. For the analysis of PPP residues multiresidual GC/MS and multiresidual LC/MS/MS method was used. For the analysis of metals flame and electrothermal atomic absorption spectrometry (FAAS, GFAAS) were used. For the analysis of biogenic amines we used HPLC/FLD method with pre-derivatization with orto phtalaldehyde. For the analysis of volatile phenols GC/MS method was used with previous extraction with organic solvent. PPP residues in grapes did not exceed maximum residue levels (MRLs). In grapes and wine only active substances allowed in integrated pest management of grapes in 2011 were determined. The concentrations of metals analyzed in wines were all below the prescribed maximum values with the exception of two samples in which exceeded concentrations of copper were found. These were probably due to treatment of wine with copper sulphate for the elimination of noxious sulphur derivatives. Volatile phenols, mainly 4-ethyl phenol in any of these samples did



not exceed the threshold of sensory perception, which gives the wine unpleasant aroma of the horse sweat. Teran wines, vintage 2011 do not have exceedances of compounds, we do not want or are harmful to human health, and therefore represent a safe product for the consumer.

Keywords: wine, permitted plant protection residues, metals, biogenic amines, volatile phenols

Uvod

Spojine, ki jih ne želimo v vinu, lahko izvirajo tako iz pridelave kot predelave grozdja. V vinogradu je tretiranje vinske trte in grozdja neobhodno, če želimo pridelati zdravo in kakovostno grozdje. Pojavljanje fitofarmaceutskih sredstev (FSS) ter koncentracije njihovih ostankov v grozdju in posledično v vinu, so odvisne od pojava bolezni ter škodljivcev, značilnih za določeno vinogradniško območje, tipa vinogradniške pridelave (konvencionalna, integrirana, ekološka), koncentracije sredstev ob škropljenju, pretečenega časa od zadnjega škropljenja in klimatskih razmer (predvsem sončnega obsevanja in količine padavin). Dovoljene vsebnosti so za aktivne spojine, ki smo jih določevali, predpisane za grozdje (MRL) v Uredbah komisije (EU) št. 839/2008, 149/2008, 822/2009, 1050/2009, 1097/2009, 459/2010, 750/2010, 765/2010, 893/2010, 893/2010, 508/2011, 520/2011, 524/2011, 812/2011, 813/2011, 978/2011 in 310/2011. Dovoljene vsebnosti aktivnih snovi (MRL) v vinu niso predpisane.

Povišane vsebnosti kovin v vinu so lahko posledica vinogradniških ukrepov (uporaba gnojil, fitofarmaceutskih sredstev na bazi kovin, predvsem bakra), lahko so posledica načina predelave grozdja v vino (podaljšana fermentacija mošta, stik mošta in vina z enološko opremo iz kovinskih zlitin), ali pa so posledica ukrepov za stabilizacijo vina in preprečevanje motnosti (uporaba enoloških sredstev). Najvišje vsebnosti kovin v vinu so predpisane v Aneksu C (Zbornik OIV).

Poleg anorganskih substanc, ki so nezaželeni v vinu in v višjih koncentracijah zdravju oporečni, lahko razvoj nezaželenih mikroorganizmov privede do tvorbe različnih organskih spojin, ki negativno vplivajo tako na senzorične kot zdravstvene učinke vina. Do danes je bilo iz grozdnega mošta in vina izoliranih 25 različnih vrst mlečnokislinskih bakterij (MKB) iz rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* in *Weissella*. Po alkoholni



fermentaciji MKB pretvorijo L-jabolčno v L-mlečno kislino. Tako imenovana jabolčno-mlečnokislinska fermentacija (JMKF) primarno vodi do biološkega razkisa, vendar tudi do sprememb v pH- vrednosti, aromi in barvi vina ter mikrobiološki stabilnosti. Kljub pozitivnemu vplivu na kakovost vina, pa so nekateri sevi MKB odgovorni tudi za nastanek različnih bolezni vina. Tudi tvorba biogenih aminov je večinoma posledica mikrobiološke aktivnosti nekaterih sevov MKB med vinifikacijo (Konig in Frohlich, 2009; Petri s sod., 2013). Najpogostejši biogeni amini v vinu so: histamin, tiramin in putrescin. Njihova koncentracija se navadno poveča med spontano JMKF ter med zorenjem brez dodanega SO₂. Ostali amini, npr. metilamin, etilamin, feniletilamin, izoamilamin in kadaverin, ki so lahko prisotni že v grozdnem moštu, pa lahko nastanejo ali se razgradijo med vinifikacijo (Lonvaud-Funel, 2001).

Kvasovke rodu *Brettanomyces/Dekkera* lahko z encimi cinamat dekarboksilaze in vinil-fenol reduktaze tvorijo v anaerobnih pogojih povišane vsebnosti hlapnih fenolov, ki dajejo vinu neprijeten vonj: 4-vinil-fenol (vonj po zdravih), 4-vinil-gvajakol (vonj po začimbah, dimu), 4-etil fenol (vonj po konjskem znoju in hlevu) in 4-etil-gvajakol (vonj po klinčkih). Takšni vonji so lahko za potrošnika moteči in nesprejemljivi. Prednostni prag zaznave v rdečih vinih, ki prekrije ostalo aromo, znaša v rdečih vinih 420 µg/l za mešanico etil-fenola in etil-gvajakola, v razmerju 10 : 1 (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Z namenom ugotavljanja vsebnosti nezaželenih spojin v Teranu letnika 2011, smo izvedli monitoring ostankov FFS v grozdju in vinu ter kovin, biogenih aminov in hlapnih fenolov v vinu Teran PTP in Terrano D.O.C. s slovenskega in italijanskega Krasa.

Material in metode

Vzorčenje

Grozdje smo vzorčili na Krasu, v vinogradih, vključenih v integrirano pridelavo. Jeseni 2011 smo ob trgatvi odvzeli 18 vzorcev grozdja s čezmejnega Krasa, poleti 2012 pa 39 vzorcev vina Teran PTP in Terrano D.O.C. (v nadaljevanju Teran) letnika 2011. Vzorci vina so bili odvzeti iz inoks tankov ali lesenih posod.

Analitske metode

Za analize ostankov FFS v vseh vzorcih smo na Kmetijskem inštitutu Slovenije uporabljali naslednje analizne metode: akreditirano multirezidualno metodo s plinskim

kromatografom z masnim spektrometrom (GC-MS); (Baša Česnik in Gregorčič, 2003) ter multirezidualno metodo s tekočinskim kromatografom, s tandemskim masnim spektrometrom LC-MS/MS (Baša Česnik in Gregorčič, 2003; Zweigenbaum in sod., 2009). Pred GC-MS in LC-MS/MS analizami smo ekstrahirali vzorce z acetonom, petroletrom in diklorometanom ter jih očistili z gelsko permeacijsko kromatografijo.

Za analizo kovin smo uporabili vzorec, ki smo mu odparili alkoholno frakcijo. Baker (Cu), železo (Fe) in cink (Zn) smo določali s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS, Analyst 800, Perkin Elmer), svinec (Pb), kadmij (Cd) in arzen (As) pa z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo (ETAAS, Analyst 600, Perkin Elmer).

Analize biogenih aminov so bile opravljene na Univerzi v Novi Gorici. Vzorce vina smo razredčili z metanolom in vzorec derivatizirali z ortohtalaldehidom ob prisotnosti 2-merkaptotetanola in boratnega pufra, s pH-vrednostjo 10,5. Tako smo dobili fluorescenčne derivate biogenih aminov, ki smo jih nato določali z visokotlačno tekočinsko kromatografijo, z fluorescenčnim detektorjem (HPLC-FLD); (Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo alto, ZDA) Detekcija je potekala pri valovni dolžini 445 nm, medtem ko je vzbujanje fluorescence potekalo pri 356 nm. Kot mobilno fazo smo uporabili (A) metanol in (B) 0,05 M raztopino natrijevega acetata ter tetrahidrofurana v razmerju 96 : 4.

Število MKB smo določili s klasično gojitveno metodo na trdnem selektivnem gojišču MRStj (Biolife, Italija) z dodanim 50 mg/l cikloheksimidom in 2 % paradižnikovim sokom. Na selektivno gojišče smo razmazali od 0,1 do 1 ml vzorca in anaerobno inkubirali pri 25 °C.

Pri analizi hlapnih fenolov smo v vzorec vina dodali interni standard 2,3-dimetilfenol in vino ekstrahirali 30 minut z dietiletrom v ultrazvočni kopeli. Ekstrakte smo po sušenju z natrijevim sulfatom določevali z GC-MS.



Rezultati

Ostanki FFS v grozdju in vinu

Glede na aktivne snovi, najdene v grozdju in vinu, smo sklepali, da so kmetje uporabljali komercialno dostopna FFS za zatiranje oidija vinske trte (*Uncinula necator*), črne pegavosti vinske trte (*Cryptosporella viticola*), rdečega listnega ožiga (*Pseudopeziza tracheiphila*), sive grozdne plesni (*Botrytis cinerea*), peronosporne vinske trte (*Plasmopara viticola*), pasastega grozdnega sukača (*Eupoecilia ambiguella*), križastega grozdnega sukača (*Lobesia botrana*) in ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus*). Pregled je prikazan v Preglednici 1.

Preglednica 1: Trgovsko ime za fitofarmacevtska sredstva (FFS) in uporaba za aktivne snovi, določene v vzorcih grozdja in vina

* Tehnološka navodila za integrirano pridelavo grozdja za leto 2011, MAFF, 2011

Vsebnost ostankov FFS je bila pričakovano višja v grozdju kot v vinih. Rezultati so prikazani v preglednici 2.

Aktivna snov	FFS-trgovsko ime*	Uporaba proti*
Azoksistrobin	QUADRIIS, UNIVERSALIS	Oidij, črna pegavost, rdeči listni ožig, peronospora
Benalaksil	GALBEN C, GALBEN M	Peronospora
Benalaksil-M	FANTIC F WG	Peronospora
Boskalid	COLLIS	Oidij, siva plesen
Ciprodinil	SWITCH 62,5 WG	Siva plesen
Dimetomorf	FORUM STAR, ACROBAT MZ WG	Peronospora
Fenhexamid	TELDOR SC 500	Siva plesen
Fludioksonil	SWITCH 62,5 WG	Siva plesen
Folpet	UNIVERSALIS, FOLPAN 80 WDG, FANTIC F WG, FORUM STAR,	Oidij, črna pegavost, rdeči listni ožig, peronospora
	PERGADO-F, MIKAL FLASH, MELODY COMBI WP 43,5,	
	MIKAL PREMIUM F	
Iprovalikarb	MELODY COMBI WP 43,5, MIKAL PREMIUM F	Peronospora
	MELODY DUO WG 66,8A	
Klorpirifos	PYRINEX 25 CS	Križasti in pasasti grozdni sukač, ameriški škržatek
Kvinoksifen	CRYSTAL	Oidij
Mandipropamid	REVUS, PERGADO-F, PERGADO MZ	Peronospora
Metalaksil-M	RIDOMIL GOLD MZ PEPITE, RIDOMIL GOLD COMBI PEPITE,	Peronospora
	RIDOMIL GOLD PLUS 42,5 WP	
Metoksifenozyd	RUNNER 240 SC	Križasti in pasasti grozdni sukač
Tebukonazol	FALCON EC 460, FOLICUR EW 250, ORIOUS 25 EW,	Oidij
	MYSTIC 250 EC, NATIVO 75 WG	
Zoxamid	ELECTIS 75 WG	Peronospora

Preglednica 2: Vsebnost ostankov fitofarmacevtskih sredstev (FFS) v grozdju in vinu

	Grozdje	Grozdje	Grozdje	Vino	Vino
	vsebnost	št. vzorcev	MRL	vsebnost	št. vzorcev
	(mg/kg)		(mg/kg)	(mg/l)	
	0,03 - 1,11	5	2	0,04 - 0,15	4
Benalaksil + benalaksil-M - fungicid	0,01	1	0,3	-	-
Boskalid - fungicid	0,04 - 0,07	2	5	0,01 - 0,23	4
Ciprodinil -fungicid	0,01 - 1,80	7	5	0,01 - 0,21	21
Dimetomorf - fungicid	0,01 - 0,03	3	3	0,01 - 0,10	8
Fenhexamid - fungicid	0,10 - 0,51	3	5	0,01 - 0,02	4
Fludioksnil - fungicid	0,03 - 1,12	5	4	0,01 - 0,09	19
Folpet - fungicid	0,03 - 1,85	15	5	-	-
Iprovalikarb - fungicid	0,05	1	2	0,03	1
Klorpirifos - insekticid	0,02 - 0,10	4	0,5	-	-
Kvinoksifen - fungicid	0,02	1	1	-	-
Mandipropamid - fungicid	0,01 - 0,13	4	2	-	-
Metalaksil + metalaksil-M - fungicid	0,02 - 0,13	7	1	0,03 - 0,12	7
Metoksifenozyd - insekticid	-	-	1	0,01	1
Tebukonazol - fungicid	-	-	2	0,02 - 0,03	2
Zoxamid - fungicid	0,07	1	5	-	-

V grozdju smo tako določili naslednje aktivne spojine: azoksistrobin, benalaksil in benalaksil-M, boskalid, ciprodinil, dimetomorf, fenheksamid, fludioksonil, folpet, iprovalikarb, klorpirifos, kvinoksifen, mandipropamid, metalaksil in metalaksil-M, ter zoksamid. Predhodne raziskave (Čuš in sod., 2010a) analiz FFS v zrelem grozdju Refoška so pokazale primerljive vsebnosti aktivnih spojin, ki smo jih določili tudi mi: boskalida (0,03 mg/kg), dimetomorfa (0,07 mg/kg) in folpeta (0,41 mg/kg). Čuš in sod. (2010a) so v grozdju Refoška določili tudi klorotalonil, ki ga v naših vzorcih nismo našli. Različni avtorji poročajo o podobnih koncentracijah ostankov FFS, kot smo jih določili v grozdju sorte Refošk. Tako je o folpetu v vinskem grozdju poročal Farris in sod. (1992); (0,50 mg/kg), o vsebnosti klorpirifosa (0,14 mg/kg) Navarro in sod. (2001), o vsebnosti ciprodinila (1,03 mg/kg) Cabras in sod. (1997) ter o vsebnosti folpeta (0,10-0,60 mg/kg) in ciprodinila (0,14-1,45 mg/kg) Otero in sod. (2003).

V vinu smo določili navedene aktivne spojine FFS: azoksistrobin, boskalid, ciprodinil, dimetomorf, fenheksamid, fludioksonil, iprovalikarb, metalaksil in metalaksil-M, metoksifenozid in tebukonazol. Čuš in sod. (2010b) so izmed teh aktivnih spojin v ustekleničenih domačih in tujih vinih, vzorčenih na trgovskih policah, ugotovili vsebnosti azoksistrobina (0,04 mg/l), boskalida (0,01-0,17 mg/l), ciprodinila (0,01-0,44 mg/l), dimetomorfa (0,01-0,04 mg/l), fenheksamida (0,02-0,17 mg/l), fludioksonila (0,02-0,21 mg/l) in metalaksila (0,03-0,06 mg/l). Vsebnosti so primerljive z rezultati v Teranu letnika 2011. Prav tako so v vzorcih vina našli tudi aktivni snovi iprodion in procimidon, ki ju mi nismo določili. Ravno tako je o vsebnostih ciprodinila (0,21 mg/l) v vinu poročal Cabras in sod. (1997), o vsebnosti metalaksila (0,10-1,30 mg/l) pa Farris in sod. (1992). Rezultati so primerljivi z našimi. Podatki iz literature kažejo (Čuš in sod. 2010a), da se pri procesu predelave iz grozdja v vino vsebnost aktivnih spojin: ciprodinil, fenheksamid, folpet in klorpirifos zelo zmanjša, medtem ko je boskalid med vinifikacijo zelo perzistenten. Kljub temu, da analizirano vino ni bilo pridelano iz analiziranega grozdja, je zanimivo dejstvo, da je bil folpet prisoten v večini (15) vzorcev grozdja, vendar v nobenem vzorcu vina.

Vsebnost kovin v vinu Teran

Analize kovin v 39 vzorcih vina Teran so pokazale, da so koncentracije cinka, svinca, kadmija in arzena v vinu pod predpisanimi najvišjimi dopustnimi vrednostmi in samo v dveh od 39 vzorcev smo izmerili vsebnost bakra, ki je višja od največje dopustne. Zadnje je verjetno posledica uporabe prevelike količine bakrovega sulfata za odpravljanje napak vina, kot je vodikov sulfid (H_2S). Izmerjene koncentracije bakra in cinka v vinu Teran so v skladu s pričakovanji ter podatki iz literature (Ribéreau-Gayon in sod., 2000, Paneque in sod., 2010). Povprečna vsebnost težkih kovin (svinca, kadmija in arzena) v vzorcih terana l. 2011 je bila precej nižja od največje dovoljene koncentracije, kar je zelo pozitivno za potrošnike Terana. Prejšnje raziskave (Ribéreau-Gayon in sod., 2000) so pokazale, da je povprečna vsebnost svinca v evropskih vinih $63 \mu\text{g/l}$, v avstralskih $28 \mu\text{g/l}$ ter v ameriških $24 \mu\text{g/l}$. V vinu Teran je bila določena povprečna koncentracija svinca $14 \mu\text{g/l}$, tudi najvišja izmerjena vrednost ($59 \mu\text{g/l}$) je pod evropskim povprečjem. Povprečna koncentracija kadmija v vzorcih vina Teran ($0,2 \mu\text{g/l}$) je kar 50-krat nižja od največje dovoljene, kar 5-krat nižja od povprečne koncentracije, ki jo v svoji študiji navajajo madžarski raziskovalci ($1,06 \mu\text{g/l}$); (Ajtony in sod., 2008) ter nekoliko nižja od navedene v raziskavi vin iz južne Italije ($0,25$ do $0,38 \mu\text{g/l}$); (Galgano in sod., 2008). Izmerjene koncentracije arzena so bile v vseh vzorcih vin Teran pod mejo kvantitativne določitve – LOQ ($\text{LOQ} = 10 \mu\text{g/l}$), kar se ujema tudi s podatki študije madžarskih (Ajtony in sod., 2008) in grških raziskovalcev (Galani-Nikolakaki in sod., 2002). Rezultati analiz kovin v vinu so zbrani v preglednici 3.

Preglednica 3. Vsebnosti kovin v vzorcih vin Teran 2011.

kovina	najvišja dovoljena koncentracija	povprečna koncentracija v vzorcih vin Teran	najnižja koncentracija v vzorcih vin Teran	najvišja koncentracija v vzorcih vin Teran	število vzorcev, ki presegajo najvišjo dovoljeno koncentracijo
baker - Cu	1 mg/l	0,30 mg/l	0,02 mg/l	1,89 mg/l	2
železo - Fe		1,45 mg/l	0,54 mg/l	4,56 mg/l	
cink - Zn	5 mg/l	0,68 mg/l	0,09 mg/l	2,68 mg/l	0
svinec - Pb	150 $\mu\text{g/l}$	14 $\mu\text{g/l}$	5 $\mu\text{g/l}$	59 $\mu\text{g/l}$	0
kadmij - Cd	10 $\mu\text{g/l}$	0,2 $\mu\text{g/l}$	0,1 $\mu\text{g/l}$	0,7 $\mu\text{g/l}$	0
arzen - As	200 $\mu\text{g/l}$	<10 $\mu\text{g/l}$	-	-	0

Biogeni amini

Pri določevanju biogenih aminov smo v desetih vzorcih izmerili najvišje koncentracije putrescina (povprečje 34,3 mg/l) ter etanolamina (povprečje 21,5 mg/l). V posameznih vzorcih smo določili tudi prisotnost tiramina (povprečje 1,9 mg/l), histamina (povprečje 2,06 mg/l), medtem ko so bile za metilamin izmerjene bistveno nižje koncentracije (do 0,6 mg/l). Koncentracije kadaverina, butilamina in triptamina so bile v vseh vzorcih pod mejo detekcije (0,08, 0,46 in 0,4 mg/l za kadaverin, butilamin in triptamin). Rezultati biogenih aminov so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: vsebnost biogenih aminov v desetih vzorcih Terana l. 2011.

	Putrescin	Kadaverin	Etanolamin	Histamin	Metilamin	Tiramin	Butilamin	Triptamin
Vzorec 11/	Koncentracija [mg/l]							
1011	20,46 ± 0,16	< 0,08	22,18 ± 0,46	0,58 ± 0,05	< 0,07	0,99 ± 0,27	< 0,9	< 0,4
995	15,21 ± 0,72	< 0,08	21,59 ± 1,04	< 0,06	0,17	< 0,85	< 0,9	< 0,4
997	68,26 ± 3,54	< 0,08	25,19 ± 0,32	< 0,06	0,44 ± 0,20	< 0,85	< 0,9	< 0,4
1007	43,46 ± 0,43	< 0,08	27,82 ± 0,80	6,54 ± 0,69	0,62 ± 0,07	2,02 ± 0,59	< 0,9	< 0,4
1008	28,16 ± 2,09	< 0,08	22,03 ± 1,25	5,93 ± 0,05	0,201 ± 0,005	< 0,85	< 0,9	< 0,4
1009	49,17 ± 1,77	< 0,08	26,99 ± 0,07	< 0,06	0,15 ± 0,01	< 0,85	< 0,9	< 0,4
1081	5,09 ± 0,09	< 0,08	12,27 ± 0,17	< 0,06	< 0,07	< 0,85	< 0,9	< 0,4
1084	8,25 ± 0,14	< 0,08	15,82 ± 1,76	< 0,06	< 0,07	0,42 ± 0,09	< 0,9	< 0,4
1088	< 0,03	< 0,08	17,68 ± 1,72	0,36 ± 0,05	0,14 ± 0,01	< 0,85	< 0,9	< 0,4
1090	78,71 ± 4,64	< 0,08	23,94 ± 1,08	6,90 ± 0,37	0,330 ± 0,004	10,54 ± 2,61	< 0,9	< 0,4
povprečje	34,28	< 0,08	21,55	2,06	0,23	1,91	< 0,9	< 0,4
najnižja konc.	5,09	< 0,08	12,27	< 0,06	< 0,07	0,42	< 0,9	< 0,4
najvišja konc.	78,71	< 0,08	27,82	6,9	0,62	10,54	< 0,9	< 0,4

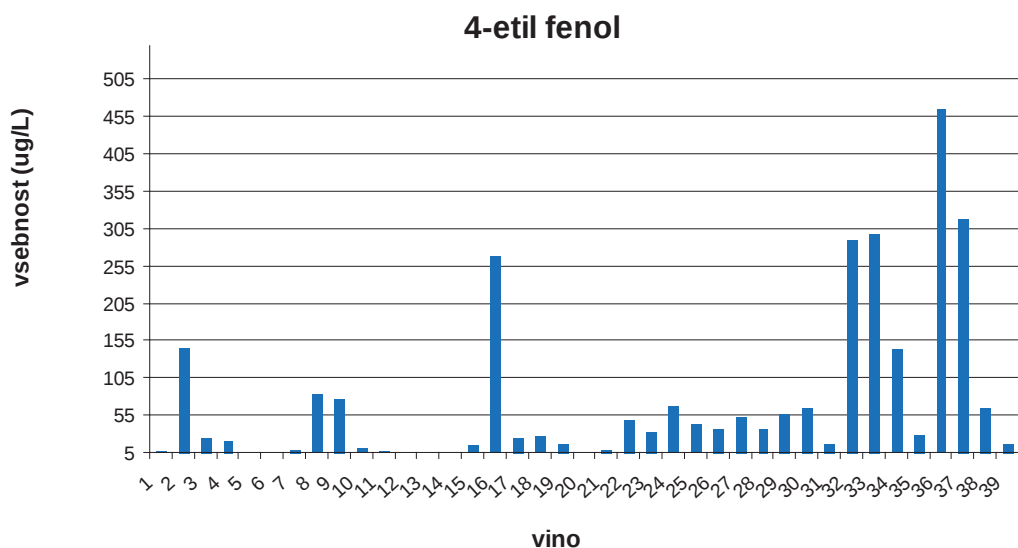


Čuš in sod. (2011) so v staranih rdečih vinih (sorte Modri Pinot, Merlot in Cabernet Sauvignon) vinorodne dežele Primorska določili najvišjo vrednost putriscina v vzorcu Modrega Pinota l. 2006, kjer je vsebnost znašala 62,4 mg/l; vsebnost histamina 8 mg/l, in tiramina 6,8 mg/l. V vinih Izbrani Teran so pri dveh vzorcih določili nad 8 mg/l putriscina ter v Izbranem Teranu l. 2008 7,3 mg/l histamina.

V tretjini testiranih vzorcev nismo zasledili MKB na selektivnem gojišču MRStj, v tretjini vzorcev smo zasledili od $2,2 \times 10^2$ do $3,3 \times 10^2$ CFU/ml, v preostalih vzorcih so znašale vrednosti od $5,5 \times 10^2$ do $1,12 \times 10^3$ CFU/ml. V primerih, kjer nismo zasledili MKB, so bile nizke tudi vrednosti biogenih aminov. Med ostalimi vzorci nismo zasledili korelacije, zato bomo v prihodnje določili izolate MKB do nivoja vrste. Znano je, da je tvorba biogenih aminov odvisna tudi od seva MKB znotraj določenih vrst (Konig in Frohlich, 2009; Petri s sod., 2013). Za zmanjševanje nastanka biogenih aminov v rdečih vinih se priporoča uporabo izolirane kulture MKB, ki med mlečnokislinsko fermentacijo ne tvorijo biogenih aminov. Tudi pravilna uporaba SO_2 po zaključeni mlečnokislinski fermentaciji bi lahko učinkovito zmanjšala živost nezaželenih MKB in posredno znižala vsebnost biogenih aminov v vinih. Analize prostega in skupnega SO_2 Terana letnika 2011 so namreč pokazale dokaj nizke vrednosti, in sicer v poprečju 39 vzorcev Terana letnika 2011 je prosti SO_2 znašal 13 mg/l, skupni SO_2 pa 43 mg/l (Vanzo in sod., 2012).

Hlapni fenoli

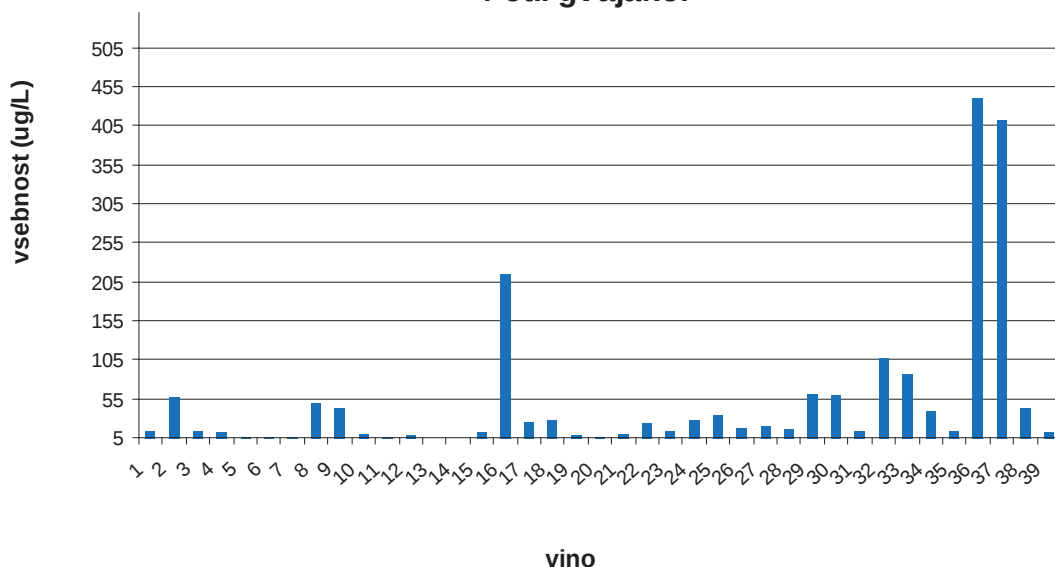
Hlapni fenoli so produkti encimskega delovanja kvasovk, tako med fermentacijo kot med zorenjem v slabih higienskih pogojih in nepravilni uporabi SO_2 . Rezultati vsebnosti hlapnih fenolov v vzorcih vin letnika 2011 so prikazane na slikah 1–4. Podane so vse vsebnosti nad mejo kvantitativne določitve (limit of quantification – LOQ), ki je za vse štiri spojine znašala 5 µg/l in je pod pragom senzoričnih zaznav.



Slika 1: Vsebnost 4-etil fenola v Teranu

Vsebnost 4-etil-fenola (4-EF) se je gibala od 6 do 465 $\mu\text{g/l}$, s povprečno vsebnostjo 86 $\mu\text{g/l}$, kar je pod mejo senzorične zaznave. Prisotnost 4-etil-fenola smo določili v sledovih (vrednost med mejo detekcije in mejo kvantitativne določitve metode) v 4 vzorcih vina. Čuš in sod. (2011) so v Izbranih Teranih starejših letnikov (2007, 2008, 2009) določili 1016, 678 ter 616 $\mu\text{g/l}$ 4-EF.

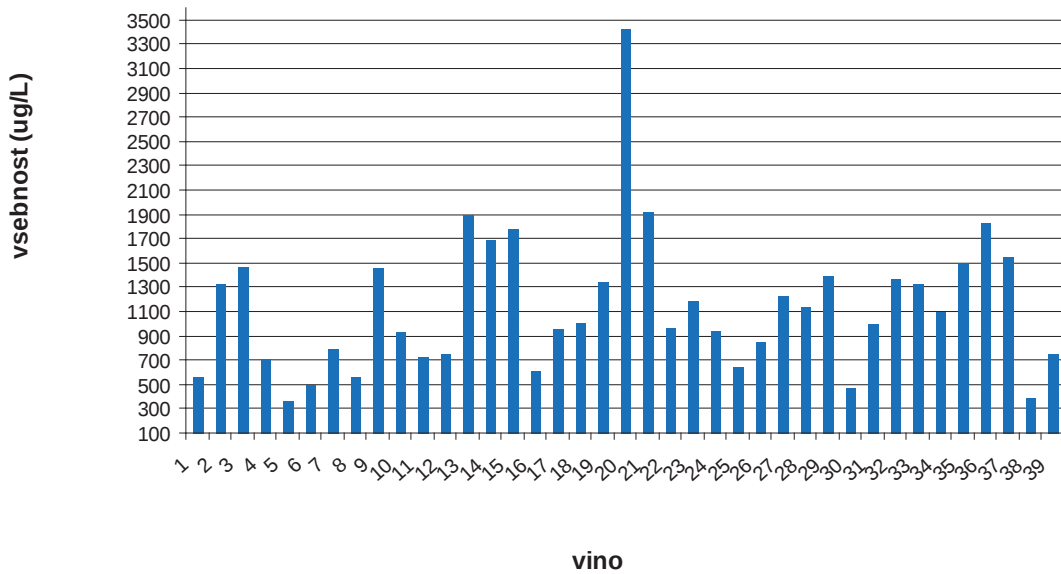
4-etil gvajakol



Slika 2: Vsebnost 4-etil gvajakola v Teranu

Vsebnost 4-etil-gvajakola (4-EG) se je gibala med 6 in 441 µg/l, s povprečno vsebnostjo 54 µg/l. Poleg tega smo prisotnost 4-EG določili v sledovih še v dveh vzorcih vina. Čuš in sod. (2011) so določili najvišjo vsebnost 4-EG 263 µg/l v Izbranem Teranu letnika 2007. Podatki iz literature (Ribéreau-Gayon in sod., 2000) navajajo navadno razmerje med 4-EF in 4-EG 8:1, kar za naše rezultate ne velja, saj smo v naših vzorcih določili razmerje 4-EF : 4-EG 1,5 : 1.

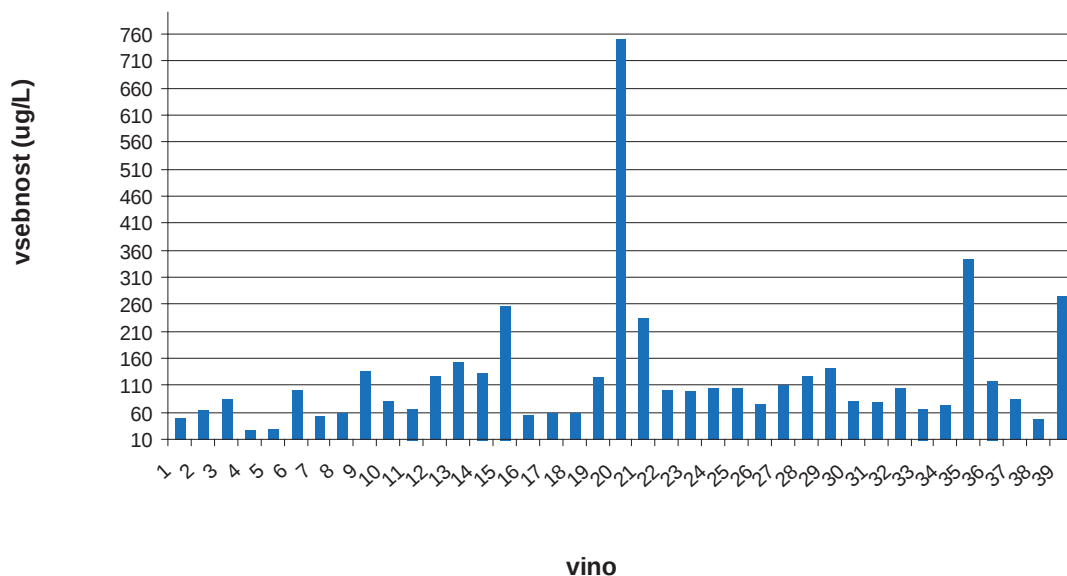
4-vinil fenol



Slika 3: Vsebnost 4-vinil-fenola v Teranu

Vsebnost 4-vinil fenola (4-VF) se je gibala od 366 do 3438 µg/l, s povprečno vsebnostjo 1141 µg/l. Po podatkih iz literature (Chatonnet in sod. 1993) je zaznavni prag za vinilfenole 725 µg/l pri razmerju 4-vinil fenol in 4-vinil gvajakol 1 : 1. Bavčar (2011) je največ 4-VF določil pri belih vinih v sorti Rebula, in sicer v koncentracijah 317-577 µg/l.

4-vinil gvajakol



Slika 4: Vsebnost 4-vinil-gvajakola v Teranu

Vsebnost 4-vinil gvajakola (4-EG) se je gibala od 28 do 750 µg/l, s povprečno vsebnostjo 125 µg/l. Zaznavni prag 4-EG je 440 µg/l (Williams in sod., 1980; Rocha in sod., 2005) in lahko s svojim vonjem po popru ali nageljnovih žbicah pozitivno prispeva k aromi vina. Eden vzorcev Terana je imel vsebnost 750 µg/l in je tako presegel prag zaznave.

Razprava in sklepi

Analize spojin, ki jih ne želimo v vinu, so pokazale, da je Teran, pridelan iz grozdja integrirane ali ekološke pridelave, varen za potrošnike. Vsebnosti ostankov FFS so v skladu s predpisanimi najvišjimi vrednostmi za grozdje, medtem ko vino nima predpisanih najvišjih vrednosti za ostanke FFS. Analize so pokazale, da je ostanke FFS vsebovalo 17 od 18 pregledanih vzorcev grozdja, vendar so bili v vseh vzorcih ostanki pod MRL. Vsebnosti ostankov FFS v grozdju so primerljive z drugimi avtorji (Čuš in sod. 2010a, Farris in sod. 1992, Navarro in sod. 2001, Cabras in sod. 1997, Otero in sod. 2003). Najpogostejše določena aktivna snov je bil folpet, ki se uporablja za zatiranje oidija, črna pegavosti, rdečega listnega ožiga in peronospor. V vinih smo v 29 vzorcih od skupno 39 analiziranih vzorcev določili ostanke FFS. Rezultati analiz so primerljivi z rezultati iz literature

(Čuš in sod. 2010b, Cabras in sod. 1997, Farris in sod. 1992). Vsebnosti vseh posameznih aktivnih spojin so bile manjše od 0,25 mg/l.

Glede na rezultate analiz kovin v vinu lahko zaključimo, da so vina Teran za potrošnika varna, saj so bile izmerjene koncentracije kovin precej nižje od predpisanih najvišjih dopustnih vrednosti in nižje kot v primerljivih vinih iz južne Italije (Galgano in sod, 2008) ali madžarske (Ajtony in sod., 2008). Izjema je presežena vsebnost bakra v dveh vzorcih, kar je verjetno posledica uporabe prevelike količine bakrovega sulfata za odpravljanje napak vina (H_2S).

Analize biogenih aminov so pokazale vrednosti, skladne z ostalimi raziskavami. Tudi najvišje izmerjena koncentracija za histamin je nižja od najvišjih priporočenih vrednosti v Avstriji in Švici (10 mg/l) ter Franciji (8 mg/l), je pa višja od priporočenih vrednosti v Nemčiji (2 mg/l) na Nizozemskem (3 mg/l) in v Belgiji (5 mg/l). Koncentracije putrescina in tiramina so znotraj območij, ki jih za rdeča vina navajajo literaturni viri, medtem ko teh podatkov za etanolamin v literaturi nismo zasledili. Višja vsebnost biogenih aminov je bila potrjena z večjo mikrobiološko aktivnost mlečnokislinskih bakterij, zato bi pravilna uporaba SO_2 lahko občutno zmanjšala nastanek teh nezaželenih spojin v vinu.

Analize hlapnih fenolov niso pokazale obremenjenosti Terana letnika 2011 z omenjenimi spojinami. Zaznavni prag 4-etil fenol 420 $\mu g/l$ je presegel le en vzorec od skupno 39 analiziranih vzorcev vina. Nekoliko povišane vsebnosti so se pokazale za 4-vinil fenol, ki pa ga ne povezujemo vedno z negativnimi senzoričnimi zaznavami. Vrednosti za 4-etil gvajakol in 4-vinil gvajakol so bile v povprečju pod senzoričnim pragom zaznave.

Literatura

- Ajtony, Z., Szoboszlai, n., Suskó, E. K., Mezei, P., György, K., Bencs, L.; 2008, Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content, *Talanta* 76 (2008) 627–634.
- Baša Česnik, H., Gregorčič, A. 2003. Multirezidualna analizna metoda za določevanje ostankov pesticidov v sadju in zelenjavi. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, *Kmetijstvo, Zootehnika* 82, 2:167–180.
- Bavčar, D. 2011. Vpliv maceracije na aromatične značilnosti primorskih belih vin. Doktorska disertacija. Ljubljana 2011.



Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., Minelli, E. V., Cabitza, F., Cubeddu, M., 1997. Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 45: 2708–2710.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Lavigne, V. 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 2:191–202.

Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, International Organisation of Vine and Wine (OIV), Edition 2012, Annex C: Maksimum acceptable limits of various substances.

Čuš, F., Baša Česnik, H., Velikonja Bolta, Š., Gregorčič, A. 2010 a. Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control* 21, 1512–1518.

Čuš, F., Baša Česnik, H., Velikonja Bolta, Š., Gregorčič, A. 2010 b. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. *Food Control* 21, 150–154.

Čuš, F., Gerič Stare, B., Bach, B. Barnavon, L. 2011. Vsebnost biogenih aminov in hlapnih fenolov ter prisotnost kvasovke *Brettanomyces bruxellensis* v slovenskih vinih. *Vinarski dan* 2011, Ljubljana, 30. november 2011, str. 5–24.

Farris, G. A., Cabras, P., Spanedda, L. 1992. Pesticide residues in food processing. *Italian Journal of Food Science* 3: 149–169.

Galani-Nikolakaki, S., Kallithrakas-Kontos, N., Katsanos, A. A., (2002), Trace element analysis of Cretan wines and wine products, *The Science of Total Environment* 285 (2002), 155–163.

Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Scarpa, T., Palma, A., 2008, Analysis of trace elements in southern italian wines and their classification according to provenance, *Food Science and technology* 41 (2008), 1808–1815.

http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/index_en.htm

Konig, H., Frohlich, J. 2009. Lactic acid bacteria. V: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Heidelberg, str. 3–29.

Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 199: 9–13.

Navarro S., Oliva J., Navarro G., Barba, A. 2001. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in grapes. *American Journal of Enology & Viticulture* 52: 35–40.

Otero, R. R., Grande, B. C., Gándara, J. S. 2003. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A* 992: 121–131.

Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M.T., Clavijo, A., Gómez, I. A., 2010, Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing, *Microchemical Journal* 94 (2010), 175–179.

Petri, A., Pfannebecker, J., Frolich, J, Konig, H. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol* 33: 48–54.

Ribéreau-Gayon et al., Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments, J. Wiley & Sons Ltd., 2000.

Rocha, S. M., Coutinho, P., Delgadillo, I., Coimbra, A. D. 2005. Effect of enzymatic aroma release on the volatile compounds of white wines presenting different aroma potentials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2:199–205.

Tehnološka navodila za integrirano pridelavo grozdja za leto 2011, MAFF, 2011.

Zweigenbaum, J., Flanagan, M., Stone, P., Glauner, T., Zhao, L. 2009. Multi-Residue Pesticide Analysis with Dynamic Multiple Reaction Monitoring and Triple QUadropole LC/MS/MS. Agilent Technologies, Inc., Application Note, Appendix IV: LC/MS/MS Conditions for 300-Pesticide Methods using the Agilent 1290 Infinity LC.

Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B. 1980. Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 4: 766–711.







Disponibilità e attività dei pigmenti dell'uva negli animali: implicazioni per la salute umana

1,2,3,4 Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste

Fornasaro (1) dr., via L. Giorgieri 1, 34127 Trieste

Tramer (2) dr., ibid

Žiberna (3) dr., ibid

Passamonti (4) prof. dr., ibid

Stefano FORNASARO¹, Federica TRAMER², Lovro ŽIBERNA³, Sabina PASSAMONTI⁴

Sommario

Gli antociani sono molecole abbondantemente presenti nella frutta e nella verdura, ma, a seguito della loro assunzione, sono rinvenuti nel sangue e nei tessuti solamente in tracce e transitoriamente. Tuttavia, essi incidono profondamente sul metabolismo cellulare e la funzionalità d'organo ed il loro effetto sulla salute è confermato da numerose evidenze epidemiologiche. Per queste ragioni, gli antociani della dieta possono essere considerati dei micronutrienti.

Parole chiave: antociani, dieta, flavonoidi, micronutrienti

Bioavailability and activity of grape pigments in animals: implications for human health

Abstract

Even though anthocyanins are abundant in fruits and vegetables, they are found in plasma and tissues only in trace amounts and transiently after their intake. However, they profoundly affect cellular metabolism, organ functioning, and have epidemiological evidence supporting their health-promoting effects. For these reasons, dietary anthocyanins might be seen as micronutrients.

Keywords: anthocyanins, diet, flavonoids, micronutrients

Introduzione

Gli antociani costituiscono il più vasto gruppo di pigmenti vegetali idrosolubili, e determinano la pigmentazione dei tessuti epidermici di frutta, verdura, fiori e cereali. Sono abbondanti in cibi di largo consumo come frutti rossi, arance rosse e bevande derivate come succhi e vino (Wu et al., 2006). Come additivi alimentari, si ritrovano anche in cibi

e bevande, utilizzati sia come coloranti naturali (E163N), sia come nutraceutici. A condizioni di pH acido, la stabilità chimica degli antociani trova un ambiente ottimale.

Chimicamente gli antociani rappresentano un ampio gruppo di molecole costituito da circa 400 diversi membri, tutti con struttura relativamente grande, peso molecolare di circa 500 Da, e carattere marcatamente idrofilico. La loro struttura chimica è costituita da una porzione poliaromatica, detta antocianidina, modificata tramite idrossilazione e/o metilazione, legata a una porzione glicidica. I pigmenti presenti nel vino consistono di diglucosidi, monoglucosidi, mono e diglucosidi acetilati di 5 principali agliconi: peonidina, malvidina, cianidina, petunidina e delphinidina.

Il consumo stimato di antociani nell'uomo varia tra i 3 e i 215 mg/die (Chun, Chung, and Song, 2007), ma studi più recenti suggeriscono un consumo medio dell'ordine di 57-69 mg/die (Beking and Vieira, 2011).

I polifenoli sono stati considerati sostanze antinutrienti fino al 1988, anno in cui, Haslam, per la prima volta, ne rivalutò il ruolo (Haslam, 1988). Da quel momento, hanno ricevuto una considerevole attenzione per il loro potenziale effetto sulla salute.

Evidenze raccolte in studi in vitro e in vivo indicano che gli antociani o i loro metaboliti possono avere un impatto benefico su un ampio spettro di malattie croniche, come quelle cardiovascolari, neurodegenerative e neoplastiche (Dohadwala and Vita, 2009; Forester and Waterhouse, 2009; Thomasset et al., 2009; Vauzour et al., 2008).

Attività biologica

Nonostante le note proprietà degli antociani come componenti della dieta, è possibile rintracciarli intatti nel plasma e nelle urine, assieme a infinitesime quantità di derivati glucoronati e/o sulfo-coniugati (Felgines et al., 2003; Kay, Mazza, and Holub, 2005; Mazza et al., 2002; Shipp and Abdel-Aal, 2010).

La maggior parte degli studi mostra che l'assorbimento avviene piuttosto velocemente (Passamonti et al., 2003; Talavera et al., 2003) (approssimativamente 0.25-2 ore) e la loro escrezione è completa dopo 6-8 ore (Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2002). Nell'uomo, il picco plasmatico massimo dopo somministrazione di una dose di 7-1618 µmoli si aggira intorno a 1-100 nM (Prior and Wu, 2006).

In animali da laboratorio, dopo l'assunzione di alimenti ricchi in antociani, normalmente meno dell'1 % della dose ingerita è escreta nelle urine (McGhie and Walton, 2007), mentre nell'uomo la resa risulta maggiore, tra l'1.5 % e il 5.1 % (Lapidot et al., 1998). Comunque, l'esistenza di metaboliti e di prodotti di degradazione degli antociani non ancora identificati, potrebbe portare ad una sottostima della biodisponibilità di questi composti (Manach et al., 2005).

Queste caratteristiche farmacocinetiche sono determinate dalle funzioni biochimiche della barriera costituita dall'epitelio gastrico e intestinale. Gli antociani sono assorbiti principalmente a livello gastrico, attraverso un sistema di trasporto attivo che include trasportatori come la bilitranslocasi (Passamonti et al., 2003) e i trasportatori sodio dipendenti SGLT (Felgines et al., 2008), e successivamente a livello intestinale (Talavera et al., 2004). Gli antociani non modificati, penetrati all'interno delle cellule intestinali, non possono essere trasportati attraverso la membrana basolaterale degli enterociti. Infatti, un trasportatore specifico di antociani, come la bilitranslocasi è espresso solamente sul dominio luminale della membrana plasmatica degli enterociti, mentre nessun altro trasportatore di efflusso sembra corrispondere al profilo di trasportatore nel sangue (Passamonti et al., 2009). Utilizzando un modello in vitro di cellule epiteliali di intestino, Caco-2, è stato dimostrato come il trasporto di antociani di ribes nero attraverso la membrana apicale avvenga in misura maggiore rispetto a quello attraverso la membrana basolaterale (Steinert et al., 2008).

Gli antociani, perciò, transitano attraverso il tratto intestinale fino ad arrivare al colon. Qui la flora batterica fornisce enzimi capaci di tagliare rapidamente la loro porzione glicosidica per generare un aglicone, non solo chimicamente instabile, ma anche substrato di altri enzimi di taglio da cui si ottengono dei fenoli (Selma, Espin, and Tomas-Barberan, 2009). Pertanto, il metabolismo da parte della microflora intestinale è un importante fattore di controllo della biodisponibilità degli antociani.

Quando tali molecole sono amministrate per via endovenosa, in modo da eludere le modificazioni dovute al loro passaggio nel tratto gastro-intestinale, esse sorprendentemente svaniscono molto velocemente. Sono facilmente trasportate negli organi escretori, fegato e reni,

dove sono metabolizzate attraverso metilazione, ed infine attivamente secrete nella bile e nelle urine (Vanzo et al., 2011).

Due sembrano, a questo punto, i fattori farmacocinetici principali coinvolti nell'apparente scarsa biodisponibilità degli antociani: il primo costituito dal modesto passaggio dal lume intestinale al sangue (basso assorbimento); il secondo dal processo opposto, cioè, un veloce passaggio dal sangue agli organi (rapida distribuzione).

In realtà, test in vitro mostrano quanto potente sia, invece, la bioattività degli antociani. In colture cellulari agiscono come antiossidanti anche a concentrazioni molto basse (< 1 nM) (Bornsek et al., 2012); in sezioni isolate di arteria, essi inducono vasodilatazione a concentrazioni μ M (Ziberna et al., 2012); in cuori isolati e perfusi, fino ad una concentrazione di 200 nM essi, a seguito di un ciclo di ischemia-riperfusion, esplicano cardio-protezione, ma, superato tale valore, mostrano tossicità concentrazione-dipendente, manifestando così un effetto ormetico. Quest'ultima caratteristica, che non era stata osservata in cellule isolate, dimostra l'importanza dello svolgere i test tossicologici non solamente in modelli sperimentali semplici, ma, preferibilmente, anche in sistemi complessi (Ziberna et al., 2010).

Considerando specificamente l'attività antiossidante degli antociani nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno, è attualmente accettato, che essi non possano agire attraverso una diretta attività di scavenger. Infatti, la loro concentrazione intracellulare non raggiunge i livelli stechiometrici dei radicali liberi, sia quando questi sono generati a livello endogeno, nelle cellule in respirazione, sia quando sono generati da iniziatori radicalici addizionati dall'esterno. La spiegazione più plausibile è che gli antociani possano agire come antiossidanti cellulari attraverso molteplici meccanismi, non ancora completamente caratterizzati. Perciò, il meccanismo prevalente potrebbe essere diverso, a seconda della funzione biologica delle cellule coinvolte. Per esempio, in esperimenti in vivo con ratti inoculati i.v. con una dose di cianidina 3-glucoside (C3G), il metabolismo epatico di questi composti ha causato una leggera colestasi intra-epatica, dovuta alla competizione tra peonidina 3-glucoside (il derivato metilato della C3G) e l'efflusso di sali biliari nella bile. La colestasi causa un meccanismo di compensazione: si determina un reflusso di taurocolato (un sale biliare) nel sangue, implicante, in cambio, la ritenzione di glutathione ridotto, a sua volta

causato dalla competizione che questa molecola ha con il trasportatore di efflusso del taurocolato. L'effetto netto è quello di un aumento del rapporto intracellulare di glutazione ridotto/glutazione ossidato e perciò un netto aumento di antiossidanti disponibili (Vanzo et al., 2011).

Questi risultati possono spiegare diverse osservazioni fatte in soggetti umani. Uno studio in cui è stato valutato l'effetto dell'ingestione giornaliera di un estratto purificato di bucce di uva rossa sulla capacità antiossidante del siero, ha dimostrato come l'estratto purificato di antociani migliori la capacità antiossidante totale del siero sia in condizioni fisiologiche normali sia durante l'induzione di stress ossidativo (Lionetto et al., 2011).

Simili risultati sono stati ottenuti con il consumo di 400mL/die di vino rosso per 2 settimane (Micallef, Lexis, and Lewandowski, 2007). Gli effetti benefici di questi prodotti bioattivi sembrano essere mediati da una pletora di altri meccanismi biochimici, capaci di agire sia indipendentemente che in modo sinergico a livello di diversi fattori di rischio di malattie metaboliche e cardiovascolari.

Per esempio, Tsuda e collaboratori hanno dimostrato per primi l'effetto inibitorio degli antociani sull'accumulo del grasso corporeo. (Tsuda et al., 2003). È stato dimostrato che flavonoidi puri o succo d'uva totale, inibiscono l'attività e l'aggregazione piastrinica (Dávalos, Bartolomé, and Gómez-Cordovés, 2005; Yang et al., 2012). Un'accresciuta suscettibilità all'aggregazione piastrinica contribuisce all'esordio e alla progressione della malattia cardiovascolare. Elevati valori plasmatici di colesterolo, specialmente colesterolo-LDL, e triacilgliceroli (TAG), e bassi livelli plasmatici di colesterolo-HDL sono indipendentemente associati con un aumento del rischio cardiovascolare. Uno studio ha dimostrato che l'integrazione nella dieta di un'elevata dose di antociani (il triplo del consueto) normalizza i valori del colesterolo-HDL. (Qin et al., 2009).

Una più bassa incidenza di alcune patologie, come le malattie cardiovascolari (CVD), è associata con il consumo di uva e dei suoi prodotti (succo d'uva e vino) (Dohadwala and Vita, 2009; Iriti and Faoro, 2009).

Commento finale

Sebbene abbondanti nella frutta e nella verdura, gli antociani sono presenti nel plasma e nei tessuti solamente in tracce. Ciò nonostante, essi condizionano

il metabolismo cellulare contribuendo al bilanciamento tra salute e malattia. Per queste caratteristiche, gli antociani possono essere considerati dei micronutrienti.

Ringraziamenti

Finanziato dal Fondo Regionale Europeo per lo Sviluppo, Cooperazione transfrontaliera Italia-Slovenia Programma 2007-2013 (Progetto standard AGROTUR).

Riferimenti bibliografici

- Beking, K., and Vieira, A. (2011). An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *Int J Food Sci Nutr* 62(1), 17-9.
- Bornsek, S. M., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrich, N. P., Abram, V., Tramer, F., and Passamonti, S. (2012). Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry* 134(4), 1878-1884.
- Chun, O. K., Chung, S. J., and Song, W. O. (2007). Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137(5), 1244-52.
- Dávalos, A., Bartolomé, B., and Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry* 93(2), 325-330.
- Dohadwala, M. M., and Vita, J. A. (2009). Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr* 139(9), 1788S-93S.
- Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2003). Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr* 133(5), 1296-301.
- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2002). Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J Nutr* 132(6), 1249-53.
- Forester, S. C., and Waterhouse, A. L. (2009). Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *J Nutr* 139(9), 1824S-31S.
- Haslam, E. (1988). Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense—A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14(10), 1789-1805.
- Iriti, M., and Faoro, F. (2009). Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat Prod Commun* 4(5), 611-34.
- Kay, C. D., Mazza, G. J., and Holub, B. J. (2005). Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr* 135(11), 2582-8.
- Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., and Kanner, J. (1998). Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As Detected in Human Urine†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10), 4297-4302.
- Lionetto, M. G., Giordano, M. E., Calisi, A., Erroi, E., De Nuccio, E., and Schettino, T. (2011). Effect of the daily ingestion of a purified anthocyanin extract from grape skin on rat serum antioxidant capacity. *Physiol Res* 60(4), 637-45.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(1), 230S-42S.

Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., and Holub, B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 50(26), 7731-7.

McGhie, T. K., and Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 51(6), 702-13.

Micallef, M., Lexis, L., and Lewandowski, P. (2007). Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 6, 27.

Passamonti, S., Terdoslavich, M., Franca, R., Vanzo, A., Tramer, F., Braidot, E., Petrussa, E., and Vianello, A. (2009). Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Curr Drug Metab* 10(4), 369-94.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett* 544(1-3), 210-3.

Prior, R. L., and Wu, X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res* 40(10), 1014-28.

Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., Cao, L., and Ling, W. (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 90(3), 485-92.

Selma, M. V., Espin, J. C., and Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* 57(15), 6485-501.

Shipp, J., and Abdel-Aal, E. S. M. (2010). Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal* 4, 7-22.

Steinert, R. E., Ditscheid, B., Netzel, M., and Jahreis, G. (2008). Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in ussing type chambers. *J Agric Food Chem* 56(13), 4995-5001.

Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2003). Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Stomach in Anesthetized Rats. *J Nutr* 133(12), 4178-4182.

Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D. P., Steward, W. P., and Gescher, A. J. (2009). Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother Pharmacol* 64(1), 201-11.

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., and Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr* 133(7), 2125-30.

Vanzo, A., Vrhovsek, U., Tramer, F., Mattivi, F., and Passamonti, S. (2011). Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *J Nat Prod* 74(5), 1049-54.

Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., and Spencer, J. P. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr* 3(3-4), 115-26.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., and Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 54(11), 4069-75.

Yang, Y., Shi, Z., Rehem, A., Jin, J. W., Li, C., Wang, Y., Andrews, M. C., Chen, P., Zhu, G., Ling, W., and Ni, H. (2012). Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases. *PLoS One* 7(5), e37323.

Ziberna, L., Lunder, M., Moze, S., Vanzo, A., Tramer, F., Passamonti, S., and Drevensek, G. (2010). Acute Cardioprotective and Cardiotoxic Effects of Bilberry Anthocyanins in Ischemia-Reperfusion Injury: Beyond Concentration-Dependent Antioxidant Activity. *Cardiovasc Toxicol* 10(4), 283-294.

Ziberna, L., Tramer, F., Moze, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F., and Passamonti, S. (2012). Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Radic Biol Med*.

Effetti della gestione della chioma sulla produttività delle uve refošk

1, 2, 3, 4, Università di Nova Gorica, Centro di ricerca sul Vino

5, 6 Istituto Kmetijski della Slovenia, Laboratorio di Enologia

Sivilotti (1) dr., Vipavska c. 13, 5270 Ajdovščina

Lorena (2) doc. dr., ibid

Jež (3), dr., ibid

Tronkar (4), ibid

Turk (5), ibid

Vanzo (6), doc. dr., Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

Lisjak (7) dr., ibid

Paolo SIVILOTTI¹, Lorena BUTINAR², Anastazija JEŽ³, Jan TRONKAR⁴, Mitja TURK⁵, Andreja VANZO⁶, Klemen LISJAK⁷

Riassunto

L'equilibrio tra superficie fogliare e produzione è un fattore cruciale al fine di ottimizzare la qualità delle uve e poi dei vini. In quest'ottica nell'annata 2012 sono state impostate due sperimentazioni volte a verificare l'effetto di alcune tecniche agronomiche sulla produzione e sulla qualità delle uve Terrano. Dai primi risultati ottenuti, emerge una risposta chiara della varietà alla riduzione della produzione e all'aumento del rapporto chioma/produzione, ed è soprattutto la componente polifenolica a trarne beneficio.

Parole chiave: Terrano, diradamento dei grappoli, defogliazione pre-fioritura, rapporto area fogliare/produzione, polifenoli

Discovering the effects of canopy management on Refosk grapes

Abstract

The equilibrium between leaf area and production has to be considered crucial in order to optimise grape and wine quality. For this reason, in the season 2012 two trials have been carried out with the aim to ascertain the effects of different canopy management techniques on yield and grape quality in Refosk. Looking at the first results, a clear influence of yield reduction or leaf area-to-yield increase on grape production and quality was observed. Moreover, polyphenols concentration was found positively affected by treatments.

Keywords: Refosk, cluster thinning, pre-flowering leaf removal, leaf area-to-yield rate, polyphenols

Introduzione

Il Terrano è una varietà autoctona e come tale poco studiata dai ricercatori che normalmente focalizzano la loro attenzione su poche varietà internazionali. A livello viticolo ed enologico conoscenze specifiche sul Terrano non sono quindi disponibili.

L'equilibrio della pianta è sicuramente il fattore più importante nell'ottica di ottimizzare la produzione e la qualità delle uve. Kliewer e Dokoozlian (2005) hanno evidenziato come valori di area fogliare compresi tra 0.7 e 1.4 m² per kg di uva prodotta, rappresentano un range di variazione ottimale per la maggior parte dei sistemi viticoli e delle forme di allevamento. Alcune varietà di vite particolarmente produttive, necessitano inoltre di interventi correttivi di bilanciamento poichè naturalmente non riescono a rientrare all'interno del range di equilibrio tra superficie fogliare e produzione (Bravdo et al., 1985; Reynolds, 1989; Guidoni et al., 2002; Dami et al., 2006). Il diradamento dei grappoli rappresenta sicuramente la pratica viticola più utilizzata al fine di ottenere un buon bilanciamento tra produzione e qualità delle uve, ma un'altra via per raggiungere lo stesso risultato è rappresentato dalla defogliazione pre-fioritura, ed in bibliografia è disponibile un'ampia trattazione a riguardo (Tardaguila et al 2008; Poni et al., 2009; Sternad Lemut et al., 2011; Palliotti et al., 2012). Rimuovendo un numero significativo di foglie fotosinteticamente efficienti nella fase di pre-fioritura, si provoca uno stress per la pianta, che reagisce riducendo l'allegagione dei fiori. Il risultato finale è un grappolo molto più spargolo.

Sebbene i risultati siano preliminari, i primi dati raccolti nelle sperimentazioni condotte nel territorio del Carso nell'anno 2012, vogliono evidenziare il ruolo dell'equilibrio area fogliare/produzione sulla produttività e sulla qualità delle uve Terrano.

Materiali e metodi

Nell'annata 2012 un pool di prove sperimentali è stato messo in campo nel territorio del Carso nell'ambito del progetto AGROTUR/Agroturistica carsica. Le prove di carattere viticolo volevano investigare l'effetto di alcune tecniche agronomiche sull'equilibrio area fogliare / produzione, e come conseguenza sulla qualità delle uve Terrano.

In un primo vigneto sito in località Dutovlje, è stato impostato il seguente confronto: UN: tesi non trattata; PFLR: defogliazione (rimozione delle 4-5 foglie basali di ogni tralcio) in pre-fioritura (25.5.12); CT: diradamento dei grappoli (eliminazione del secondo grappolo su ogni tralcio) all'invaiaitura (2.8.12).

In un secondo vigneto in località Komen, è stata impostata una prova fattoriale in cui sono stati posti a confronto due altezze di cimatura della chioma all'invaiaitura (chioma intera 14 foglie; chioma ridotta 10 foglie/tralcio) e due livelli di produzione (tutti i grappoli; diradamento grappoli). Entrambi i trattamenti di riduzione della chioma e di diradamento dei grappoli (eliminazione del secondo grappolo su ogni tralcio) sono stati effettuati all'invaiaitura (1.8.12). Le tesi a confronto sono state: FCFB (chioma intera – tutti i grappoli); FCHB (chioma intera - diradamento grappoli); HCFB (chioma ridotta – tutti i grappoli); HCHB (chioma ridotta - diradamento grappoli).

Entrambe le prove sono state impostate secondo uno schema sperimentale completamente randomizzato, con 4 repliche/tesi a Dutovlje e 3 repliche/tesi a Komen.

Nella stagione estiva è stata determinata l'area fogliare facendo attenzione di separare le foglie principali dalle femminelle e determinando inoltre l'area asportata con la defogliazione pre-fioritura. Alla raccolta è stato raccolto il peso della produzione ed il numero di grappoli per pianta.

A partire dalla fase di piena invaiatura (14.8.12), sono stati raccolti campioni di 5-6 grappoli/parcella in 4 date fino alla maturazione. Per ogni campione è stato ottenuto il mosto per spremitura, sul quale è stato analizzato il livello di solidi solubili (Brix), l'acidità titolabile e il pH.

Un pool di 200 acini per ogni tesi è stato messo in congelatore (-20°C), e successivamente frullato al fine di ottenere una poltiglia. Una volta scongelati, i campioni sono stati frullati e posti in estrazione per la determinazione della maturità fenolica secondo la metodica proposta da Glories (1978). In dettaglio, due aliquote di 25 g vengono pesate e poste in estrazione aggiungendo in un caso 25 mL di una soluzione a pH 1 (0.1 N HCl in acqua distillata) e nell'altro 25 mL di una soluzione a pH 3.2 (5 g acido tartarico e 22 mL di NaOH in 1 L di acqua distillata). Dopo un periodo di estrazione di 4 ore, i campioni vengono filtrati

e preparati per la determinazione spettrofotometrica della densità ottica a 280 nm (indice di polifenoli totali, IPT) e del contenuto di antociani totali ed estraibili (Glories 1978).

Da un secondo pool di 200 acini le bucce ed i vinaccioli sono stati separati con cura e posti in estrazione in una soluzione idroalcolica per 5 giorni. Dopo questo periodo sono stati determinate le concentrazioni di antociani totali, e di tannini a basso (LMWP) e alto (HMWP) peso molecolare (Rigo et al, 2000).

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le medie separate utilizzando il tesi di Student Newman Keuls ($p < 0.05$).

Risultati e discussione

diradamento dei grappoli e defogliazione pre-fioritura

Come ricordato nell'introduzione, la riduzione della produzione può essere ottenuta sia con il diradamento dei grappoli (CT) sia con la defogliazione prefioritura (PFLR). Anche nel caso della prova condotta sulla varietà Terrano è stata ottenuta una riduzione significativa della produzione rispetto alla tesi testimone non trattata (UN) in cui ne l'una ne l'altra tecnica erano state applicate (tab. 1). In particolare, nel caso del tesi diradata la minore produzione era legata principalmente alla riduzione del numero di grappoli mentre, nel caso della defogliazione pre-fioritura, la riduzione della produzione era principalmente imputabile al minore peso dei grappoli.

L'area fogliare non ha riportato delle differenze significative tra le tesi a confronto, ne ad inizio stagione (prima dell'intervento di defogliazione; dati non riportati) ne alla maturazione (tab. 2). Con l'intervento di defogliazione (PFLR) è stato rimosso il 38 % delle foglie al 25.5.12, e si è potuto osservare un recupero dell'area fogliare che alla raccolta era del tutto comparabile a quella della tesi UN. Solitamente con la defogliazione pre-fioritura le piante reagiscono immediatamente stimolando la produzione di femminelle (Poni et al, 2008; Tardaguila et al., 2010) ma nella presente sperimentazione non si è osservata una maggior crescita delle femminelle nella tesi defogliata (PFLR) rispetto alle altre due tesi. Molto probabilmente il periodo di stress idrico che ha caratterizzato la stagione estiva ha influenzato negativamente lo sviluppo della vegetazione.

Il rapporto superficie fogliare / produzione è risultato equilibrato nelle tesi UN e PFLR, in linea con quanto riportato anche da Kliwer e Dokoozlian (2005), mentre nel caso della tesi diradata (CT) il valore risultava sbilanciato verso l'alto (tab. 2), e questo ha probabilmente favorito un anticipo della maturazione dei grappoli.

Tabella 1 – effetto del diradamento dei grappoli e della defogliazione prefioritura sui parametri quantitativi.

tesi	numero di grappoli	produzione (kg/pianta)	peso medio grappolo (g)
UN	14,6	4,30 a	292 a
PFLR	15,2	2,59 b	187 b
CT	9,67	2,57 b	269 a
<i>Sign. F</i>	<i>n.s.</i>	*	*

Tabella 2 – effetto del diradamento dei grappoli e della defogliazione prefioritura sulle componenti dell'area fogliare.

tesi	tralci principali	femminelle	area fogliare totale (m ²)	LA / Y1 (m ² /kg)
UN	2.24	1.71	3.95	1,22
PFLR	2.18	1.74	3.92	1,46
CT	2.68	1.69	4.37	1,99
<i>Sign. F</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

1LA / Y: rapporto area fogliare / produzione

Anche le caratteristiche compositive delle uve hanno evidenziato delle differenze tra le tesi a confronto. In dettaglio l'evoluzione dei solidi solubili totali (Brix) risultava sempre a favore della tesi in cui era stato effettuato il diradamento dei grappoli, mentre valori simili emergevano per le tesi UN e PFLR (fig. 1B). Effettivamente il maggior rapporto area fogliare / produzione potrebbe aver condizionato positivamente l'accumulo di zuccheri nelle bacche della tesi CT. Gli andamenti dell'acidità titolabile e del pH sembrerebbero non averne risentito in maniera significativa dei trattamenti imposti (Fig. 1C e 1D).

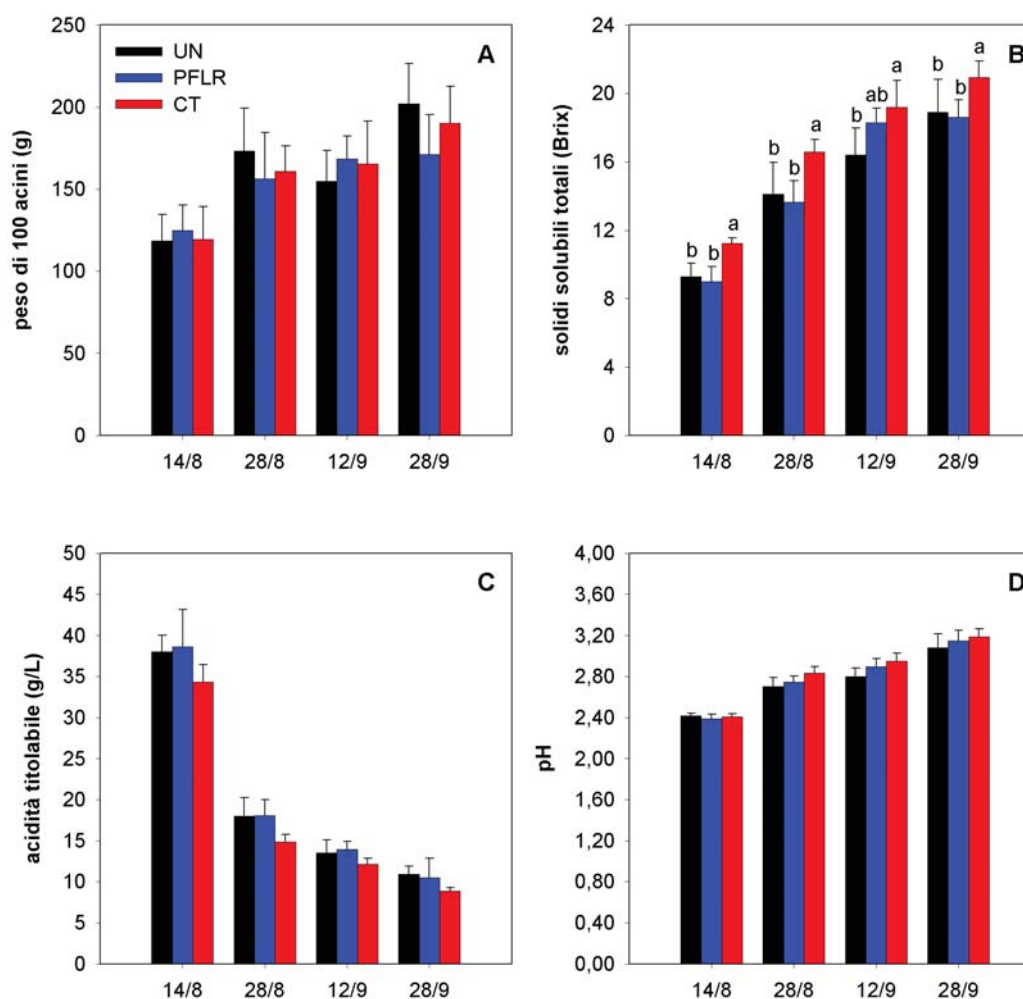


Figura 1 – Andamento del peso di 100 bacche e dei principali parametri tecnologici di maturità delle uve dall'invasatura alla raccolta.

Anche i parametri di maturità fenolica, hanno evidenziato dei risultati simili a quanto visto per i parametri tecnologici. Il diradamento dei grappoli ha mostrato i risultati di sicuro più interessanti, sia per quanto riguarda il potenziale antocianico totale (fig. 2 in Bertolini et al., 2012) che estraibile (fig. 2A). Anche l'indice dei polifenoli totali (fig. 2B) è maggiore nel caso della tesi sottoposta a diradamento dei grappoli (CT). Non di molto inferiori i risultati ottenuti nel caso della defogliazione pre-fioritura (PFLR), soprattutto per quanto riguarda il dato di antociani totali all'ultima data di campionamento (fig 2 in Bertolini et al., 2012). Osservando l'andamento degli antociani estraibili (fig. 2A), si nota come

nelle prime tre date di campionamento la concentrazione di questa frazione colorante sia risultata simile nei trattamenti PFLR e UN, mentre alla data di vendemmia la percentuale estratta sia aumentata significativamente per la tesi PFLR. Potremmo ipotizzare quindi un ritardo nella maturazione, che spiegherebbe sia la minore concentrazione di solidi solubili che di antociani rispetto al diradamento dei grappoli. La bassa concentrazione di antociani estraibili durante la maturazione potrebbe essere parimenti spiegata dalla maggiore resistenza fisica delle bucce (maturità cellulare rallentata).

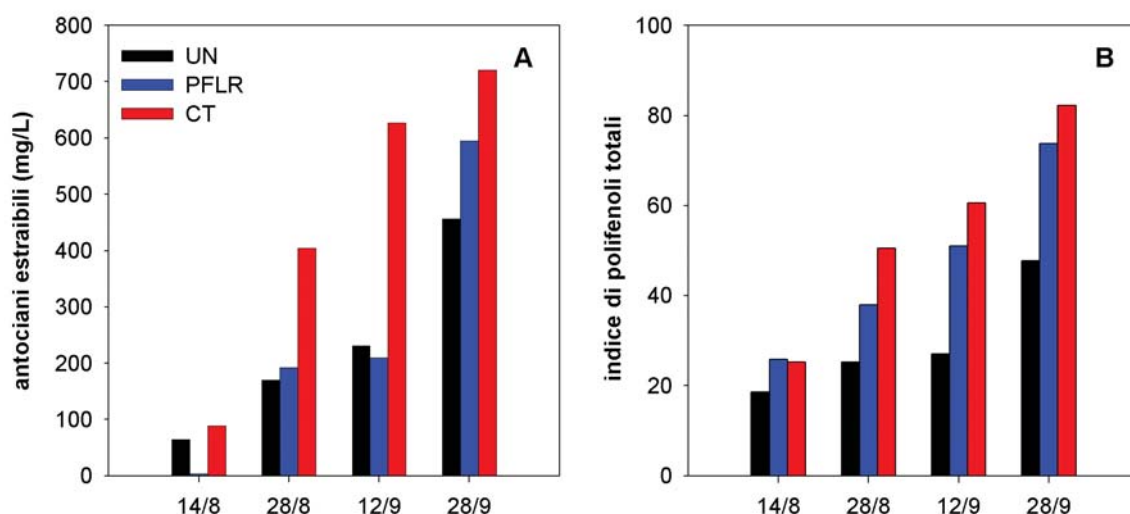


Figura 2 – Andamento degli antociani estraibili (A) e dell'indice di polifenoli totali (B) dall'invaiaitura alla raccolta.

A contribuire a questa ipotesi, l'estrazione delle componenti polifenoliche in un solvente alcolico, ha evidenziato una maggiore concentrazione sia di antociani che di polifenoli tannici (tab. 3). Il livello di tannini a basso peso molecolare delle bucce è simile nei trattamenti UN e CT mentre è più alto nel caso della defogliazione (PFLR). Questo dato risulta maggiore anche nel caso dei tannini da vinaccioli. L'estrazione di tannini ad alto peso molecolare dalle bucce è simile per le tesi CT e PFLR, ma molto superiore per i vinaccioli del trattamento PFLR. Anche questi dati rappresentano un'ulteriore conferma del probabile ritardo di maturazione delle viti sottoposte a defogliazione pre-fioritura.

La maggiore concentrazione tannica (sia da bucce che da vinaccioli) potrebbe essere importante nel caso del Terrano, poiché le uve di questa varietà normalmente presenta una componente polifenolica bassa, che pregiudica la durata nel tempo dei vini.

Tabella 3 – effetto del diradamento dei grappoli e della defogliazione prefioritura sulle componenti polifenoliche delle bucce e dei vinaccioli.

	bucce (mg/kg)			vinaccioli (mg/kg)	
	LMWP	HMWP	antociani totali	LMWP	HMWP
UN	132	757	1558	221	170
PFLR	231	1764	2571	661	663
CT	131	1570	2027	439	386

LMWP: tannini a basso peso molecolare - HMWP: tannini ad alto peso molecolare

Rapporto area fogliare / produzione

L'equilibrio tra area fogliare e produzione è importante al fine di ottenere una buona qualità delle uve alla vendemmia, ma come già ricordato, le differenze tra le varietà sono a volte così misteriose che è necessario analizzarle nel dettaglio.

Nei trattamenti dove era stato effettuato il diradamento dei grappoli (FCHB e HCHB), ovviamente il numero degli stessi alla vendemmia è risultato inferiore (tab. 4). Sebbene si possa notare una riduzione importante della produzione ed un aumento del peso medio grappolo come effetto di compensazione, la grande variabilità all'interno del vigneto non ha permesso di ottenere differenze significative tra i trattamenti.

Comparando le tesi a chioma intera (FCFB e FCHB) con quelle a chioma ridotta (HCFB e HCHB), ci si rende conto facilmente come l'intervento di cimatura abbia provocato una riduzione significativa dell'area fogliare (tab. 5). Seppure non significativi, i dati relativi al rapporto area fogliare / produzione evidenziano valori più alti nel caso del trattamento FCHB ed i più bassi per HCFB. I valori trovati rientrano all'interno del range proposto da Kliewer e Dokoozlian (2005) al meno della tesi FCHB, dove il diradamento dei grappoli ha fatto lievitare il rapporto al di sopra della soglia superiore.

Tabella 4 – effetto del rapporto area fogliare/produzione sui parametri quantitativi alla raccolta.

tesi	numero di grappoli	produzione (kg/pianta)	peso medio grappolo (g)
FCFB	14.6 a	4.31	297
FCHB	9.44 b	3.14	327
HCFB	15.8 a	4.68	288
HCHB	8.56 b	3.06	363
<i>Sign. F</i>	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabella 5 – effetto del rapporto area fogliare/produzione sulle componenti dell'area fogliare.

tesi	tralci principali	femminelle	area fogliare totale (m ²)	LA / Y1 (m ² /kg)
FCFB	3.61 a	2.31 ab	5.91 a	1.62
FCHB	3.16 ab	2.78 a	5.94 a	2.75
HCFB	2.74 b	1.17 c	3.91 b	1.10
HCHB	2.24 c	1.65 bc	3.89 b	1.40
<i>Sign. F</i>	**	**	**	<i>n.s.</i>

1LA / Y: rapporto area fogliare / produzione

La riduzione della produzione nei trattamenti FCHB e HCHB, ha provocato un effetto di compensazione anche sul peso medio acino (fig. 3A), che è risultato più alto, con differenze significative solamente nelle prime due date di campionamento.

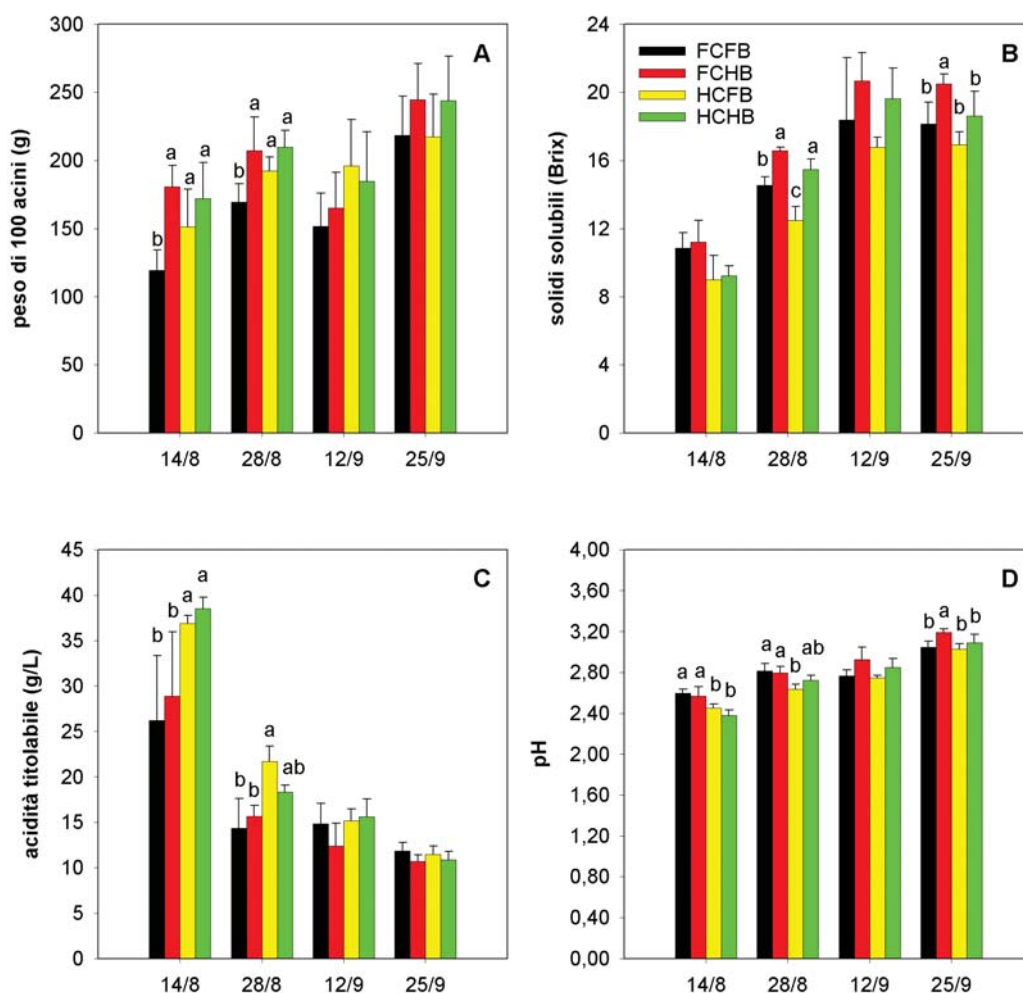


Figura 3 – andamento del peso di 100 bacche e dei principali parametri tecnologici di maturità delle uve dall'invasatura alla raccolta.

Mentre l'acidità titolabile ha evidenziato alcune differenze nei primi campionamenti (fig. 3C), con valori più elevati per le tesi a chioma ridotta, il pH è risultato significativamente più alto nei trattamenti FCFB e FCHB, ed alla raccolta il valore più alto è stato osservato nel caso del trattamento FCHB (fig. 3D).

Il diradamento dei grappoli ha provocato un accumulo di polifenoli ed antociani nelle bacche (tab. 6). L'indice dei polifenoli totali ed il contributo percentuale dei tannini da vinacciolo (Mp) sono risultati maggiori nel caso delle tesi diradate. Come già evidenziato sopra, un aumento nella dotazione polifenolica (soprattutto tannini) potrebbe

diventare interessante nel caso del Terrano, poiché questa varietà normalmente presenta una concentrazione molto bassa di questa componente.

Tabella 6 – effetto del rapporto area fogliare/produzione sulle componenti fenoliche delle bacche alla raccolta (25 set 2012).

	antociani totali (mg/L)	indice di polifenoli totali	Mp
FCFB	1202	52,2	21,10 %
FCHB	1440	67,4	30,80 %
HCFB	1078	50,8	20,90 %
HCHB	1491	59	26,40 %

Conclusioni

I risultati di entrambe le sperimentazioni condotte su Terrano hanno dimostrato una volta ancora le potenzialità di alcune tecniche agronomiche di modificare la produttività e le caratteristiche qualitative delle uve. Buoni risultati sono stati ottenuti sia con in diradamento dei grappoli che con la defogliazione pre-fioritura, ma questi primi riscontri necessitano comunque di essere confermati con ulteriori campagne di misure.

Ringraziamenti

Si ringraziano le aziende “Lisjak” e “Vinakras” per la collaborazione durante la sperimentazione.

Il presente lavoro sperimentale rientra nelle attività previste del progetto AGROTUR / agroturistica carsica – progetto finanziato nell’ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013, dal Fondo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali.

Bibliografia

Bertolini, A.; Petrusa, E.; Braidot, E.; Peresson, C.; Zancani, M.; Rajčević, U.; Sivilotti, P.; Lisjak, K.; Vianello, A., 2012. Trasporto di flavonoidi quale indicatore di maturazione nell’uva Refošk. In Vinarski dan 2012. D. Bavčar et al. (Eds.). Ljubjana, Slovenia.

Bravdo, B.; Hepner, Y.; Loinger, C.; Cohen, S.; Tabacman, H., 1985. Effect of Crop Level and Crop Load on Growth, Yield, Must and Wine Composition, and Quality of Cabernet Sauvignon. American Journal of Enology and Viticulture, 36: 125-131.

Dami, I.; Ferree, D.; Prajitna, A.; Scurlock, D., 2006. A Five-year Study on the Effect of Cluster Thinning on Yield and Fruit Composition of 'Chambourcin' Grapevines. *HortScience*, 41: 586-588.

Glories, Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. 195 pp. Thèse Doctorat d'Etat, Université Bordeaux II.

Guidoni, S.; Allara, P.; Schubert, A., 2002. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 224-226.

Kliewer, W. M.; Dokoozlian, N. K., 2005. Leaf Area/Crop Weight Ratios of Grapevines: Influence on Fruit Composition and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 170-181.

Palliotti, A.; Poni, S.; Berrios, J. G.; Bernizzoni, F., 2010. Vine performance and grape composition as affected by early-season source limitation induced with anti-transpirants in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16: 426-433.

Poni, S.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Libelli, N., 2009. Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15: 185-193.

Reynolds, A. G., 1989. Impact of pruning strategy, cluster thinning, and shoot removal on growth, yield, and fruit composition of low-vigor de Chaunac vines. *Canadian Journal of Plant Science*, 69: 269-275.

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

Sternad Lemut M.; Trošt K.; Sivilotti P.; Vrhovšek U., 2011. Pinot Noir wine color related phenolics as affected by leaf removal treatments in Vipava Valley. *J. Food Comp. Anal.* 24: 777-784.

Tardáguila, J.; Diago, M. P.; Martinez de Toda, F.; Poni, S.; Vilanova, M., 2008. Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of cv. Grenache grown under non irrigated conditions. *Journal International de la Science de la Vigne ed du Vin*, 42: 221-229.

Potenziale polifenolico del terano

1,2,3,4,5,6 Istituto
Agrario della Slovenia

1 doc. dr., Hacquetova
ulica 17, Ljubljana

2 univ. dipl. inž. agr., c.s.

3 univ. dipl. inž. živ.
tehnol., c.s.

4 doc.dr., c.s.

5 dr., c.s.

6 dr., c.s.

Andreja VANZO¹, Katja ŠUKLJE², Mojca JENKO³, Franc Čuš⁴, Dejan BAVČAR⁵, Klemen LISJAK⁶

Riassunto

Il Teran PTP è un vino prodotto con uve di Terrano nella zona viticola del Carso sloveno. Il Terrano D.O.C. è un vino prodotto invece sul Carso italiano, nelle provincie di Gorizia e Trieste. Nel territorio transfrontaliero questo vino si riconosce dal suo colore rosso violaceo intenso che riflette l'alto contenuto di sostanze coloranti rosse – antociani e la sua media composizione in tannini. Con l'intenzione di analizzare il potenziale polifenolico dei vini carsici menzionati e le caratteristiche delle singole zone di produzione abbiamo analizzato il contenuto e la composizione dei polifenoli estraibili dall'uva Terrano e il contenuto di polifenoli nei vini Teran PTP e Terrano D.O.C. dell'annata 2011. I campioni di vino dalla Slovenia e dall'Italia in media contenevano: 2090 mg/kg-uva e 1943 mg/l-vino di polifenoli totali; 1528 mg/kg e 936 mg/l di antociani totali; 492 mg/kg e 865 mg/l di proantocianidini (tannini) a basso peso molecolare (p.m.) e 2213 mg/kg e 2413 mg/l di tannini ad alto p.m. Abbiamo confermato che il Terrano è una varietà di uva con un contenuto di antociani superiore alla media il che dona al Teran PTP e al Terrano D.O.C. un colore intenso ed un alto potenziale alimentare. Abbiamo anche scoperto che la distribuzione media dei proantocianidini a basso p.m. tra bucce e vinaccioli era rappresentata da un rapporto di 28:72, mentre la distribuzione media dei proantocianidini ad alto p.m. tra bucce e vinaccioli era 68:32. Ciò significa che con macerazioni prolungate si possono lisciviare i tannini dai vinaccioli, arricchendo così la struttura tannica del vino. La comparazione dei parametri chimici base nei vini da entrambe le zone transfrontaliere ha confermato la conformità con il disciplinare del vino Teran della denominazione PTP slovena per il 66 % dei campioni di vino.

Parole chiave: antociani, polifenoli, proantocianidini-tannini dell'uva, resveratrol, Teran PTP, Terrano D.O.C.

Polyphenol potential of teran

Abstract



Teran PTP is wine produced from grape Refosk on absolute vineyard locations in Slovenian vineyard sub-district Karst. Terrano D.O.C. is wine produced on Italian Karst in province of Gorizia and province of Trieste. Cross border Teran wine is known for its intense red-violet color - high content of red grape pigments-anthocyanins, and medium tannin content. The objective of this study was to investigate the polyphenol potential of Teran wines and to evaluate the properties of wines from different vineyards at Karst. For the vintage 2011 the content of each polyphenol group was determined in both, grapes Refosk and wines Teran PTP and Terrano D.O.C. Grape and wine samples from Slovenia and Italy had on the average the content of: total polyphenols 2090 mg/kg-grape and 1943 mg/l-wine; total anthocyanins 1528 mg/kg and 936 mg/l; low molecular weight proanthocyanidins (tannins) 492 mg/kg and 865 mg/l and high molecular weight proanthocyanidins 2213 mg/kg and 2413 mg/l, respectively. It was confirmed that Refosk is a grape variety having the content of anthocyanins above the average, what resulted in a strong color of Teran wines and a huge nutritional potential of those wines. It was also found that the ratio of low molecular tannins between skin:seeds was on the average 28:72 and the ratio of high molecular tannins between skin:seeds was 68:32, respectively. It could be postulated that by using long post-fermentation maceration, additional tannins from seeds could be extracted and improve the tannic structure of wine. The results of basic chemical properties of cross border Teran wines have been confirmed the consistency to Slovenian Regulative for Wine labeled PTP Teran for 66 % of analyzed wines.

Keywords: anthocyanins, polyphenols, proanthocyanidins-grape tannins, resveratrol, Teran PTP, Terrano D.O.C.

Introduzione

I polifenoli sono uno dei gruppi di metaboliti secondari delle piante più rappresentati e sono parametri importanti per la qualità dell'uva e del vino. Influiscono sulla stabilità e le qualità sensoriali del vino. Sono responsabili del colore rosso (antociani), del gusto amarognolo (LMWP - proantocianidine o tannini a basso p.m. dell'uva) e dell'astringenza (MHWP - tannini ad alto p.m. dell'uva). I polifenoli influiscono

sulla percezione del corpo del vino, hanno un'influenza stabilizzante e sono la base per la maturazione del vino. Oltre per il loro legame con la qualità del vino, sono importanti anche per la salute dell'uomo, come principi biologicamente attivi.

I flavonoidi rappresentano la maggior parte dei polifenoli del vino rosso e si lisciviano dalle bucce e dai vinaccioli della bacca d'uva durante la macerazione e la contemporanea fermentazione alcolica. Durante la fermentazione alcolica lo zucchero si trasforma in alcol che è un ottimo solvente per la lisciviazione dei flavonoidi, soprattutto dai vinaccioli della bacca. I gruppi di flavonoidi più presenti nel vino rosso sono i flavani e gli antociani. I flavani comprendono i composti monomerici semplici (catechine, epicatechine ecc.) e le unità monomeriche legate in LMWP e HMWP. Entrambi si trovano nelle bucce e nei vinaccioli della bacca d'uva. Gli antociani sono coloranti rossi che nella *Vitis vinifera* L. si trovano principalmente nella buccia della bacca dell'uva. Durante la maturazione si legano con le proantocianidine incolori con peso molecolare superiore, stabilizzando così il colore del vino.

I fattori che influenzano il profilo e la concentrazione di composti fenolici nell'uva e in seguito nel vino, sono: la varietà (fattore principale), il terroir, le condizioni climatiche dell'annata, la tecnica agronomica e di vinificazione.

Poiché il Carso è caratterizzato da condizioni geografiche, geologiche e climatiche uniche, si intende analizzare l'influenza della posizione, o più correttamente utilizzando un termine francese del 'terroir' del Carso, relativamente al contenuto e alla composizione dei polifenoli nell'uva Terrano e nei vini Teran PTP e Terrano D.O.C. Nella parte slovena del Carso il vino Teran PTP è protetto dalla dicitura di denominazione tradizionale riconosciuta (Disciplinare, 2008). I vini Teran PTP e Izbrani Teran PTP, in Slovenia vengono prodotti soltanto dall'uva Terrano (*Vitis vinifera* L.) in una zona di produzione delimitata, nell'ambito della sottoregione viticola dell'altipiano Carsico. In Italia il vino Terrano D.O.C. si produce sul Carso nelle provincie di Gorizia e di Trieste e il vino Terrano Classico D.O.C. soltanto nella provincia di Trieste (Gazzetta Ufficiale, 2011).

Qui sono presentati i risultati per l'annata 2011. L'annata 2012 è in preparazione e verrà presentata come valore di paragone l'anno prossimo. Nello studio sono per la prima volta presentati i profili e la localizzazione dei polifenoli

nell'uva Terrano e i profili polifenolici nel vino Teran PTP e Terrano D.O.C. del territorio transfrontaliero del Carso sloveno e italiano.

Materiali e metodi

Campionamento dell'uva e del vino

Si è effettuata un campionamento rappresentativo dell'uva Terano nell'ottobre del 2011, durante la vendemmia in 18 vigneti sul Carso sloveno e italiano. A inizio giugno 2012 sono stati raccolti 38 campioni di vino dai produttori del consorzio "Združenje Konzorcij kraških pridelovalcev Terana" e dai produttori del Consorzio Tutela Vini Collio e Carso. Tutti i vini erano dell'annata 2011, di cui 27 campioni di Teran PTP (Carso sloveno) e 11 campioni di Terrano D.O.C. (Carso italiano).

Estrazione dei polifenoli dall'uva

Subito dopo il campionamento l'uva è stata raffreddata a 4 °C e sono stati preparati gli estratti di buccia e di vinaccioli dalle bacche d'uva. Si è usato un metodo di estrazione che simula il processo di vinificazione in condizioni da laboratorio (Mattivi et al., 2002). Le bucce e i vinaccioli separate da un campione rappresentativo di 200 g di bacche d'uva, sono stati posti in estrazione separatamente per 5 giorni a 30 °C in una soluzione di acqua ed etanolo (88:12 v/v), che conteneva 100 mg/l SO₂, 5 g/L di acido tartarico e tamponato a pH 3.2. Gli estratti sono stati insufflati con azoto e conservati a 4 °C fino alle analisi spettrofotometriche, effettuate nel dicembre del 2011.

Analisi spettrofotometriche degli estratti d'uva e di vino

Le analisi spettrofotometriche dei polifenoli totali, degli antociani totali e dei tannini a basso e ad alto p.m. sono state eseguite con uno spettrofotometro Agilent 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, ZDA) secondo i metodi di Stefano et. al. (1989) in condizioni ottimizzate (Rigo et al., 2000).

I polifenoli totali sono stati espressi in mg/kg (+)-catechina di peso fresco d'uva negli estratti di buccia e di vinacciolo (e i risultati sono stati sommati) e in mg/l (+)-catechina nei vini.

Abbiamo espresso in valori di antociani totali come mg/kg di peso fresco d'uva o in mg/l nei vini. Abbiamo tenuto in considerazione l'assorbanza media di un complesso di antociani estratti da uva Cabernet sauvignon (massa

molecolare media di 500 g/mol e coefficiente di estinzione del composto 18800 M⁻¹cm⁻¹ in soluzione 70:30:1 etanolo: acqua:HCl).

Il contenuto di HMWP è stato espresso come mg cianidina/kg di peso fresco dell'uva o in mg cianidina/L nei vini. Per quanto riguarda il contenuto in LMWP reattivi con la vanillina, questo è stato espresso come mg (+)-catechina /kg di peso fresco dell'uva o in mg (+)-catechina /L nei vini.

L'intensità e la tonalità del colore del vino sono state misurate direttamente nei campioni di vino in base alle misurazioni delle densità ottiche a 420 nm, 520 nm e 620 nm in cuvetta da 1mm di percorso ottico.

Analisi di antociani monomerici nei vini con utilizzo di cromatografo liquido ad alta pressione con detector con serie di diodi (HPLC-DAD)

Gli antociani nei vini sono stati analizzati utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione HPLC-DAD (Agilent Technologies 1100). Abbiamo sviluppato e validato un metodo con rilevamento a 520 nm con buona separazione di tutti e 15 gli antociani (Vanzo e Vrhovšek, 2005). Abbiamo valutato i singoli antociani nel vino in mg/l di equivalenti al malvidina 3-glucoside con l'aiuto di una curva di taratura per il malvidina 3-glucoside nell'intervallo tra 1 e 500 mg/l ottenendo una correlazione 0.99927.

Analisi dei stilbeni (resveratroli) nei vini con HPLC-DAD

I resveratroli sono stati analizzati con HPLC-DAD (Agilent Technologies 1100). Il metodo è stato sviluppato per rilevare sia il *cis*- e *trans*-resveratrolo in forma libera che legato al glucosio (*cis*- e *trans*-piceidi) (Mattivi e Nicolini, 1997; Vrhovšek et al., 1995). Tutte le forme di stilbeni sono state valutate in mg/l equivalenti di *trans*-resveratrolo.

Analisi base dei vini

I parametri fisico-chimici di base sono stati stabiliti con metodi ufficiali EU (Commission regulation EEC N. 2676/90, EC 335/2005), con l'eccezione dei parametri: zuccheri e ceneri che sono stati determinati con metodi interni. Le analisi di parametri fisico-chimici e di diversi gruppi di polifenoli nei vini si sono effettuate in luglio e agosto del 2012, cioè quando i vini erano già disponibili per il consumo.

Num.			MS	AT	AM	pH	TP ^a	SA ^b	LMWP ^a	HMWP ^a
/11	posizione	forma	(°Brix) g/L a. tartarico	g/L			(mg/kg catehina)	(mg/kg)	(mg/kg catehina)	(mg/kg cianidina)
1987	Komen1	cordone	21,4	9,5	5,2	3,04	1729	1607	480	2288
1988	Kreplje	pergola	21,8	9,7	4,9	3,44	2464	1425	610	2181
1989	Sveto1	pergola	22,0	8,0	2,9	3,52	2392	1883	568	2538
1990	Sveto2	d.guyot*	22,3	9,0	4,3	3,23	2231	1822	553	2277
1991	Tublje1	guyot s.**	22,4	7,9	3,4	3,39	1789	1232	338	2083
1992	Hruševica	d. guyot	21,5	8,6	3,3	3,16	2242	2148	464	2677
1993	Utovlje	pergola	19,4	9,4	3,4	3,26	1356	1020	273	1089
1994	Komen2	guyot s.	21,6	9,8	5,1	3,34	2255	1777	621	4260
1995	Tublje2	guyot s.	21,3	8,9	4,1	3,20	1730	1437	446	1564
1996	Brestovica	d. guyot	22,1	7,3	2,3	3,44	2272	1491	477	2059
1997	Sežana	cordone	21,7	8,4	4,0	3,27	2297	1469	491	2113
1998	Dutovlje	guyot s.	22,6	6,6	3,1	3,35	1929	1114	482	1981
1999	Kapriva	guyot s.	20,2	8,8	3,4	3,14	2185	1360	481	2101
2000	Škrbina	guyot s.	22,2	9,3	4,6	3,33	2171	1665	619	2356
2001	Sepulje	pergola	21,0	11,4	5,9	3,09	2170	1659	605	2540
2002	Praprot1	nessun d.	22,0	6,9	1,6	3,53	2147	1533	435	2138
2003	Praprot2	guyot s.	22,5	7,5	4,0	3,60	2207	1218	600	1852
2004	Repen	d. guyot	22,0	7,6	3,3	3,24	2050	1646	306	1734
		Media	21,7	8,6	3,8	3,31	2090	1528	492	2213
		SD***	0,8	1,2	1,1	0,16	280	285	107	633

Risultati

Contenuto dei polifenoli nell'uva della varietà Terrano annata 2011

Tabella 1: Parametri chimici di base nei mosti e contenuto dei singoli polifenoli totali nelle bacche della varietà terrano; campioni raccolti durante la vendemmia 2011 sul territorio del Carso transfrontaliero.

MS - solidi solubili, AT - acidità titolabile, AM- acido malico, PT - polifenoli totali, SA - antociani totali, LMWP - proantocianidini a basso p.m., HMWP - proantocianidini ad alto p.m.

*doppio Guyot, **Guyot semplice, ***Deviazione standard

^aI risultati in mg/kg rappresentano la somma dei polifenoli estraibili dalle bucce e dai vinaccioli, calcolati in proporzione alla massa dell'uva fresca.

^bI risultati in mg/kg rappresentano la somma dei antociani estraibili dalle bucce e dalle bacche, calcolati in proporzione alla massa dell'uva fresca.



Nello studio è stata inclusa l'uva della varietà Terrano, raccolta alla vendemmia nel 2011 da 18 particelle, sparse nel Carso sloveno e italiano. Il mosto d'uva ha mostrato al momento della vendemmia nel 2011 un livello di solidi solubili pari a 21,7 °Brix, un'acidità titolabile di 8,6 g/L e 3,8 g/L di acido malico. I valori riscontrati evidenziano una buona maturazione dell'uva (Tabella 1). In confronto all'annata 2011, va menzionata l'annata 2012, in quanto mostra valori nettamente inferiori di secca sostanza secca, ossia il livello di solidi solubili si attestava a 18,3 °Brix, il pH attorno a 3.04 e l'acidità totale a valori di 10,1 g/L (la media dei 29 campioni di uva dell'annata 2012). Le analisi del profilo polifenolico dell'annata 2012 saranno illustrate in occasione del prossimo simposio.

Oltre ai metaboliti primari una lavorazione ottimale delle varietà Teran PTP e Terrano D.O.C. dall'uva Terrano, necessita anche di informazioni relative al profilo polifenolico della varietà di uva in questione. Sono di vitale importanza il contenuto degli antociani totali, nonché la distribuzione tra vinaccioli e bucce delle protoantocianidine a basso e alto peso molecolare. Oltre al contenuto delle stesse, che varia a seconda delle stagioni dell'anno, bisogna sottolineare anche un dato cruciale, ovvero dove si localizzano i tannini nella bacca. In base a questo dato è possibile scegliere la tecnologia di vinificazione più appropriata (tempo e modalità di macerazione giusti) per una produzione di vini con qualità sensoriale superiore.

I risultati delle misurazioni hanno dimostrato che oltre alla varietà, anche la posizione dei singoli vigneti influenza il contenuto dei flavonoidi estraibili dall'uva (Tabella 1). I valori medi dei polifenoli estraibili totali da bucce e vinaccioli ammontavano a 2090 ± 280 mg/kg di uva. I dati ottenuti indicano un valore superiore rispetto al contenuto riscontrato in un'altra annata per la varietà Cabernet sauvignon (1669 mg/kg), utilizzando lo stesso metodo di estrazione e analisi in Montenegro (Pajović et al., 2012). Il risultato è proporzionato al contenuto di antociani nell'uva Terrano dell'annata 2011, siccome il metodo spettrofotometrico ha determinato tutti i polifenoli totali, presenti nella buccia e nei vinaccioli.

L'uva della varietà Terrano, presente sul Carso ha mostrato nel 2011 un contenuto medio di antociani estraibili pari a 1528 ± 285 mg/kg. Il contenuto medio di antociani totali in uve Terrano raccolte nella regione vitivinicola Primorska nelle annate 1999 e 2000 ammontava a 1100-1300 mg/kg,

(Vrhovšek et al., 2002) (utilizzando gli stessi metodi analitici e di estrazione). In Montenegro, il contenuto medio degli antociani totali alla vendemmia nelle uve delle varietà Cabernet sauvignon, Vranac e Kratošija dell'annata 2011 risultava pari a 1035 mg/kg, 980 mg/kg e 467 mg/kg rispettivamente (Pajović et al., 2012). I risultati confermano che l'uva della varietà Terrano ha un livello di antociani superiore alla media, il che le conferisce un incredibile valore colorante e un elevato potenziale alimentare.

Il contenuto medio di proantocianidine LMWP estraibili da bucce e vinaccioli ammontava a 492 ± 107 mg/kg, mentre i tannini HMWP erano stimati a 2213 ± 633 mg/kg. I risultati per le proantocianidine LMWP sono inferiori del 100 % rispetto alla media rilevata nell'uva nelle annate 1999 al 2000, quando i valori variavano tra i 1000-1300 mg/kg (Vrhovšek et al., 2002). I risultati delle misurazioni relative alle proantocianidine ad alto peso molecolare superavano del 23 % la media di 1400-1700 mg/kg per la varietà Terrano nella regione vinifera di Primorska per le annate del 1999 e 2000 (Vrhovšek et al., 2002). Il contenuto superiore di proantocianidine ad alto peso molecolare e di antociani presenti nella bacca dell'uva, confrontato con le annate precedenti, dimostra che l'annata 2011 era favorevole ad una maggiore sintesi polifenolica. Scegliendo il momento più appropriato per la vendemmia e la tipologia di vinificazione, si è potuto osservare degli effetti positivi nella percezione della 'pienezza' e del 'corpo' del vino Teran PTP e Terrano D.O.C. (annata 2011).

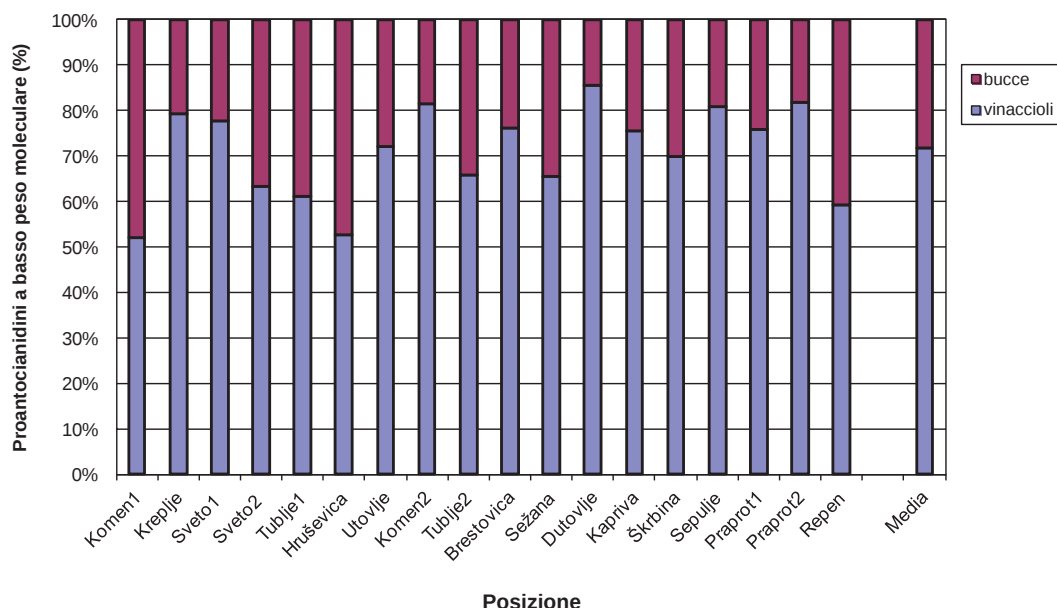


Figura 1: Distribuzione delle proantocianidini a basso peso molecolare tra le bucce e i vinaccioli dell'uva Terrano; campioni raccolti durante la vendemmia sul Carso transfrontaliero.

Ci interessava inoltre scoprire la distribuzione dei composti fenolici nella bacca d'uva della varietà Terrano. Abbiamo evidenziato come la distribuzione media delle proantocianidine a basso peso molecolare, provenienti da 18 località, tra bucce e vinaccioli aveva un rapporto medio di 28:72 (Figura 1), mentre la distribuzione media delle proantocianidine ad alto peso molecolare tra bucce e vinaccioli era 68:32 (Figura 2). L'uva della varietà Terrano sul Carso vanta quasi due terzi del totale di proantocianidine a basso peso molecolare nei vinaccioli e due terzi di proantocianidine ad alto peso molecolare nelle bucce. I risultati sono simili alla media riscontrata nelle annate 1999 e 2000 per i campioni di uva Terrano della regione vitivinicola di Primorska. I risultati del periodo sopra menzionato mostrano una distribuzione dei proantocianidine a basso peso molecolare tra bucce e vinaccioli in rapporto di 25:75 e una distribuzione dei proantocianidine ad alto peso molecolare tra bucce e vinaccioli pari a 61:39 (Vrhovšek et al., 2002). La similitudine tra i risultati conferma che la localizzazione dei tanini rappresenta una caratteristica della varietà in questione.

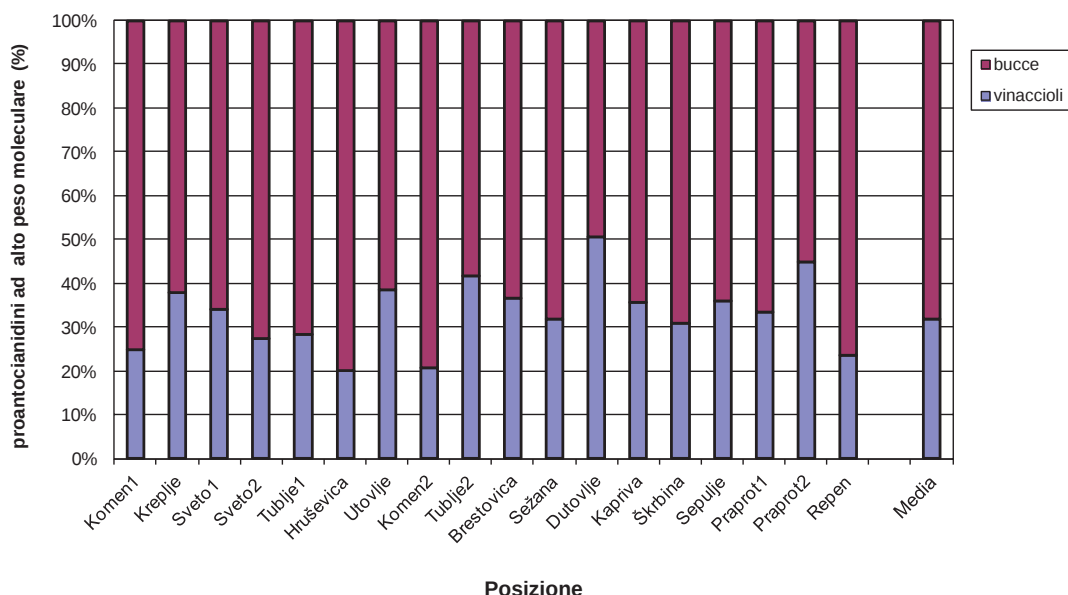


Figura 2: Distribuzione delle proantocianidini ad alto peso molecolare tra le bucce e i vinaccioli dell'uva Refosco; campioni raccolti durante la vendemmia sul Carso transfrontaliero.

Contenuto di polifenoli nel vino Teran (annata 2011)

Sui 38 campioni di vino dell'annata 2011, 27 campioni di Teran PTP e 11 di Teranno D.O.C., abbiamo determinato le caratteristiche del colore (intensità e tonalità) e la concentrazione di polifenoli totali, il profilo delle diverse antocianine e il livello di resveratrolo.

La Tabella 2 indica il contenuto dei singoli polifenoli totali nei vini di nove mesi, i cui campioni corrispondono ai singoli produttori nei consorzi del Carso transfrontaliero. I vini dell'annata 2011 avevano un colore intenso che in media riportava un valore di 23,6 AU come conseguenza dell'alto contenuto di antociani totali. La tonalità del colore, definita dal rapporto tra l'assorbanza a 420 nm e 520 nm, rivela l'età del vino. I vini giovani hanno una tonalità del colore che varia tra 0.2 fino a 0.3, mentre i vini maturi hanno un valore tra 1,2 e 1,4, anche se i valori possono cambiare a seconda della varietà (Glories, 1984). In media la tonalità del colore presente nei nostri campioni si attestava attorno a valori di 0,6, il che dimostra che i vini erano ancora relativamente giovani. Purtroppo non siamo in possesso di profili polifenolici annuali del vino Teran, anche se l'Istituto agrario della Slovenia KIS dispone per l'annata 2007 di dati,



relativi a un intervallo confrontabile (nei vini di 9 mesi), ottenuti con gli stessi metodi utilizzati per analizzare i profili polifenolici di 23 tipi di Teran PTP dell'annata 2006. Il valore medio dei polifenoli totali nei vini dell'annata 2001 ammontava a 1943 mg/l (confrontati con i dati dell'annata 2006: 1505 mg/l) mentre il contenuto medio degli antociani totali era di 936 mg/l (annata 2006: 208 mg/l). Il contenuto medio di antociani totali era di 4,5 volte superiore nell'annata 2011, che si è dimostrata come un'annata eccezionale per contenuto di sostanze coloranti. Inoltre, l'annata 2011 era egualmente ricca di proantocianidine ad alto peso molecolare, ossia di tannini, composti che conferiscono al vino struttura e astringenza. In media il loro contenuto ammontava a 2413 mg/l (confrontati con i dati dell'annata 2006: 1130 mg/l). Il contenuto medio dei tannini a basso peso molecolare, responsabili del gusto amaro dei vini, ammontava a 865 mg/l (nell'annata del 2006: 508 mg/l). Dalle analisi dei profili polifenolici e dal confronto con l'annata del 2006 possiamo trarre la conclusione che l'annata del 2011 è stata caratterizzata da un contenuto superiore sia di proantocianidine che di antociani. Sarà possibile trarre migliori e più ampie conclusioni dopo aver confrontato i risultati con l'analisi dell'uva e del vino delle annate 2012 e 2013.

Tabella 2: Contenuto dei singoli gruppi di polifenoli nei vini di nove mesi con denominazione Teran PTP e Terrano D.O.C.; campioni raccolti presso i produttori dei consorzi sul Carso transfrontaliero.

PT - polifenoli totali, SA - antociani totali, LMWP - proantocianidini a basso p.m., HMWP - proantocianidini ad alto p.m.

*Deviazione standard

N. /12	Intensità (AU)	Tono	PT (mg/L catehina)	SA (mg/L)	LMWP (mg/L catehina)	HMWP (mg/L cianidina)
985	23,3	0,54	1643	1115	377	1643
986	21,8	0,57	1194	829	304	1282
987	27,3	0,60	2199	978	1024	2777
988	22,6	0,60	2227	1035	1044	2569
989	19,7	0,54	1862	947	846	1996
990	22,4	0,51	1549	944	726	1922
991	31,3	0,45	1912	1286	579	2490
992	27,6	0,49	2024	1137	366	2552
993	25,8	0,46	1508	927	451	1956
994	23,1	1,05	1967	1326	725	2661
995	29,5	0,47	1961	1331	850	2166
996	23,3	0,58	1419	865	543	1866
997	32,9	0,56	2098	1091	927	2948
998	30,2	0,54	2177	1114	916	2477
999	30,9	0,51	2326	1096	1312	3444
1000	22,4	0,51	1797	947	546	1938
1001	20,4	0,53	1491	846	463	1777
1002	24,1	0,60	1500	758	511	1692
1003	25,4	0,52	2376	1183	1102	2847
1004	26,4	0,52	1961	1156	823	2168
1005	24,9	0,55	2286	977	1228	2884
1006	20,2	0,55	1898	805	994	2337
1007	25,7	0,54	2652	1095	1120	2842
1008	29,4	0,60	2765	1110	1673	4048
1009	23,0	0,58	2296	701	1019	2576
1010	26,5	0,56	1906	922	901	2525
1011	26,0	0,54	2213	1107	955	3236
1079	15,8	0,67	1435	578	661	1736
1080	15,8	0,58	2005	578	1592	3265
1081	26,1	0,54	1606	822	534	1852
1082	15,1	0,58	1499	833	407	1724
1083	14,6	0,65	1781	601	1072	3159
1084	24,3	0,56	1948	861	764	2208
1085	12,6	0,64	1331	541	792	1240
1086	11,8	0,93	1774	348	798	1466
1087	24,7	0,62	2854	832	1575	3551
1088	24,4	0,61	2204	808	1488	3234
1090	24,5	0,55	2188	1124	872	2634
Media	23,6	0,58	1943	936	865	2413
SD**	5,1	0,11	393	225	355	668

Tabella 3: Contenuto degli antociani liberi e il contenuto dei resveratroli nei vini di nove mesi con denominazione Teran PTP e Terrano D.O.C.; campioni raccolti presso i produttori dei consorzi sul Carso transfrontaliero.

DPgl-delfinidina glucoside, CNgl-cianidina glucoside, PTgl-petunidina glucoside, PN-peonidina glucoside. MVgl-malvidina glucoside, t-resv.- *trans*- resveratrolo, c-resv. – *cis*-resveratrolo

*Deviazione standard

^aGli esteri dell'acido acetico e p-cumarico, presenti in minoranza, non sono inclusi nel totale dei antociani liberi.

N. /12	Antociani liberi ^a (mg/L MVgl)						Stilbeni (mg/L <i>t</i> -resveratrol)				
	DPgl	CNgl	PTgl	PNgl	MVgl	SOMMA	<i>t</i> -piceid	<i>c</i> -piceid	<i>t</i> -resv.	<i>c</i> -resv.	SOMMA
985	20	4	39	33	271	367	2,8	2,6	1,5	0,4	7,3
986	15	3	27	17	177	239	1,1	0,9	0,9	0,3	3,3
987	14	4	25	42	165	250	2,1	1,9	1,0	0,4	5,4
988	10	5	20	19	115	170	2,2	2,2	1,0	0,3	5,7
989	16	4	29	28	185	262	2,1	2,2	1,1	0,4	5,8
990	8	3	17	16	128	172	1,0	1,3	1,1	0,4	3,7
991	50	11	71	49	385	567	2,2	1,5	2,5	0,3	6,5
992	25	6	44	37	225	337	3,9	3,0	1,8	0,6	9,3
993	20	5	35	24	184	267	2,2	1,4	2,2	0,4	6,2
994	52	12	63	45	271	444	3,5	2,1	2,3	0,5	8,4
995	47	11	62	48	255	423	4,1	2,6	2,4	0,7	9,8
996	16	5	28	3	142	194	2,0	1,9	0,9	0,5	5,3
997	25	5	32	22	151	235	1,7	1,4	1,0	0,2	4,3
998	25	5	38	20	163	251	1,7	1,4	1,0	0,2	4,2
999	23	6	37	27	208	302	3,1	2,8	1,7	0,4	7,9
1000	17	2	31	21	219	291	4,0	3,0	4,5	1,1	12,6
1001	20	3	37	19	171	251	1,2	1,2	1,4	0,8	4,5
1002	20	4	33	18	154	228	1,5	1,3	2,2	1,1	6,0
1003	19	4	31	25	157	235	3,3	2,5	2,6	1,3	9,8
1004	17	5	30	28	143	223	2,1	1,5	1,8	0,6	6,0
1005	15	5	23	17	101	161	1,9	1,7	1,5	0,5	5,6
1006	19	7	36	39	202	303	1,8	1,3	1,9	1,0	6,0
1007	19	6	36	35	206	303	3,5	2,3	2,6	0,5	8,9
1008	25	7	38	32	193	295	5,1	3,6	2,8	0,9	12,4
1009	4	1	8	5	52	68	2,3	1,8	1,9	0,9	6,9
1011	19	4	28	36	180	266	5,0	3,3	2,3	0,6	11,1
1079	6	2	12	12	96	128	0,2	1,0	0,3	0,7	2,2
1080	16	4	8	5	25	58	2,2	1,2	3,4	1,5	8,2
1081	12	3	66	62	178	321	1,0	1,0	0,4	0,3	2,8
1082	20	5	34	20	311	390	2,5	1,8	2,9	0,8	8,1
1083	7	2	15	13	92	128	0,8	1,3	1,1	0,9	4,1
1084	17	3	29	25	179	254	3,0	2,3	2,9	1,4	9,5
1085	5	2	15	22	124	168	1,4	1,4	3,0	2,0	7,8
1086	0	0	1	2	46	50	0,9	0,8	0,3	1,9	3,9
1087	8	2	19	13	87	129	5,7	3,2	3,5	1,1	13,6
1090	19	6	33	27	184	268	2,9	1,9	2,7	1,5	9,0
Media	19	5	31	26	171	251	2,5	1,9	1,9	0,8	7,2
SD*	11	3	16	14	72	107	1,4	0,8	1,0	0,5	3,0



La tabella 3 mostra il contenuto degli antociani liberi e il contenuto di resveratrolo nei vini di nove mesi con denominazione Teran PTP e Terrano D.O.C., i cui campioni sono stati raccolti presso i produttori dei consorzi sul Carso sloveno e italiano. I risultati relativi al contenuto degli antociani liberi confermano l'alto contenuto presente in questi vini. Già durante la macerazione gli antociani cominciano a formare con le proantocianidine dei pigmenti con pesi molecolari superiori, e per questo motivo la loro concentrazione diminuisce con l'invecchiamento del vino. Siccome le analisi sono state effettuate su vini di nove mesi, il contenuto medio degli antociani liberi ammontava ancora a 251 mg/l, di cui il 68 % corrispondeva alla malvidina 3-glucoside. Le analisi dei 15 campioni di vino Terrano dell'annata 2006 (analizzati 9 mesi dopo la macerazione) hanno mostrato un valore medio di 417 mg/l per gli antociani liberi, mentre le analisi dei vini Cabernet sauvignon, Refosco, Teran PTP e Merlot di tre mesi dell'annata 2003 mostravano in media un valore di 209 mg/l (Vanzo e Vrhovšek, 2005). Oltre alla loro importanza tecnologica, gli antociani rivestono un importante ruolo per la salute umana, grazie agli studi che hanno confermato una correlazione tra consumo di bevande e di alimenti ricchi di antociani, e la prevenzione di malattie croniche, quali ad esempio il cancro, i disturbi cardiovascolari, le malattie neuro-degenerative e il diabete. Gli antociani liberi vengono assorbiti rapidamente attraverso le pareti dello stomaco entrando nella circolazione sanguigna dei mammiferi (Passamonti et al., 2003), e assorbendosi poi nel cervello, fegato e in altri organi, dove sono biologicamente attivi (Passamonti et al., 2005, Vanzo et al., 2008).

Il resveratrolo è una fitoalessina che protegge la buccia della bacche dai raggi UV e previene lo sviluppo della muffa grigia. Oltre agli antociani, la presente sostanza è uno dei principi bioattivi più conosciuti presenti nel vino. In questo gruppo sono incluse anche: *trans*-piceide, *cis*-piceide, *trans*-resveratrolo e *cis*-resveratrolo. Dopo la scoperta del resveratrolo, la sostanza è diventata oggetto di numerosi studi dietologici che hanno confermato le sue caratteristiche positive nell'alimentazione umana. Gli studiosi ipotizzano che il resveratrolo sia una delle sostanze che aiuta a diminuire il numero delle cardiopatie nelle persone che consumano regolarmente il vino con i principali pasti. Il contenuto del resveratrolo nel vino è determinato dalla

varietà, dal tipo di vinificazione, dall'origine geografica, dalla forma di allevamento e dai fattori ambientali. Vrhovšek (1998) ha confrontato la concentrazione del resveratrolo in diverse varietà e annate di vini rossi. I valori massimi di concentrazione media per tutte le quattro forme del resveratrolo sono state determinate nella varietà Modra frankinja (12,6 mg/L), seguita dal pinot nero (12,2 mg/l), Refosco (11,9 mg/l), Merlot (8,2 mg/l) e Cabernet sauvignon (5,5 mg/l). Il contenuto medio di tutte le quattro forme di resveratrolo, presenti nei vini Teran PTP e Terrano D.O.C dell'annata 2011, ammontava a 7,2 mg/l (mentre nell'annata 2006 era di 5,0 mg/l). I risultati risultano in accordo con i dati di altri studi svolti, dove i valori medi di resveratrolo in vini rossi si attestavano in un range dai 5 ai 7 mg/l (Mattivi 1993, Vrhovšek 1995).

Parametri principali del vino Teran PTP e Terrano D.O.C (annata 2011)

L'obiettivo della ricerca era stabilire il valore dei principali parametri chimici nei campioni di vino rosso, presenti sul Carso italo-sloveno e con denominazione Teran PTP e Terrano D.O.C. Con la determinazione è stato possibile confrontare le similitudini e le differenze tra i vini prodotti sul Carso da entrambi i lati del confine di stato. Siccome le analisi sono state eseguite presso l'Istituto agrario della Slovenia, abbiamo proceduto a verificare la conformità dei vini con il Disciplinare del vino Vino Terrano DTR con la Denominazione Tradizionale Riconosciuta. (Gazzetta ufficiale della Repubblica di Slovenia, numero 16/2008), il quale però ha valore unicamente sul territorio sloveno.

Tabella 4: I principali parametri chimici nei vini Terrano di 10 mesi; campioni raccolti presso i produttori dei consorzi nel Carso italiano e sloveno.

AT –acidità titolabile, SV – sostanze volatili, SO_2 l. – SO_2 liberi, SO_2 t. – SO_2 totali, AL – acido lattico, zuccheri r. - zuccheri riduttori

*Risultati fuori dal Disciplinare per la Denominazione Tradizionale Riconosciuta

**Risultati atipici

***Deviazione standard

N. /12	alcool (vol. %)	estratto (g/L)	AT (g/L tartarico)	SV (g/L acetico)	SO2 I. (mg/L)	SO2 t. (mg/L)	pH	densità	AL (g/L)	Zuccheri r (g/L)	cenere (g/L)
985	11,67	27,6	7,4	1,09	20	55	3,30	0,99528	1,5	1,9	2,28
986	12,21	27,8	7,2	0,53	14	48	3,34	0,99470	2,1	1,9	2,23
987	12,16	33,6	6,9	0,85	14	38	3,44	0,99701	2,0	3,9	2,50
988	11,76	33,5	7,0	0,81	14	41	3,44	0,99745	2,1	3,5	2,60
989	11,02	30,2	6,9	0,61	12	39	3,37	0,99701	2,5	2,8	2,14
990	11,63	34,8	8,3	0,7	13	42	3,17	0,99809	2,0	2,9	2,05
991	12,27	29,5	8,0	0,41	11	38	3,22	0,99540	1,9	1,2	2,28
992	12,10	30,0	7,5	0,51	13	39	3,27	0,99567	1,9	2,8	2,27
993	11,79	29,7	8,2	0,51	11	37	3,11	0,99538	1,9	2,1	1,83
994	12,44	33,0	7,4	0,41	17	45	3,30	0,99645	2,4	3,4	2,75
995	12,74	31,3	7,5	0,37	17	40	3,27	0,99575	2,3	2,3	2,81
996	12,51	30,8	7,2	0,75	12	41	3,42	0,99554	2,1	3,0	2,42
997	12,44	31,1	7,4	0,69	10	32	3,41	0,99571	2,1	1,5	2,74
998	12,39	30,5	7,4	0,67	11	45	3,41	0,99556	2,1	1,3	2,71
999	12,53	31,2	7,6	0,52	18	50	3,24	0,99564	2,0	2,4	2,45
1000	12,51	31,3	7,3	0,52	12	42	3,32	0,99572	1,4	2,3	2,42
1001	11,96	28,3	7,1	0,49	13	35	3,33	0,99520	2,5	1,9	2,48
1002	11,73	27,9	7,2	0,55	12	39	3,32	0,99530	2,7	1,9	2,68
1003	13,73*	30,6	7,5	0,53	15	40	3,35	0,99406	2,2	2,8	2,69
1004	12,62	29,0	7,8	0,61	12	36	3,29	0,99470	2,3	1,8	2,30
1005	12,05	31,7	7,7	0,97*	13	44	3,34	0,99641	2,5	2,6	2,61
1006	11,04	29,7	7,5	0,75	15	39	3,37	0,99681	2,6	1,9	2,41
1007	11,8	30,0	7,0	0,75	14	44	3,42	0,99603	2,7	2,9	2,41
1008	13,14*	43,5**	8,8	0,74	12	42	3,70	0,99972	2,1	3,6	4,44**
1009	13,81*	35,1	7,4	0,83	11	38	3,40	0,99567	2,1	3,4	2,48
1010	13,28*	30,5	7,3	0,65	12	44	3,42	0,99447	2,3	2,9	2,50
1011	15,26*	33,9	7,9	0,63	15	42	3,42	0,99363	2,9	3,1	2,65
1079	10,65	26,0	6,8	0,68	9	47	3,39	0,99583	2,6	1,7	2,14
1080	11,74	31,7	9,6	0,54	15	58	3,25	0,99677	0,5*	2,3	2,62
1081	12,41	27,6	8,7	0,61	13	37	3,22	0,99441	1,0	1,8	2,12
1082	13	28,0	7,6	0,45	12	53	3,34	0,99391	1,2	2,3	2,35
1083	12,68	26,0	6,5	0,23	11	33	3,43	0,99347	2,3	2,3	1,89*
1084	11,36	31,8	8,1	0,38	17	58	3,38	0,99724	1,9	2,9	2,57
1085	10,78	28,0	7,0	0,74	11	40	3,49	0,99645	2,3	2,3	2,25
1086	15,51*	33,9	5,4*	0,88	11	34	3,82	0,99339	2,0	4,3	2,71
1087	15,14*	40,9**	8,2	0,69	12	52	3,43	0,99647	0,3*	10,3*	2,53
1088	15,11*	41,5**	8,2	0,79	11	41	3,42	0,99681	0,3*	9,7*	2,53
1090	12,38	29,6	6,2	0,51	20	48	3,50	0,99521	1,8	2,8	2,33
Media	12,01	30,4	7,5	0,62	13	43	3,37	0,99575	2,1	2,5	2,44
SD***	0,60	2,4	0,7	0,17	3	6	0,13	0,00131	0,4	0,7	0,23



Considerando i valori medi dei campioni analizzati, la loro origine (il Carso sloveno o italiano) e il numero di picchi nei risultati, possiamo confermare la similitudine tra i vini da entrambi i lati del confine di stato, relativamente ai seguenti parametri chimici: estratto di materia secca, acidità titolabile, acidità volatile, solforosa libera e totale. Allo stesso tempo possiamo confermare le differenze tra i vini da entrambi i lati del confine di stati, relativamente ai seguenti parametri chimici: grado alcolico reale, acido lattico, zuccheri riduttori e pH. Grazie alla disposizione del sopra menzionato disciplinare, i vini sloveni presentano similitudini, relativamente ai principali parametri chimici.

Il Disciplinare sloveno sul vino Teran PTP con la Denominazione Tradizionale Riconosciuta determina tra l'altro:

un valore massimo del grado alcolico reale di 13,0 vol %, l'obbligo almeno di una parziale deacidificazione biologica e un valore minimo di acido lattico nel vino pari a 1,0 g/L, il valore massimo dei zuccheri riduttori è 4,0 g/L.

Di conseguenza possiamo trarre la conclusione che le maggiori differenze tra i vini da entrambi i lati del confine siano attribuibili alla limitazione presenti in Sloveni, relativa al contenuto alcolico e all'obbligo di una deacidificazione biologica quanto meno parziale. L'armonizzazione dei disciplinari, volta a unificare i vini del territorio carsico, dovrà tenere conto delle differenze presenti nelle tecnologie viti-vinicole, praticate da entrambi i lati del confine di stato.

Il confronto dei vini sloveni e italiani ha confermato la conformità di 25 campioni di vino con il Disciplinare sloveno sul vino Teran PTP con la Denominazione Tradizionale Riconosciuta. Nel caso dei restanti 13 campioni (8 sloveni e 5 italiani), ossia del 34 % dei campioni totali raccolti, non era possibile confermare la conformità con il disciplinare.

Discussione e risultati

L'obiettivo primario dello studio che continuerà anche negli anni futuri, è determinare il contenuto e il profilo dei polifenoli presenti nell'uva Terrano e nel vino Teran PTP e Terrano D.O.C di diverse annate, e coltivato in località diverse. Facendo così si potranno quantificare sia le caratteristiche varietali che le caratteristiche delle diverse località geografiche nel Carso italiano e sloveno. I dati

ottenuti con il presente studio contribuiranno a migliorare la qualità del vino Teran PTP e del Terrano D.O.C - due importanti prodotti tradizionali del Carso.

Nel presente studio dell'annata 2011 è stata inclusa l'uva della varietà Terrano, raccolta durante la vendemmia in 18 località diverse e ben 39 campioni di vino Teran PTP e Terrano D.O.C, prodotti nel Carso italiano e sloveno. I risultati così ottenuti dimostrano che il contenuto dei flavonoidi estraibili presenti nell'uva, è influenzato sia dalla varietà che dalla posizione geografica. Il valore medio di polifenoli totali è risultato superiore nell'annata 2011 in confronto ad altre annate della stessa varietà. Da ciò è possibile dedurre che l'annata 2011 era estremamente favorevole per la maturazione dell'uva Terrano sul Carso. Come già dimostrato in precedenza, l'uva Terrano del Carso vanta un contenuto di coloranti rossi (antociani) superiore alla media, il che conferisce il tipico colore rosso-viola intenso al vino, apportando al contempo un notevole contributo al suo valore alimentare. In media la varietà Terrano non risulta così ricca in tannini come ad esempio il Cabernet sauvignon, il Merlot e la varietà Modra frankinja. Utilizzando una macerazione prolungata della vinaccia, invece, è possibile sfruttare al massimo l'apporto dei tannini dai vinaccioli delle bacche d'uva. Nel caso di una maturazione insufficiente dell'uva i tannini presenti nei vinaccioli risultano però di scarsa qualità sensoriale. Da ciò deriva l'importanza della giusta maturità dell'uva al tempo della vendemmia.

Confrontando i parametri chimici primari nei vini da entrambi i lati del confine è stata confermata la conformità di 25 campioni, ossia del 66 % dei campioni di vino, con il Disciplinare sloveno dei vini con la Denominazione Tradizionale Riconosciuta PTP Teran, anche se la validità del disciplinare non si estende oltre il confine sul territorio italiano. Nei caso dei restanti 13 campioni (8 sloveni e 5 italiani), ossia del 34 % dei campioni totali raccolti, non era possibile confermare la conformità con il disciplinare.

Ringraziamenti

Le attività del progetto AGROTUR / agroturistica carsica sono state finanziate nell'ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013, dal Fondo europeo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali. Gli autori ringraziano le collaboratrici del Laboratorio enologico presso l'Istituto agrario della

Slovenia KIS (Iva Kmetič Ceglar, Nada Bizjak e Bernarda Žitko) e i viticoltori dei due consorzi “Združenje Konzorcij kraških pridelovalcev Terana” e il Consorzio Tutela Vini Collio e Carso che hanno contribuito gentilmente i campioni d’analisi.

Bibliografia

Di Stefano, R., Cravero, M.C., Gentilini, N. 1989. Methods for the study of wine polyphenols. *L’Enotecnico*, 5: 83-89.

Gazzeta Ufficiale n. 239 del 13. ottobre 2011, decreto 20. settembre 2011.

Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation. Partie I. Connaiss. Vigne Vin, 18, 195–217.

Mattivi, F. 1993. Il contenuto di resveratrolo nei vini rossi e rosati trentini del commercio. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 37-45.

Mattivi, F., Monetti, A., Nicolini, G. 1995. Composizione fenolica e caratterizzazione di vini rossi monovarietali. *L’Enotecnico*, 6: 69-79.

Mattivi, F., Nicolini, G. 1997. Analysis of polyphenols and resveratrol in Italian wines. *BioFactors*, 6: 445-48.

Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., Valenti, L. 2002. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 957: 37-56.

Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran, Uradni list št. 16, 15. 2. 2008.

Pajović, R., Raičević, N., Popović, T., Lisjak, K., Vanzo, A. 2012. Polyphenol potential of red grapes and wines from Montenegro. V: Čuš, F. (ur.), Marinček, L. (ur.). *Vinarski dan 2012*, Ljubljana, 28. november 2012. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije: inviato.

Passamonti, S., Vrhovšek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. 2005. Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7029-7034.

Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G. 2000. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1996-2002.

Vanzo, A. Vrhovšek, U. 2005. Antocianini - bioaktivne spojine vina = anthocyanins - bioactive compounds in wine. *Slovenski kemijski dnevi*, Maribor, 22. in 23. September, Glavič, P. in Brodnjak-Vončina, D. (ur.), FKKT, Maribor: str. 8.

Vanzo, A., Terdoslavich, M., Brandoni, A., Torres, A.M., Vrhovšek, U., Passamonti, S. 2008. Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 10, 1106-1116.

Vrhovšek, U., Eder, R., Wendelin, S. 1995. The occurrence of *trans*-resveratrol in Slovenian red and white wines. *Acta Alimentaria*, 24, 203-212.

Vrhovšek, U. 1998. Resveratrol in Slovenian wines. *Sodobno kmetijstvo*, 31, 10: 437-440.

Trasporto di flavonoidi quale indicatore di maturazione nell'uva Refošk

1, 2, 3, 4, 5, 10 Università di Udine, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Sezione di Biologia vegetale

6 Centro trasfusionale della Slovenia

7 Università di Nova Gorica, Centro di ricerca sul Vino

8,9 Istituto Kmetijski della Slovenia, Laboratorio di Enologia

Bertolini (1) dr., Via delle Scienze N.206, 33100 Udine

Petrussa (2) dr., ibid

Braidot (3) prof., ibid

Peresson (4) dr., ibid

Zancani (5) prof., ibid

Rajčević (6) doc. dr., Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Sivilotti (7) dr., Vipavska c. 13, 5270 Ajdovščina

Vanzo (8), doc. dr., Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

Lisjak (9) dr., ibid

Vianello (10) prof., Via delle Scienze N.206, 33100 Udine

Alberto Bertolini¹, Elisa PETRUSSA², Enrico BRAIDOT³, Carlo Peresson⁴, Marco Zancani⁵, Uros Rajčević⁶, Paolo SIVILOTTI⁷, Andreja VANZO⁸, Klemen LISJAK⁹, Angelo VIANELLO¹⁰

Sommario

Questa ricerca è stata condotta al fine di studiare l'effetto del diradamento dei grappoli all'invaiaatura (CT) e della defogliazione in pre-fioritura (PFLR) su alcuni parametri inerenti la maturazione e la qualità di uve Refošk. In particolare, il contenuto di sostanze fenoliche è stato correlato con l'andamento dell'espressione di una proteina trasportatrice di flavonoidi presente nella buccia della bacca. Tale proteina è riconosciuta da un anticorpo prodotto contro una sequenza della bilitranslocasi di mammifero, un enzima coinvolto nel trasporto di sostanze fenoliche assunte con la dieta.

Questo anticorpo ha consentito di evidenziare, tramite test ELISA, la presenza del trasportatore in bacche di uva Refošk a diversi stadi di maturazione. L'espressione del traslocatore bilitranslocasi-simile incrementava all'invaiaatura e all'inizio della maturazione nei campioni CT rispetto al controllo, mentre la tesi PFLR ha mostrato un andamento opposto. Tuttavia, alla raccolta, le bacche del controllo presentavano una concentrazione dell'enzima significativamente maggiore rispetto alle tesi a confronto.

Questi risultati non sembravano strettamente correlati con il contenuto di antociani totali della bacca, in quanto i pigmenti totali aumentavano maggiormente nelle tesi CT e PFLR rispetto al controllo, a seguito di un favorevole spostamento del bilancio tra superficie fotosintetica e organi riproduttivi indotto da tali pratiche viticole. Similmente, anche il potenziale fenolico valutato allo stadio di raccolta mostrava un incremento positivo degli indici analizzati nella tesi PFLR e, in parte, in quella CT. In conclusione, sebbene le pratiche viticole in grado di aumentare il rapporto "source/sink" nel grappolo comportino una ridotta espressione del

traslocatore bilitranslocasi-simile, il livello di quest'ultimo e quello di altre proteine di trasporto sarebbero sufficienti a garantire un'adeguata traslocazione dei metaboliti secondari.

Parole chiave: Refošk, diradamento dei grappoli, defogliazione precoce, trasporto di flavonoidi, polifenoli, bilitranslocasi-simile, maturazione

Flavonoid transport as a marker in Refosk grape maturation

Abstract

This research was performed with the aim of studying the influence of cluster thinning at véraison (CT) and pre-flowering leaf removal (PFLR) on some maturation and quality parameters of grape Refošk.

Polyphenol content was related to the pattern of a flavonoid transporter present in the skin. This protein cross-reacted with an antibody raised against a sequence of the mammalian bilitranslocase, an enzyme involved in dietary polyphenol assumption.

This antibody was used in ELISA test to probe the presence of the transporter in ripening Refošk grape berry. The bilitranslocase-like translocator expression was increased at the véraison and the onset of maturation by CT treatment, when compared to untreated grapevines, while PFLR showed the opposite trend. Nevertheless, at harvest, untreated samples showed an increment of protein concentration, which was significantly higher than in the other treatments.

These results seem not strictly related with the total anthocyan content in grape berry, since total pigments increased more in CT and PFRL rather than in control samples, due to a favourable shift in photosynthetic area and reproductive organ balance induced by these agronomic practices. Similarly, also the phenolic potential, specifically evaluated at the harvest stage, showed a positive increase of all the parameters examined in the PFLR samples and of some of them in the CT ones. In conclusion, although the viticultural practices able to increase source/sink ratio in the cluster lead to a reduced expression of bilitranslocase-like translocator, its level and the one of other transporter proteins would be adequate enough to accomplish secondary metabolite translocation.

Keywords: Refošk, cluster thinning, early leaf removal, flavonoid transport, polyphenols, bilitranslocase-like, maturation

Introduzione

Durante la maturazione, nelle cultivar di vite a bacca nera, la buccia inizia progressivamente a pigmentarsi a seguito della biosintesi ed accumulo di sostanze fenoliche, quali i flavonoidi (Famiani et al., 2000). Quest'ultimi (antociani, flavonoli, catechine e proantocianidine) svolgono ruoli essenziali nell'uva, dove sono coinvolti in numerosi processi fisiologici.

I flavonoidi rappresentano, inoltre, un parametro qualitativo delle uve, in quanto influenzano il profilo organolettico del vino, contribuendo sia alle proprietà aromatiche e di colore, sia alle potenzialità nutraceutiche. La crescente attenzione verso una maggior qualità dei vini richiede, quindi, non solo di attuare tecniche colturali nel vigneto che permettano di migliorare il potenziale fenolico delle uve, ma anche di acquisire una più approfondita conoscenza sulla maturazione fenolica della bacca. In tale contesto, risulta cruciale lo studio dei meccanismi di trasporto cellulare dei flavonoidi, i quali dopo la sintesi subiscono un'ulteriore traslocazione in diversi siti di accumulo nella bacca.

Recentemente, una proteina vegetale, simile alla bilitranslocasi di mammifero, coinvolta nel trasporto di antocianine e flavonoidi è stata evidenziata in bucce e polpa di bacche d'uva Merlot e Friulano, quale ulteriore trasportatore tra quelli ipotizzati (Braidot et al., 2008; Bertolini et al., 2009). Tale proteina è espressa in maniera crescente nel corso della maturazione fenologica della bacca, nonché risulta indotta da condizioni ambientali di carenza idrica.

Al fine di studiare il ruolo di questa proteina nella maturazione fenolica della bacca, si è scelto di analizzare il trasportatore mediante un test immunochimico in estratti proteici da buccia di uva Refošk. L'andamento della concentrazione proteica è stato successivamente correlato alla concentrazione dei principali componenti fenolici. In aggiunta, tale analisi è stata effettuata in bacche ottenute da uve di piante sottoposte a pratiche agronomiche in grado di influenzare l'epoca di maturazione, quali la defogliazione precoce e il diradamento dei grappoli sul tralcio.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

L'analisi dell'espressione del trasportatore in bacche d'uva è stata condotta su uva dell'annata 2012, proveniente da un vigneto di viti cv Refošk, presso l'azienda Lisjak in Dutovlje, Slovenia. Le piante erano allevate a Guyot monolaterale, con tre tesi a confronto: non defogliate (UN, untreated); defogliazione precoce 10 giorni prima della fioritura (4-5 foglie/germoglio; 25.5.2012) (PFLR, Pre-Flowering Leaf Removal); diradamento dei grappoli all'invasatura (1 grappolo/germoglio; 2.8.2012) (CT, Cluster Thinning). È stato impostato uno schema sperimentale completamente randomizzato con 4 repliche per ogni trattamento.

Un campione rappresentativo di 5-6 grappoli è stato raccolto in ogni data di campionamento e su ognuna delle parcelle. Le bacche sono state separate dai raspi e poste in freezer a -80°C per eventuali analisi strumentali.

Determinazione degli antociani totali

Un campione di 200 bacche per ogni trattamento è stato raccolto in quattro date di campionamento e frullato al fine di ottenere una poltiglia. La determinazione della maturità fenolica delle bacche, secondo il metodo proposto da Glories (1978), prevede che due aliquote di 25 g vengano pesate e poste in estrazione aggiungendo in un caso 25 mL di una soluzione a pH 1 (0.1 N HCl in acqua distillata) e nell'altro 25 mL di una soluzione a pH 3.2 (5 g acido tartarico e 22 mL di NaOH in 1 L di acqua distillata). Dopo un periodo di estrazione di 4 ore, i campioni sono stati filtrati e preparati per la determinazione spettrofotometrica del contenuto di antociani totali.

Determinazione di antocianine totali e proantocianidine
È stato scelto di utilizzare un metodo di estrazione dei polifenoli totali che simulasse il processo di vinificazione (Mattivi et al. 2002). Le bucce provenienti da un campione di 200 bacche per ogni trattamento sono state estratte per 5 giorni a 30°C con una soluzione idroalcolica (12:88 v/v) contenente 100 mg/l SO₂ e 5 g/L di acido tartarico (pH 3.2). Gli estratti sono stati quindi analizzati allo spettrofotometro come indice di vanillina (proantocianidine a basso p.m.), Bate-Smith (proantocianidine ad alto p.m.), nonché di antocianine totali e riferiti al peso fresco delle bacche (mg/Kg), secondo il metodo di Rigo et al. (2000).

Estrazione delle proteine totali da buccia d'uva

Per l'estrazione delle proteine totali da buccia, sono stati scelti 5-6 grappoli da tre repliche biologiche randomizzate per ciascun trattamento per tre date di campionamento: invaiatura (véraison) (circa il 50 % bacche invaiate, 14 agosto 2012); maturazione precoce (7 settembre 2012); piena maturazione (28 settembre 2012). Da un campione di 20 bacche è stata separata la buccia e ne è stata estratta la proteina totale secondo i metodi modificati di Conlon & Salter (2007) e Song et al. (2006), mediante tampone alcalino caldo e successiva precipitazione in acetone acidificato.

Analisi immunochimica del trasportatore di flavonoidi

Per il test immunochimico, mediante saggio ELISA, sono stati saggiati 5 µg totali di proteina in micropiastra, incubati con un anticorpo primario (clone IgM 11C9), prodotto contro il peptide EFTYQLTSSPTC, corrispondente alla sequenza 235-246 della bilitranslocasi di mammifero (Passamonti et al., 2005). La reazione immunochimica è stata misurata mediante saggio colorimetrico della fosfatasi alcalina.

Analisi statistica

Sui dati del test ELISA è stata eseguita l'analisi della varianza (software STATISTICA, versione 8). Le medie sono state confrontate mediante test di Fisher LSD, con significatività di $p \leq 0.05$.

Risultati

In uva Refošk la concentrazione del trasportatore di flavonoidi bilitranslocasi-simile aumentava nella buccia durante la maturazione, mostrando un incremento progressivo in tutti i trattamenti considerati (Fig.1). Dai risultati del test ANOVA, mostrati in tabella 1, infatti, la data di campionamento era un fattore di variabilità statisticamente significativo tra le diverse tesi ($p < 0.001$). Questo risultato conferma che tale proteina è specificatamente correlata con il processo di maturazione della bacca d'uva, come già dimostrato anche in altre cultivar di vite (Braidot et al., 2008; Bertolini et al., 2009).

Tabella 1 – Test ANOVA degli effetti dei fattori data di campionamento (D) e trattamento agronomico (T) sull'espressione del traslocatore bilitranslocasi-simile in buccia di uva Refošk

La tipologia di trattamento e l'interazione dei fattori data di campionamento x trattamento agronomico influenzavano l'espressione proteica ($p < 0.001$). In particolare, l'espressione del trasportatore era aumentata significativamente solamente allo stadio dell'invasitura nei campioni CT, rispetto alle tesi UN e PFLR, mentre negli stadi successivi risultava non significativamente differente dal controllo. Viceversa, il trattamento PFLR causava una significativa riduzione nella quantità espressa della proteina in quasi tutti gli stadi di maturazione analizzati rispetto alle viti non defogliate o diradate.

Al fine di comprendere il ruolo fisiologico del trasportatore bilitranslocasi-simile durante la maturazione fenolica dell'uva "Refošk", sono stati saggiati i contenuti totali di antociani e polifenoli nelle bacche provenienti da viti sottoposte ai tre diversi trattamenti. Questi parametri sono stati scelti in alternativa a quelli tecnologici di maturazione, in quanto indici più specifici della composizione qualitativa della bacca.

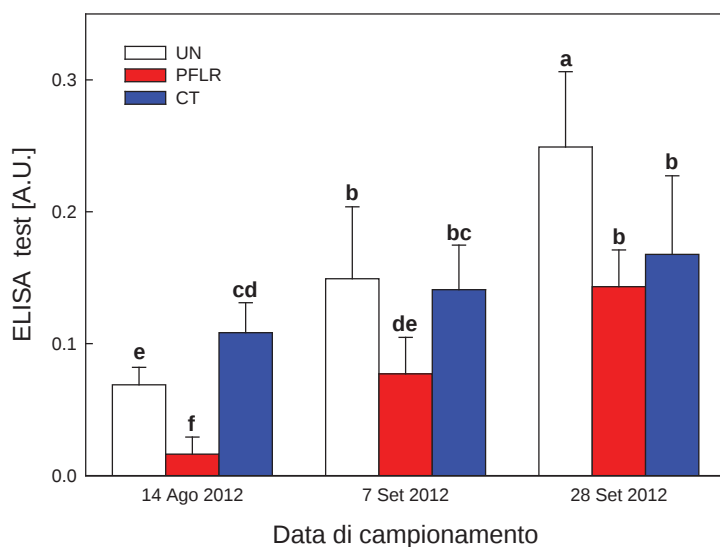


Figura 1 : Andamento dell'espressione proteica del trasportatore di flavonoidi in buccia di bacca da viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT) durante la stagione 2012. Lettere diverse indicano differenze significative ad un livello di confidenza del 95 %.

Il contenuto di antociani totali della bacca Refošk, valutato secondo il metodo Glories (1978), aumentava nelle tesi CT e PFLR rispetto al controllo, a partire dall'invasatura e in tutti gli stadi considerati. Questo risultato confermava l'anticipo di maturazione della bacca, indotto da questi trattamenti agronomici, sia a livello di indici tecnologici (Sivilotti et al., 2012, Fig. 1), sia per quanto riguarda il potenziale antocianico estraibile e l'indice dei polifenoli totali (Sivilotti et al., 2012, Fig. 2). Questo effetto era atteso, in quanto l'impatto di un più favorevole rapporto "source/sink" indotto da tali pratiche viticole può influenzare favorevolmente il metabolismo e l'accumulo di antociani alla vendemmia, migliorando la qualità del vino in produzione.

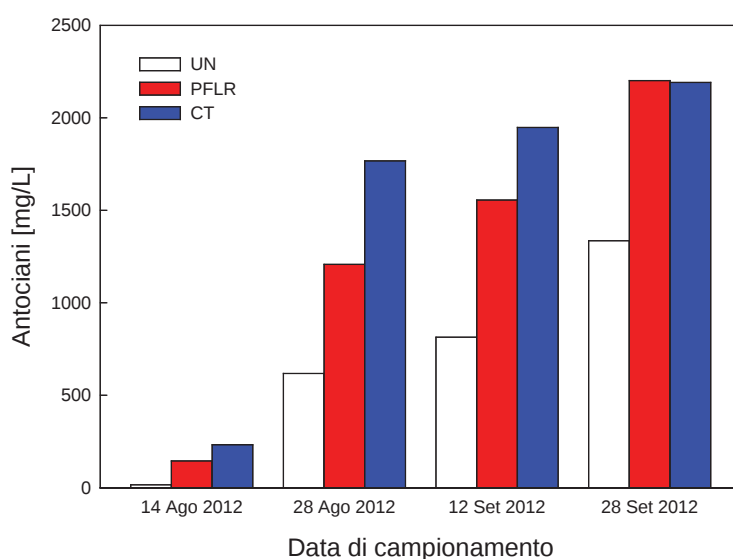
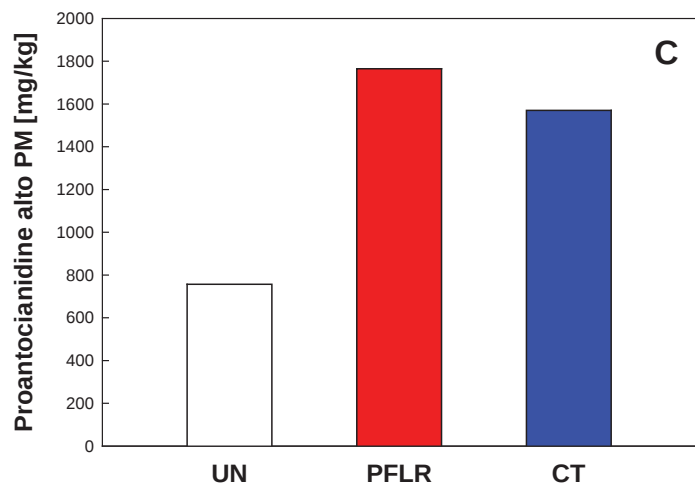
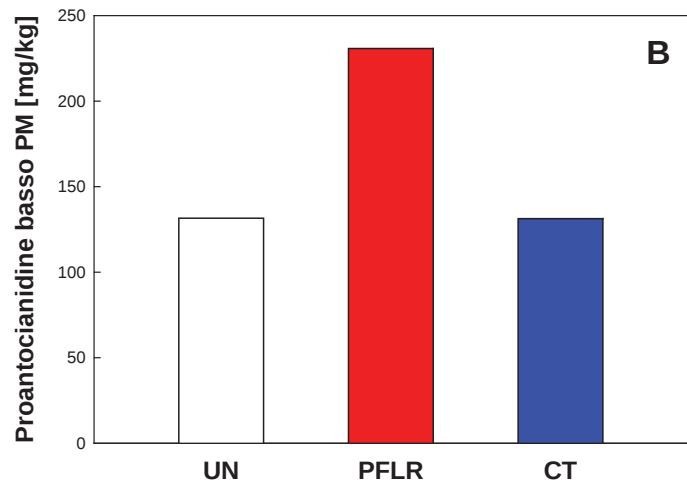
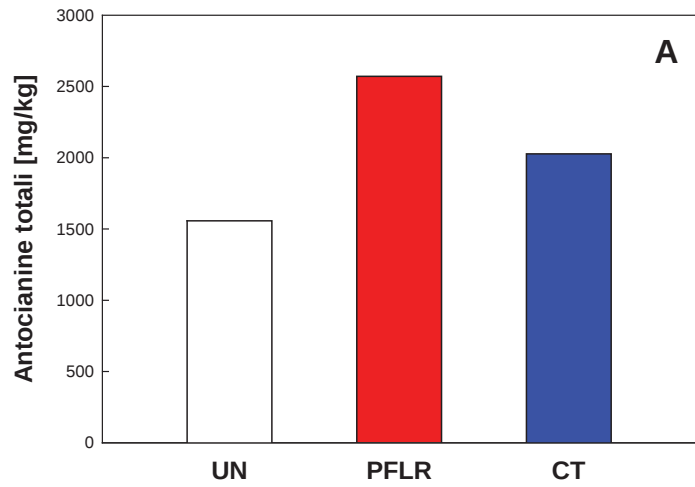


Figura 2 : Andamento del contenuto di antociani totali estratti da bacche di viti non defogliate (UN), defogliate in pre-floritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT) durante la stagione 2012.

Anche per quanto concerne il potenziale polifenolico delle bucce d'uva alla raccolta, alcuni parametri analizzati, quali antocianine totali e tannini ad alto peso molecolare, aumentavano nelle bacche da piante CT e PFLR rispetto a quelle UN (Fig. 3A, 3C), mentre la componente tannica a basso peso molecolare risultava superiore in quelle PFLR (Fig. 3B). Le differenze riscontrate in alcuni dei parametri analizzati per descrivere la componente fenolica delle bacche possono essere attribuite al diverso procedimento di estrazione utilizzato nelle due tipologie di analisi.



Trattamenti

In base a questi risultati è possibile suggerire alcune considerazioni finali. In particolare, il contenuto di polifenoli e antociani nella bacca a maturità non sembra essere strettamente correlato con l'espressione del trasportatore bilitranslocasi-simile, in quanto i pigmenti e i tannini aumentavano maggiormente nelle tesi CT e PFRL rispetto alle piante non defogliate, dove invece si osservava una maggiore presenza di tale proteina. Tuttavia, la sua espressione era sicuramente aumentata nel corso della maturazione in tutte le tesi, suggerendo un ruolo importante per il trasportatore bilitranslocasi-simile durante le fasi di maturazione della bacca. È comunque possibile che l'espressione di altre proteine coinvolte nel trasporto secondario dei flavonoidi sia positivamente influenzato dalle pratiche viticole che aumentano il rapporto "source/sink" nel grappolo.

Figura 3 : Antocianine (A), proantocianidine a basso peso molecolare (B), proantocianidine ad alto peso molecolare (C) in buccia di bacche da viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT) allo stadio di piena maturazione (28/9). I dati sono espressi come mg/kg di peso fresco delle bacche.

Conclusioni

Questi risultati confermano, in accordo con precedenti dati di letteratura (Pastore et al., 2011), che le pratiche viticole atte ad incrementare il rapporto source/sink presentano un impatto positivo sulla composizione fenolica della bacca, comportando un anticipo di maturazione ed un miglioramento della qualità.

Tuttavia, tali pratiche non aumentavano l'espressione del trasportatore bilitranslocasi-simile nella buccia d'uva, nonostante il livello di espressione fosse correlato allo stadio di maturazione in tutte le tesi considerate. Questo risultato suggerisce che la regolazione dell'espressione di tale trasportatore sia indipendente da quella della biosintesi delle sostanze polifenoliche. Non si può invece escludere che altre proteine candidate al trasporto siano, invece, differentemente modulate durante la maturazione della bacca o influenzate dai trattamenti viticoli studiati, come evidenziato recentemente (Pastore et al., 2011).

In conclusione, queste osservazioni preliminari potranno fornire un contributo alla conoscenza fisiologica della maturazione fenolica in uva Refošk e costituire un utile

punto di partenza per indirizzare le future sperimentazioni volte a migliorare la valutazione qualitativa delle bacche in maturazione.

Ringraziamenti

Si ringraziano i progetti europei di Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013 TRANS2CARE (Rete Transregionale per l'Innovazione ed il Trasferimento Tecnologico per il Miglioramento della Sanità – progetto finanziato nell'ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013) e AGROTUR (agroturistica carsica – progetto finanziato nell'ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013, dal Fondo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali).

Bibliografia

- Bertolini A., Peresson C., Petrusa E., Braidot E., Passamonti S., Macrí F., Vianello A. 2009. Identification and localization of the bilitranslocase homologue in white grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3861-3871
- Braidot E., Petrusa E., Bertolini A., Peresson C., Ermacora P., Loi N., Terdoslavich M., Passamonti S., Macrí F., Vianello A. 2008. Evidence for a putative flavonoid translocator similar to mammalian bilitranslocase in grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Planta*, 228: 203-213
- Conlon H.E., Salter M.G. 2007. Plant protein extraction. *Methods in Molecular Biology*, 362: 379-383
- Famiani F., Walker R.P., Tecs L., Chen Z.H., Proietti P., Leegood R.C. 2000. An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany*, 51: 675-683
- Glories Y. 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. 195 pp. Thèse Doctorat d'Etat, Université Bordeaux II
- Mattivi F., Zulian C., Nicolini G., Valenti L. 2002. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957: 37-56
- Passamonti S., Cocolo A., Braidot E., Petrusa E., Peresson C., Medic N., Macrí F., Vianello A. 2005. Characterization of electrogenic bromosulphophthalein transport in carnation petal microsomes and its inhibition by antibodies against bilitranslocase. *Febs Journal*, 272: 3282-3296
- Pastore C., Zenoni S., Tornielli G.B., Allegro G., Dal Santo S., Valentini G., Intrieri C., Pezzotti M., Filippetti I. 2011. Increasing the source/sink ratio in *Vitis vinifera* (cv Sangiovese) induces extensive transcriptome reprogramming and modifies berry ripening. *BMC Genomics*, 12: 631-654

Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rosetto M., Scarpa M., Vrhovsek U., Mattivi F. 2000. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1996-2002

Sivilotti P., Butinar L., Jež A., Tronkar J., Turk M., Vanzo A., Lisjak K. 2012. Effetto della gestione della chioma sulla produzione e sulla qualità delle uve terrano. In *Vinarski dan 2012*. D. Bavčar et al. (Eds.). Ljubljana, Slovenia

Song J., Braun G., Bevis E., Doncaster K. 2006. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis*, 27: 3144-3151





Sostanze che non vogliamo nel vino

1, 2, 3, 4, 5 Kmetijski
inštitut Slovenije

6,7,8,9,10 Univerza v
Novi Gorici

1 PhD, Hacquetova ulica
17, 1000 Ljubljana

2 MSc, ibid

3 PhD, ibid

4 PhD, ibid

5 PhD, ibid

6 PhD, Vipavska 13,
5000 Nova Gorica

7 ibid

8 PhD, ibid

9 PhD, professore
associato, Vipavska 13,
5000 Nova Gorica

10prof.PhD, idib

Helena BAŠA ČESNIK¹, Vida ŽNIDARŠIČ-PONGRAC²,
Špela VELIKONJA BOLTA³, Franc ČUŠ⁴, Lorena
BUTINAR⁶, Andreja RAKAR⁷, Romina ŽABAR⁸, Polonca
TREBŠE⁹, Mladen FRANKO¹⁰, Klemen LISJAK⁵

Riassunto

La coltivazione della vite richiede una adeguata protezione del vigneto che si ottiene con l'utilizzo di fungicidi e altri pesticidi, che proteggono la pianta e l'uva stessa. La produzione integrata utilizza una serie di prodotti fitosanitari autorizzati (PPP), mentre nella coltivazione biologica dell'uva è concesso unicamente l'utilizzo del rame e dello zolfo. I residui dei prodotti fitosanitari possono accumularsi nell'uva e passare in parte anche nel vino. Inoltre, nella fermentazione malolattica si producono le ammine biogene, generate per opera dei batteri lattici che utilizzano come precursori gli aminoacidi. I lieviti del genere *Brettanomyces/Dekkera* possono formare dei fenoli volatili responsabili di sentori olfattivi riconducibili al sudore del cavallo o ai medicinali. Nel presente articolo vengono esposti i risultati ottenuti tramite il monitoraggio delle sostanze indesiderate nelle uve Terrano D.O.C. e Teran PTP raccolte nel territorio del Carso. Il campionamento è stata eseguito sia nei vigneti che applicano la produzione integrata che in quelli biologici. Per quanti riguarda l'uva e il vino abbiamo monitorato il livello dei residui da prodotti fitosanitari, mentre nel vino è stato monitorato anche il contenuto di metalli, di ammine biogene e di fenoli volatili. Per l'analisi dei residui fitosanitari (PPP) è stato utilizzato un metodo gascromatografico, accoppiato alla spettrometria di massa (GC/MS) e un metodo di cromatografia liquida accoppiato alla spettrometria di massa (LC/MS/MS). I metalli presenti nel vino sono stati analizzati tramite spettrometria di assorbimento atomico a fiamma (FAAS) e spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite (GFAAS). Le ammine biogene sono state analizzate con la cromatografia liquida HPLC utilizzando un rilevatore a fluorescenza (FLD), preceduta da derivatizzazione con aldeide o-ftalica. L'analisi dei fenoli volatili è stata condotta con il metodo GC/MS, mediante una previa estrazione in solvente organico. In nessuno dei campioni raccolti i residui dei PPP presenti nell'uva hanno oltrepassato la soglia massima consentita



(maximum residue level = MRL). Nell'uva e nel vino sono stati determinati unicamente i residui delle sostanze attive, il cui utilizzo è stato consentito nella coltivazione integrata dell'uva nel 2011. La concentrazione dei metalli ha mostrato valori nel vino sotto la soglia massima consentita, con l'eccezione del rame presente in due campioni e probabilmente da mettere in relazione all'uso eccessivo del solfato di rame nella correzione del vino (H_2S). In tutti i campioni i fenoli volatili, in particolare il 4-etil-fenolo responsabile di sentori sgradevoli riconducibili al sudore di cavallo, sono rimasti sotto la soglia olfattiva. I Terrani dell'annata 2011 non hanno superato i limiti delle sostanze che non vogliamo nel vino perché nocive per la salute, e quindi questi vini possono essere considerati sicuri per il consumatore..

Parole chiave: vino, residui di prodotti fitosanitari, metalli, ammine biogene, fenoli volatili

Unwanted compounds in wines

Abstract

Grape production requires adequate protection of vine with substances that prevent the growth of mold and other vine and grape 'diseases'. In integrated production a number of permitted plant protection products (PPPs) are used, while in the organic production of grapes only use of copper and sulphur is permitted. PPP residues can remain on grapes and they can partly pass into the wine. It is also possible that in lactic acid fermentation, biogenic amines are formed by lactic acid unwanted bacteria from amino acid precursors. Yeasts of the genus *Brettanomyces/Dekkera* can form volatile phenols, which have been associated with the smell of horse sweat or medicines. This paper presents the results of monitoring of undesirable compounds in the production of the Karst Teran wine. Sampling was performed in vineyards included in integrated pest management and organic production. In grapes and wine, plant protection product (PPP) residues were monitored. In wine, metals, biogenic amines and volatile phenols were monitored as well. For the analysis of PPP residues multiresidual GC/MS and multiresidual LC/MS/MS method was used. For the analysis of metals flame and electrothermal atomic absorption spectrometry (FAAS, GFAAS) were used. For the analysis of biogenic amines we used HPLC/FLD method with pre-derivatization with ortho phtalaldehyde. For the

analysis of volatile phenols GC/MS method was used with previous extraction with organic solvent. PPP residues in grapes did not exceed maximum residue levels (MRLs). In grapes and wine only active substances allowed in integrated pest management of grapes in 2011 were determined. The concentrations of metals analyzed in wines were all below the prescribed maximum values with the exception of two samples in which exceeded concentrations of copper were found. These were probably due to treatment of wine with copper sulphate for the elimination of noxious sulphur derivatives. Volatile phenols, mainly 4-ethyl phenol in any of these samples did not exceed the threshold of sensory perception, which gives the wine unpleasant aroma of the horse sweat. Teran wines, vintage 2011 do not have exceedances of compounds, we do not want or are harmful to human health, and therefore represent a safe product for the consumer.

Keywords: wine, permitted plant protection residues, metals, biogenic amines, volatile phenols

Introduzione

Le sostanze che non vogliamo nel vino possono originarsi sia per effetto di talune tecniche agronomiche che della lavorazione dell'uva. I trattamenti in vigneto sono essenziali al fine di ottenere un'uva sana e di qualità. La presenza di residui di prodotti fitosanitari (PPP) nell'uva e poi, anche nel vino, sono direttamente correlate a una serie di fattori, tra cui l'insorgenza di patologie fungine più o meno devastanti a seconda della regione viticola, il regime di coltivazione viticola (convenzionale, integrato, biologico), la concentrazione dei pesticidi nelle soluzioni irrorate, il tempo trascorso dall'ultima irrorazione con pesticidi e dalle condizioni climatiche (in particolare modo le radiazioni solari e il livello delle precipitazioni). Le disposizioni relative ai valori consentiti delle sostanze attive presenti nell'uva (MRL), oggetto delle nostre misurazioni, sono pubblicate nei Regolamenti comunitari (UE) numero 839/2008, 149/2008, 822/2009, 1050/2009, 1097/2009, 459/2010, 750/2010, 765/2010, 893/2010, 893/2010, 508/2011, 520/2011, 524/2011, 812/2011, 813/2011, 978/2011 e 310/2011. La regolamentazione vigente non prevede la presenza delle sostanze attive (MRL) nel vino.

Un aumento della presenza di metalli nel vino può essere dovuta ad alcune pratiche viticole (utilizzo di fertilizzanti, prodotti fitosanitari a base di metalli, in particolare a base

di rame), oppure può essere la diretta conseguenza della tecnica di vinificazione (fermentazione prolungata del mosto e/o macerazione delle uve in vinificatori metallici), come può benissimo attribuirsi all'esecuzione di trattamenti di stabilizzazione del vino necessari per prevenire l'insorgere della torbidità (utilizzo di prodotti enologici). Il contenuto massimo di metalli nel vino è prescritto nell'Allegato C (Pubblicazione dell'Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino Zbornik OIV).

Tra le sostanze non desiderate nel vino figurano non solo le sostanze inorganiche, ma anche altri composti nocivi alla salute se presenti in concentrazioni elevate. Anche lo sviluppo di micro-organismi indesiderati può portare alla formazione di vari composti organici che producono degli effetti negativi sulle proprietà sensoriali e salutistiche del vino. Fino ad oggi sono stati isolati dal mosto e dal vino ben 25 tipi diversi di batteri lattici (LB) dei seguenti ceppi *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. In seguito alla fermentazione malo-lattica, l'acido malico si trasforma in acido lattico per opera di questi microrganismi. Principalmente la fermentazione malo-lattica (FML) porta alla deacidificazione, oltre che al cambiamento del pH, dell'aroma e del colore del vino, nonché alla sua stabilizzazione microbiologica. Nonostante gli effetti positivi che alcune varietà di batteri lattici hanno sulla qualità del vino, alcune di queste rappresentano le ragioni principali per la manifestazione di talune malattie del vino. Anche le ammine biogene si formano durante il processo di vinificazione principalmente ad opera di alcune varietà di batteri lattici (Konig e Frohlich, 2009; Petri et al., 2013). Le ammine biogene più frequenti nel vino sono: istamina, tiramina e putrescina. Solitamente la loro concentrazione aumenta durante la fermentazione malo-lattica spontanea FML e durante la maturazione, se non viene aggiunta la SO_2 . La formazione e la decomposizione di altre ammine, come ad esempio la metilamina, l'etilamina, la feniletilamina, l'isoamilamina e la cadaverina, che possono essere già presenti nel mosto, può avvenire durante la vinificazione (Lonvaud-Funel, 2001).

I lieviti del genere *Brettanomyces*/*Dekkera* possono provocare, in condizioni anaerobiche grazie agli enzimi cipionato-decarbossilasi e vinil-fenolo reductasi, un aumento del contenuto di fenoli volatili che conferiscono al vino sentori sgradevoli: 4-vinil-fenolo (medicinali), 4-vinil-guaiacolo (spezie, fumo), 4-etil-fenolo (sudore di cavallo e stalla)

e 4-etil-guaiacolo (chiodi di garofano). Questo tipo di sentori possono risultare sgradevoli e inammissibili per il consumatore. La soglia di preferenza nei vini rossi che copre il restante aroma è di 420 µg/l per la miscela di etil-fenolo e etil-guaiacolo nel rapporto di 10:1 (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Il monitoraggio dei residui dei prodotti PPP nell'uva e nel vino è stato svolto con l'obiettivo non solo di determinare il contenuto delle sostanze indesiderate nei vini Terrano dell'annata 2011, ma anche per determinare il contenuto di metalli, ammine biogene e fenoli volatili nei vini Terrano PTP e nel vino Terrano D.O.C., prodotti nel Carso italiano e sloveno.

Materiali e metodi

Campionatura

I campioni d'uva sono stati raccolti sul Carso, più precisamente in vigneti dove vengono normalmente applicate le regole della produzione integrata. Nell'autunno del 2011 abbiamo raccolto alla vendemmia 18 campioni di uva nel territorio del Carso transfrontaliero, mentre nell'estate del 2012 sono stati raccolti ben 39 campioni di vino Teran PTP e Terrano D.O.C. dell'annata 2011. I campioni di vino sono stati raccolti sia da cisterne in inox che da botti di legno.

Metodi analitici

L'Istituto agrario della Slovenia ha utilizzato per le analisi dei residui di prodotti fitosanitari PPP nei campioni i seguenti metodi analitici: la gascromatografia, accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS) (Baša Česnik e Gregorčič, 2003) e il metodo di cromatografia liquida-spettrometria di massa LC-MS/MS (Baša Česnik e Gregorčič, 2003; Zweigenbaum et al., 2009). Prima di procedere con le analisi GC-MS e LC-MS/MS i campioni sono stati estratti con acetone, etere di petrolio e di-cloro-metano, purificandoli con la cromatografia ad esclusione molecolare.

Per l'analisi dei metalli veniva utilizzato un campione tale quale in cui veniva tolta la frazione alcolica. I valori dei rame (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn) sono stati determinati mediante la spettrometria di assorbimento atomico a fiamma (FAAS, Analyst 800, Perkin Elmer) mentre piombo (Pb), cadmio (Cd) e arsenico (As) mediante spettroscopia di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETAAS, Analyst 600, Perkin Elmer).



Le analisi delle ammine biogene sono state effettuate presso l'Università di Nova Gorica. I campioni del vino sono stati diluiti con metanolo. Ogni singolo campione è stato sottoposto a derivatizzazione con l'ortoftaldeide in presenza di 2-mercapto-etanolo e di borato tamponato a pH 10,5. In questo modo sono stati ottenuti i derivati fluorescenti delle ammine biogene che sono stati determinati mediante la cromatografia liquida HPLC utilizzando un rivelazione a fluorescenza (FLD) (Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo alto, USA). La determinazione è stata ottenuta ad una lunghezza d'onda di 445 nm, mentre la rivelazione della fluorescenza si è invece otteneva a 356 nm. Come fase mobile sono state utilizzate due soluzioni: (A) il metanolo e (B) una soluzione da 0,05 M di acetato di sodio e tetra-idrofurano in rapporto di 96:4.

Il numero dei LB è stato determinato con il metodo di coltura classico su un terreno di coltura selettivo solido MRStj (Biolife, Italia), al quale sono stati aggiunti 50 mg/l di cicloesimide e il 2 % di succo di pomodoro. Sul terreno di coltura selettivo abbiamo spalmato da 0,1 a 1 ml di campione, ponendolo poi nell'incubatrice anaerobica alla temperatura di 25 °C.

Per l'analisi dei fenoli volatili abbiamo aggiunto al vino lo standard interno di 2 e 3-dimetil-fenolo, procedendo all'estrazione ultrasonica del vino per 30 minuti con l'etere dietilico. Dopo l'essiccazione con il solfato di sodio abbiamo proceduto alla determinazione mediante il metodo GC-MS.

Risultati

Residui dei prodotti fitosanitari nell'uva e nel vino

In relazione alle sostanze attive ritrovate nelle uve e nei vini, abbiamo ipotizzato che i viticoltori avessero utilizzato delle sostanze attive PPP accessibili da un punto di vista commerciale, ed utilizzati per la difesa nei confronti dell'oidio (*Uncinula necator*), dell'eutipiosi (*Cryptosporella viticola*), del rossore parassitario (*Pseudopeziza tracheiphila*), della muffa grigia (*Botrytis cinerea*), della peronospora (*Plasmopara viticola*), della tignola della vite (*Eupoecilia ambiguella*), della tignoletta dell'uva (*Lobesia botrana*) e della cicalina vettore della flavescenza dorata (*Scaphoideus titanus*). La corrispondenza tra sostanza attiva e utilizzo è riportata nella Tabella 1.

Tabella 1: marchio commerciale (PPP) delle diverse sostanze attive determinate nei campioni di uva, e principali utilizzi

Sostanza attiva	PPP-nome marchio commerciale*	Utilizzato contro*
Azoxystrobin	QUADRI, UNIVERSALIS	Oidio, eutipiosi, rossore parassitario, peronospora
Benalaxil	GALBEN C, GALBEN M	Peronospora
Benalaxil-M	FANTIC F WG	Peronospora
Boscalid	COLLIS	Oidio, muffa grigia
Ciprodinil	SWITCH 62,5 WG	Muffa grigia
Dimetomorf	FORUM STAR, ACROBAT MZ WG	Peronospora
Fenhexamid	TELDOR SC 500	Muffa grigia
Fludioxonil	SWITCH 62,5 WG	Muffa grigia
Folpet	UNIVERSALIS, FOLPAN 80 WDG, FANTIC F WG, FORUM STAR,	Oidio, eutipiosi, rossore parassitario, peronospora
	PERGADO-F, MIKAL FLASH, MELODY COMBI WP 43,5,	
	MIKAL PREMIUM F	
Iprovalicarb	MELODY COMBI WP 43,5, MIKAL PREMIUM F,	Peronospora
	MELODY DUO WG 66,8A	
Clorpirifos	PYRINEX 25 CS	Tignola tignoletta, cicalina vettore della flavescenza dorata
quinoxyfen	CRYSTAL	Oidio
Mandipropamid	REVUS, PERGADO-F, PERGADO MZ	Peronospora
Metalaxil-M	RIDOMII GOLD MZ PEPITE, RIDOMII GOLD COMBI PEPITE,	Peronospora
	RIDOMII GOLD PLUS 42,5 WP	
Metoxifenozide	RUNNER 240 SC	Tignola e tignoletta
Tebuconazole	FALCON EC 460, FOLICUR EW 250, ORIUS 25 EW,	Oidio
	MYSTIC 250 EC, NATIVO 75 WG	
Zoxamid	ELECTIS 75 WG	Peronospora

* Disciplinare di produzione integrata dell'uva per l'anno 2011, MAFF, 2011

Come atteso, il contenuto dei residui PPP era superiore nell'uva rispetto a quanto trovato nei vini. I risultati sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2: Contenuto dei residui di sostanze attive PPP nell'uva e nel vino.

	Uva	Uva	Uva	Vino	Vino
	contenuto	numero di campioni	MRL	contenuto	numero di campioni
	(mg/kg)		(mg/kg)	(mg/L)	
Azoxistrobin - fungicida	0,03 - 1,11	5	2	0,04 - 0,15	4
Benalaxil + benalaxil-M - fungicida	0,01	1	0,3	-	-
Boscalid - fungicida	0,04 - 0,07	2	5	0,01 - 0,23	4
Cyprodinil - fungicida	0,01 - 1,80	7	5	0,01 - 0,21	21
Dimetomorf - fungicida	0,01 - 0,03	3	3	0,01 - 0,10	8
Fenexamid - fungicida	0,10 - 0,51	3	5	0,01 - 0,02	4
Fludioxonil - fungicida	0,03 - 1,12	5	4	0,01 - 0,09	19
Folpet - fungicida	0,03 - 1,85	15	5	-	-
Iprovalicarb - fungicida	0,05	1	2	0,03	1
Clorpirifos - insetticida	0,02 - 0,10	4	0,5	-	-
Quinoxifen - fungicida	0,02	1	1	-	-
Mandipropamid - fungicida	0,01 - 0,13	4	2	-	-
Metalaxil + metalaxil-M - fungicida	0,02 - 0,13	7	1	0,03 - 0,12	7
Metossiifenozone - insetticida	-	-	1	0,01	1
Tebuconazolo - fungicida	-	-	2	0,02 - 0,03	2
Zoxamide - fungicida	0,07	1	5	-	-

Le sostanze attive determinate nelle uve sono state le seguenti: azoxistrobin, benalaxil e benalaxil-M, boscalid, cyprodinil, dimetomorf, fenexamid, fludioxonil, folpet, iprovalicarb, clorpirifos, quinoxifen, mandipropamid, metalaxil e metalaxil-M, nonché zoxamide. Le ricerche svolte in precedenza (Čuš et al., 2010a) sulla analisi dei PPP nell'uva matura di Terrano avevano dimostrato dei contenuti comparabili con quanto ritrovato nei campioni qui testati: boscalid (0,03 mg/kg), dimetomorf (0,07 mg/kg) e folpet (0,41 mg/kg). Čuš et al. (2010a) avevano determinato anche la presenza del clorotalonil nell'uva Terrano,, la cui presenza non è stata ritrovata in questi ultimi campioni. Proprio come abbiamo fatto noi per la varietà Terrano, altri autori hanno riportato simili concentrazioni di residui di PPP. La presenza del folpet nell'uva è stata riportata da Farris et al. (1992) (0,50 mg/kg), la presenza del clorpirifos (0,14 mg/kg) da Navarro et al. (2001), la presenza del cyprodinil (1,03 mg/kg) da Cabras et al. (1997), mentre Otero et al. (2003) hanno riportato la presenza del folpet (0,10-0,60 mg/kg) e del cyprodinil (0,14-1,45 mg/kg).

Nel vino abbiamo determinato la presenza delle seguenti sostanze attive PPP: azoxistrobin, boscalid, cyprodinil, dimetomorf, fenexamid, fludioxonil, folpet, iprovalicarb, metalaxil e metalaxil-M, metossifenozide e tebuconazolo. Čuš et al. (2010b) hanno determinato la presenza delle seguenti sostanze attive nei vini imbottigliati, locali ed esteri, presenti in commercio: azoxistrobin (0,04 mg/l), boscalid (0,01-0,17 mg/l), cyprodinil (0,01-0,44 mg/l), dimetomorf (0,01-0,04 mg/l), fenexamid (0,02-0,17 mg/l), fludioxonil (0,02-0,21 mg/l) e metalaxil (0,03-0,06 mg/l). Le concentrazioni trovate erano paragonabili a quelle ottenute per i Terrani dell'annata 2011. Inoltre i campioni di vino hanno dimostrato la presenza delle sostanze attive iprodione e procimidone, riscontrate anche nelle nostre analisi. Cabras et al. (1997) aveva riportato la presenza del cyprodinil (0,21 mg/l) nel vino, mentre Farris et al. la presenza del metalaxil (0,10-1,30 mg/l) (1992). I risultati risultano confrontabili con quelli che ottenuti nei nostri vini. I dati rivelati dalla bibliografia (Čuš et al. 2010a) dimostrano che il contenuto delle sostanze attive cyprodinil, fenexamid, folpet e clorpirifos diminuisce notevolmente durante il processo di vinificazione, mentre il boscalid è risultato molto persistente durante tale processo. Nonostante il vino non corrisponda con l'uva analizzata, è al quanto interessante notare come la sostanza attiva folpet è presente nella maggior parte (15) dei campioni di uva, ma non è mai stata rilevata in alcun campione di vino.

Contenuto dei metalli nei vini Terrano

Le analisi effettuate su 39 campioni di vino Terrano hanno rivelato concentrazioni di zinco, piombo, cadmio e arsenico sotto la soglia dei valori massimi consentiti. Solo in due dei 39 campioni è stata rilevata una concentrazione di rame, superiore ai valori massimi consentiti. Probabilmente il valore elevato è da mettere in relazione all'uso eccessivo del solfato di rame, utilizzato proprio come l'idrogeno solforato per la correzione del vino (H_2S). Le concentrazioni di rame e zinco, determinate nei vini Terrano, non erano in linea con le aspettative e con i dati riportati in bibliografia (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Paneque et al., 2010). Il contenuto medio dei metalli pesanti (piombo, cadmio e arsenico) presenti nei campioni dell'annata 2001 del Terrano, è molto al di sotto della soglia massima consentita, il che rappresenta un dato estremamente positivo per i consumatori del Terrano. Le ricerche precedentemente svolte (Ribéreau-Gayon et al., 2000) hanno dimostrato una presenza media del piombo nei vini europei di 63 $\mu g/l$, in quelli australiani di 28 $\mu g/l$ e in quelli americani di 24 $\mu g/l$. La concentrazione media di

metallo	concentrazione massima consentita
rame - Cu	1 mg/l
ferro - Fe	
zinco - Zn	5 mg/l
piombo - Pb	150 $\mu g/l$
cadmio - Cd	10 $\mu g/l$
arsenico - As	200 $\mu g/l$

piombo (14 µg/l), determinata per i vini Terrano e persino il valore massimo rilevato (59 µg/l) risultano essere sotto la media europea. La concentrazione media del cadmio nei campioni del vino Terrano (0,2 µg/l) è inferiore di 50 volte al valore massimo consentito, di cinque volte rispetto alla concentrazione media riportata da ricercatori ungheresi (1,06 µg/l) (Ajtony et al., 2008) e lievemente inferiore ai valori riportati in una ricerca condotta su vini del sud d'Italia (dal 0,25 al 0,38 µg/l) (Galgano et al., 2008). La concentrazione di arsenico determinata in tutti i campioni è risultata inferiore al limite di quantificazione - LOQ (LOQ = 10 µg/l), il che coincide con i dati riportati da Ajtony et al. (2008) e da Galani-Nikolakaki et al. (2002). I risultati delle analisi dei metalli sono presentati nella tabella 3.

Tabella 3. Contenuto di metalli nei campioni dei vini Terrano nell'annata 2011.

concentrazione media nei campioni dei vini della varietà Terrano	concentrazione minima nei campioni dei vini della varietà Terrano	concentrazione massima nei campioni dei vini della varietà Terrano	numero dei campioni con valori che superano la concentrazione massima consentita
0,30 mg/l	0,02 mg/l	1,89 mg/l	2
1,45 mg/l	0,54 mg/l	4,56 mg/l	
0,68 mg/l	0,09 mg/l	2,68 mg/l	0
14 µg/l	5 µg/l	59 µg/l	0
0,2 µg/l	0,1 µg/l	0,7 µg/l	0
<10 µg/l	-	-	0

Ammine biogene

Nella determinazione delle ammine biogene abbiamo rilevato in dieci campioni i valori più alti nella concentrazione della putrescina (media 34,3 mg/l) e della etanolamina (media 21,5 mg/l). Nei singoli campioni abbiamo determinato la presenza della tiramina (media 1,9 mg/l), istamina (media 2,06 mg/l) mentre le concentrazioni della metilamina sono risultate nettamente inferiori (fino a 0,6 mg/l). Le concentrazioni della cadaverina, butilamina e triptamina erano sotto il limite di rivelabilità (0,08, 0,46 e rispettivamente 0,4 mg/l per la cadaverina, butilamina e triptamina). I risultati delle ammine biogene sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4: contenuto delle ammine biogene in dieci campioni di Terrano, annata 2011.

	Putrescina	Cadaverina	Etanolamina	Istamina	
Campione 11/	Concentrazione [mg/L]				
1011	20,46 ± 0,16	< 0,08	22,18 ± 0,46	0,58 ± 0,05	
995	15,21 ± 0,72	< 0,08	21,59 ± 1,04	< 0,06	
997	68,26 ± 3,54	< 0,08	25,19 ± 0,32	< 0,06	
1007	43,46 ± 0,43	< 0,08	27,82 ± 0,80	6,54 ± 0,69	
1008	28,16 ± 2,09	< 0,08	22,03 ± 1,25	5,93 ± 0,05	
1009	49,17 ± 1,77	< 0,08	26,99 ± 0,07	< 0,06	
1081	5,09 ± 0,09	< 0,08	12,27 ± 0,17	< 0,06	
1084	8,25 ± 0,14	< 0,08	15,82 ± 1,76	< 0,06	
1088	< 0,03	< 0,08	17,68 ± 1,72	0,36 ± 0,05	
1090	78,71 ± 4,64	< 0,08	23,94 ± 1,08	6,90 ± 0,37	
media	34,28	< 0,08	21,55	2,06	
concentrazione minima	5,09	< 0,08	12,27	< 0,06	
concentrazione massima	78,71	< 0,08	27,82	6,9	



	Metilamina	Tiramina	Butilamina	Triptamina
	< 0,07	0,99 ± 0,27	< 0,9	< 0,4
	0,17	< 0,85	< 0,9	< 0,4
	0,44 ± 0,20	< 0,85	< 0,9	< 0,4
	0,62 ± 0,07	2,02 ± 0,59	< 0,9	< 0,4
	0,201 ± 0,005	< 0,85	< 0,9	< 0,4
	0,15 ± 0,01	< 0,85	< 0,9	< 0,4
	< 0,07	< 0,85	< 0,9	< 0,4
	< 0,07	0,42 ± 0,09	< 0,9	< 0,4
	0,14 ± 0,01	< 0,85	< 0,9	< 0,4
	0,330 ± 0,004	10,54 ± 2,61	< 0,9	< 0,4
	0,23	1,91	< 0,9	< 0,4
	< 0,07	0,42	< 0,9	< 0,4
	0,62	10,54	< 0,9	< 0,4



Čuš et al. (2011) hanno determinato la concentrazione di ammine biogene in vini rossi della regione vitivinicola Primorska sottoposti a invecchiamento (varietà Pinot nero, Merlot e Cabernet sauvignon); i valori più elevati sono stati ottenuti in un campione di Pinot nero del 2006, pari a 62,4 mg/l di putrescina, 8 mg/l di istamina e 6,8 mg/l per la tiramina. Nel caso dei vini Terrano in due campioni il livello di putrescina superava gli 8 mg/l, mentre in un campione dell'annata 2008 è stato rilevato un valore di istamina pari a 7,3 mg/l.

Un terzo dei campioni analizzati non ha evidenziato la presenza di LB sui terreni di coltura selettiva MRStj; un altro terzo presentava valori compresi tra $2,2 \times 10^2$ e $3,3 \times 10^2$ CFU/ml. Nel resto dei campioni i valori risultavano variabili tra il $5,5 \times 10^2$ e il $1,12 \times 10^3$ CFU/ml. Nei campioni, in cui non è stata rilevata la presenza del LB, la concentrazione di ammine biogene erano bassi. Per gli altri campioni non è stato evidenziato alcun tipo di correlazione, perciò in futuro verranno esaminate le diverse specie di batteri lattici presenti, poiché è un fatto risaputo che la formazione delle ammine biogene dipende dalla specie di lacto-bacillo ma può essere molto diversa in alcuni ceppi della stessa specie (Konig e Frohlich, 2009; Petri et al., 2013). Per ridurre la formazione delle ammine biogene nei vini rossi si consiglia l'utilizzo di ceppi di batteri lattici che non promuovano la formazione di ammine biogene durante la fermentazione malo-lattica. Anche il corretto utilizzo della SO_2 dopo la fermentazione malo-lattica potrebbe diminuire la vitalità dei batteri lattici indesiderati, con il risultato di ottenere una minore presenza di ammine biogene nei vini. Le analisi della solforosa libera e totale nei Terrani dell'annata 2011 hanno mostrato dei valori alquanto bassi; in media il contenuto del SO_2 libera ammontava a 13 mg/l, mentre la SO_2 totale è risultata pari a 43 mg/l (Vanzo et al., 2012).

Fenoli volatili

I fenoli volatili sono il prodotto dell'attività enzimatica dei lieviti durante la fermentazione, di mancanza di igiene durante la maturazione con di un uso non corretto della solforosa (SO_2). I risultati del contenuto relativo ai fenoli volatili nel vino Terrano 2011 sono indicati nelle figure 1-4. Sono indicate solamente le concentrazioni maggiori del limite di quantificazione (limit of quantification – LOQ), che per tutti e quattro i composti risultava pari a 5 µg/l, al di sotto della soglia olfattiva.

4-etil fenolo

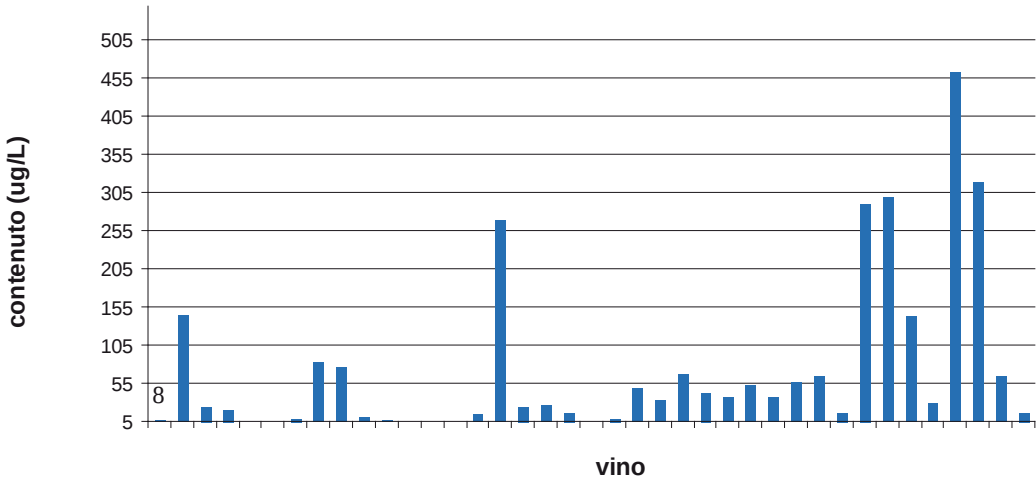


Figura 1: Contenuto del 4-etil fenolo nel Terrano

La presenza del 4-etil-fenolo (4-EF) variava tra i 6 e i 465 µg/l, con una media pari a 86 µg/l; tutti i valori risultano quindi al di sotto della soglia di percezione sensoriale. In quattro campioni di vino la presenza del 4-etil-fenolo è stata rilevata in tracce (valore tra il limite di rilevazione e la soglia del metodo di determinazione quantitativa). Čuš et al. (2011), hanno rilevato dei valori pari a 1016, 678 e 616 µg/l 4-EF, in Terrani selezionati da tre annate viticole (2007, 2008, 2009).

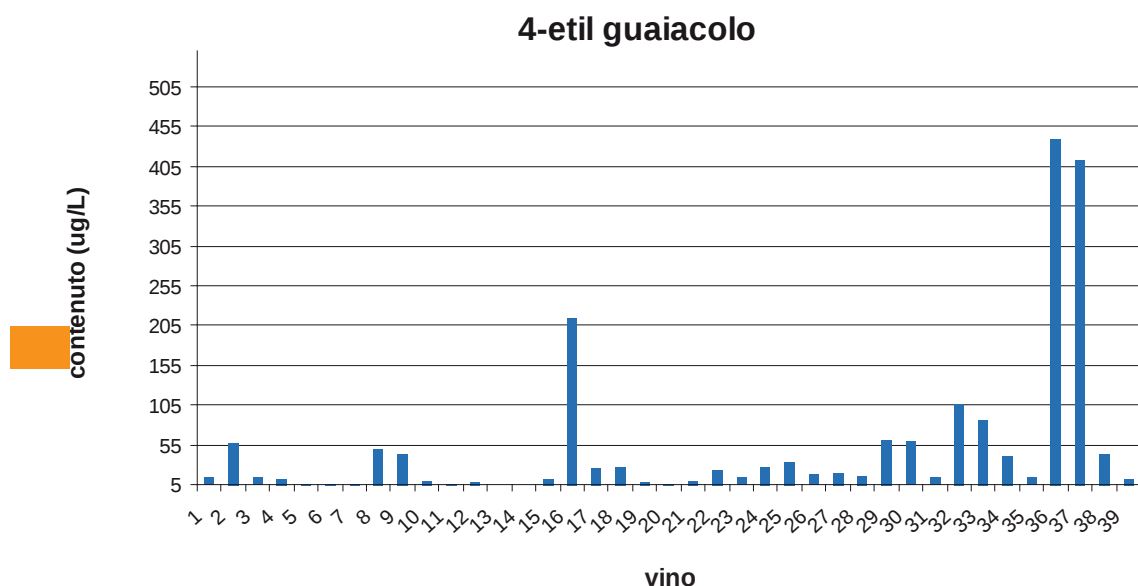


Figura 2: Contenuto del 4-etil guaiacolo nel Terrano

Il contenuto del 4-etil guaiacolo (4-EG) variava tra i 6 e 441 µg/l, con un valore medio di 54 µg/l, e due campioni con concentrazioni in tracce. Čuš et al. (2011) hanno determinato il valore massimo del 4-EG di 263 µg/l nel Terrano scelto dell'annata 2007. I dati, riportati in bibliografia (Ribéreau-Gayon et al., 2000) indicano un rapporto standard di 8:1 tra il 4-EF e il 4-EG; i risultati ottenuti su terrano evidenziano un rapporto 4-EF:4-EG molto più basso e pari a 1,5:1.

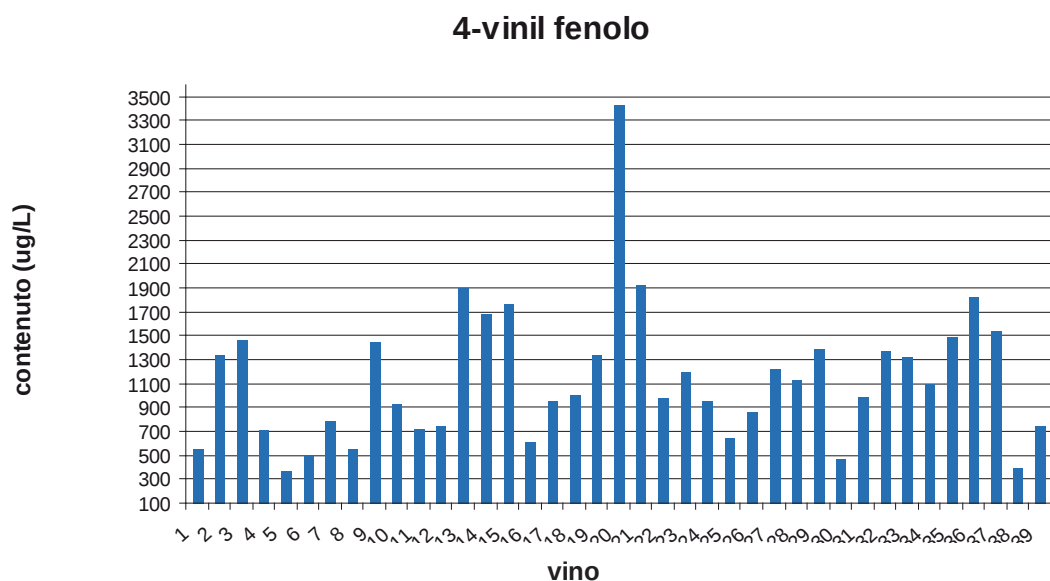


Figura 3: Contenuto del 4-vinil fenolo nel Terrano

Il contenuto del 4-vinil fenolo (4-VF) variava tra i 366 e i 3438 µg/l, con un valore medio di 1141 µg/l. Dai dati presenti in bibliografia (Chatonnet et al. 1993) la soglia di percezione sensoriale per i vinil fenoli ammonta a 725 µg/l con un rapporto tra 4-vinil fenolo e 4-vinil guaiacolo di 1:1. Bavčar (2011) ha determinato valori alti del 4-VF in vini bianchi della varietà Rebula, con concentrazioni nel range di 317-577 µg/l.

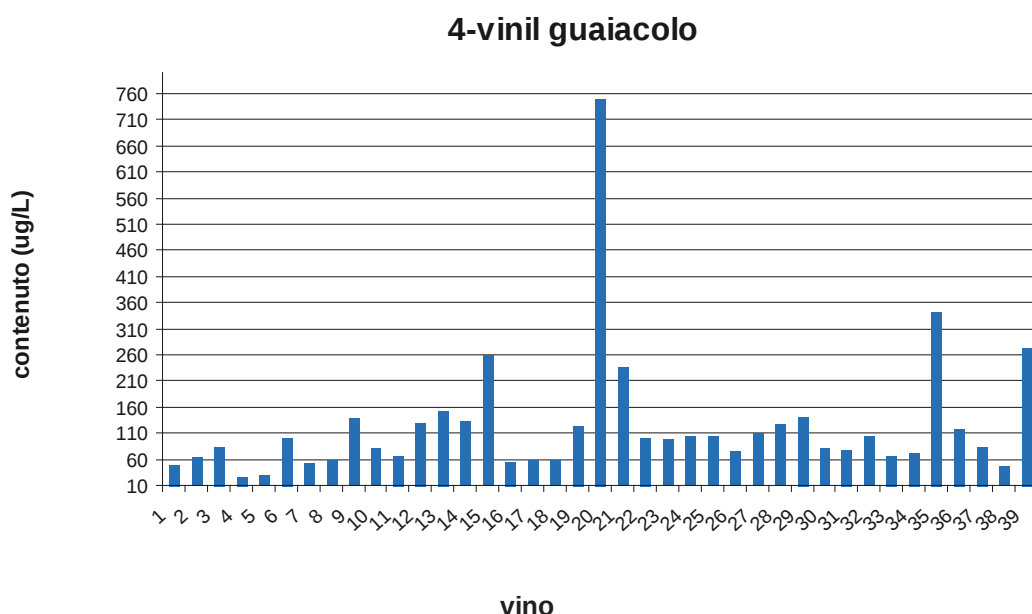


Figura 4: Contenuto del 4-vinil guaiacolo nel Terrano

Il contenuto del 4-vinil guaiacolo (4-EG) variava tra i 28 e 750 $\mu\text{g/l}$, con un valore medio di 125 $\mu\text{g/l}$. La soglia percettiva del 4-EG è di 440 $\mu\text{g/l}$ (Williams et al., 1980; Rocha et al., 2005). Il suo sentore che riconduce al pepe o i chiodi di garofano può contribuire positivamente all'aroma del vino. Solamente un campione di Terrano aveva un contenuto di 750 $\mu\text{g/l}$ al di sopra della soglia della percezione sensoriale.

Discussione e risultati

Le analisi delle sostanze che non vogliamo presenti nei vini, hanno evidenziato come i Terrani prodotti da coltivazione biologica o integrata, risultavano essere sicuri per la salute dei consumatori. Il contenuto dei residui di sostanze attive (PPP) rientrava nei valori massimi consentiti per l'uva, mentre per quanto riguarda il vino, non è possibile confrontare i risultati poiché non vi sono dei riferimenti legislativi con i valori massimi consentiti. Le analisi hanno dimostrato che i residui di PPP erano presenti in 17 dei 18 campioni di uva analizzati. Tuttavia ogni campione presentava valori al di sotto del limite massimo. La concentrazione dei residui di sostanze attive (PPP) nelle uve è comparabile con quanto riportato da altri autori (Čuš et al. 2010a, Farris et al. 1992, Navarro et al. 2001, Cabras et al. 1997, Otero et al. 2003). La sostanza attiva

più frequentemente determinata è stata il folpet, utilizzata per la difesa nei confronti di peronospora in primis, oidio, rossore parassitario e muffa grigia. In 29 dei 39 campioni di vino analizzati sono stati determinati residui di PPP. I risultati delle analisi sono comparabili con quelli riportati in letteratura (Čuš et al. 2010b, Cabras et al. 1997, Farris et al. 1992). Il contenuto totale delle sostanze attive era inferiore ai 0,25 mg/l.

In relazione ai risultati dell'analisi dei metalli presenti nel vino, possiamo concludere che i vini Terrano sono sicuri per la salute dei consumatori, poichè le concentrazioni determinate era ben al di sotto dei valori massimi consentiti e nettamente inferiori in confronto ai vini prodotti nel sud Italia (Galgano et al., 2008) o in Ungheria (Ajtony et al., 2008). L'unica eccezione è una concentrazione elevata di rame in due campioni, molto probabilmente da attribuibile ad un uso eccessivo di solfato di rame, utilizzato per la correzione del vino (H_2S).

Le analisi della ammine biogene hanno mostrato valori simili a quelli riscontrati nell'ambito di altre ricerche. Anche la concentrazione più alta di istamina risulta essere inferiore ai valori massimi raccomandati in Austria e Svizzera (10 mg/l) o in Francia (8 mg/l). Il valore determinato risulta essere superiore invece ai valori massimi raccomandati in Germania (2 mg/l), Paesi Bassi (3 mg/l) e Belgio (5 mg/l). La concentrazione della putrescina e della tiramina rientrano nei range indicati anche in bibliografia per i vini rossi, mentre per quanto riguarda l'etanolamina purtroppo non vi sono dei riferimenti in letteratura. Concentrazioni maggiori di ammine biogene sono stati messi in relazione ad una maggiore attività dei batteri lattici. Con l'uso corretto del SO_2 è però possibile diminuire nettamente la formazione di tali sostanze indesiderate nel vino.

La concentrazione di fenoli volatili non ha compromesso le proprietà organolettiche dei Terrani dell'annata 2011. La soglia di percezione del 4-etil fenolo di 420 $\mu g/l$ è stata superata solamente in uno dei 39 campioni di vino analizzati. In media i valori del 4-etil guaiacolo e del 4-vinil guaiacolo risultavano essere sotto la soglia della percezione olfattiva.

Bibliografija

- Ajtoni, Z., Szoboszalai, n., Suskó, E.K., Mezei, P., György, K., Bencs, L.; 2008, Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content, *Talanta* 76 (2008) 627-634.
- Baša Česnik H., Gregorčič A. 2003. Multirezidualna analizna metoda za določevanje ostankov pesticidov v sadju in zelenjavi. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika 82, 2:167-180.
- Bavčar D. 2011. Vpliv maceracije na aromatične značilnosti primorskih belih vin. Doktorska disertacija. Ljubljana 2011.
- Cabras P., Angioni A., Garau V. L., Melis M., Pirisi F. M., Minelli E. V., Cabitza F., Cubeddu M., 1997. Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 45: 2708-2710.
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., Lavigne V. 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 2:191-202
- Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, International Organisation of Vine and Wine (OIV), Edition 2012, Annex C: Maksimum acceptable limits of various substances
- Čuš F., Baša Česnik H., Velikonja Bolta Š., Gregorčič A. 2010 a. Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control* 21, 1512-1518.
- Čuš F., Baša Česnik H., Velikonja Bolta Š., Gregorčič A. 2010 b. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. *Food Control* 21, 150-154.
- Čuš F., Gerič Stare B., Bach B. Barnavon L. 2011. Vsebnost biogenih aminov in hlapnih fenolov ter prisotnost kvasovke *Brettanomyces bruxellensis* v slovenskih vinih. *Vinarski dan* 2011, Ljubljana 30. november 2011, str. 5-24.
- Farris G. A., Cabras P., Spanedda L. 1992. Pesticide residues in food processing. *Italian Journal of Food Science* 3: 149-169.
- Galani-Nikolakaki, S., Kallithrakas-Kontos, N., Katsanos, A.A., (2002), Trace element analysis of Cretan wines and wine products, *The Science of Total Environment* 285 (2002) 155-163.
- Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Scarpa, T., Palma, A., 2008, Analysis of trace elements in southern italian wines and their classification according to provenance, *Food Science and technology* 41 (2008) 1808-1815.
- http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/index_en.htm
- Konig, H., Frohlich, J. 2009. Lactic acid bacteria. V: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Heidelberg, str. 3-29.
- Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 199: 9-13.
- Navarro S., Oliva J., Navarro G., Barba A. 2001. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in grapes. *American Journal of Enology & Viticulture* 52: 35-40.

Otero R.R., Grande B.C., Gándara J.S. 2003. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A* 992: 121-131.

Paneque, P., Álvarez-Sotomayor M.T., Clavijo A., Gómez, I.A., 2010, Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing, *Microchemical Journal* 94 (2010) 175-179.

Petri, A., Pfannebecker, J., Frolich, J., Konig, H. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol* 33: 48-54.

Ribéreau-Gayon et al., *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*, J. Wiley & Sons Ltd., 2000

Rocha S.M., Coutinho P., Delgadillo I., Coimbra A.D. 2005. Effect of enzymatic aroma release on the volatile compounds of white wines presenting different aroma potentials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2:199-205.

Tehnološka navodila za integrirano pridelavo grozdja za leto 2011, MAFF, 2011.

Zweigenbaum J., Flanagan M., Stone P., Glauner T., Zhao L. 2009. Multi-Residue Pesticide Analysis with Dynamic Multiple Reaction Monitoring and Triple QUadropole LC/MS/MS. Agilent Technologies, Inc., Application Note, Appendix IV: LC/MS/MS Conditions for 300-Pesticide Methods using the Agilent 1290 Infinity LC.

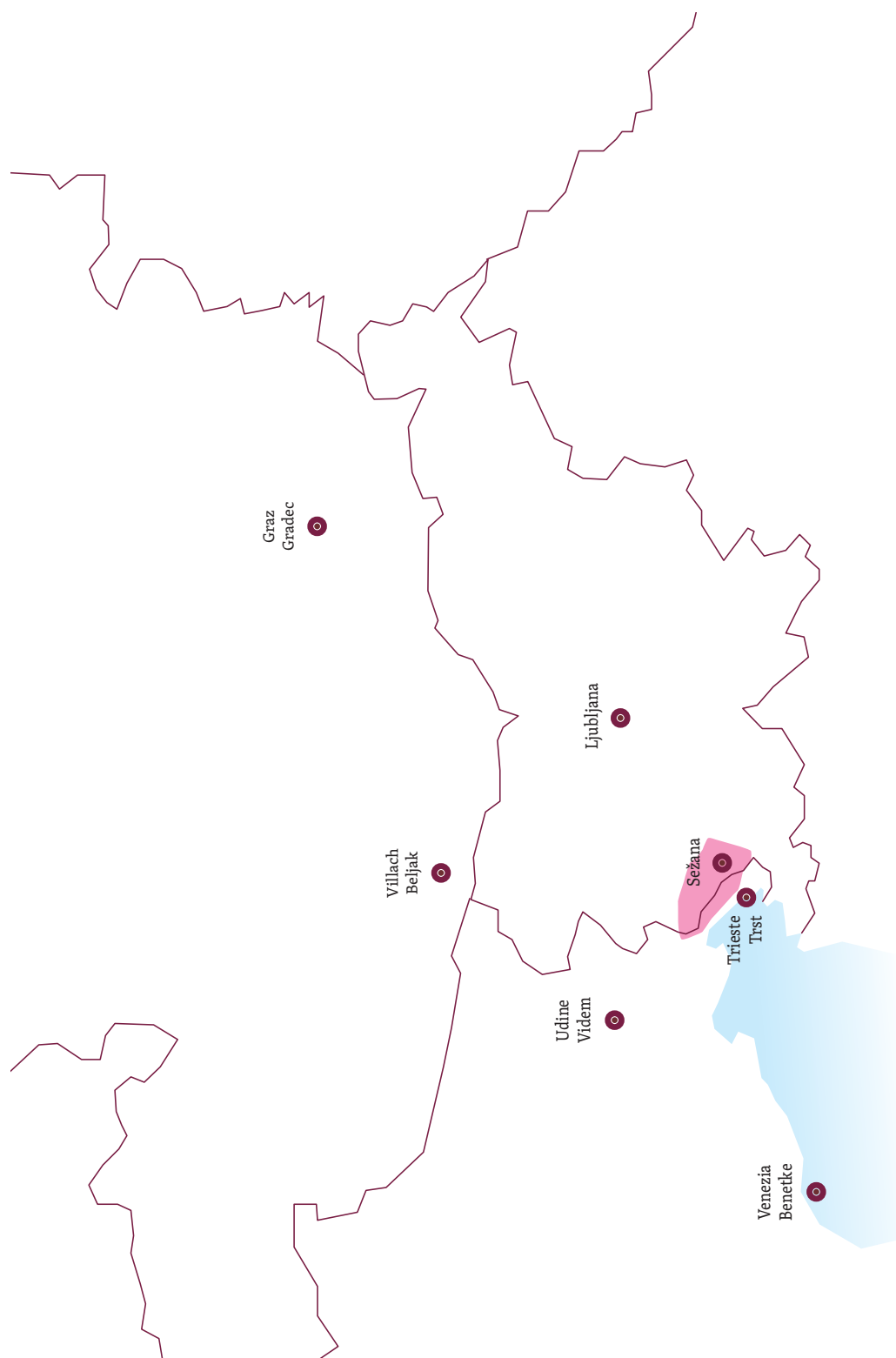
Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. 1980. Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 4: 766-711.

27501

TERAN









Kmetijski
inštitut
Slovenije



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE



KONZORCIJ
KRAŠKIH
PRIDLOVALCEV
TERANA



Projekt sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev. Progetto finanziato nell'ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013, dal Fondo europeo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali.



REPUBLIKA SLOVENIJA
**MINISTRSTVO ZA GOSPODARSKI
RAZVOJ IN TEHNOLOGIJO**



**Ministero dell'Economia
e delle Finanze**