

AGROTUR



TRADIZIONALNI KRAŠKI PRIDELKI IN PRODUKTI - RAZISKAVE ZA IZBOLJŠANJE NJIHOVE KAKOVOSTI

Simpozij AGROTUR

Trst, 27. november 2014

Zbornik prispevkov simpozija

www.agrotur.si

PRODOTTI TRADIZIONALI DEL CARSO - LA RICERCA AL SERVIZIO DELLA QUALITÀ

Simposio AGROTUR

Trieste, 27 novembre 2014

Atti del congresso - pubblicazioni scientifiche

www.agrotur.it



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



Investiamo nel
vostro futuro!
Naložba v vašo
prihodnost!

www.ita-sto.eu

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

Organizator

Università degli Studi di Trieste
Kmetijski inštitut Slovenije
Univerza v Novi Gorici
Università degli Studi di Udine
Združenje Konzorcij kraških pridelovalcev terana

Izdal in založil

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

Recenzenti prispevkov

izr. prof. dr. Andreja Vanzo
dr. Dejan Bavčar
izr. prof. dr. Paolo Sivilotti
dr. Klemen Lisjak
dr. Drago Babnik
doc. dr. Branka Mozetič
asist. dr. Lovro Žiberna

Fotografije

Marijan Močivnik

Oblikovanje in tisk

Tiskarna Mljač, Divača

Naklada 500 izvodov

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

663.222(497.472)(082)
637.525(497.472)(082)

SIMPOZIJ Agrotur (2014 ; Trst)

Tradicionalni kraški pridelki in produkti - raziskave za izboljšanje njihove kakovosti : zbornik prispevkov simpozija = Prodotti tradizionali del Carso - la ricerca al servizio della qualità : atti del congresso - pubblicazioni scientifiche / Simpozij Agrotur, Trst, 27. november 2014 = Simposio Agrotur, Trieste, 27 novembre 2014 ; [organizator Università degli Studi di Trieste ... [et al.] ; urednik Klemen Lisjak]. - Ljubljana : Kmetijski inštitut Slovenije, 2014

ISBN 978-961-6311-88-5

1. Gl. stv. nasl. 2. Vzp. stv. nasl. 3. Lisjak, Klemen 4. Università degli Studi (Trieste)
278708480

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 e di esclusiva responsabilità dei partner progettuali e non rispecchia necessariamente le posizioni ufficiali dell'Unione europea.

**TRADICIONALNI KRAŠKI PRIDELKI
IN PRODUKTI - RAZISKAVE ZA
IZBOLJŠANJE NJIHOVE KAKOVOSTI**

Simpozij AGROTUR

Trst, 27. november 2014

Zbornik prispevkov simpozija

www.agrotur.si

**PRODOTTI TRADIZIONALI DEL CARSO -
LA RICERCA AL SERVIZIO DELLA QUALITÀ**

Simposio AGROTUR

Trieste, 27 novembre 2014

Atti del congresso - pubblicazioni scientifiche

www.agrotur.it

Projekt Agrotur	7
<i>Klemen Lisjak</i>	
Teran je vinska posebnost	9
<i>Friderik Vodopivec</i>	
Vpliv antočianov v rdečem vinu na možgane in kognitivne sposobnosti	11
<i>Stefano Fornasaro, Lovro Ziberna, Federica Tramer, Sabina Passamonti</i>	
Kako lahko izboljšamo kakovost grozdja sorte refošk – pregled petih različnih ampelotehničnih ukrepov	21
<i>Paolo Sivilotti, Lorena Butinar, Branka Škvarč, Martina Soban, Adrian Montez Gutiérrez, Marina Kobakhidze, Andreja Vanzo, Klemen Lisjak</i>	
Učinek ampelotehničnih ukrepov na kopičenje antocianov in izražanje transportnih proteinov v vitis vinifera cv. refošk	37
<i>Sonia Patui, Carlo Peresson, Alberto Bertolini, Enrico Braidot, Marco Zancani, Sabina Passamonti, Paolo Sivilotti, Lorena Butinar, Andreja Vanzo, Klemen Lisjak, Angelo Vianello, Elisa Petrusa</i>	
Polifenolni potencial grozdja refošk in vina teran na Krasu	51
<i>Klemen Lisjak, Paolo Sivilotti, Dejan Bavčar, Andreja Vanzo</i>	
Aromatski profil vina teran	67
<i>Helena Baša Česnik, Dejan Bavčar, Klemen Lisjak</i>	
Hlapni fenoli in biogeni amini v vinih teran	79
<i>Helena Baša Česnik, Klemen Lisjak, Andreja Rakar, Mojca Žorž, Romina Žabar, Mitja Martelanc, Lorena Butinar, Paolo Sivilotti, Polonca Trebše, Mladen Franko</i>	
Ostanki fitofarmaceutskih sredstev in kovine v vinu teran	91
<i>Helena Baša Česnik, Vida Žnidaršič Pongrac, Špela Velikonja Bolta, Klemen Lisjak</i>	
Možnosti za zmanjševanje soli v kraškem pršutu – vpliv na kakovostne parametre in sprejemljivost za potrošnike	103
<i>Martin Škrlep, Marjeta Čandek-Potokar, Boris Potočnik, Maja Prevolnik Povše, Nina Batorek Lukač, Marjeta Žemva, Klemen Lisjak</i>	

Il progetto Agrotur	119
<i>Klemen Lisjak</i>	
La peculiarità del terrano	121
<i>Friderik Vodopivec</i>	
l'influenza degli antociani del vino rosso sul cervello e le funzioni cognitive	123
<i>Stefano Fornasaro, Lovro Ziberna, Federica Tramer, Sabina Passamonti</i>	
Come possiamo migliorare la qualità delle uve Terrano-Refošk – risultati di cinque sperimentazioni	133
<i>Paolo Sivilotti, Lorena Butinar, Branka Škvarč, Martina Soban, Adrian Montez Gutiérrez, Marina Kobakhidze, Andreja Vanzo, Klemen Lisjak</i>	
Effetto di tecniche agronomiche sull'accumulo di antocianine e sull'espressione di proteine trasportatrici in Vitis vinifera cv. Refošk	147
<i>Sonia Patui, Carlo Peresson, Alberto Bertolini, Enrico Braidot, Marco Zancani, Sabina Passamonti, Paolo Sivilotti, Lorena Butinar, Andreja Vanzo, Klemen Lisjak, Angelo Vianello, Elisa Petrusa</i>	
Potenziale polifenolico dell'uva Refošk e del vino terrano del Carso	159
<i>Klemen Lisjak, Paolo Sivilotti, Dejan Bavčar, Andreja Vanzo</i>	
Profilo aromatico del vino Terrano	175
<i>Helena Baša Česnik, Dejan Bavčar, Klemen Lisjak</i>	
Fenoli volatili e ammine biogene nei vini Terrano	187
<i>Helena Baša Česnik, Klemen Lisjak, Andreja Rakar, Mojca Žorž, Romina Žabar, Mitja Martelanc, Lorena Butinar, Paolo Sivilotti, Polonca Trebše, Mladen Franko</i>	
Residui di fitofarmaci e metalli nel vino Terrano	199
<i>Helena Baša Česnik, Vida Žnidaršič Pongrac, Špela Velikonja Bolta, Klemen Lisjak</i>	
Possibilità di riduzione del contenuto di sale nel prosciutto crudo "Kraški pršut" - effetto sui parametri di qualità e accettabilità da parte dei consumatori	211
<i>Martin Škrlep, Marjeta Čandek-Potokar, Boris Potočnik, Maja Prevolnik Povše, Nina Batorek Lukač, Marjeta Žemva, Klemen Lisjak</i>	



PROJEKT AGROTUR

Kras zaznamujejo edinstvene klimatske in geološke značilnosti, izjemna pestrost favne in flore ter značilna kraška krajina s svojimi tradicionalnimi pridelki in produkti. Vse našteto daje temu območju edinstvenost, ki predstavlja pojem v svetovnem merilu. V okviru projekta Agrotur, <http://www.agrotur.si>, smo s celovitim pristopom želeli izboljšati kakovost in prepoznavnost vina teran ter kraškega pršuta, sinonima prepoznavnosti Krasa. V treh letih trajanja projekta smo tako s horizontalnim (med raziskovalnimi inštitucijami) kot vertikalnim povezovanjem (do končnih uporabnikov, vinogradnikov, lokalnega prebivalstva ...) izpeljali vrsto aktivnosti za izboljšanje kakovosti in turistične prepoznavnosti Krasa, tradicionalnih kraških pridelkov in produktov ter njihovih pozitivnih učinkov na zdravje. Z najsodobnejšo analitiko smo natančno preučili bioaktivne komponente terana in grozdja refošk treh letnikov ter njihov pozitiven vpliv na zdravje; obenem smo temeljito preučili kraška vinogradniška tla – jerino, kraško entomofavno (žuželke) ter negativne vplive kmetovanja na kraško okolje. Z aplikativnimi poskusi za izboljšanje kakovosti terana in kraškega pršuta, ki smo jih opravili pri vinogradnikih in pridelovalcih pršuta na Krasu, smo prišli do novih znanj, ki bodo lokalnim pridelovalcem v pomoč pri kmetovanju, promociji in trženju tradicionalnih kraških produktov.

V treh letih smo v laboratorijih partnerskih raziskovalnih inštitucij opravili analize več kot 60.000 različnih komponent, spojin, aktivnih snovi ..., s katerimi smo pridobili nova znanja o kraških pridelkih in produktih, njihovi pridelavi in predelavi ter vplivih novih tehnologij na njihovo izboljšanje. Rezultate raziskav smo predstavili na štirih različnih simpozijih, ki smo jih organizirali v okviru projekta, jih objavili v zbornikih, strokovnih in znanstvenih revijah ter več diplomskih delih, ki so jih opravili študentje v okviru projekta na Univerzi v Novi Gorici. V zadnjem zborniku so tako predstavljene temeljne in aplikativne projektne raziskave in analize, opravljene na refošku, teranu in kraškem pršutu.

Turizem na Krasu je zelo pomembna gospodarska panoga, zato je bil eden od ciljev projekta Agrotur postaviti novo, skupno čezmejno blagovno znamko »Kras, destinacija avtohtonih produktov«. Naš namen je bil podpreti vse dosedanje aktivnosti na področju kraškega agroturizma in promovirati tradicionalne kraške produkte. V sklopu projekta smo postavili mrežo ponudnikov turističnih prenočitvenih zmogljivosti (t. i. čezmejni razpršeni hotel: <http://www.hoteldobregaterana.si/>), kjer svoje prenočitvene kapacitete, pridelke in produkte ponujajo turistične kmetije na čezmejnem Krasu. Namen mreže je izboljšati prepoznavnost in povečati število turistov na Krasu, saj bomo na ta način optimizirali lokalno ekonomijo in ohranili kraško podeželje aktivno ter kmetijam prijazno.

Seveda pa projekt ne bi uspel brez aktivnega sodelovanja kraških pridelovalcev terana, združenih v konzorcija na slovenskem in italijanskem Krasu. Promocije, ki so jih opravili kraški vinogradniki na obeh straneh meje, so igrale ključno vlogo pri izboljšanju prepoznavnosti Krasa in terana doma ter v tujini. Z njihovo pomočjo in delovanjem je projekt dobil smisel in prave rezultate, kar je bil cilj financiranja čezmejnih projektov v okviru programa Slovenija–Italija 2007–2013.

*dr. Klemen Lisjak,
vodja projekta Agrotur*

TERAN JE VINSKA POSEBNOST

Na Krasu imata vinogradništvo in vinarstvo več kot tisočletno tradicijo. Gojenje vinske trte sega daleč v zgodovino. Ugodne vremenske, talne razmere, hiter ter dinamični razvoj vinogradništva in vinarstva posebno v zadnjem desetletju na Krasu omogočajo ohranjanje vinorodnega okoliša, lokalne tradicije, želje kupcev in visoko kakovost vina.

Tu je domovina terana, ki dosega v zadnjih letih zavidljivo kakovost in potrjuje, da gre za domačo in svetovno vinsko posebnost.

Lepa pokrajina je vredna ogleda, saj je polna vinskih in drugih znamenitosti, kot so npr. Lipica, Škocjanske jame in Vilenica. Kras ponuja tudi pestro in bogato ponudbo kulinarčnih dobrot, med katere sodi v prvi vrsti vino teran.

Zavedamo se, da je teran del naše kulturne dediščine, tradicije, zgodovine in je kot tak pomembna gospodarska dejavnost, ki na Krasu predstavlja velik delež nacionalnega dohodka ter s tem ohranja živo podeželje.

Da je Kras takšen, kakršen je, je v veliki meri zaslužen človek. Znal je (in zna) izkoristiti naravne danosti, ki mu jih ponujata sodobna znanost ter narava. Če se vrnemo malo nazaj, torej lahko smelo in argumentirano trdimo, da je Kras vinogradniški in da se je tu v tisočletni tradiciji dogajalo veliko strokovnih aktivnosti, ki pričajo o vzgojeni avtohtoni sorti refošk, ki daje na Krasu zaradi specifičnih ekoloških in pedoloških značilnosti posebno vino, Kraševci ga imenujejo teran.

V zadnjih letih opažamo, da se poraja poseben odnos vinogradnikov do trte in vina, zlasti zato, ker je bila trta vzgojena doma. Ta odnos vpliva na vino teran, zato je vsak kozarec nekaj posebnega in edinstvenega. Je zgodba o teranu, na katerega smo Kraševci, še posebno vinogradniki in vinarji, ponosni, saj nam daje veselje in eksistenco.

Vedno bolj smo prepričani, da se vrednost terana ne odraža samo v njegovih lepih cvetici, ki nas spominja na sveže, včasih tudi prezele gozdne

sadeže, temveč tudi v harmoniji, polnem, sadnem, mineralnem in plemenitem okusu.

Zavedamo se, da se zgodba razvoja vinogradništva in vinarstva ne bo nikoli končala, zato s pridom koristimo sredstva, ki nam jih ponujata EU in domovina. S projektom AGROTUR smo pridobili veliko znanja za pridelavo visokokakovostnega grozdja in vina teran. Zavedamo se, da imamo v svojih vinogradih in kletih bogato dediščino, torej odgovornost, privilegij in priložnost, da ta potencial izkoristimo in ga plemenitimo.

dr. Friderik Vodopivec

VPLIV ANTOČLANOV V RDEČEM VINU NA MOŽGANE IN KOGNITIVNE SPOSOBNOSTI

Stefano FORNASARO¹, Lovro ZIBERNA², Federica TRAMER³, Sabina PASSAMONTI⁴

1, 2, 3, 4 Università degli Studi di Trieste

¹ dr.

² dr.

³ prof. dr.

⁴ prof. dr.

POVZETEK

Zmerno uživanje rdečega vina zmanjša tveganje za srčno-žilne, nevrodegenerativne, rakave in nekatere druge bolezni. Zadnji podatki kažejo, da imajo med številnimi bioaktivnimi snovmi v rdečem vinu antociani najmočnejše zaščitno delovanje za zdravje. Antociani imajo antioksidativno, protivnetno, protibakterijsko in protirakavo aktivnost. V pričujočem prispevku bomo predstavili biološko aktivnost antocianov iz rdečega vina. Sodobne prehranjevalne smernice za promocijo zdravega načina življenja naj vključujejo zmerno uživanje rdečega vina kot bistveni del vsakodnevne prehrane.

Ključne besede: flavonoidi, polifenoli, rdeče vino, zdrava dieta

Influence of anthocyanins in red wines on brains and cognitive capability

ABSTRACT

Moderate consumption of red wine reduces the risk of cardiovascular, neurodegenerative, cancer, and some of the other diseases. Among numerous bioactive compounds in the red wine, the most recent information show that anthocyanins have the most pronounced health protective benefits. Anthocyanins have anti-oxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-carcinogenic activities. Here we review the red wine anthocyanins and their bioactivity. Modern dietary guidelines

for healthy lifestyle promotion shall include moderate consumption of red wine as an essential part of the daily nutrition.

Keywords: anthocyanins, healthy diet, polyphenols, red wine

1. UVOD

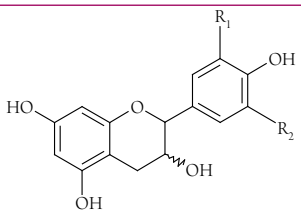
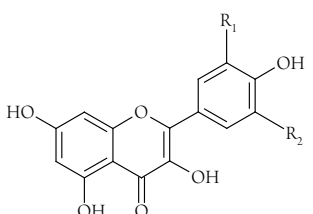
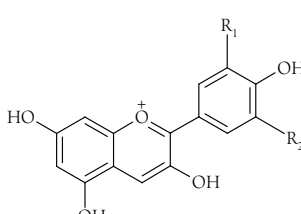
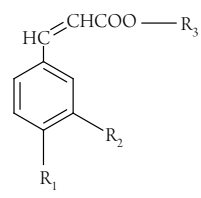
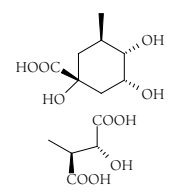
Uživanje vina pomembno vpliva na proces staranja in na pričakovano življenjsko dobo. Poleg tega se zdi, da pozitivno vpliva na tipične bolezni, ki so povezane s starostjo (Chrysohoou in Stefanadis 2013). Rdeči pigmenti v rdečem vinu, imenovani antocijani, so skupina številnih molekul iz kemijskega razreda flavonoidov, ki so biološko zelo aktivni. Za razliko od nekaterih vitaminov, ki imajo čisti antioksidativni učinek in so sploh bistvenega pomena za vitalnost celice, antocijani pri tem ne igrajo ključne vloge. Vendar so različne študije pokazale, da daljše uživanje majhnih količin antocijanov, na primer preko zmernega uživanja vina, koristno vpliva na preprečevanje nastanka različnih kroničnih neurodegenerativnih bolezni, ki so povezane z izgubo kognitivnih sposobnosti (Letenneur 2004), prav tako na bolezni srca in ožilja (Di Castelnuovo in sod. 2002). Zato je danes v znanosti velik interes, da bi razumeli, kako antocijani učinkujejo na varovanje celic pred staranjem ali pred ostalimi patološkimi mehanizmi. Zaradi njihove posebne kemijske strukture se antocijani absorbirajo v kri v zelo majhnih količinah. Kljub temu lahko antocijani vstopijo v celice, se vežejo s tarčnimi molekulami in vplivajo na določene funkcije celic. Zaradi tega se obravnavajo kot nutraceutiki: snovi, ki so prisotne v prehrani in delujejo podobno kot zdravila.

2. BIOAKTIVNE SESTAVINE V VINU

Vino vsebuje več kot 500 snovi: vodo, etanol, sladkorje (glukozo in fruktozo), glicerol, organske kisline (vinsko, jabolčno, mlečno kislino, itd.) aromatične spojine, pektine, aminokisline, polifenole, vitamine, žveplove spojine in dušikove derivate (Soleasin sod. 1997).

Med bioaktivne sestavine spada široka skupina polifenolov (glej Preglednico 1), ki so razdeljeni na: flavonoide (antocijani, katehin, epikatehin, kvercetin idr.), neflavonoide, kot so fenolne kisline (*p*-kumarna, cimeto-va, kavna, gentizinska, ferulna in vanilinska kislina) in stilbene (resveratrol) (Waterhouse 2002).

Preglednica 1. Kemijske strukture polifenolov rdečega vina Povzeto po (Corderin sod. 2001; Waterhouse 2002; Dell'Agliin sod. 2004).

Chemical structure	Subgroup																			
FLAVONOIDS																				
	Flavanols (flavan-3-ols)																			
	<table> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>katehin (epikatehin)</td> <td>-H</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td>galokatehin (epigalokatehin)</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	katehin (epikatehin)	-H	-OH	galokatehin (epigalokatehin)	-OH	-OH										
	R ₁	R ₂																		
katehin (epikatehin)	-H	-OH																		
galokatehin (epigalokatehin)	-OH	-OH																		
	Flavonoli																			
	<table> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>kvercetin</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>miricetin</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td>kemferol</td> <td>-H</td> <td>-H</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	kvercetin	-OH	-H	miricetin	-OH	-OH	kemferol	-H	-H							
	R ₁	R ₂																		
kvercetin	-OH	-H																		
miricetin	-OH	-OH																		
kemferol	-H	-H																		
	Antocianidini																			
	<table> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cianidin</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>delfinidin</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td>peonidin</td> <td>-OCH₃</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>petunidin</td> <td>-OCH₃</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td>malvidin</td> <td>-OCH₃</td> <td>-OCH₃</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	cianidin	-OH	-H	delfinidin	-OH	-OH	peonidin	-OCH ₃	-H	petunidin	-OCH ₃	-OH	malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃	
	R ₁	R ₂																		
cianidin	-OH	-H																		
delfinidin	-OH	-OH																		
peonidin	-OCH ₃	-H																		
petunidin	-OCH ₃	-OH																		
malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃																		
NE-FLAVONOIDI																				
	Hidroksicimetne kisline																			
	<table> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>kavna k.</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>ferulna k.</td> <td>-OH</td> <td>-OCH₃</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>kumarinska k.</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>klorogenska k.</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	kavna k.	-OH	-OH	-H	ferulna k.	-OH	-OCH ₃	-H	kumarinska k.	-OH	-H	-H	klorogenska k.	-OH	-OH
	R ₁	R ₂	R ₃																	
kavna k.	-OH	-OH	-H																	
ferulna k.	-OH	-OCH ₃	-H																	
kumarinska k.	-OH	-H	-H																	
klorogenska k.	-OH	-OH																		
																				
	<table> <tbody> <tr> <td>kaftarina k.</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> </tr> </tbody> </table>	kaftarina k.	-OH	-OH																
kaftarina k.	-OH	-OH																		

Derivati benzojske kisline			
	R ₁	R ₂	R ₃
benzojska k.	-H	-H	-H
galna k.	-OH	-OH	-OH
vanilna k.	-H	-OH	-OCH ₃
protokatehuična k.	-H	-OH	-OH

Stilbenoidi			
resveratrol			

2.1 Antociani

Vinu dajejo njegovo tipično rdečo barvo antociani, pigmenti, ki so prisotni tudi v sadju in zelenjavi. To so sorazmerno velike hidrofilne molekule (molekularna masa približno 500 Da). Opisanih je bilo več kot 400 kemijskih različic. Najbolj pogosti antociani v vinu so malvidin, cianidin, peonidin, delfinidin, in petunidin, ki so vezani na eno ali dve molekuli glukoze in druge majhne molekule (estri očetne, kumarne in kavne kisline).

Znanstveni dokazi kažejo na to, da lahko živalske celice celujejo na antociane podobno kot nekatera zdravila. Namreč, po omejeni absorpciji antocianov v prebavila, le-ti potujejo v jetra in ledvice, kjer se po manjših kemijskih spremembah hitro izločijo z žolčem ali z urinom. Če gledamo na te značilnosti s fiziološko-farmakološkega vidika, se zdi, da se živalski organizmi branijo pred antociani tako, da njihovo absorpcijo omejijo na minimum in poskrbijo za njihovo hitro izločanje.

Vendar tudi majhne količine antocianov, ki preidejo v kri kmalu po tem, ko vstopijo v prebavni sistem, imajo učinke na varovanje zdravja (Hein in sod. 2012).

Poglobitev: vidiki farmakokinetike in biološke uporabnosti antocianov

Glavna značilnost antocianov je njihova omejena biološka razpoložljivost, kar pomeni, da imajo zelo nizko plazemsko koncentracijo (0.1-1 μ M) (Manachin sod. 2005). Za to je odgovorna omejena absorpcija v črevesju kot tudi hiter prehod skozi organe izločanja, čemur sledi njihovo izločanje v žolč in urin (Vanzo in sod. 2011). Nedavni po-

datki, ki so bili pridobljeni tako, da se je prostovoljcem dalo majhen odmerek (0,5 g, enakovredno 1,114 μmol) označenega ($^{13}\text{C}_5$, neškodljiv) cianidin-3-O-glukozida (C3G), kažejo na 12% biološko razpoložljivost danega odmerka. Podrobneje: 5,4 % odmerka je bilo izločenega v urinu, 6,9 % v izdihu, 32 % v fecesu (Czank, Cassidy in sod. 2013). Druga študija je preučila tudi metabolite antocianov, ki nastajajo v debelem črevesju s pomočjo bakterijske flore in se nato absorbirajo. Najbolj zastopan metabolit (s plazemsko koncentracijo 11 nmol/L) je bila protokatehnična kislina-3-O-glukuronid; sledila je hipurna kislina (1,962 nmol/L v plazmi) (de Ferrarsin sod. 2014). Predvideva se, da bi naj tudi metaboliti antocianov imeli biološke učinke v telesu.

3. UČINKI ANTOCIANOV NA ZDRAVJE

Redno in zmerno uživanje rdečega vina zmanjšuje tveganje za nastanek neurodegenerativnih, srčno-žilnih in rakavih bolezni. To se pripisuje antioksidativnim in protivnetnim lastnostim polifenolov iz rdečega vina (red wine polyphenols, RWP), vendar je potrebno razjasniti še mnogo mehanističnih podrobnosti. Zdi se namreč bolj verjetno, da ti pomembni sistemski učinki niso posledica neposredne antioksidativne aktivnosti, temveč posrednih učinkov, ki se povečujejo kaskadno. Veliko dokazov, pridobljenih z eksperimenti, kaže na to, da lahko antociani modulirajo znotrajcelične poti sporočanja, ki uravnavajo življenjske funkcije, kot sta celična proliferacija in odzivanje na zunanje dražljaje (Ndiayein sod. 2005; Calabresein sod. 2012). Antociani imajo tudi hormetične lastnosti, pri čemer v majhnih koncentracijah varujejo celice, medtem ko so pri večjih koncentracijah citotoksični (Ristow 2014).

4. UČINKI ANTOCIANOV NA MOŽGANE

Nekatere epidemiološke ugotovitve kažejo, da se pri tistih, ki vino uživajo v zmernih količinah, poslabšanje kognitivnih sposobnosti ali demenca v starosti pojavi redkeje kot pri ostalih (de Rijk in sod. 1997; Orgozo in sod. 1997; Commengesin sod. 2000). Te ugotovitve so potrjene z najnovejšimi raziskavami, v katerih je bil nadzorovan delež polifenolov v grozdju (Krikorian in sod. 2010; Krikorian in sod. 2012). Nadaljnji preskusi so bili narejeni z eksperimentalnimi modeli *in vitro* ali *in vivo* na živalih (Dajas in sod. 2003; Zhu in sod. 2007; Echeverry in sod. 2010; Basli, Soulet in sod. 2012). V znanstveni literaturi je tudi nekaj kliničnih študij, kjer so uporabili antociane kot prehranske dodatke (Albarracin in sod. 2012).

Kognitivni primanjkljaj in demenca ter Parkinsonova bolezen izvirajo iz strukturnih poškodb živčnih celic, ki jih povzroča čezmerno nastajanje reaktivnih kisikovih radikalov (ROS). Četudi se ROS tvorijo normalno in jih celica uporablja za uravnavanje nekaterih svojih osnovnih funkcij, so ti strupeni, ko je presežen določen prag. Zaščitni učinki polifenolov grozdja izvirajo iz njihove sposobnosti interakcije s celičnimi tarčami, ki sodelujejo pri: i) nadzoru odpornosti na nevrotoksine (Zhu in sod. 2007; Granzotto in Zatta 2014); ii) nadzoru endogenega tvorjenja ROS in drugih visoko reaktivnih molekul (reaktivne dušikove vrste, RNS); (Calabrese in sod. 2012); iii) posrednikov vnetja, ki spodbujajo tvorjenje ROS in RNS (Kao in sod. 2010; Spilisbury, Vauzour in sod. 2012); iv) diferenciacije in vzdražljivosti nevronov (Spencer 2008).

Poleg teh učinkov so tu še drugi, ki vplivajo na možgansko ožilje in povečujejo krvni pretok in posledično pretok kisika z aktivacijo nevrogeneze v hipokampusu, ki je ena izmed najbolj pomembnih točk za naše kognitivne funkcije (Williams in Spencer 2012).

5. VPRAŠANJE PRISOTNOSTI ANTOCIANOV V MOŽGANIH

Antociani lahko preidejo v možgane (tako v možgansko skorjo kot v male možgane) prašičev, katerih dieta je bila obogatena z borovničevimi ekstrakti (Kalt in sod. 2008). Podobni podatki so bili pridobljeni tudi s podganami (el Mohsen in sod. 2006). Znano je, da so lahko antociani absorbirani v želodcu in dosežejo možgane v nekaj minutah (Passamonti in sod. 2005). Zato se sklepa, da lahko antociani prečkajo krvno-možgansko pregrado in prodrejo v centralni živčni sistem s pomočjo specifičnih transportnih mehanizmov, ki spodbujajo njihov prehod preko bioloških membran (Ziberna in sod. 2013).

4.1 Delo v Agroturu

V okviru projekta Agrotur smo preučili prisotnost antocianov in drugih spojin, ki se tvorijo v debelem črevesju s pomočjo učinkovanja črevesne bakterijske flore, v možganih. Izvedli smo eksperimente na anesteziranih podganah s predhodno avtorizacijo skladno z evropskimi in nacionalnimi zakonskimi določbami. Eksperimenti niso živalim povzročili nobene bolečine in so bili zelo kratki (20-25 min), zaradi česar niso povzročali stresa in spreminjali fizioloških funkcij (zlasti krvno-možganske pregrade, ki loči krvni predel od možganov). Intravenozno so bile odmerjene majhne količine čistih spojin. Živalim so bili po hitri usmrčitvi odstranjeni organi in biološke tekočine, ki so bili nato podvrženi analitičnim postopkom, s katerimi se je izmerilo in opredelilo najdene spojine.

Zelo veliko analiz je bilo izvedenih na Centru za raziskave in inovacije Fundacije Edmund Mach (San Michele all'Adige, Trento), zlasti na Oddelku za kakovost hrane in prehrano (odgovorni: dr. Fulvio Mattivi), pri čemer se je koristilo tehnično infrastrukturo Metabolomske platforme (odgovorna: dr. Urška Vrhovšek).

Izsledki so navedeni v dveh znanstvenih člankih, ki bosta objavljena tekom leta 2015. Skratka, v možganih smo našli pomembno količino odmerjenih spojin, med katerimi so bili kemijsko nespremenjeni antociani in nekateri njihovi metaboliti. Posebno zanimivo je opazovanje hitrega prehoda vseh teh molekul iz krvi v možgane.

Drugi poskusi, narejeni *in vitro* in pri katerih se je uporabilo celične kulture astrocitov (celice, ki so prisotne v možganih in opravljajo podporno funkcijo hranjenja živčnih celic), so pokazali, da lahko kvercetin, (flavonoid, ki je zelo podoben antocianom), vstopi v celice preko več transportnih sistemov. Ti podatki kažejo na to, da imajo flavonoidi molekularne tarče v možganih.

4.2 Inovacija in vpliv

Rezultati teh raziskav so postregli z informacijami – ki do sedaj niso bile na voljo – o možnosti, da pigmenti vina lahko preidejo v možgane in neposredno učinkujejo na celice. Ti podatki so zelo pomembni za vino Teran, v katerem je koncentracija antocianov zelo visoka in pri katerem se skuša proizvesti grozdje, ki je še bolj bogato z antociani. Zaradi tega cilj, da se proizvede vina, ki so bogata s pigmenti, ni opravičljiv zgolj z argumenti, ki se tičejo okusa ali telesa vina ali njegove tržne vrednosti, temveč tudi z argumenti, ki so povezani z zdravjem.

Te informacije so uporabne za proizvajalce, ki se lahko zaradi boljšega poznavanja lastnosti vina bolje odločijo, kako ga izboljšati in promovirati svojim gostom.

Poznavanje osnovnih lastnosti vina in njegovega učinkovanja na človeški organizem omogoča izdelavo dobro osnovanih priporočil, kako uživati vino, da imamo od tega korist in ne škodujemo lastnemu zdravju. Zelo pomembno je, da se to sporočilo prenese na mlade, ki so izpostavljeni tveganju zlorabe alkohola.

5. PRIPOROČILA ZA UŽIVANJE VINA

Tradicionalno uživanje vina, ki ga najdemo v sredozemskih državah, ima po večini pozitivne učinke na zdravje. Značilnosti »sredozemskega« uživanja vina so naslednje: 1) zmerne količine; 2) uživanje enakomerno porazdeljeno preko tedna (majhne količine vsak dan); 3) majhne količine žganih pijač; 4) prednost se daje rdečemu vinu; 5) uživanje vina ob hrani; 6) izogibanje prekomernemu uživanju (Gea in sod. 2014).

Italijanske smernice priporočajo, da se ne preseže 24–36 g čistega etanola na dan za odraslega moškega. To ustreza 200–300 ml vina (12 % etanola) na dan. Za ženske se priporoča ne več kot 12–24 g (100–200 ml rdečega vina) na dan. Nekatere države priporočajo nekoliko višje količine, na primer Nizozemska in Španija priporočata 40 g za moške in 24 g za ženske. Po drugi strani pa imajo nekatere države nižje prage, kot na primer Danska (21 g in 14 g), Poljska (20 g in 10g) ter Slovenija (20 g in 10g). (NHMRC, 2009; Robins and British Medical Association, 1995).

6. 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 vsem vinarjem Združenja Konzorcij kraških pridelovalcev terana in Consorzia Tutela Vini Collio e Carso, ki so prispevali vzorce za analize.

7. BIBLIOGRAFIJA

- Albarracin, S. L., B. Stab, et al. (2012). »Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease.« *Nutr Neurosci* **15**(1): 1-9.
- Basli, A., S. Soulet, et al. (2012). »Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection.« *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**(2): 1-14.
- Calabrese, V., C. Cornelius, et al. (2012). »Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity.« *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1822**(5): 753-783.
- Chrysohoou, C. and C. Stefanadis (2013). »Longevity and diet. Myth or pragmatism?« *Maturitas* **76**(4): 303-7.
- Commenges, D., V. Scotet, et al. (2000). »Intake of flavonoids and risk of dementia.« *Eur J Epidemiol* **16**(4): 357-63.
- Corder, R., J. A. Douthwaite, et al. (2001). »Endothelin-1 synthesis reduced by red wine.« *Nature* **414**(6866): 863-4.
- Czank, C., A. Cassidy, et al. (2013). »Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ¹³C-tracer study.«
- Dajas, F., F. Rivera, et al. (2003). »Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids.« *Neurotox Res* **5**(6): 425-32.
- de Ferrars, R. M., C. Czank, et al. (2014). »The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans.« *Br J Pharmacol* **171**(13): 3268-82.
- de Rijk, M. C., M. M. Breteler, et al. (1997). »Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study.« *Arch Neurol* **54**(6): 762-5.
- Dell'Agli, M., A. Busciala, et al. (2004). »Vascular effects of wine polyphenols.« *Cardiovasc Res* **63**(4): 593-602.

- Di Castelnuovo, A., S. Rotondo, et al. (2002). »Meta-Analysis of Wine and Beer Consumption in Relation to Vascular Risk.« *Circulation* **105**: 2836-2844.
- Echeverry, C., F. Arredondo, et al. (2010). »Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study.« *J Agric Food Chem* **58**(4): 2111-2115.
- el Mohsen, M., J. Marks, et al. (2006). »Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats.« *The British journal of nutrition* **95**(1): 51-58.
- Gea, A., M. Bes-Rastrollo, et al. (2014). »Mediterranean alcohol-drinking pattern and mortality in the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) Project: a prospective cohort study.« *Br J Nutr* **111**(10): 1871-80.
- Granzotto, A. and P. Zatta (2014). »Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition.« *Front Aging Neurosci* **6**: 95.
- He, F., N. N. Liang, et al. (2012). »Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression.« *Molecules* **17**(2): 1571-601.
- Kalt, W., J. B. Blumberg, et al. (2008). »Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs.« *J Agric Food Chem* **56**(3): 705-12.
- Kao, T.-K., Y.-C. Ou, et al. (2010). »Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia.« *Life Sciences* **86**(9-10): 315-321.
- Krikorian, R., E. L. Boespflug, et al. (2012). »Concord Grape Juice Supplementation and Neurocognitive Function in Human Aging.« *J Agric Food Chem*.
- Krikorian, R., M. D. Shidler, et al. (2010). »Blueberry supplementation improves memory in older adults.« *J Agric Food Chem* **58**(7): 3996-4000.
- Letenneur, L. (2004). »Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results.« *Biol Res* **37**(2): 189-93.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). »Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.« *Am J Clin Nutr* **81**(1): 230S-42S.
- Ndiaye, M., M. Chataigneau, et al. (2005). »Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery.« *FASEB J* **19**(3): 455-7.
- Orgogozo, J. M., J. F. Dartigues, et al. (1997). »Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area.« *Rev Neurol (Paris)* **153**(3): 185-92.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2005). »Fast access of some grape pigments to the brain.« *J Agric Food Chem* **53**(18): 7029-34.
- Ristow, M. (2014). »Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits.« *Nat Med* **20**(7): 709-11.
- Soleas, G. J., E. P. Diamandis, et al. (1997). »Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention.« *J Clin Lab Anal* **11**(5): 287-313.
- Spencer, J. P. E. (2008). »Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance.« *Proc Nutr Soc* **67**(2): 238-252.
- Spilsbury, A., D. Vauzour, et al. (2012). »Regulation of NF- κ B activity in astrocytes: effects of flavonoids at dietary-relevant concentrations.« *Biochemical and biophysical research communications* **418**(3): 578-583.

- Vanzo, A., U. Vrhovsek, et al. (2011). »Exceptionally Fast Uptake and Metabolism of Cyanidin 3-Glucoside by Rat Kidneys and Liver.« *Journal of natural products*.
- Waterhouse, A. L. (2002). »Wine phenolics.« *Ann N Y Acad Sci* **957**: 21-36.
- Williams, R. J. and J. P. Spencer (2012). »Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease.« *Free Radic Biol Med* **52**(1): 35-45.
- Zhu, J. T. T., R. C. Y. Choi, et al. (2007). »Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: a comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing beta-amyloid-induced cell death.« *J Agric Food Chem* **55**(6): 2438-2445.
- Ziberna, L., S. Fornasaro, et al. (2013). *Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters*. R. R. Watson, V. R. Preedy and S. Zibadi. San Diego, Academic Press: 489-511.

KAKO LAHKO IZBOLJŠAMO KAKOVOST GROZDJA SORTE REFOŠK – PREGLED PETIH RAZLIČNIH AMPELOTEHNIČNIH UKREPOV

Paolo SIVILOTTI¹, Lorena BUTINAR², Branka ŠKVARČ³,
Martina SOBAN⁴, Adrian MONTEZ GUTIÉRREZ⁵,
Marina KOBAXHIDZE⁶, Andreja VANZO⁷, Klemen LISJAK⁸

1, 2, 3, 4, 5 Univerza v Novi Gorici, Center za raziskave vina
6 Batumi Shota Rustaveli State University, Batumi, Georgia
7, 8 Kmetijski inštitut Slovenije

¹ izr. prof. dr.

² doc. dr.

⁶ dr.

⁷ izr. prof. dr.

⁸ dr.

IZVLEČEK

Na območju vinorodnega okoliša Kras je bilo zasnovanih pet različnih terenskih poskusov, s katerimi smo želeli preveriti, kako določeni ampelotehnični ukrepi vplivajo na boljšo kakovost grozdja sorte Refošk (*Vitis vinifera* L.). Vsa ampelotehnična dela so imela vpliv na razmerje med listno površino in maso pridelka; nižji pridelek, pridobljen pri zgodnjem odstranjevanju listov, redčenju grozdov in vršičkanju ter pri zmernem do močnem vodnem stresu, se je pokazal kot učinkovit dejavnik pri izboljšanju osnovnih parametrov dozorevanja grozdja in na kopičenju fenolov v grozdnih jagodah.

Ključne besede: Refošk, redčenje grozdov, vršičkanje, zgodnje odstranjevanje listov, razmerje med listno površino in maso pridelka, suša, polifenoli, antociani.

How we can improve the quality of grapes cv. refošk – overview of five different ampelotechnic trials

ABSTRACT

In the area of Karst, five experiments were set up with the aim to find out how selected viticultural techniques could impart an improvement in grape quality. All techniques had an effect over the ratio between leaf area and yield. The crop reduction, obtained both by pre-flowering leaf removal, cluster thinning or shoot thinning and moderate-to-strong water stress demonstrated to be really effective in order to improve the basic maturation but also the accumulation of phenolics in the grape berries.

Keywords: Refošk, cluster thinning, shoot thinning, pre-flowering leaf removal, leaf area-to-yield rate, drought, polyphenols, anthocyanins

1. UVOD

Vinogradniki po vsem svetu ugotavljajo, da je uravnovešenost rastline temeljnega pomena, če želimo pridelati grozdje najboljše kakovosti. Z namenom doseči najboljše razmerje med listno površino (vir ogljikovih hidratov) in maso pridelka (kjer se kopičijo metaboliti), je bilo opravljenih že veliko poskusov. Med indeksi, ki jih uporabljajo raziskovalci, se razmerje med listno površino in maso pridelka uporablja najpogosteje. Po navedbah Kliewerja in Dokoozliana (2005) je območje med 0,8 in 1,4 m²/kg optimalno za večino sort in gojitvenih oblik. Kmalu za tem so Reynolds in sod. (2007) ugotovili, da gojitvena oblika vpliva na liste, ki so izpostavljeni svetlobi in zasenčeni, pa tudi na celotno fotosintetsko aktivnost vinske trte. Tako določena gojitvena oblika neposredno vpliva na optimalno razmerje med listno površino in maso pridelka in je lahko bolj ali manj učinkovita glede na izpostavljenost listov sončni svetlobi. Pri grozdih, izpostavljenih sončni svetlobi, se pojavijo spremembe tako v primarnem kot sekundarnem metabolizmu grozdne jagode.

Vsebnost suhe snovi (Zoecklein in sod., 1992; Bergqvist in sod., 2001), antocianov in drugih flavonoidov (Sternad Lemut in sod. 2013, Lee in Skinkis 2013) se v grozdju poveča pri tistih trtah, ki so bolj izpostavljene sončnemu obsevanju. Kako lahko izboljšamo izpostavljenost grozdja sončnemu obsevanju? Kot smo že omenili, z določeno gojitveno obliko lahko zmanjšamo osenčenost listov in povečamo izpostavljenost grozdov sončni svetlobi. To najlažje dosežemo tako, da tako pri šparonski kot

pri kordonski gojitveni obliki opravimo odstranjevanje listov v predelu grozdja.

Glede na razmerje med listno površino in maso pridelka je znano, da prihaja pri mnogih sortah do problemov preobremenitve s pridelkom (Guidoni in sod., 2002; Dami in sod., 2006). Pri takih pogojih Zoecklein in sod. (1992) navajajo, da neugodno razmerje med listno površino in maso pridelka lahko privede do nižje vsebnosti sladkorjev v grozdnih jagodah v času trgatve. Večina vinogradnikov se zato zaveda, da morajo v času rastne sezone uravnnavati količino pridelka z redčenjem grozdov in s tem izboljšati razmerje med grmom vinske trte (listno površino) ter maso pridelka. Redčenje grozdov je glavna vinogradniška tehnika za direktno zmanjšanje pridelka in boljšo akumulacijo sladkorjev ter fenolov v grozdne jagode (Reynolds in sod., 1989; Bubola in sod. 2011). Predpostavljamo, da je glavni učinek redčenja grozdov kompenzacija med zmanjšanim številom grozdov in večjo povprečno težo grozda (Sivilotti in Lavrenčič, 2010), vendar ta učinek v praksi ni vedno potrjen (Gatti in sod., 2012 a).

V zadnjem desetletju nekateri predlagajo (Tardaguila in sod., 2008; Poni in sod., 2009; Palliotti in sod., 2012) še drugi način za doseganje znižanja mase pridelka, in sicer izvedbo odstranjevanja listov v predelu grozdja pred cvetenjem. Caspari in sod. (1998) razlagajo, da odstranjevanje listov pred cvetenjem zniža vsebnost razpoložljivih ogljikovih hidratov za nastavek cvetov. Posledica so manj zbiti grozdi in s tem nižji pridelek ter zaradi zadnjega tudi višja vsebnost flavonoidov. Sternad Lemut in sod. (2013), Lee in Skinkis (2013) ter Diago in sod. (2012) so opazili višje koncentracije flavonoidov – predvsem flavanolov – pri grozdnih jagodah, ki so bile izpostavljene ukrepu odstranjevanja listov pred cvetenjem. Drugače pa ugotavljajo Gatti in sod. (2012a), ki navajajo, da odstranjevanje listov pred cvetenjem lahko vpliva na višjo vsebnost titracijskih kislin v grozdju v času trgatve; ta podatek je pomemben z vidika globalnega segrevanja ozračja, ker višje temperature dramatično vplivajo na znižanje skupnih kislin.

Nazadnje naj omenimo še vršičkanje, tehniko, s katero lahko uravnava-mo maso pridelka vinske trte. Vršičkanje zgodaj v rastni sezoni izboljša fotosintetsko aktivnost listne površine in mikroklimo v predelu grozdja ter izpostavljenost listov sončni svetlobi. Tudi ta ukrep lahko uporabimo, ko želimo zmanjšati maso pridelka in s tem povečati kakovost grozdja (Gatti in sod., 2012 b).

Na osnovi pregleda različnih tehnik smo v sezonah 2012 in 2013 zasnovali pet terenskih poskusov v vinorodnem okolišu Kras, z namenom preučiti učinek različnih ampelografskih tehnik na maso pridelka in kakovost grozdja ter vina pri sorti Refošk (*Vitis vinifera* L.).

2. MATERIALI IN METODE

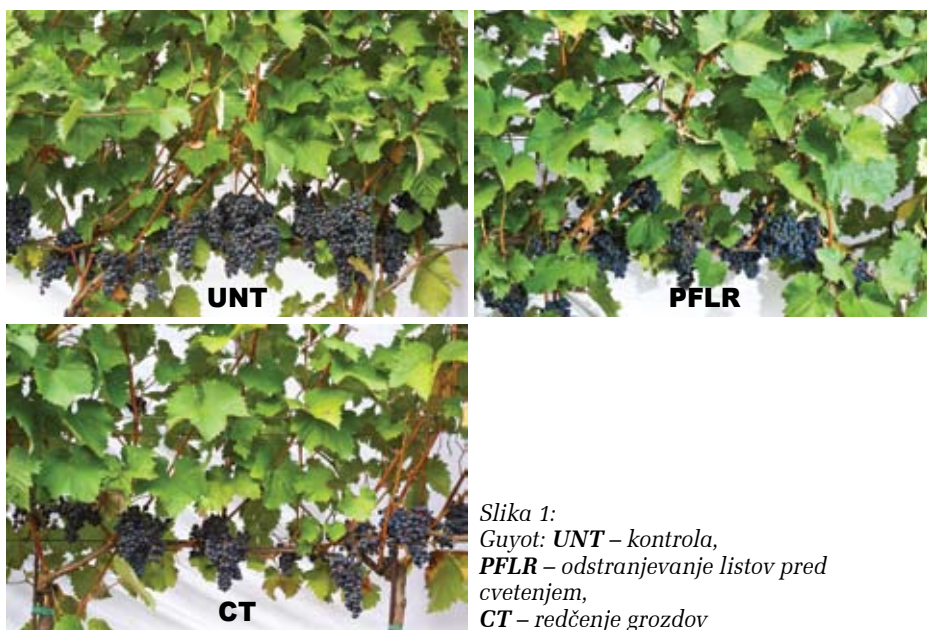
V okviru projekta AGROTUR je bilo v sezonah 2012 in 2013 na območju vinorodnega okoliša Kras zasnovanih pet poskusov. Kot smo že poročali (Sivilotti in sod., 2012), je bil namen poskusov ugotoviti, kako štiri različni ampelotehnični ukrepi vplivajo na razmerje med listno površino in maso pridelka ter posledično na kakovost grozdja in vina sorte Refošk.

Preglednica 1: opis vinogradniških poskusov

POSKUS	KRAJ	SEZONA IN CILJ	GOJITVENA OBLIKA	AMPELOTEHNIČNI UKREP	
1	Dutovlje	Kako znižanje mase pridelka z ukrepoma PFLR in CT vpliva na dozorevanje grozdja (2012–13)	Guyot	1. UNT , kontrola 2. PFLR , zgodnje odstranjevanje listov izvedeno 10 dni pred cvetenjem (25. 5. 2012; 28. 5. 2013). Na vsaki mladiki je bilo odstranjenih 4–5 bazalnih listov. 3. CT , redčenje grozdov ob začetku obarvanja grozdnih jagod (2. 8. 2012; 21. 8. 2013).	
2		Kako gojitvena oblika (tradicionalni latnik ali guyot) in redčenje grozdov vplivajo na kakovost grozdja ob trgatvi (2012)	Latnik in guyot	1. Guyot UN 2. Guyot CT , redčenje grozdov ob začetku obarvanja grozdnih jagod (2. 8. 2012). 3. Latnik UNT 4. Latnik CT , redčenje grozdov ob začetku obarvanja grozdnih jagod (2. 8. 2012).	
3		Kako redčenje mladik vpliva na nižji pridelek in boljše kakovost grozdja (2012)		1. UNT , kontrola. 2. SH , redčenje mladik: vsako drugo mladiko ('oko') se odstrani takoj po brstenju (ko dosežejo 3–10 cm); redčenje dvojnih mladik in pregostih mladik 'v glavi' vinske trte.	
4		Komen	Ugotoviti razmerje med listno površino in maso pridelka, ki je povezano s kakovostjo grozdja (2012)	Guyot	1. FCFB (brez vršičkanja – vsi grozdi), kontrola, celotna listna površina, vsi grozdi. 2. FCHB (brez vršičkanja – zredčeni grozdi), celotna površina, polovica grozdov je bila zredčenih ob začetku obarvanja grozdnih jagod (1. 8. 2012). 3. HCFB (vršičkanje – vsi grozdi), odstranjene 40 % listne površine ob začetku obarvanja grozdnih jagod (1. 8. 2012), prisotni vsi grozdi na trsu. 4. HCHB (vršičkanje – zredčeni grozdi), odstranjene 40 % listne površine in polovica grozdov ob začetku obarvanja grozdnih jagod (1. 8. 2012).
5		Krajna vas	Kako vpliva vodni stres na dozorevanje grozdja (2012)	Guyot	1. MS (zmeren do močan vodni stres). 2. SS (močan do zelo močan vodni stres).

V primeru poskusa št. 1 smo določili relativne spremembe mase pridelka in osnovnih kakovostnih parametrov grozdja. Vsebnost skupnih antocijanov smo določili v času trgatve po metodi Mattivi in sod. (2006). Sešteli smo vsoto di-, tri-, OH- in CH₃-substituiranih antocijanov.

V poskusih št. 2, 4 in 5 smo želeli preučiti vpliv različnih ampelotehničnih ukrepov na osnovne tehnološke parametre grozdja. Za določanje vsebnosti skupnih polifenolov in antocijanov v času dozorevanja, pri poskusu št. 2 in 4, smo uporabili metodo po Ilandu (2004), medtem ko smo pri poskusih št. 3 in 5 izvedli analize nizkomolekularnih (LMWP) in visokomolekularnih proanocijanidinov (HMWP) po metodi Riga in sod. (2000).





*Slika 3:
SH, redčenje mladik: vsako drugo
mladiko se odstrani takoj po brstenju;
redčenje dvojnih mladik in pregostih
mladik 'v glavi' vinske trte.*



FCFB



FCHB



HCFB



HCHB

*Slika 4:
Listna površina/
masa pridelka:
FCFB – brez
vršičkanja, vsi
grozdi; **FCHB** –
brez vršičkanja,
zredčeni grozdi;
HCFB – vršičkanje,
vsi grozdi;
HCHB –
vršičkanje,
zredčeni grozdi.*



Slika 5: vodni stres: MS – zmeren do močan, SS – močan do zelo močan.

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Zgodnje odstranjevanje listov (PFLR) v primerjavi z redčenjem grozdov (CT)

Kot so že ugotovili Sivilotti in sod. (2012), oba ampelotehnična ukrepa, PFLR in CT, prispevata k nižji masi pridelka in tako k boljšemu razmerju med listno površino ter maso pridelka. Na rezultate, pridobljene v letih 2012 in 2013, so precej vplivali vremenski dejavniki v času rastne sezone. V letu 2013 je bila namreč povprečna pridelava nižja, tako da prednosti ukrepa redčenja grozdov niso prišle do izraza, ravno tako je bil učinek zgodnjega odstranjevanja listov (PFLR) precej manjši v letu 2013 v primerjavi z letom 2012.

V sezoni 2012 je bil jasno opažen vpliv ukrepa PFLR na maso grozda in vpliv ukrepa CT na število grozdov (preglednica 2). Razlike so bile opazne tako pri količinskih parametrih pridelka, kot tudi pri osnovnih kakovostnih fizikalno-kemijskih parametrih grozda. V sezoni 2012 je prišlo v primeru izvedenega ukrepa CT do višje vsebnosti skupnih suhih snovi in nižje titracijske kisline v primerjavi s kontrolo (UNT), kjer ni bilo izvedenega tretiranja. Podoben, a ne tako izrazit učinek smo opazili tudi v primeru izvedenega ukrepa PFLR. V sezoni 2013 pri obeh ukrepih, CT in PFLR, nismo opazili tako očitnega vpliva, oziroma je bilo pri ukrepu CT opaziti celo nasprotni trend.

Preglednica 2 – Razlika v odstotkih med količinskimi parametri pridelka in osnovnimi kakovostnimi parametri pri ukrepih redčenja grozdov (CT) in zgodnjega odstranjevanja listov (PFLR) v primerjavi s kontrolo (UNT) v sezonah 2012 in 2013.

leto	primerjava	število grozdov	teža grozda	masa pridelka	suha snov (Brix)	titracijske kisline	pH
2012	CT vs. UNT	-34 %	-8 %	-40 %	+17 %	-21 %	+4 %
	PFLR vs. UNT	-8 %	-41 %	-40 %	+3 %	-4 %	+4 %
2013	CT vs. UNT	-9 %	-6 %	-14 %	-15 %	-5 %	-3 %
	PFLR vs. UNT	+8 %	-25 %	-22 %	+1 %	-3 %	+1 %

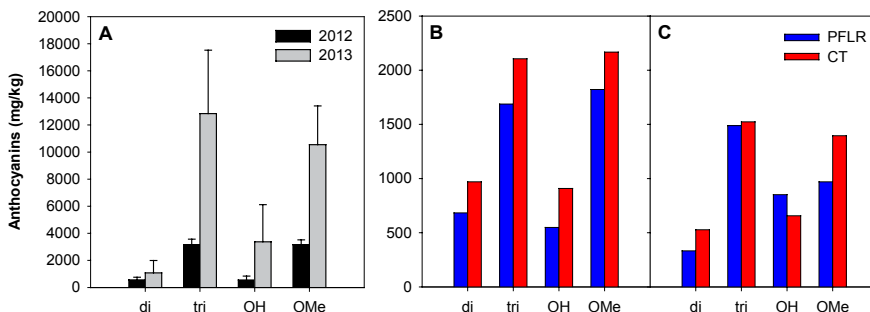
V primeru obeh ukrepov, CT in PFLR, je prišlo do zvišanja koncentracije antocianov in koncentracije taninov v grozdnih pečkih ter jagodnih kožicah. V pečkih smo opazili znatno povišane vsebnosti taninov (LMWP in HMWP), v jagodnih kožicah pa je bila pri ukrepu PLFR višja koncentracija visokomolekularnih (HMWP) in nizkomolekularnih (LMWP) proantocianidinov v primerjavi s kontrolo (UNT) (preglednica 3). Ti rezultati kažejo, da ukrep PFLR pomembno vpliva na povišanje koncentracije taninov v grozdju. Lahko bi predstavljal pomembno vinogradniško tehniko za zvišanje koncentracije taninov v grozdju pri sorti Refošk.

Preglednica 3 – Razlika v odstotkih med nizkomolekularnimi (LMWP) in visokomolekularnimi proantocianidini (HMWP) in skupnimi antociani v jagodnih kožicah ter grozdnih pečkih v času trgatve; in sicer pri ukrepih redčenja grozdov (CT) ter zgodnjega odstranjevanja listov (PFLR) v primerjavi s kontrolo (UNT) v sezoni 2012.

	kožice grozdne jagode (mg/kg)			pečke grozdne jagode (mg/kg)		
	LMWP	HMWP	skupni antociani	LMWP	HMWP	
2012	CT vs. UNT	-0,8 %	+107 %	+33 %	+99 %	+127 %
	PFLR vs. UNT	+75 %	+133 %	+65 %	+199 %	+290 %

Koncentracija skupnih prostih antocianov je bila podobna v primeru ukrepa redčenja grozdov (CT) in zgodnjega odstranjevanja listov (PFLR), v obeh primerih je bila višja tudi v primerjavi s kontrolo (UNT). Pri obeh ukrepih je prišlo do razlik v sestavi antocianov, in sicer do višje vsebnosti tri- in OCH₃-substituiranih monomerov v primerjavi s kontrolo. Ta sprememba v sestavi antocianov nakazuje, da je verjetno prišlo do premika v biosintezi antocianov, ki sta ga sprožila ukrep odstranjevanja listov in redčenja grozdov.

Slika 6: Podatki o antocianinih v grozdu pri kontroli (UNT) v sezonah 2012 in 2013 (A). Povečana koncentracija antocianinov v grozdu pri ukrepih zgodnjega odstranjevanja listov (PFLR) in redčenja grozdov (CT) v primerjavi s kontrolo (UNT) v sezoni 2012 (B) in 2013 (C). Di-, tri-, OH-, in OCH₃-substituirani antociani. Na stolpcih so prikazani standardni odkloni (n = 4).



3.2 Primerjava gojitvenih oblik latnik in guyot

Gojitvena oblika je ključnega pomena za produktivnost vinske trte in kakovost grozda. Latnik omogoča večjo produktivnost zaradi večje obremenitve trte ob zimski rezi, po drugi strani pa so listi bolj optimalno razporejeni in tako bolj fotosintetsko učinkoviti v primerjavi z gojitveno obliko guyot, kjer je listna površina bolj ozko in vertikalno omejena.

Vzorčenje za osnovne kakovostne parametre in skupne polifenole je bilo izvedeno 12. septembra 2012 (15 dni pred trgatvijo). Kot pričakovano, je ukrep redčenja grozda pri obeh gojitvenih oblikah vplival na večjo težo grozdnih jagod in večjo vsebnost suhih snovi ter znižal vsebnost titracijskih kislin (preglednica 4). Pri gojitveni obliki guyot je ukrep redčenja grozdov vplival na precejšnje povečanje vsebnosti suhe snovi (iz 16.4 na 19.2 °Brix), pri latniku pa na znatno znižanje vsebnosti titracijskih kislin (iz 17.5 na 14.3 g/l) (preglednica 4). Na podlagi rezultatov osnovnih kakovostnih parametrov sklepamo, da je bilo pri gojitveni obliki latnik razmerje med listno površino in maso pridelka neuravnovešeno, ker je bila masa pridelka prevelika (podatek ni na razpolago). Tudi v primeru ukrepa redčenja grozdov je bilo kopičenje sladkorjev omejeno. Nasprotno pa je manjša masa pridelka pri gojitveni obliki guyot omogočila večje povišanje vsebnosti suhe snovi (sladkorjev), kar pomeni, da je bilo s to gojitveno obliko doseženo dobro razmerje med listno površino in maso pridelka.

Pri polifenolih smo opazili drugačno sliko. Pri ukrepu redčenja grozdov je prišlo pri obeh gojitvenih oblikah, latnik in guyot, do povišane kon-

centracije antocianov in skupnih polifenolov, s tem da je bila najvišja koncentracija antocianov določena pri gojitveni obliki guyot ter najvišja koncentracija skupnih polifenolov pri gojitveni obliki latnik (preglednica 4). Na podlagi dobljenega sklepanja, da je masa pridelka vplivala na dozorevanje grozdja (zadnje je bilo kasnejše pri latniku). Na latniku je grozdje manj izpostavljeno soncu, zato je temperatura grozdov navadno nižja kot pri vzgojni obliki guyot. Zato je verjetno prišlo do večjega kopičenja antocianov v grozdnih jagodah pri vzgojni obliki latnik.

Preglednica 4 – Vpliv gojitvene oblike na maso grozdnih jagod, osnovne kakovostne parametre, antociane (ant.) in skupne polifenole (pol.) pri kontroli (UNT) in redčenju grozdov (CT) v sezoni 2012.

obravnava		teža grozdnih jagod (g)	skupne suhe snovi (°Brix)	titracijs- ke kisline (g/L)	pH	ant. (mg/kg)	pol. (mg/kg)
guyot	UNT	159	16,4	13,5	2,80	1218	1512
	CT	169	19,2	12,1	2,95	2023	1754
CT vs. UNT		+6 %	+17 %	-10 %	+5 %	+66 %	+16 %
latnik	UNT	147	15,9	17,5	2,89	1461	1607
	CT	153	16,8	14,3	2,90	1803	1884
CT vs. UNT		+4 %	+6 %	-18 %	+4 %	+23 %	+17 %

3.3 Redčenje mladik

Z redčenjem vsake druge mladike po brstenju ter odstranitvijo dvojnih mladik na začetku rastne sezone smo dosegli zmanjšanje potencialnega števila mladik. Glede na različne komponente listne površine smo znatno zmanjšali število glavnih mladik na rastlino. Ker je bilo manj mladik na rastlino kot je to običajno za sorto Refošk, ni prišlo do kompenzacije na račun lateralne rasti (rasti zalistnikov) (preglednica 5). S tem smo skupno listno površino znižali za 25 %. Zračen grm vinske trte, kjer je bilo izvedeno redčenje mladik (ST), je tako imel manj zasenčenih listov in zato bolj fotosintetsko učinkovite liste. Pri ST-obravnavi smo v primerjavi s kontrolo (UNT), kjer ni bil izveden ukrep, opazili 14% povečanje vsebnosti suhe snovi (°Brix) (preglednica 5). V primerjavi s kontrolo (UNT) je bila masa pridelka pri tem ukrepu za 17 % manjša, predvsem zaradi zmanjšanja števila grozdov (-14 %) in ne zaradi kompenzacije preko povečane povprečne mase grozdov (+4 %). Povprečna masa grozdnih jagod je bila pri ST-obravnovanju večja (+59 %) (preglednica 5).

Preglednica 5 – Vpliv redčenja mladik (ST) v primerjavi s kontrolo (UNT) na listno površino (LP) in količinske parametre pridelka v sezoni 2012.

ampelo-tehnični ukrep	LP zalistniki (m ²)	LP glavne mladike (m ²)	skupna LP (m ²)	število grozdov	povprečna masa grozda (g)	masa pridelka (kg/trto)	masa 100 jagod (g)	skupna suha snov (Brix)
UNT	1,62	2,13	3,75	12,6	292	3,69	121,29	18,3
ST	1,59	1,23	2,82	10,5	303	3,18	192,96	20,9
ST vs. UNT	-2 %	-42 %	-25 %	-17 %	+4 %	-14 %	+59 %	+14 %

Zmanjšanje mase pridelka po trsu (na račun izvedbe ukrepa redčenja mladik (ST)), je bilo pozitivno tudi z vidika izboljšane sestave ekstrabilnih polifenolov v času trgatve. V preglednici 6 lahko opazimo precejšnje povečanje nizkomolekularnih (za 36 % v jagodnih kožicah in 6 % v grozdnih pečkih) in visokomolekularnih proantocianidinov (za 17 % v jagodnih kožicah in grozdnih pečkih) v obravnavanju ukrepa redčenja mladik (ST) (preglednica 6). Prav tako se je v primerjavi s kontrolo (UNT) zaradi ukrepa redčenja mladik (ST) povečala vsebnost antocianov (za 17 %) (preglednica 6).

Preglednica 6 – Vpliv redčenja mladik na sestavo nizkomolekularnih proantocianidinov (LMWP), visokomolekularnih proantocianidinov (HMWP) in skupnih antocianov v jagodnih kožicah ter grozdnih pečkih v sezoni 2012.

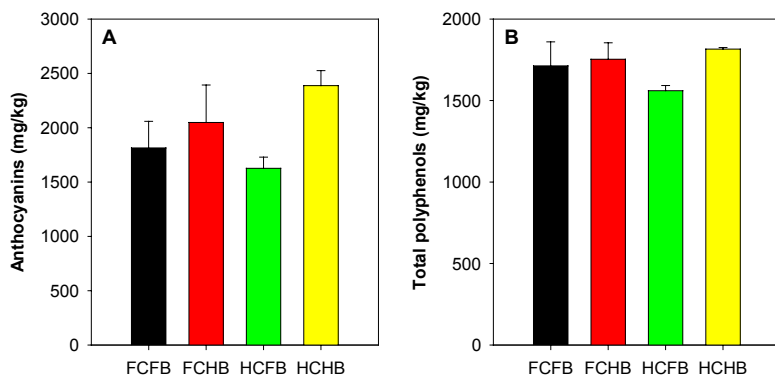
	jagodne kožice (mg/kg)			grozдне pečke (mg/kg)	
	LMWP	HMWP	antociani	LMWP	HMWP
UNT	252	1782	448	526	603
ST	343	2079	522	556	703
ST vs. UNT	+36 %	+17 %	+17 %	+6 %	+17 %

Tako kot za ukrep zgodnjega odstranjevanja listov in redčenja grozdov, smo tudi za ukrep redčenja mladik po brstenju ugotovili, da pride do povišanja vsebnosti proantocianidinov v jagodni kožici, kar pomembno vpliva na boljšo senzorično kakovost vina.

3.4 Vpliv razmerja med listno površino in maso pridelka

V povezavi s poskusom št. 4 je bila večina podatkov o osnovnih kakovostnih parametrih in količinskih parametrih pridelka že predstavljenih v prispevku Sivilotti in sod. (2012) ter diplomskem delu Tronkarja (2014). Če primerjamo različna obravnavanja, pridemo do zaključka, da ukrep

redčenja grozdov izboljša kopičenje antocianov v grozdju tako pri vršičkanih kot nevršičkanih trsih. Med vsemi obravnavanji se je le ukrep HCFB (vršičkanje – vsi grozdi) izkazal kot precej neuravnovešen, zato je bila koncentracija antocianov in skupnih polifenolov pri tem ukrepu precej nižja (slika 7).



Slika 7 – Koncentracija ekstrabilnih antocianov (A) in ekstrabilnih skupnih polifenolov (B) v grozdnih jagodah ob trgatvi. Na stolpcih so prikazani standardni odkloni ($n=3$). FCFB – brez vršičkanja, vsi grozdi; FCHB – brez vršičkanja, zredčeni grozdi; HCFB – vršičkanje, vsi grozdi; HCHB – vršičkanje, zredčeni grozdi.

Pri obravnavanju (FCHB), kjer je bil izveden le ukrep redčenja grozdov brez vršičkanja, smo opazili precej višje koncentracije proantocianidinov v grozdnih pečkah, medtem ko opaznih razlik glede proantocianidinov v jagodnih kožicah ni bilo (preglednica 7). Koncentracija proantocianidinov v jagodnih kožicah je bila pri nevršičkanih trsih višja v primerjavi z vršičkanimi trsi, ne glede na to, ali je bilo izvedeno redčenje grozdov. Pri trtah, kjer je bilo izvedeno vršičkanje in redčenje grozdov, je bila koncentracija proantocianidinov nižja tako v jagodnih kožicah kot v grozdnih pečkah. Vzrok bi lahko bila bolj uravnovešena trta z zmanjšano rastjo (bujnostjo) in s tem hitrejšim dozorevanjem grozdja ter znižano vsebnostjo taninov.

Preglednica 7 – Sestava in primerjava nizkomolekularnih proantocianidinov (LMWP), visokomolekularnih proantocianidinov (HMWP) v jagodnih kožicah in grozdnih pečkah v času trgatve zaradi zmanjšanja grma vinske trte in mase pridelka (FCFB – brez vršičkanja, vsi grozdi; FCHB – brez vršičkanja, zredčeni grozdi; HCFB – vršičkanje, vsi grozdi; HCHB – vršičkanje, zredčeni grozdi) v sezoni 2012.

		jagodne kožice (mg/kg)		grozдне pečke (mg/kg)	
		LMWP	HMWP	LMWP	HMWP
brez vršičkanja	FB	413 ± 33	2065 ± 167	246 ± 34	301 ± 42
	HB	409 ± 33	2171 ± 176	395 ± 55	488 ± 68
FCHB vs. FCFB		-1 %	+5 %	+61 %	+62 %
vršičkanje	FB	384 ± 31	1878 ± 152	401 ± 56	491 ± 68
	HB	348 ± 28	1397 ± 113	286 ± 40	329 ± 46
HCHB vs. HCFB		-9 %	-26 %	-29 %	-33 %

3.5 Vpliv vodnega stresa

Večina podatkov, ki se nanašajo na osnovne kakovostne parametre in sestavo polifenolov v času trgatve, je bilo že predstavljenih v Sivilotti in sod. (2014). Med zmernim in močnim vodnim stresom (MS) ter močnim do zelo močnim vodnim stresom (SS) ni bilo opaziti bistvenih razlik pri osnovnih kakovostnih parametrih. V primeru skupnih polifenolov pa se je močni vodni stres odražal v višjih koncentracijah proantocianidinov v jagodi kožici in nižjih koncentracijah proantocianidinov v grozdnih pečkah. Kot smo že omenili, se moramo izogibati prenizki vsebnosti taninov v grozdnih pečkah, saj je minimalna koncentracija taninov potrebna za doseganje harmoničnosti vina.

Preglednica 8 – Razlika v odstotkih med nizkomolekularnimi proantocianidini (LMWP) in visokomolekularnimi proantocianidini (HMWP) v jagodnih kožicah ter grozdnih pečkah v času trgatve, pod vplivom srednjega do močnega vodnega stresa (MS) in močnega do zelo močnega vodnega stresa (SS), v sezoni 2012.

stres	jagodne kožice		grozдне pečke	
	LMWP	HMWP	LMWP	HMWP
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
SS vs. MS	+29,3 %	+72,6 %	-30,6 %	-34,4 %

4. ZAKLJUČEK

Uvajanje različnih tehnik za upravljanje grma vinske trte pri sorti Refošk na območju vinorodnega okoliša Kras je privedlo do pomembnih učinkov na dozorevanje grozdja, predvsem na polifenolne spremembe v jagodnih kožicah in grozdnih pečkah. Ključnega pomena za zagotavljanje boljše kakovosti grozdja in posledično vina je optimalno razmerje med listno površino in maso pridelka (uravnovešena rastlina). V terenskih poskusih, ki so bili opravljeni v letih 2012 in 2013, so vse izvedene tehnike dosegle cilj: z zmanjšanjem mase pridelka je prišlo do pozitivnega vpliva na »polifenolno« in »taninsko« kakovost grozdja. Ker je ukrep zgodnjega odstranjevanja listov (PFLR) pomembno vplival na povišano vsebnost taninov (v jagodnih kožicah in grozdnih pečkah) v grozdju, je lahko uporaben za povišanje vsebnosti taninov in povečanje potenciala staranja vin. Gojitvena oblika guyot je pokazala boljše rezultate v primerjavi s tradicionalnim latnikom, vendar z zmanjšanjem mase pridelka lahko precej izboljšamo kakovost grozdja pri gojitveni obliki latnik. Z redčenjem mladik po samem brstenju ter odstranjevanjem dvojnih mladik v začetku sezone je prišlo do boljše kakovosti grozdja zaradi povišane vsebnosti suhe snovi in taninov v jagodnih kožicah. Tanini iz jagodnih kožic imajo boljše senzorične lastnosti, zato se ta ukrep priporoča pri pridelavi grozdja sorte Refošk. Pri vodnem stresu je pomembno, da se izognemo ekstremnim razmeram, saj negativno vplivajo na sestavo polifenolov. Zaradi vseh naštetih učinkov obstajajo možnosti za nadaljnjo uporabo teh ampelotehničnih ukrepov - tehnik na območju vinorodnega okoliša Kras, z namenom izboljšati kakovost vina Teran in mu s tem zagotoviti večji sloves pri potrošniku doma ter v tujini.

5. ZAHVALE

Zahvaljujemo se kmetijam Lisjak, Vodopivec in Štoka ter podjetju Vinakras, d. o. o.: za pomoč in sodelovanje pri poskusih. 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.

6. LITERATURA

- Bergqvist, J.; Dokoozlian, N.K.; Ebisuda, N. 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 1–7.
- Bubola, M.; Peršurić, Đ.; Kovačević Ganić, K. 2011. Impact of clusterthinning on productive characteristics and winephenolic composition of cv. Merlot. *Journal of Food Agriculture & Environment* 9: 36–39.
- Caspari, H. W.; Lang, A.; Alspach, P. 1998. Effects of Girdling and Leaf Removal on Fruit Set and Vegetative Growth in Grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 359–366.
- 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.
- Diago, M. P.; Ayestaran, B.; Guadalupe, Z.; Poni S.; Tardaguila J. 2012. Impact of prebloom and fruit set basal leaf removal on the flavonol and anthocyanin composition of Tempranillo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63: 367–376.
- Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S. 2012a. Effects of Cluster Thinning and Preflowering Leaf Removal on Growth and Grape Composition in cv. Sangiovese. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63: 325–332.
- Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi S.; Merli, M.C.; Poni, S. 2012. Scacchiatura della vite, effetti e scelte in funzione della produzione. *Informatore agrario*, 64: 38–42.
- 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.
- Iland, P.; Bruer, N.; Edwards, G.; Caloghris, S.; Wilkes, E. 2004. *Chemical Analysis of Grapes and Wine Techniques and Concepts*. 118 pp. 2nd Edition. P. Iland Wine Promotions Pty Ltd. Adelaide, Australia.
- Kliwer, 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.
- Lee, J.; Skinkis, P. 2013. Oregon "Pinot noir" grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chemistry*, 139: 893–901.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. and Velasco, R., (2006) Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7692–7702.
- Palliotti, A.; Gardi, T.; Berrios, J. B.; Civardi, S.; Poni, S. 2012. Early source limitation as a tool for yield control and wine quality improvement in a high-yielding red *Vitis vinifera* L. cultivar. *Scientia Horticulturae*, 145: 10–16.
- 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.
- Reynolds, A. G.; Schlosser, J.; Sorokowsky, D.; Roberts, R.; Willwerth, J.; de Savigny, C. 2007. Magnitude of Viticultural and Enological Effects. II. Relative Impacts of Cluster Thinning and Yeast Strain on Composition and Sensory Attributes of Chardonnay Musqué. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 25–41.
- Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovšek U., Mattivi F. 2000.

- Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 48(6): 1996–2002.
- Sivilotti, P., Butinar, L., Jež, A., Šuklje, K., Vanzo, A. and Lisjak, K. 2014. Stress idrico nei vigneti del Carso ed effetti sulla qualità delle uve. In *Kraško okolje*. K. Lisjak & L. Butinar (Eds.). 53–63. Vipava, Slovenia.
- Sivilotti, P.; Butinar, L.; Jež, A.; Tronkar, J.; Turk, M.; Vanzo, A.; Lisjak, K. 2012. Odkrivanje učinkov vinogradniških tehnologij pri sorti Refošk. In *"Bioaktivne spojine terana"*. K. Lisjak (Ed.). 15–27. Ljubljana, Slovenia.
- Sivilotti, P.; Lavrenčič, P. 2010. Vpliv obremenitve in različnega termina trgatve na kemično sestavo in organoleptične lastnosti vina Merlot. In *"Vinarski dan 2010"*. F. Čuš F. & L. Marinček (Eds.), pp. 95–106. Ljubljana, Slovenia.
- Sternad Lemut, M.; Sivilotti, P.; Franceschi, P.; Wehrens, R.; Vrhovsek, U. 2013. The use of metabolite profiling to study grape skin polyphenolic behaviour as a result of canopy microclimate manipulation in "Pinot noir" vineyard. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61: 8976–8986.
- 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.
- Tronkar, J., 2014. Vpliv razmerja med obremenitvijo in listno površino grma vinske trte na kakovost grozdja in vsebnost polifenolov pri sorti 'Refošk' (*V. vinifera*). Diplomsko delo, 44. str. Univerza v Novi Gorici, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo.
- Zoecklein, B. W.; Wolf, T. K.; Duncan, N. W.; Judge, J. M.; Cook, M. K. 1992. Effects of Fruit Zone Leaf Removal on Yield, Fruit Composition, and Fruit Rot Incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 139–148.

UČINEK AMPELOTEHNIČNIH UKREPOV NA KOPičENJE ANTOCIANOV IN IZRAŽANJE TRANSPORTNIH PROTEINOV V *VITIS VINIFERA* CV. REFOŠK

Sonia PATUI¹, Carlo PERESSON², Alberto BERTOLINI³,
Enrico BRAIDOT⁴, Marco ZANCANI⁵, Sabina PASSAMONTI⁶,
Paolo SIVILOTTI⁷, Lorena BUTINAR⁸, Andreja VANZO⁹,
Klemen LISJAK¹⁰, Angelo VIANELLO¹¹, Elisa PETRUSSA¹²

1, 2, 3, 4, 5, 11, 12 Università di Udine, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Sezione di Biologia vegetale

6 Università di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita

7, 8 Univerza v Novi Gorici, Center za raziskave vina

9, 10 Kmetijski inštitut Slovenije

¹ dr.

² dr.

³ dr.

⁴ izr. prof. dr.

⁵ izr. prof. dr.

⁶ prof. dr.

⁷ izr. prof. dr.

⁸ doc. dr.

⁹ izr. prof. dr.

¹⁰ dr.

¹¹ prof.

¹² dr.

POVZETEK

Raziskovalno delo, izvedeno v letih 2012 in 2013, preiskuje nekatere biokemične vidike kopičenja antocianov v jagodni kožici grozdja *Vitis vinifera* cv. refošk, pri katerem so uporabljeni različni ampelotehnični ukrepi, kot sta redčenje grozdov in razlitanje pred cvetenjem. S spreminjanjem ravnovesja med listno površino in maso pridelka obe tehniki izboljšujeta kvaliteto grozdja in posledično vina.

Znano je, da se med zorenjem antociani in drugi flavonoidi kopičijo znotraj vakuol celic povrhnjice preko mehanizmov, ki lahko vključujejo tudi membranske transportne proteine. Paralelni analizi jagodne kožice služita razumevanju, ali je nivo izražanja teh proteinov lahko povezan s

profilom antocianov in ali ga je mogoče spreminjati preko specifičnega ravnovesja med listno površino in maso pridelka: I) določanje vsebnosti in profila antocianov s pomočjo HPLC-DAD detektorja; II) ELISA imunološki test izražanja različnih membranskih transportnih proteinov, kot so ABC1, GST, MATE in bilitranslokazi (BTL) podoben protein.

Splošno gledano so rezultati, pridobljeni v preteklih dveh letih, pokazali, da zgodnje razlitanje in redčenje grozdja le delno stimulirajo koncentracijo pigmentov v jagodni kožici, saj je ta močno pod vplivom sezonskih dejavnikov. Vzporedno je na raven izražanja preučeni proteinov vplivalo tudi zorenje grozdja. Natančneje, leta 2013, je bil profil transportnih proteinov, kot so: MATE, ABCC1, BTL podoben protein ter GST, povezan s povečanjem antocianov med zorenjem, ni se pa spreminjal glede na ampelotehnične ukrepe, izvedene v vinogradu.

Pri obravnavanih letnikih so bili klimatski pogoji eden izmed glavnih dejavnikov spremenljivosti fenolnega zorenja grozdja sorte refošk, čeprav se je izkazalo, da lahko tudi transportni proteini, ki skrbijo za kopičenje antocianov, delno uravnavajo njihovo končno koncentracijo.

Ključne besede: antociani, zgodnje razlitanje, redčenje grozdov, zorenje jagod, refošk, membranski transportni proteini.

Effect of agronomic techniques on anthocyanin accumulation and transporter expression in *Vitis vinifera* cv. Refošk

ABSTRACT

The present research, performed in the seasons 2012 and 2013, aimed at studying the biochemical aspects of anthocyanin accumulation in the skin of *Vitis vinifera* (cv. Refošk) grape berry under different canopy management techniques, such as cluster thinning and pre-flowering leaf removal, in order to improve wine quality by balance between leaf area and production.

It is well-known that, during ripening, anthocyanins and other flavonoids are accumulated inside the vacuole of tement cells, through mechanisms involving membrane transporters. In order to understand whether the expression level of these proteins could be related to the anthocyanin profile and affected by a specific leaf area/ yield ratio, two parallel analysis were performed on the skin berry during maturation: i) anthocyanin profile by HPLC-DAD; ii) protein expression level by im-

munology ELISA test on different proteins involved in membrane transport, such as ABCC1, GST, MATE and bilitranslocase (BTL)-like.

Taken together, the results of the two seasons evidence that cluster thinning and pre-flowering leaf removal could stimulate only partially the pigment concentration in the skin, since this parameter was strongly affected by seasonal trend. Similarly, the protein expression pattern was not homogeneously influenced in the two seasons by maturation steps or agronomic practices. In particular, in the season 2013 the profiles of the putative transporters, such as MATE, ABCC1 and BTL-like, and of GST, were correlated with anthocyanin content during maturation, whereas they were not influenced by canopy management.

In conclusion, the seasonal climatic trend represents one of the main factors of variance in polyphenol maturity in Refošk grape berry; however, also the transporters responsible for anthocyanin accumulation could affect partially their final concentration.

Keywords: anthocyanins, berry maturation, cluster thinning, early leaf removal, membrane transporters, Refošk.

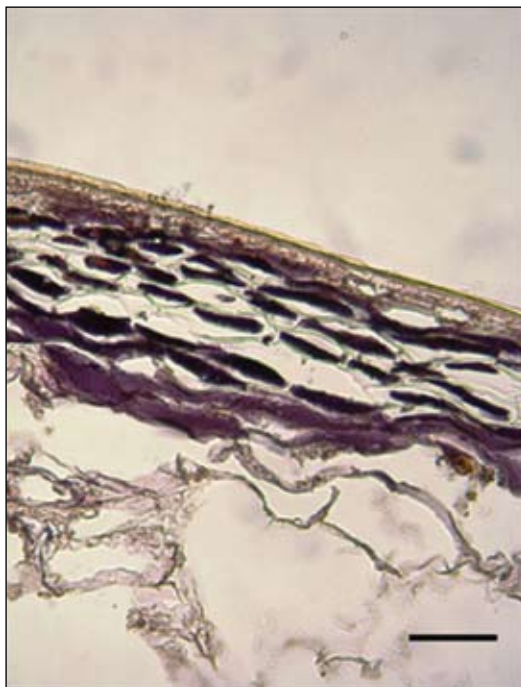
1. UVOD

Med zorenjem rdečih sort vinske trte se v jagodni kožici sintetizirajo in kopičijo različne vrste flavonoidov (antociani, flavonoli, katehini in proantocianidini). Te spojine opravljajo poglobitve fiziološke funkcije, saj prispevajo k barvnim ter delno k aromatskim lastnostim vina in so posebno cenjene zaradi učinkov, ki jih imajo na zdravje človeka (Boss & Davies, 2009). Koncentracija in sestava antocianov v zrelem grozdju sta glavna pokazatelja kakovosti barve za nadaljnjo vinifikacijo. Zaradi tega se je razvilo posebno zanimanje za razumevanje biokemičnih mehanizmov, ki skrbijo za pigmentacijo grozdja in njeno uravnavanje.

Med kopičenjem flavonoidov poleg encimov za biosintezo delujejo tudi različni membranski proteini, ki prenašajo spojine iz citoplazme proti vakuoli, kjer pride do končnega kopičenja (Petrucci in sod. 2013). Pred kratkim se je pojavil predlog, da bi glavni kandidati aktivnega in *Vitis* membranskega transporta lahko bili: transporterji tipa ATP-Binding Cassette, poddružina 1 (ABCC1) (Francisco in sod. 2013), ki skupaj z glutation-S-transferazo kopičijo malvidin monoglukoizid; transporterji Multidrug And Toxin compound Extrusion (MATE), ki prenašajo acilirane antociane (Gomez in sod., 2011). Poleg tega je bilo moč zaslediti v sortah merlot in sauvignonaise (furlanski tokaj) vsebnost bilitranslokazi pri sesalcih podobnega proteina (BTL-podoben), ki sodeluje pri procesu prenašanja antocianov in flavonolov (Braidot in sod. 2008; Bertolini in sod. 2009) (Slika št. 1).

V raziskavi smo zato želeli preučiti, ali lahko proces zorenja grozdja sorte refošk in uporabljeni ampelotehnični ukrepi za izboljšanje ka-

kovosti vina vplivajo na koncentracijo in profil antocijanov v jagodni kožici in, podobno, na raven izražanja proteinov, ki bi lahko sodelovali pri njihovem kopičenju.



Slika št. 1. – Imunolokalizacija BTL podobnega prenašalca v delu grozdne jagode vzorčene ob trgatvi. Lokalizacija proteina, prisotnega v epidermičnih in pod epidermičnih celicah kožice grozdne jagode je označena z vijoličasto barvo. Merilo črte= 50 μ m.

2. MATERIALI IN METODE

Rastlinski material

Analiza izražanja proteinov in kopičenja antocijanov v času zorenja grozdja sorte refošk je bila opravljena v grozdju letnikov 2012 in 2013. Preizkus je bil opravljen v vinogradu z gojitveno obliko Guyot na domačiji Lisjak v kraju Dutovlje. V vinogradu so bili preizkušeni trije različni ampelotehnični ukrepi: kontrola brez razlivanja (UN); zgodnje razlivanje 10 dni pred cvetenjem (4-5 listov/poganjek) (PFLR); redčenje grozdja pred njegovim popolnim obarvanjem (1 grozd/poganjek) (CT). Poskus je imel naključno zastavljeno shemo s 3 ponovitvami za vsak posamezen ampelotehnični ukrep in vsak posamezen datum vzorčenja. Med letoma 2012 in 2013 je bilo opravljeno 5 vzorčenj: **faza pred obarvanjem jagod** (6. avgust 2013); **faza obarvanja jagod** (*véraison*) (približno 50 % obarvanih jagod, 14. avgust 2012 in 21. avgust 2013); **faza predčasne dozorelosti** (7. september 2012 in 6. september 2013);

faza pred končno dozorelostjo (20. september 2013); **končna dozorelost** (28. september 2012 in 27. september 2013).

Ob datumih, ki so bili določeni za vzorčenje, je bilo z vsake vzorčne parcele obranih 5-6 grozdov s skupnim številom 100 jagod. Grozdne jagode smo ločili od grozdnih pecljev in jih, za nadaljnje instrumentalne analize hranili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kožice zamrznjenih grozdnih jagod so bile zdrobljene v možnarju s pomočjo tekočega dušika in uporabljene za ekstrakcijo prostih antocianov (5 g sveže mase kožic za vsak vzorec) ter za ekstrakcijo skupnih proteinov (3 g sveže mase kožic za vsak vzorec).

Ekstrakcija in kromatografska analiza prostih antocianov s HPLC detektorjem

Skupni antociani so bili ekstrahirani iz zdrobljenih kožic s pomočjo metanola, ohlajenega na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, in sicer v razmerju 1 : 10 jagodnih kožic : solvent (m : v). Ekstrakcija je potekala na sobni temperaturi, v temnem prostoru 4 ure. Ekstrakti so bili nato centrifugirani na $3000\times g$ za 5 minut pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Usedlino se je ponovno ekstrahirala v metanolu 1 uro, centrifugirala. Oba supernatanta sta bila združena, prepihana z dušikom in shranjena pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alikvotni deli, dobljeni iz metanolnih ekstraktov, so bili odparjeni pri nizkem tlaku in temperaturi manjši od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorci so bili rekonstituirani s topilom primernim za HPLC analizo, filtrirani s filtrom iz PVDF (pore $0,22\text{ }\mu\text{m}$) in takoj analizirani. Za karakterizacijo in kvantifikacijo antocianov je bil uporabljen kromatograf Agilent 1100 HPLC skupaj z detektorjem z nizom diod (DAD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ZDA) (Vanzo in Vrhovšek, 2005). Posamezni antociani so bili izraženi v mg/kg ekvivalentov malvidin 3-glukozida.

Ekstrahiranje skupnih proteinov in imuno-kemijska analiza transportnih proteinov ter vezikularnega transporta flavonoidnih snovi

Skupni proteini so bili ekstrahirani iz zdrobljenih kožic (3 g na vzorec) z modificiranimi metodami Conlona in Salterja (2007) in Songa in sod. (2006), s pomočjo toplega bazičnega pufra ter raztopine acetona in klorovodikove kisline. Koncentracija proteina je bila izmerjena z Bradfordovo metodo.

Pri imuno-kemijskem testu z vzorcem ELISA je bilo v mikrotitrskih ploščicah preizkušenih $5\text{ }\mu\text{g}$ proteina na vdolbino. Mikrotitrskе ploščice so bile prekrivane z različnimi antigeni: anti-BTL sesalcev, ki se je tvoril proti peptidu EFTYQLTSSPTC in ki odgovarja sekvenci 235-246 bilitranslokaze sesalcev (Passamonti in sod. 2005); anti-GST razreda tau (*TaGSTU1-1*)

Triticum aestivum; anti-MATE, ki ga je proti peptidu AALSIRVSNEL-GYGHPRAAK tvoril imunizirani kunec in odgovarja sekvenci permeaze 1 antocianov trte, kot opisuje Gomez in sod. (2011) (Proteogenix); anti-ABCC1 *A. thaliana* (Agrisera). Imuno-kemijska reakcija se je izmerila s pomočjo kolorimetra za alkalno fosfatazo.

Statistična analiza

S podatki, ki so bili pridobljeni s pomočjo testa ELISA in kromatografske analize, je bila opravljena analiza spremenljivosti (programska oprema STATISTICA, različica 8).

3. REZULTATI

Profil skupnih antocianov in transporterjev flavonoidov, prisotnih v jagodni kožici med zorenjem grozdja sorte refošk - letnik 2012

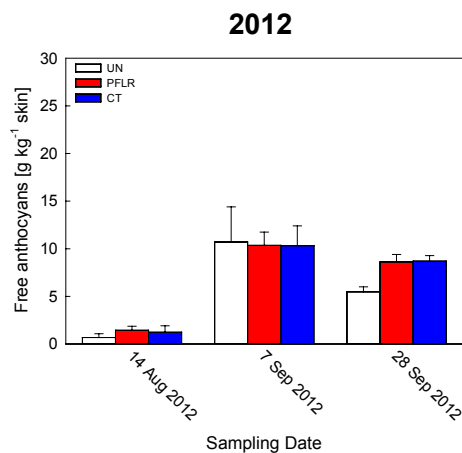
Analiza profila antocianov s HPLC detektorjem je potrdila, da se v jagodni kožici grozdja sorte refošk kopičijo različne vrste antocianov. Najbolj razširjeni antociani v vinu so glukozidi malvidina, cianidina, delfinidina, peonidina in petunidina ter, v manjši meri njihove acilirane in kumaroilirane oblike (Preglednica št.1).

Preglednica št. 1. Profil prostih antocianov v jagodni kožici grozdja sorte refošk v končni fazi dozorelosti (28. 9. 2012) in fazi pred končno dozorelostjo (20. 9. 2013). Vzorci so bili vzeti s trt, na katerih ni bilo opravljeno razlistanje (UN), s trt, kjer je bilo opravljeno razlistanje pred fazo cvetenja (PFLR) oziroma s trt, na katerih se je redčilo število grozdov (CT). Vrednosti so izražene v mg/kg ekvivalentov malvidin 3-glukozida.

	28.09.12			20.09.13		
	UN	PFLR	CT	UN	PFLR	CT
DPgl	425±197	798±358	1029±217	2940±1994	3620±1258	3384±1755
CNgl	127±65	302±39	432±159	0±0	0±0	0±0
PTgl	504±143	861±246	1102±149	2731±1292	3212±1094	3120±1272
PNgl	434±113	942±222	1100±98	645±372	807±201	961±637
MVgl	2224±245	3180±227	3127±99	7169±923	7495±2163	7860±1712
DPgl-ac	88±37	142±50	137±22	477±388	578±232	521±273
CNgl-ac	24±10	46±1	56±16	56±54	69±18	76±53
PTgl-ac	118±40	183±37	17515	511±310	591±219	558±226
PNgl-ac	69±16	145±41	1334	74±33	84±26	104±57

MVgl-ac	550±45	789±3	543±40	1299±233	1367±405	1437±337
DPgl-kum	72±9	110±25	104±10	341±132	365±117	356±103
MV-kafeolat	24±4	25±1	18±1	31±14	27±5	35±10
CNgl-kum	29±2	41±3	52±12	29±18	73±20	82±46
PTgl-kum	93±14	132±22	108±11	322±47	325±84	331±60
PNgl-kum	89±13	183±44	154±12	106±19	103±27	120±35
MVgl-kum	600±218	737±82	434±57	1174±266	1020±143	1112±215

V letu 2012 se je vsebnost antocijanov v jagodni kožici znatno povečala pri prehodu med fazo obarvanja jagod in fazo predčasne dozorelosti (Slika št. 2), pri čemer sta začetni vrednosti znašali 2 g/kg za prvo in 9 g/kg za drugo fazo, medtem ko je ob trgatvi vsebnost rahlo upadla. Ampelotehnična ukrepa CT in PFLR sta imela pozitiven učinek na kopičenje antocijanov le ob trgatvi.



Slika št. 2

Kopičenje prostih antocijanov v jagodni kožici grozdja sorte refošk - letnik 2012.

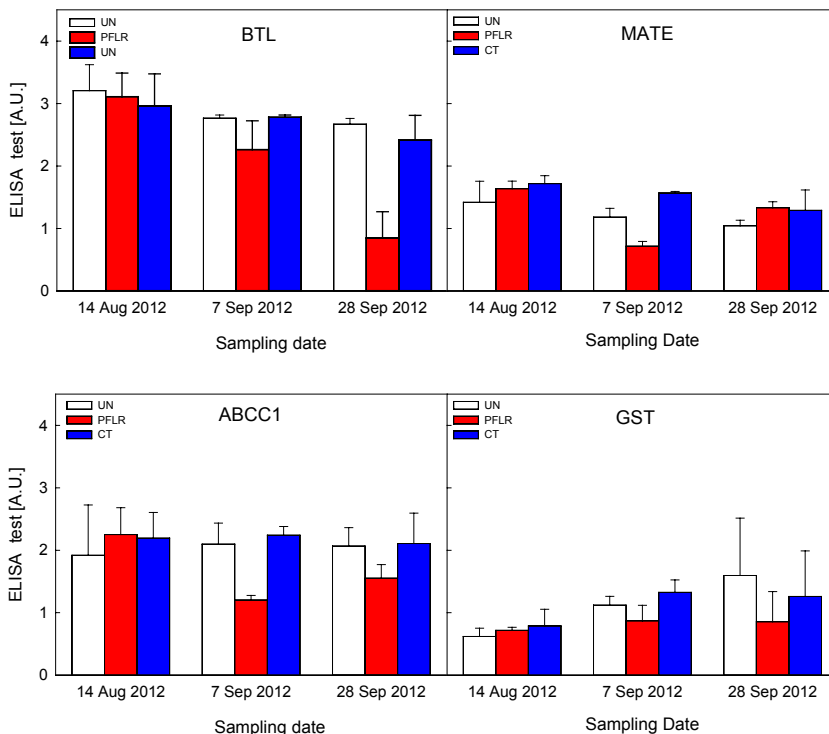
Trte, na katerih ni bilo opravljeno razlitanje (UN); trte, na katerih je bilo opravljeno razlitanje pred fazo cvetenja (PFLR); in trte, na katerih se je redčilo število grozdov (CT). Faza obarvanja jagod: 14. avgust 2012.

S pomočjo protiteles iz imuno-kemijskega testa ELISA, ki lahko reagirajo specifično proti različnim transporterjem, je bila ugotovljena pri letniku 2012 stopnja izražanja transportnih proteinov v jagodni kožici (Slika št. 3 in Preglednica št. 2). Na izražanje aktivnih membranskih transportnih proteinov, kot so BTL-podobni protein, MATE in ABCC1, faza zorenje ni vplivala, saj je bil nivo teh proteinov povišan že med fazo obarvanja jagod in je pri nadaljnjih fazah ostajal nespremenjen ali pa je celo upadel (ukrep PFLR).

Nasprotno pa se je izražena količina GST, ki se domnevno veže na sintetizirane antocijane za spodbujanje transporta preko ABCC1, po-

večevala med fazami zorenja. Prikazani trend se ujema s kopičenjem antocianov v jagodni kožici. Ampelotehnična ukrepa PFLR in CT žal nista pozitivno vplivala na izražanje tega proteina, četudi se je ravno nasprotno izkazalo pri bolj nakopičenih antocianih. Ampelotehnični ukrep PFLR je v primerjavi z referenčnim ukrepom povzročil splošno zmanjšanje proteinske koncentracije pri vseh upoštevanih proteinih, razen ob trgatvi pri primeru MATE.

2012



Slika št. 3 - Profil izražanja transporterjev v jagodni kožici grozdja sorte refošk - letnik 2012.

Trte, na katerih ni bilo opravljeno razlitanje (UN); trte, na katerih je bilo opravljeno razlitanje pred fazo cvetenja (PFLR) oziroma trte, na katerih so redčili število grozdov (CT). Faza obarvanja jagod 14. avgust 2012.

Preglednica št. 2. Povprečja in skupni standardni odkloni pri trgatvi 2012 v povezavi z izražanjem proteinov, ki sodelujejo pri transportu antocianov v jagodni kožici grozdja sorte refošk, razvrščena po datumih in ampelotehničnih ukrepih. Dvosmerni test ANOVA po datumih in ukrepih.

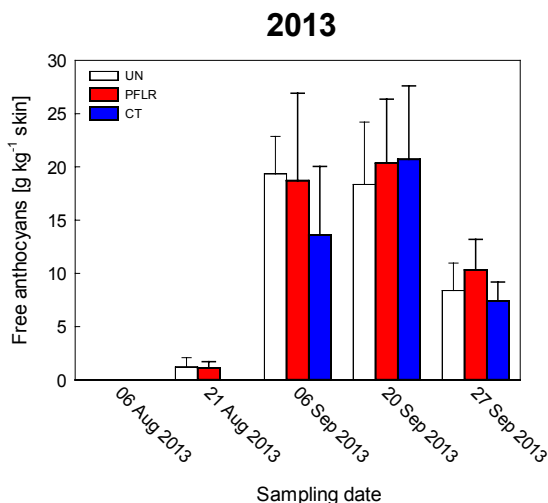
Datum	Test ELISA (A.U.)	Ukrep	Test ELISA (A.U.)	Datum x Ukrep
14. 8. 2012	1,90±0,22 ^a	UN	1,83±0,22 ^a	
7. 9. 2012	1,72±0,35 ^{ab}	PFLR	1,47±0,40 ^b	
28. 9. 2012	1,59±0,41 ^b	CT	1,91±0,24 ^a	
F	4,45	F	9,96	F 3,71
P	0,027*	P	0,001**	P 0,023*

Profil skupnih antocianov in transporterjev flavonoidov v jagodni kožici med zorenjem grozdja sorte refošk – letnik 2013

Zaradi želje po boljšem sledenju zorenja grozdja v fazi pred obarvanjem jagod, je bilo v letu 2012 opravljenih 5 vzorčenj (2 več kot leta 2012).

Po pričakovanih vsebnosti antocianov v fazi pred obarvanjem jagod v jagodnih kožicah ni bilo zaznati (Slika št. 4); v nadaljevanju se je izkazalo, da je do največjega povišanja antocianov prišlo med fazo obarvanja jagod in prvimi fazami zorenja, podobno kot pri letniku 2012. Na splošno so bile leta 2013 vremenske razmere bolj naklonjene kopičenju antocianov, saj je bila njihova skupna vrednost dvakrat večja kot leta 2012 (približno 20 g/kg). Žal pa je v zaključni fazi izmerjena količina antocianov drastično padla, najverjetneje zaradi sive grozdne plesni, ki povzroča zmanjšanje števila polifenolov.

Za razliko od letnika 2012, ampelotehnična ukrepa CT in PFLR nista vplivala na povečano kopičenje antocianov. Pri nobenem vzorčenju se namreč ni pokazala večja sprememba v primerjavi z vzorci trt, na katerih ni bila opravljena defoliacija (UN). V letu 2013 so nizke temperature med fazo cvetenja negativno vplivale na brstenje, še posebej pri ampelotehničnem ukrepu UN. To je privedlo do občutne izravnave med pridelki, pri katerih so bili uporabljeni omenjeni ampelotehnični ukrepi, in lahko posledično pojasnjuje pomanjkanje razlik v profilu antocianov.



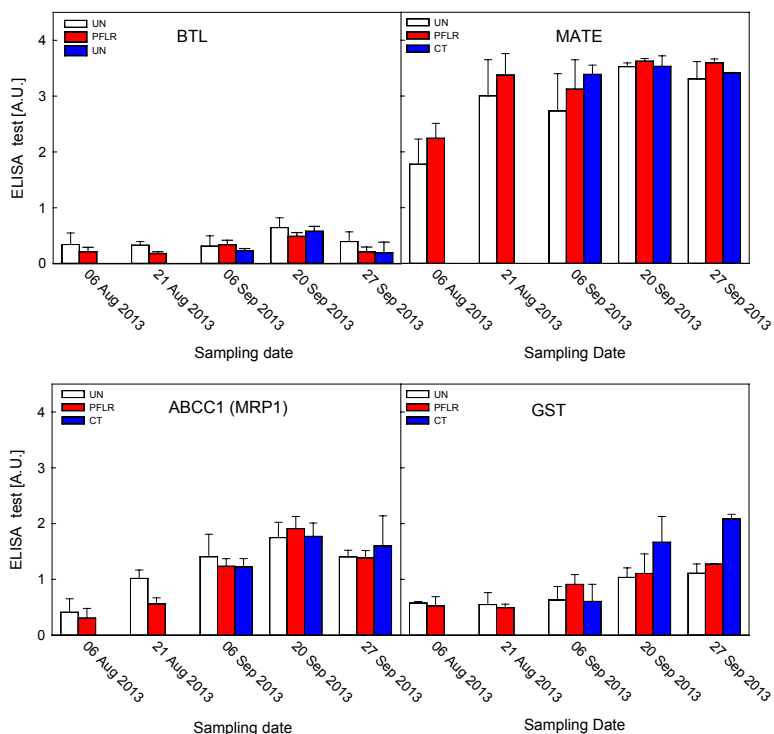
Slika št. 4 - Kopičenje prostih antocianov v jagodni kožici grozdja sorte refošk - letnik 2013.

Trte, na katerih ni bilo opravljeno razlitanje (UN); trte, na katerih je bilo opravljeno razlitanje pred fazo cvetenja (PFLR) oziroma trte, na katerih se je redčilo število grozdov (CT). Faza obarvanja jagod 21. avgust 2013.

Pri letniku 2013 je moč opaziti drugačen potek pri stopnji izražanja proteinov (Slika št. 5 in Preglednica št. 3). Izkazalo se je namreč, da je koncentracija ABCC1 odvisna od zorenja; do povečanja koncentracije je prišlo pri različnih datumih vzorčenja, skladno s trendom antocianov v jagodni kožici. Če bi želeli potrditi trend iz leta 2013, bi morali v toplejšem letu 2012 opraviti ustrezno dodatno vzorčenje pred obarvanjem jagod in tako ugotoviti, ali bi bila stopnja izražanja transporterjev resnično precej nižja. Izražanje MATE se je povečalo med fazo pred obarvanjem jagod in fazo obarvanja jagod. V nadaljnjih fazah se koncentracija ni spreminjala, podobno kot pri letniku 2012.

Tudi leta 2013 se je pokazala korelacija med zorenjem in količino izražanja GST, na katero je pozitivno vplival tudi ampelotehnični ukrep CT. Na isti način je zorenje pozitivno vplivalo na stopnjo izražanja BTL-podobnega proteina, povezanega z aktivnim sekundarnim transportom flavonoidov, čeprav so nanj negativno vplivali ampelotehnični ukrepi.

2013



Slika št. 5 - Profil izražanja transporterjev v jagodni kožici grozdja sorte refošk – letnik 2013.

Trte, na katerih bilo opravljeno razlistanje (UN); trte, na katerih je bilo opravljeno razlistanje pred fazo cvetenja (PFLR) in trte, na katerih se je redčilo število grozdov (CT). Faza obarvanja jagod 21. avgust 2013.

Preglednica št. 3. Povprečja in skupni standardni odkloni pri trgatvi 2013 v povezavi z izražanjem proteinov, ki so vključeni v transport antocianov v jagodni kožici grozdja sorte refošk, razvrščeni po datumu in ampelotehničnih ukrepih. Dvosmerni test ANOVA po datumih in ukrepih.

Datum	Test ELISA (A.U.)	Ukrep	Test ELISA (A.U.)	Datum x Ukrep
06/08/13	0,80±0,12 ^e	UN	1,31±0,37 ^b	
21/08/13	1,19±0,17 ^d	PFLR	1,35±0,37 ^b	
06/09/13	1,34±0,14 ^c	CT	1,69±0,26 ^a	
20/09/13	1,80±0,13 ^a			
27/09/13	1,66±0,14 ^b			
F	61,00	F	3,06	F 0,69
P	<0,001***	P	0,064	P 0,655

4. SKLEPI

Čeprav je zaradi različnih sezonskih vremenskih pogojev letnikov 2012 in 2013 težje interpretirati rezultate testiranja grozdja sorte refošk, ti vseeno kažejo, da se transporterji in transportni proteini antocianov na celični ravni izražajo v fazah zgodnjega zorenja (zlasti med fazo pred obarvanjem jagod in fazo obarvanja jagod). Zdi se, da v končnih fazah zorenja, ko pride do intenzivnega povečanja antocianov v jagodni kožici, ni potrebe po ponovni proteinski sintezi.

Nasprotno pa se lahko predpostavlja, da so za kopičenje antocianov v končnih fazah zorenja zadolženi procesi, ki ne potrebujejo energije, temveč izkoriščajo pasivne mehanizme, ki temeljijo na koncentracijskem gradientu metabolitov.

Imunološka analiza ELISA lahko prikaže le proteinski vzorec med zorenjem jagodne kožice, ne pa tudi dejanske aktivnosti preučevanih proteinov, ki se lahko regulirajo tudi med končnimi fazami zorenja. Zdi se, da je povečanje listne površine sorazmerno z maso pridelka, kar je bilo dokazano z ampelotehničnima ukrepoma CT in PFLR, ki sta delno vplivala na proteinsko sestavo v jagodni kožici.

5. ZAHVALE

Zahvaljujemo se domačiji "Lisjak" za sodelovanje pri preizkusih, prof. dr. V. Čurin in dr. U. Rajčevicu (SI) za analizo protiteles anti-BTL, dr. M. Brazier (VB) za analizo protiteles anti-GST in dr. A. Filippiju za opravljeni test ELISA.

Zahvala gre tudi evropskemu projektu AGROTUR (Kraški agroturizem), ki je sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev.

6. LITERATURA

- 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
- Boss P.K., Davies C. 2009. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries grapevine. V: *Molecular Physiology & Biotechnology*, Roubelakis-Angelakis, Kalliopi A. (Ed.), 263-292.
- 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
- Francisco R.M., Regalado A., Ageorges A.S., Burla B.J., Bassin B., Eisenach C., Zarrouk O., Vialet S., Marlin T.r.s., Chaves M.M., Martinoia E., Nagya R. 2013. ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *The Plant Cell*, 25: 1840-1854.
- Gomez C., Conejero, G., Torregrosa L., Cheynier V., Terrier N., Ageorges A. 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant Journal*, 67: 960-970.
- 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
- Petrusa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 14950-14973.
- 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
- Vanzo A., Vrhovšek U. 2005. Antocijanini - 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



POLIFENOLNI POTENCIAL GROZDJA REFOŠK IN VINA TERAN NA KRASU

Klemen LISJAK¹, Paolo SIVILOTTI², Dejan BAVČAR³,
Andreja VANZO⁴

1, 3, 4 Kmetijski inštitut Slovenije
2 Univerza v Novi Gorici

¹ dr.

² izr. prof. dr.

³ dr.

⁴ izr. prof. dr.

IZVLEČEK

Teran je zaščiteno vino s priznanim tradicionalnim poimenovanjem, pridelano iz grozdja sorte Refošk v vinorodnem okolišu Kras. Vino je prepoznavno po izraziti vijolično-rdeči barvi (zaradi visokih vsebnosti rdečih barvil – antocianov) in po srednje bogati taninski sestavi. Zaradi visokih vsebnosti antocianov mu pripisujejo pozitivne učinke na človekovo zdravje. V okviru preučevanja fenolnega potenciala grozdja smo analizirali vsebnost ekstrabilnih polifenolov v grozdju Refošk in vsebnost polifenolov v vinih Teran letnikov 2011, 2012 in 2013. Rezultati triletne študije so pokazali, da vsebuje grozdje sorte Refošk veliko ekstrabilnih antocianov (v povprečju od 1528 mg/kg do 1929 mg/kg). Povprečna vsebnost ekstrabilnih nizkomolekularnih proantocianidinov (taninov) v grozdju je znašala od 492 do 958 mg/kg in ekstrabilnih visokomolekularnih taninov od 1920 mg/kg do 2306 mg/kg. Večji masni delež pečk v grozdju letnika 2013 je pozitivno vplival na vsebnost taninov iz pečk v grozdju. Vzorci grozdja istih letnikov z več suhe snovi so vsebovali tudi več ekstrabilnih antocianov, skupnih polifenolov ter predvsem v kožicah tudi več visokomolekularnih taninov, ki imajo pozitiven vpliv tako na strukturo vina kot na zaznavo trpkosti. V vinih Teran letnika 2011 smo določili največje povprečne vsebnosti posameznih fenolnih skupin. V enoletnih vinih letnikov 2011–2013 smo določili povprečne vsebnosti skupnih antocianov v intervalu 669–936 mg/l, vsebnost prostih antocianov pa od 209 do 325 mg/l. Ti podatki vino Teran uvrščajo med vina z nadpovprečno vsebnostjo antocianov. Povprečna vsebnost resveratrola v vinih letnikov 2011–2013 je bila 6,1–9,5 mg/l. Vsebnost taninov v vinih se je občutno razlikovala tako med letniki kot med posameznimi pridelovalci. Posebnosti vina Teran se izražajo tudi v osnovnih kemijskih parametrih. Z njimi smo v vseh letnikih potrdili tipične lastnosti vin Teran: srednjo vsebnost alkohola (v povprečju 12

vol.%), večji ekstrakt, večje skupne kisline ter obvezno prisotnost mlečne kisline.

Ključne besede: grozdje Refošk, vino Teran, antociani, polifenoli, nizko-in visokomolekularni proantocianidini (tanini) grozdja, resveratrol

Polyphenol potential of Refošk grapes and teran wines from Karst

ABSTRACT

The Teran wine is a protected wine that has a recognized traditional designation and is produced from the Refošk grape in the wine-producing region of Karst. This wine is known for its distinctive purple-red colour (due to high levels of red pigment – anthocyanins) and for the medium-rich tannin composition. Due to its high content of anthocyanins, the Teran wine is attributed to have positive effects on human health. In the framework of the research of the grape phenolic potential, the content of extractable polyphenols in the Refošk grape and the content of polyphenols in Teran wines of vintages 2011, 2012 and 2013 were analyzed.

The results of a three-year study have shown that the Refošk grape variety contains high levels of extractable anthocyanins (on average from 1528 mg/kg to 1929 mg/kg). The average content of low molecular weight proanthocyanidins (tannins) ranged 492–958 mg/kg, while the extractable high molecular weight tannins content ranged 1920–2306 mg/kg. A higher percentage by mass of seeds in the grapes of the 2013 vintage had a positive effect on the contents of tannins in the grape seeds. Grape samples of the same vintage containing more total soluble solids also contained more extractable anthocyanins, total polyphenols and, especially inside the skins, a higher amount of high molecular weight tannins, which have a positive effect on the structure of the wine as well as on the perception of bitterness. In the Teran wines of the 2011 vintage, the average content of total anthocyanins was determined to be 669–936 mg/L, while the content of free anthocyanins was determined to be 209–325 mg/L. These data place the Teran wine among wines with an above-average content of anthocyanins. The average content of resveratrol in wines of vintages 2011–2013 ranged 6.1–9.5 mg/L. The levels of tannins in wines were considerably different in regard to different vintages as well as different wine producers. The particularities of the Teran wine are also expressed in basic chemical parameters. They were used to confirm the typical properties of Teran wines for all the vintages: medium alcohol content (averaging 12 % vol.), a higher extract, increased total acids, and the mandatory presence of lactic acid.

Key words: Refošk grape, Teran wine, anthocyanins, polyphenols, low and high molecular grape proanthocyanidins (tannins), resveratrol

1. UVOD

Polifenolne spojine grozdja so ključne za oblikovanje tipičnih senzoričnih lastnosti vina. Med flavonoide, najbolj zastopane polifenolne spojine rdečih vin, uvrščamo antociane in proantocianidine (tanine grozdja). Antociani so odgovorni za rdečo barvo vina (Ribéreau-Gayon, 1982), proantocianidini pa za stabilnost barve (Somers, 1971) in grenkobo ter trpkost (astringenco) vina (Robichaud and Noble, 1990).

Vsebnost antocianov in proantocianidinov ter njihova porazdelitev med kožicami in pečkami grozdne jagode so odvisni predvsem od sorte, pa tudi od klimatskih in pedoloških značilnosti vinograda (Mattivi in sod., 2009). Proantocianidini se izlužujejo iz kožic ter pečk grozdne jagode med maceracijo, ki je združena z alkoholno fermentacijo. Nastajajoči alkohol (etanol) je odlično topilo za izluževanje proantocianidinov iz pečk grozdne jagode. Struktura molekul proantocianidinov vpliva na njihovo relativno trpkost in grenkobo (Gawel, 1988). V splošnem so monomeri bolj grenki kot trpki, večje molekule proantocianidinov pa bolj trpke. Poleg sorte in geoklimatskih pogojev v času dozorevanja grozdja vplivajo na vsebnost in sestavo proantocianidinov v vinu tudi vinogradniške tehnike, stopnja dozorelosti grozdja ter vinarske tehnologije (dolžina in tehnika maceracije, temperatura, vsebnost alkohola, sev kvasovk itd.). Flavonoidi izkazujejo tudi za zdravje človeka pomembne antioksidativne lastnosti, (Rodrigo in sod., 2011).

Kras zaznamujejo edinstvene geografske, geološke in klimatske značilnosti, zato je bil namen raziskav preučiti polifenolne lastnosti sorte Refošk v različnih klimatskih pogojih (letnik 2011, 2012, 2013), na različnih lokacijah znotraj čezmejnega Krasa.

2. MATERIALI IN METODE

2.1. Vzorčenje grozdja in vina

Grozdje sorte Refošk smo reprezentativno vzorčili ob času trgatve v letnikih 2011 (n=18), 2012 (n=31) in 2013 (n=26) v vinogradih slovenskega in italijanskega Krasa. Grozdje je bilo vzorčeno 20. 9. v letu 2011, 21. 9. v letu 2012 in 25. 9. v letu 2013. Vzorce vina Teran smo vzorčili iz sodov iz nerjavečega jekla ali lesenih sodov kraških pridelovalcev vina. V treh letih smo vzorčili in analizirali 82 vin različnih proizvajalcev (38 letnika 2011, 22 letnika 2012 in 17 letnika 2013). Vzorčenja in analize vin so bile narejene 10 mesecev po fermentaciji in po mlečnokislinski fermentaciji.

2.2 Ekstrakcija polifenolov iz grozdja

Takoj po vzorčenju smo grozdje ohladili na 4 °C in pripravili selektivne ekstrakte kožic ter pečk grozdne jagode. Uporabljena je bila posebna ekstrakcijska metoda, ki simulira proces vinifikacije v laboratorijskih pogojih (Mattivi in sod., 2002). Kožice in pečke 200 g naključno vzorčnih 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. Med izluževanjem smo vzorce premešali 1 x na dan. Ekstrakti so bili preprihani z dušikom in shranjeni na 4 °C do spektrofotometričnih analiz, izvedenih 10 mesecev po ekstrakciji.

2.3 Spektrofotometrične analize ekstraktov grozdja in vina

Analize skupnih polifenolov, skupnih antocijanov, nizko- in visokomolekularnih taninov smo izvedli 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 (rezultate smo sešteli) 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.

Visokomolekularne proantocianidine smo 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.

2.4 Analize monomernih antocijanov in stilbenov (resveratrolov) v vinih HPLC-DAD

Antociane v vinih smo analizirali s pomočjo tekočinskega kromatografa visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod (HPLC-DAD) (Agilent Technologies 1100) (Vanzo in Vrhovšek, 2005). Posamezne antociane v vinu smo ovrednotili v mg/l kot ekvivalente malvidin 3-glukozida.

Resveratrole (stilbene) smo analizirali s HPLC-DAD (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 kot ekvivalente *trans*-resveratrola.

2.5 Osnovni fizikalno-kemijski parametri grozdja in vina

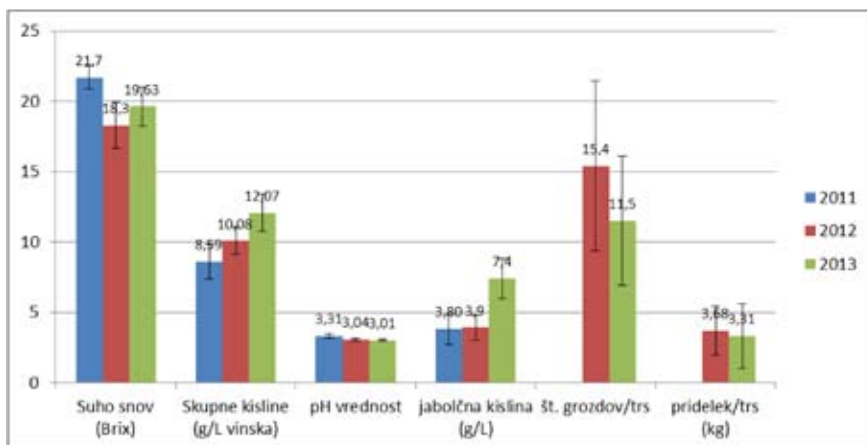
Standardne fizikalno-kemijske parametre grozdja smo določili z uradnimi metodami OIV (Compendium of international methods of wine and must analyses, Volume 1) in EU (Commission regulation EEC N. 2676/90).

Standardne kemijske parametre vin smo določili z uradnimi metodami EU (Commission regulation EEC N. 2676/90, EC 335/2005), z izjemo parametrov: reducirajoči sladkor in hlapne kisline, ki so bili določeni z internimi metodami. Tako analize standardnih kemijskih parametrov kot različnih skupin polifenolov v vinih smo opravili 10 mesecev po trgatvi.

3. REZULTATI

3.1 Osnovni fizikalno-kemijski parametri grozdja Refošk letnikov 2011, 2012 in 2013

Kakovost grozdja je v veliki meri odvisna od klimatskih pogojev v danem letniku. Rezultati osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov so pokazali velike razlike med letniki 2011, 2012 in 2013 (Slika 1). Povprečna vsebnost suhe snovi (sladkorja) je bila največja ob času trgatve v letniku 2011, in sicer 21,7 °Brix; istočasno je bila vsebnost skupnih kislin in jabolčne kisline najmanjša. Najmanjša povprečna vsebnost suhe snovi je bila določena v letniku 2012, kar pripisujemo večji obremenitvi trsov (povprečna obremenitev trsov nad 15 grozdov na trs). Možen je tudi vpliv daljšega obdobja pomanjkanja padavin v rastni sezoni 2012 na Krasu, izraženega z močnim ali zelo močnim vodnim stresom (Sivilotti in sod., 2014). Zadnji je najverjetneje vplival tudi na maso jagod. Povprečna masa 100 jagod je bila v l. 2012 193,8 g, l. 2013 pa kar 217,7 g. Največjo povprečno vsebnost skupnih kislin (12,1 g/l) in jabolčne kisline (7,1g/l) smo določili v letniku 2013. (Slika 1).



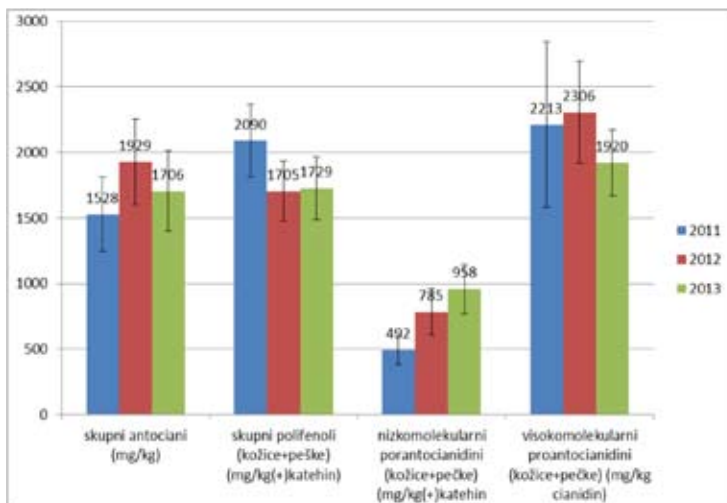
Slika 1: Osnovni fizikalno-kemijski parametri grozdja letnika 2011, 2012 in 2013 na Krasu ob času trgatve.

Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odklon.

3.2 Polifenolni potencial grozdja Refošk I. 2011, 2012 in 2013

Polifneolni profil grozdja letnikov 2011, 2012 in 2013 je prikazan na sliki 2. V grozdju letnika 2012 smo določili povprečno največ antocianov in visokomolekularnih proantocianidinov. V grozdju letnika 2011 smo določili najmanjše povprečne vsebnosti nizkomolekularnih proantocianidinov in tudi največ skupnih polifenolov. Omenjeni letnik so pridelovalci in strokovnjaki ocenili kot vrhunski letnik, ki se redko pojavlja na Krasu. Rezultati kažejo na ugodno razmerje med nizko- in visokomolekularnimi proantocianidini ($R=0,22$). V letniku 2012 je bilo isto razmerje v grozdju 0,34; v letniku 2013 pa 0,49. Razmerje nizko- in visokomolekularnih proantocianidinov prikazuje strukturo med »kratkimi« (manj polimeriziranimi) in »dolгими« (bolj polimeriziranimi) tanini. Manjše razmerje nakazuje na bolj dozorele tanine.

Povprečna vsebnost ekstrabilnih antocianov se je gibala od 1528 mg/kg do 1929 mg/kg svežega grozdja. Podatki za letnike 1999 in 2000 prikazujejo povprečne vsebnosti skupnih antocianov grozdja Refošk iz vinorodne dežele Primorska, med 1100 in 1300 mg/kg, določene z enako ekstrakcijsko in analitsko metodo (Vrhovšek in sod., 2002). V Črni gori so bile v času trgatve letnikov 2011 in 2012 z enako metodo določene naslednje povprečne vsebnosti skupnih ekstrabilnih antocianov: v 1035 in 862 mg/l v grozdju Cabernet Sauvignon, 960 in 1113 mg/l v grozdju Vranac ter 456 in 517 mg/l v grozdju Kratošija (Pajović in sod., 2014). Rezultati potrjujejo, da je Refošk sorta grozdja z nadpovprečno vsebnostjo antocianov, kar mu daje izjemen barvni in prehranski potencial.



Slika 2: Polifenolni profil grozdja letnika 2011 (n=18), 2012 (n=31) in letnika 2013 (n=26) na Krasu ob času trgatve. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odklon.

Vsebnost antocianov v kožicah (mg/kg kožic) se je med letniki prav tako razlikovala. Povprečno je bilo določeno 7853 mg antocianov na kg kožic v letu 2011, 13212 mg/kg kožic v letu 2012 in 7853 mg/kg kožic v letniku 2013. Največja vsebnost nizkomolekularnih proantocianidinov je bila določena v letniku 2013, kar je lahko tudi posledica večjega masnega deleža pečk in kožic v grozdju oz. jagodi (Tabela 1).

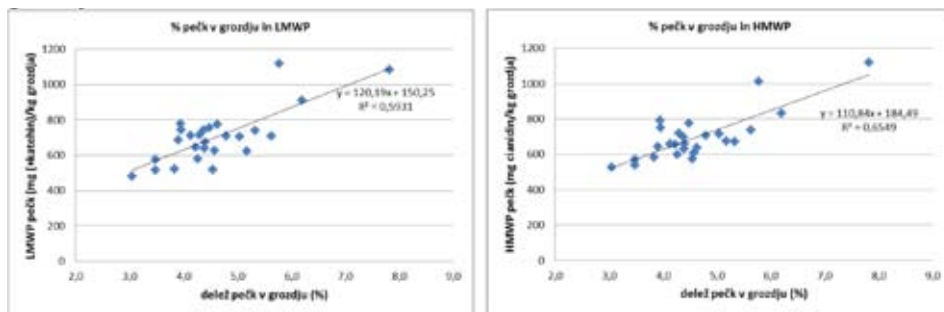
Tabela 1: Masni delež (%) pečk in masni delež (%) kožic v grozdju ob času trgatve

Letnik	% pečk*	% kožic*
2011	4,04±0,51**	15,56±2,23
2012	4,46±1,40	15,16±2,52
2013	4,61±0,98	22,48±4,03

*Masni delež (na 100 g jagod)

**Standardni odklon

Delež pečk v grozdju v posameznem letniku močno vpliva na vsebnosti ekstrabilnih taninov v grozdju in v pridelanem vinu. Večji masni delež pečk v grozdju je v letu 2013 vplival na večjo vsebnost nizko- in visokomolekularnih proantocianidinov iz pečk v grozdju (Slika 3). V letnikih 2012 in 2011 te korelacije nismo potrdili. Prav tako nismo potrdili korelacije med masnim deležem (%) kožic in ekstrabilnimi nizko- in molekularnimi proantocianidini iz kožic v grozdju.



Slika 3: Odvisnost masnega deleža pečk (%) v grozdni jagodi od vsebnosti nizkomolekularnih (LMWP, levo) in visokomolekularnih (HMWP, desno) ekstrabilnih proantocianidinov iz pečk v grozdju.

V letniku 2013 smo določili največ taninov v pečkah, v letniku 2012 pa v kožicah (Tabela 2). Tako vsebnost kot kakovost taninov v pečkah sta zelo pomembna parametra za pridelavo kakovostnega rdečega vina. Nizkomolekularni proantocianidini so odgovorni za grenkobo (Robichaud and Noble, 1990) vina. Pri Refošku vsebujejo pečke v povprečju 70 % nizkomolekularnih proantocianidinov in kožice 30 % (Slika 4). Dozorelost pečk odloča o količini ekstrabilnih taninov in je ključna za kakovost rdečega grozdja ter vina.

Tabela 2: Povprečna vsebnost proantocianidinov (taninov) v grozdju letnika 2011, 2012 in 2013 v kožicah ter pečkah.

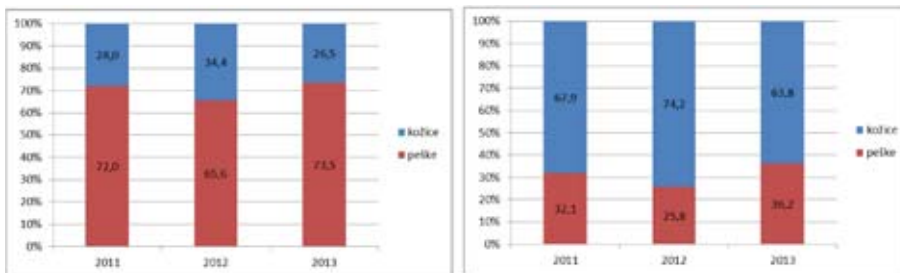
	kožice (mg/kg)		pečke (mg/kg)	
	LMWP	HMWP	LMWP	HMWP
2011	138±46*	1503±579	354±108	710±165
2012	270±116	1711±335	515±115	595±118
2013	254±81	1225±228	704±153	695±134

LMWP – nizkomolekularni proantocianidini (mg/kg (+) katehin)

HMWP – visokomolekularni proantocianidini (mg/kg cianidin)

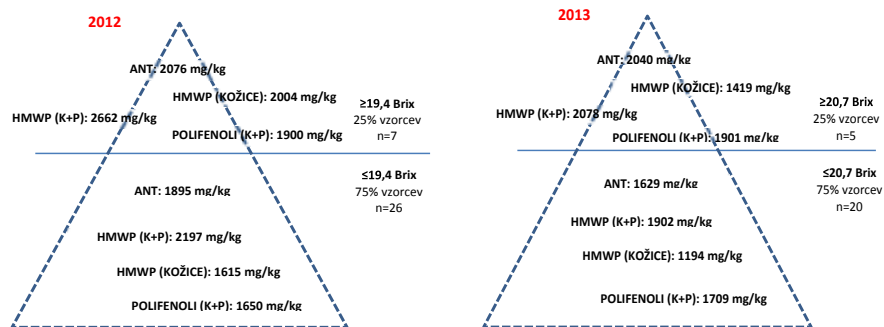
*Standardni odklon

Sorta grozdja Refošk, pridelana na Krasu, izkazuje več kot dve tretjini vseh nizkomolekularnih proantocianidinov v pečkah in približno dve tretjini vseh visokomolekularnih proantocianidinov v kožicah. Slika 4 prikazuje delež nizkomolekularnih proantocianidinov v pečkah in kožicah ter delež visokomolekularnih proantocianidinov v pečkah in kožicah v letnikih: 2011, 2012 in 2013. Lokalizacija proantocianidinov je večinoma sortno pogojena, pomemben pa je tudi vpliv letnika.



Slika 4: porazdelitev nizkomolekularnih (levo) in visokomolekularnih (desno) proantocianidinov med pečkami in kožicami v letnikih: 2011, 2012 in 2013.

Grozdje z več sladkorja (izraženega kot suha snov ($^{\circ}$ Brix)) je vsebovalo v letih 2012 in 2013 več antocianov, skupnih polifenolov ter visokomolekularnih proantocianidinov. Na sliki 5 so prikazane povprečne vsebnosti polifenolov četrtine (25 %) vzorcev grozdja z največ sladkorja v primerjavi s preostalimi vzorci (75 %) z manj sladkorja. Vsebnost visokomolekularnih proantocianidinov, torej taninov, odgovorinih za strukturo in trpkost vina, je bila v letih 2012 in 2013 večja v grozdju z več sladkorja. V grozdju letnika 2011 smo določili občutno več sladkorja kot v letnikih 2012 in 2013. Dosežena je bila boljša fenolna zrelost, zato so bile razlike med vzorci grozdja iz različnih vinogradov manjše.



Slika 5: Primerjava povprečnih vsebnosti antocianov, skupnih polifenolov ter visokomolekularnih taninov v vzorcih grozdja l. 2012 (levo) in 2013 (desno). Vzorci z večjo vsebnostjo sladkorja (nad črto) vsebujejo več polifenolov v primerjavi z vzorci z manjšo vsebnostjo sladkorja (pod črto).

ANT- skupni antociani v grozdju

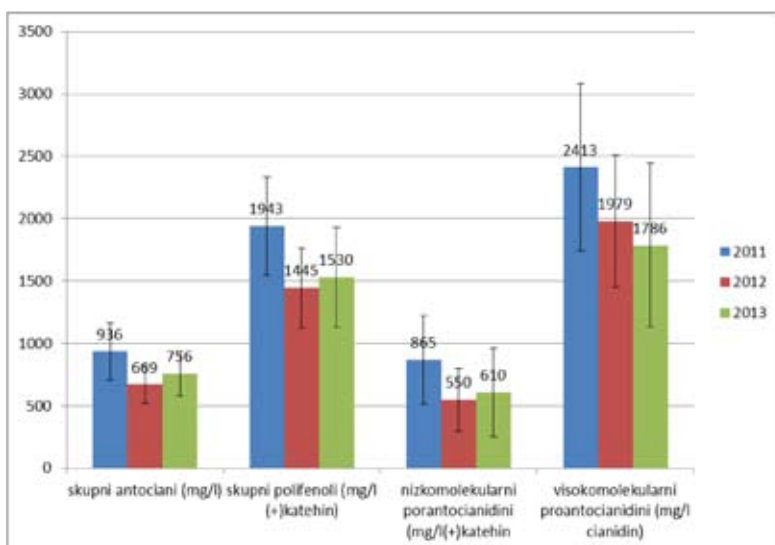
HMWP(K+P) – visokomolekularni proantocianidini (mg/kg cianidin) v grozdju (kožice + pečke)

HMWP(KOŽICE) – visokomolekularni proantocianidini (mg/kg cianidin) v kožicah

V slabših letnikih pridelave, ki izkazujejo manj sladkorja v grozdju, so vinogradniški postopki (npr. redčenje grozdja) lahko odločilni za doseg tako večjih vsebnosti sladkorjev kot boljše polifenolne strukture grozdja in vina. Bolj dozorelo grozdje tako pridobi več taninov v kožicah, ki so bolj polimerizirani in zato boljši za senzorično kakovost vina. S kasnejšim obiranjem grozdja sicer izboljšamo taninsko sestavo grozdja, vendar je tveganje zaradi poslabšanja vremena v času trgatve zelo veliko. To lahko potrdimo tudi z dejanskimi datumi trgatve, saj so kmetje v vseh treh letnikih večino grozdja potrgali med 20. in 25. septembrom.

3.2 Vsebnosti polifenolov v vinu Teran

V 38 vzorcih vina Teran letnika 2011, 22 vzorcih letnika 2012 in 17 vzorcih letnika 2013 smo določili skupne antociane, skupne polifenole, nizko- in visokomolekularne proantocianidine. Rezultati so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Polifenolni profil vina Teran letnikov 2011 (n=38), 2012 (n=22) in 2013 (n=17), vzorčenih na Krasu in analiziranih 10 mesecev po trgatvi. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odklon.

V vinih Teran letnika 2011 smo v povprečju določili največje vsebnosti posameznih polifenolnih skupin. Vina so bila bogata na skupnih antocianinih, ter nizko- in visokomolekularnih proantocianidinih. Prav zadnji so odgovorni za polno strukturo vina. Letnik 2011 je bil glede senzorične kakovosti vina znan kot nadpovprečen, kar potrjujejo tudi analize polifenolov. Čeprav je imelo grozdje letnika 2012 največ ekstrahibilnih antocianov (slika 2), smo jih v vinih določili najmanj od vseh treh letnikov. Najverjetnejši vzrok za to je slabša ekstrakcija antocianov med

maceracijo grozdja v kleti. V posameznih vinih različnih pridelovalcev se vsebnost taninov zelo razlikuje (glede na velik standardni odklon od povprečja), kar je posledica tako različne kakovosti grozdja kot različnih vinifikacijskih tehnologij v kleti (čas maceracije, temperatura, sev kvasovk ...). Da bi poenotili in izboljšali taninsko strukturo grozdja in vina Teran, bi pridelovalci na Krasu morali uskladiti tehnologije v vinogradu in v kleti.

Posamezni (prosti) monomerni antociani iz grozdja se že med maceracijo povežejo s proantocianidini v pigmente višjih molekulskih mas, zato se vsebnost monomernih antocianov med zorenjem vina zmanjšuje. Ker smo opravili analize v deset mesecev starih vinih, je povprečna vsebnost prostih antocianov v letniku 2011 znašala 251 mg/l, v letniku 2012 209 mg/l in v letniku 2013 325 mg/l. Analize 15 vzorcev vin Teran letnika 2006 (analiziranih 9 mesecev po maceraciji) so pokazale v povprečju 417 mg/l prostih antocianov (neobjavljeni podatki) ter analize 3 mesece starih vin Cabernet Sauvignon, Refošk, Teran 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 dokazano že v nekaj minutah absorbirajo iz želodca sesalcev in vstopajo v krvni obtok (Passamonti in sod., 2003), od koder se nadalje absorbirajo v možgane, jetra, ledvice 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. Povprečna vsebnost vseh štirih oblik resveratrola v vinih Teran letnika 2011 je znašala 7,2 mg/l, letnika 2012 9,5 mg/l in letnika 2013 6,1 mg/l (v letniku 2006: 5,0 mg/l, neobjavljeni podatki). 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).

3.3 Osnovni kemijski parametri vin Teran

Posebnosti Terana se izražajo tudi v standardnih kemijskih parametrih vina. Glede na aktualno vinsko zakonodajo so ostrejšše zahteve za posamezne parametre opredeljene v Pravilniku o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran (UL RS 43/00) in zajemajo: dejanski alkohol (od 10,0 vol.% do 13,0 vol.%), skupne kisline (od 6,0 do 11,0 g/l), ekstrakt brez sladkorja (vsaj 25 g/l), reducirajoči sladkor (do 4,0 g/l), pepel (vsaj 2,0 g/l), hlapne kisline (do 0,9 g/l), skupni žveplov dioksid (do 100 mg/l), prosti žveplov dioksid (do 28 mg/l) in mlečno kislino (od 1 do

5 g/l). Te prametne se obvezno preverja tudi pri izdaji dokumentacije (odločb) za promet z vinom. Samo vino, ki izpolnjuje zgornje zahteve pravilnika in je bilo tudi senzorično ustrezno ocenjeno, se v prometu lahko nahaja kot Teran PTP. Tako vina Teran uvrščamo med vina s srednjo vsebnostjo dejanskega alkohola in večjim skupnim ekstraktom. Posebno tipična je večja vsebnost skupnih kislin (lastnost sorte) in mlečne kisline – zaradi obveznega biološkega razkisa. Zagotovo pa je Teran vino z zelo majhno vsebnostjo prostega in skupnega žveplovega dioksida.

Tabela 4: Osnovni kemijski parametri vin Teran letnikov 2011, 2012 in 2013

	letnik 2011	letnik 2012	letnik 2013
	n=39*	n=22	n=21
dejanski alkohol (vol. %)	12.01 ^{**} ±0.60 A ^{***}	11.95±0.58 A	12.06±0.46 A
skupni ekstrakt (g/l)	30.0±2.4 B	27.3±1.7 A	27.1±2.6 A
skupne kisline (g/l vins. kislina)	7.5±0.7 A	8.0±0.8 B	7.5±0.8 AB
hlapne kisline (g/l oacet. kislina)	0.62±0.17 B	0.45±0.11 A	0.73±0.13 C
prosti SO ₂ (mg/l)	13±3 B	12±1 A	12±4 A
skupni SO ₂ (mg/l)	43±6 B	40±9 B	35±7 A
pH (-)	3.37±13 B	3.26±0.12 A	3.33±0.14 AB
mlečna kislina (g/l)	2.1±0.4 B	1.5±0.4 A	2.5±0.6 C
reducirajoči sladkorji (g/l)	2.5±0.7 B	1.2±0.3 A	1.3±0.7 A

* Število vzorcev, **povprečna vrednost ± standardni odklon, ***statistično značilne razlike z LSD-testom (p≤0,05)

Določevanje osnovnih kemijskih parametrov v vinih letnikov 2011, 2012 in 2013 je pokazalo primerljive vsebnosti dejanskega alkohola. Vina letnika 2011 so izkazovala večji skupni ekstrakt in relativno gostoto, večjo vsebnost prostega žveplovega dioksida in večjo vsebnost reducirajočih sladkorjev. Vina letnika 2013 so izkazovala večjo vsebnost hlapnih kislin in mlečne kisline. Dejanske razlike so praktično majhne in najverjetneje posledica razlik v klimatskih pogojih letnikov.

4. RAZPRAVA IN SKLEPI

Namen raziskav grozdja Refoš in vina Teran je bilo natančno ovrednotiti tako sorto kot geoklimatske vplive (letnika) na polifenolni profil grozdja in vina. V triletni študiji (2011–2013), ki je vključevala grozdje sorte Refoš iz 75 različnih vinogradov in 77 različnih vin Teran, smo ovrednotili polifenolni profil grozdja in vina ter osnovne fizikalno-kemijske parametre vina Teran. Pridobljeni podatki bodo pripomogli k iz-

boljšanju kakovosti vina Teran, glavnega tradicionalnega kraškega kmetijskega pridelka.

V skladu s predhodnimi študijami smo potrdili večje vsebnosti rdečih barvil antocianov v grozdju Refošk na Krasu, kar daje značilno intenzivno vijolično-rdečo barvo vinu Teran, hkrati pa pozitivno vpliva na njegovo prehransko vrednost. Za vsebnost polifenolnih spojin je imel letnik odločilni pomen. Poleg same vsebnosti taninov v grozdju je zelo pomembna njihova lokalizacija (pečke ali kožice) ter struktura. Nizkomolekularni proantocianidini so bolj grenki, visokomolekularni pa bolj trpki; vinu dajejo strukturo. V letniku 2013, kjer je bil masni delež pečk v grozdju večji, smo določili večjo vsebnost nizkomolekularnih taninov v grozdju. V letnikih 2012 in 2013 smo v bolj dozorelem grozdju (več suhe snovi oz. sladkorja) določili tudi več visokomolekularnih taninov v kožicah. Visokomolekularni tanini so senzorično odločilni, saj vinu dajejo strukturo in prijetno trpkost. Ker v primeru manj dozorelega grozdja tanini izkazujejo slabšo senzorično kakovost, je zelo pomembna primerena tehnološka zrelost grozdja v času trgatve. Pridelki na Krasu so bili še precej visoki (3,3–3,7 kg/trs), zato bi bilo za optimizacijo sladkorne stopnje in taninske kakovosti grozdja zelo priporočljivo redčenje grozdja že v času obarvanja jagod. Tako bi povečali vsebnost polimeriziranih taninov kožic in izboljšali senzorične lastnosti vina. Z ozirom na velike razlike v vsebnostih antocianov in taninov v vinih Teran različnih pridelovalcev bo treba še bolj uskladiti in poenotiti tehnologije, tako v vinogradu kot v kleti. Na ta način bomo izboljšali in poenotili kakovost vin Teran.

Primerjava osnovnih kemijskih parametrov v vinih je potrdila skladnost s slovenskim Pravilnikom o vinu z oznako PTP Teran. Zanj je značilna srednja vsebnost dejanskega alkohola (12 vol.%), kar je glede na novejšo trende o zmanjšanju alkohola v vinih pozitivno tako za potrošnike kot za pridelovalce.

5. 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 (Mateji Fortuna, Ivi Kmetič Ceglar, dr. Katji Šuklje, dr. Mojci Jenko, 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.

6. LITERATURA

- Commission Regulation (EEC), No. 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. 1990. Official Journal of the European Communities, 33, L 272: 1–129.
- Compendium of international methods of wine and must analyses, OIV-International organisation of vine and wine, Volume 1, Edition 2012. Paris
- Di Stefano, R., Cravero, M.C., Gentilini, N. 1989. Methods for the study of wine polyphenols. *L'Enotecnico*, 5: 83–89.
- European Union: Information from European Union institutions and bodies-commission, List of quality wines produced in specified regions, 2009/C 187/01, Official Journal from 8. 8. 2009
- Fornasario, S., Tramer, F., Žiberna, L., Passamonti, S. 2012. Biološka uporabnost in aktivnost pigmentov grozdja pri živalih: implikacije za zdravje ljudi, Simpozij AGROTUR, Ljubljana, 28. November 2012, pp. 7–13.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Volume 4, Issue 2, 74–95.
- 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., Nicolini, G. 1997. Analysis of polyphenols and resveratrol in Italian wines. *BioFactors*, 6: 445–48.
- Mattivi, F., Prast, A., Nicolini, G. & Valenti, L., 2002. Validazione di un nuovo metodo per la misura del potenziale polifenolico delle uve rosse e discussione del suo campo di applicazione in enologia. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 2/3, 55–74.
- Mattivi, F., Vrhovšek, U., Masuero, D. & Trainotti, D., 2009. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 27–35.
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran, Uradni list št. 16, 15. 2. 2008.
- Pajovic, R., Raicevic, D., Popovic, T., Sivilotti, P., Lisjak, K., Vanzo, A. 2014. Polyphenolic Characterisation of Vranac, Kratosija and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L. cv.) Grapes and Wines from Different Vineyard Locations in Montenegro. *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 35, No. 1.
- Passamonti, S., Vrhovšek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. 2003. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS letters*, vol. 544, str. 210–213.
- Passamonti, S., Vrhovšek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. 2005. Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, str. 7029–7034.
- Ribéreau-Gayon, P., 1982. The anthocyanins of grapes and wine. In: *Anthocyanins as food colors*. Markakis P., (ed.). Academic Press, New York. pp. 112–118.
- 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.
- Robichaud, J. L. & Noble, A. C., 1990. Astringency and bitterness of the selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 53, 343–353.
- Sivilotti, P., Butinar, L., Jež, A., Šuklje, K., Vanzo, A. and Lisjak, K. 2014. Vpliv vodnega stresa na kakovost grozdja v kraških vinogradih. V: *Kraško okolje*. K. Lisjak & L. Butinar (Urednik). 53–63. Vipava, Slovenija.
- Sternad Lemut, M., Trošt, K., Lisjak, K. 2010. Polifenolni profil slovenskih modrih pinotov in primerjava s povezanimi senzoričnimi lastnostmi = Polyphenol

- content and related sensory characteristics of Slovenian Pinot Noir wines. V: ČUŠ, Franc (ur.). *Vinarski dan 2010, Ljubljana, 17. november 2010*. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije, 2010, str. 29–38.
- Somers, T. C., 1971. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10, 2175–2186.
- 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, Urška, Vanzo, Andreja, Koruza, Boris, Korošec-Koruza, Zora. Polifenolni potencial slovenskega rdečega grozdja = Polyphenolic potential of Slovenian red grapes. V: Puconja, Mateja (ur.). *Vinogradi in vina za tretje tisočletje? : [vinogradništvo, vinarstvo, ekonomika in trženje: zbornik referatov]*. Ljubljana: Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Ljutomer: Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Celje: Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije, 2002, str. 359–367.
- 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.



AROMATSKI PROFIL VINA TERAN

Helena BAŠA ČESNIK¹, Dejan BAVČAR², Klemen LISJAK³

1, 2, 3 Kmetijski inštitut Slovenije

¹ dr.

² dr.

³ dr.

IZVLEČEK

V raziskavi smo določali aromatski profil vina Teran letnikov 2011, 2012 in 2013 pridelanih v Primorski vinorodni deželi (Kras). Osredotočili smo se predvsem na hlapne spojine, ki nastanejo med alkoholno fermentacijo. Posebno so nas zanimali estri. Ugotovili smo, da je tipična sadna aroma vina Teran posledica večje vsebnosti etil oktanoata, ki daje vonj po sladkem, češnjah in sadju. Kot drugi najpomembnejši ester je bil določen etil heksanoat, z vonjem po jabolkah in jagodah. Tretji je bil izoamil acetat, s sladkim, sadnim vonjem in vonjem po bananah. Sledila sta še etil butirat s sadnim vonjem in γ -butirolakton s sladkim, karamelnim in vonjem po praženem. Različni ampelotehnični postopki (redčenje grozdja, odstranjevanje listov pred cvetenjem) v vinogradu so minimalno vplivali na vsebnost analiziranih hlapnih spojin.

Ključne besede: vino, arome v vinu, estri, Teran

Aromatic profile of Teran wine

ABSTRACT

The aim of the present work was to present volatile profile of Teran wine produced in Primorska winegrowing region (Karst) in years 2011, 2012 and 2013. We have focused our research mainly on different groups of volatile compounds formed during alcoholic fermentation, with particular interest to esters. We have determined, that the typical fruity aroma of Teran is correlated to abundant presence of ethyl octanoate, which gives red cherry, sweet and fruity aroma. As the second most important ester ethyl hexanoate was determined, with its apple and strawberry fruity scent. The third was isoamyl acetate, with banana, fruity and sweet scent. They were followed by ethyl butyrate, with fruity odour and γ -butyrolactone described as sweet, toast and caramel. Different vi-

iculture techniques (grape thinning, leave removal before flowering) in the vineyard shown only minimal impact on the selective volatile compounds content.

Keywords: wine, aromas in wine, esters, Teran

1. UVOD

Teran je tipično vino iz področja Krasa, ki sodi v Primorsko vinorodno območje v Sloveniji. Proizvodnja tega edinstvenega rdečega vina je potekala že v Antiki. Vino Teran je pridelano iz sorte grozdja (*Vitis vinifera* L.) Refošk, ki je znana po svoji intenzivni rdeče-vijolični barvi. Ta je posledica bogate vsebnosti antocianov in nekoliko nižje vsebnosti taninov (Vanzo in sod., 2012). Zaradi njegove bogate vsebnosti polifenolov Teran pozitivno vpliva na zdravje in ima visoko hranilno vrednost (Fornasario et al., 2012). Njegove edinstvene lastnosti so izražene v sadnem vonju, ki spominja na sveže gozdne sadeže. Vino Teran se večinoma zaužije v enem letu, zato je aroma sorte zelo pomembna za njegov tipični okus.

Vino je alkoholna pijača, sestavljena iz vode (80-85 % v/v), alkoholov (predvsem etanol od 9-15 % v/v) in različnih manjših sestavin (~3 %). Te manjše sestavine predstavljajo organske kisline, sladkorji, fenoli, dušikove spojine, encimi, vitamini, lipidi, anorganski anioni in kationi ter veliko število hlapnih spojin (Revi in sod., 2014). Hlapne spojine oz. aromatične spojine vina v veliki meri določajo tudi njegov vonj in aromo. Vonj in aroma pa pomembno vplivata na kakovost vina in potrošniško naravnost kupca. Vendar so prisotne aromatične spojine vina zelo kompleksne, predvsem zato, ker so sestavljene iz zelo različnih skupin. Do danes so identificirali več kot 1000 spojin iz različnih kemijskih skupin, ki zajemajo širok spekter polarnosti, topnosti in hlapnosti: višji alkoholi, aldehidi, etilni estri maščobnih kislin, maščobne kisline, ketoni, monoterpeni, hlapni fenoli,... idr. Koncentracijsko območje teh spojin v vinu je lahko od nekaj ng/l do več sto mg/l (Andujar-Ortiz in sod., 2009; García-Carpintero in sod., 2012b). Na prisotnost, odsotnost in različne deleže hlapnih spojin v vinu močno vplivajo dejavniki pridelave (podnebje, tla, sorta, prakse pridelave grozdja) in enološki dejavniki (stanje grozdja, fermentacija, tretiranje po fermentaciji) (Welke in sod., 2014).

Vse hlapne spojine v vinu ne prispevajo k njegovi aromi. Vpliv hlapne spojine na končni vonj in aromo je odvisen od njene vsebnosti v vinu in od njenega praga zaznave. Prag zaznave je definiran kot najnižja koncentracija, ki jo lahko zazna z vonjem vsaj polovica degustatorjev, ki ocenjuje vino (Welke in sod., 2014).

Za ocenjevanje senzoričnega prispevka aromatskih spojin k vonju vina se uporablja aktivna vrednost vonja (»odor activity value«, OAV). OAV predstavlja kvantitativni pristop k ocenjevanju prispevkov hlapnih spojin k vonju. OAV je računsko razmerje med vsebnostjo posamezne spojine in njenim pragom zaznave. Hlapna spojina prispeva k vonju, ko je njena vsebnost v vinu nad pragom zaznave, torej, ko je $OAV > 1$ (Pino in Queris, 2011; Welke in sod., 2014). Drugi kvantitativni faktor je relativni prispevek vonja (»relative odor contribution«, ROC), ki predstavlja procentualni delež prispevka določene hlapne spojine in je računsko razmerje med OAV za posamezno spojino in vsoto OAV tistih spojin, ki imajo $OAV > 1$ (Welke in sod., 2014).

Kvalitativno vrednotenje senzoričnega prispevka pa izvajajo z deskriptorji vonja vsake spojine. Te deskriptorje so ugotavljali s plinsko kromatografijo-olfaktometrijo (GC-O), ki uporablja za detektor človeški nos. Po ločitvi spojin na kromatografski koloni ovrednotijo vonje spojin. Opisujejo jih kot cvetlični, sadni, zelen, vonj po topilu, vonj po plastiki, vonj po praženju in drugi (Welke in sod., 2014).

Cilj tega dela je predstaviti hlapni profil vina Teran, proizvedenega v Primorskem vinorodnem okolišu (Kras), v letnikih od 2011 do 2013. Naše raziskave smo osredotočili predvsem na različne skupine hlapnih spojin, ki nastanejo med alkoholno fermentacijo, določali pa smo tudi C6 spojine (1-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol). Posebno so nas zanimali estri, ker je od njih običajno odvisen vonj tipičnih ne-aromatičnih sort (Etievant 1993; Ferreira in sod., 1995). Za ta pristop smo se odločili tudi zaradi značilnega sadnega vonja vina Teran, ki je običajno v korelaciji z izdatnimi vsebnostmi estrov.

2. MATERIAL IN METODE

2.1 Vzorčenje

Vzorke vina Teran smo vzorčili iz sodov iz nerjavečega jekla ali lesenih sodov kraških pridelovalcev vina. Za vsak vzorec smo odvzeli 0,75 l vina. V treh letih smo odvzeli 82 vin različnih proizvajalcev (39 letnika 2011, 22 letnika 2012 in 21 letnika 2013), 9 mesecev po fermentaciji, po končani mlečnokislinski fermentaciji in pred stekleničenjem. Analize smo izvajali mesec dni po vzorčenju.

2.2 Vinogradniški poskusi

V letih 2012 in 2013 smo s pomočjo vinogradniških poskusov želeli preučiti učinek nekaterih ampelotehničnih del v vinogradu na aromatski potencial vina Teran. V dveh poskusnih vinogradih, na območju Dutovelj, je bila zastavljena primerjava med naslednjimi vzgojnimi

oblikami in vinogradniškimi tehnologijami: latnik kontrola (1), latnik 50% redčenje grozdja v fazi obarvanja jagod (2), enojni guyot kontrola (3), enojni guyot 50% redčenje grozdja v fazi obarvanja jagod (4), enojni guyot odstranjevanje listov v predelu grozdja pred cvetenjem (5).

Grozdje različnih obravnavanj smo ločeno vinificirali in v poskusnih vinih analizirali hlapne spojine po 9 mesecih zorenja (letnik 2013) in po 21 meseci zorenja (letnik 2012) v inoks posodah.

Ocenjevalna komisija, sestavljena iz enajstih degustatorjev, je vina tudi senzorično ocenila in sicer intenziteto sortne arome vina Teran in intenziteto sadne arome. Pri izračunu povprečja, smo minimalno in maksimalno oceno izločili.

2.3 Analitske metode

Osnovne fizikalno-kemijske parametre vina Teran smo določili s standardnimi EEC-metodami (Commission Regulation, 1990).

Hlapne spojine v vinu smo analizirali v dveh korakih. Najprej smo izvajali ekstrakcijo z diklorometanom, sledila pa je določitev s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom (Bavčar in sod., 2011a; Bavčar in sod., 2011b; Bavčar in Baša Česnik, 2011).

2.4 Statistična analiza

Podatke smo zbrali in uredili z uporabo Excela (Microsoft Office Professional Plus 2010) in analizo variance (one-way ANOVA), ki smo jo uporabili za primerjavo fizikalno-kemijskih lastnosti in vsebnosti aromatskih spojin. Izvedli smo jo z uporabo statističnega programskega paketa Statgraphics® Centurion XVI (StatPoint Technologies).

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Osnovni fizikalno-kemijski parametri Terana letnikov 2011, 2012 in 2013 so prikazani v Tabeli 1. Rezultati kažejo, da razlike med letniki niso velike in so verjetno le posledica različnih podnebnih pogojev. Lahko zaključimo, da vino Teran vsebuje zmerno stopnjo alkohola (12 % vol), da ima večje vsebnosti celokupnega ekstrakta in skupnih kislin, ter ima presenetljivo nizke vsebnosti prostega in skupnega žveplovega dioksida.

Tabela 1: Standardni fizikalno-kemijski parametri Terana letnik 2011, 2012 in 2013

	letnik 2011	letnik 2012	letnik 2013
	n=39	n=22	n=21
alkohol (vol. %)	12.01±0.60 ^a A ^β	11.95±0.58 ^a A ^β	12.06±0.46 ^a A ^β
ekstrakt (g/l)	30.0±2.4 ^a B ^β	27.3±1.7 ^a A ^β	27.1±2.6 ^a A ^β
skupne kisline (g/l vinska kislina)	7.5±0.7 ^a A ^β	8.0±0.8 ^a B ^β	7.5±0.8 ^a AB ^β
hlapne kisline (g/l očetna kislina)	0.62±0.17 ^a B ^β	0.45±0.11 ^a A ^β	0.73±0.13 ^a C ^β
prosti SO ₂ (mg/l)	13±3 ^a B ^β	12±1 ^a A ^β	12±4 ^a A ^β
skupni SO ₂ (mg/l)	43±6 ^a B ^β	40±9 ^a B ^β	35±7 ^a A ^β
pH	3.37±13 ^a B ^β	3.26±0.12 ^a A ^β	3.33±0.14 ^a AB ^β
relativna gostota	0.9958±0.0001 ^a B ^β	0.9948±0.0007 ^a A ^β	0.9946±0.0008 ^a A ^β
mlečna kislina (g/l)	2.1±0.4 ^a B ^β	1.5±0.4 ^a A ^β	2.5±0.6 ^a C ^β
reducirajoči sladkorji (g/l)	2.5±0.7 ^a B ^β	1.2±0.3 ^a A ^β	1.3±0.7 ^a A ^β

^a-za vse podatke je predstavljena povprečna vrednost ± standardni odklon

^β-statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$) so označene z A, B, C i

Rezultati raziskave vsebnosti izbranih hlapnih spojin so prikazani v Tabeli 2. Ugotovili smo, da vina Teran vsebujejo visoke vsebnosti 1-heksanola (povprečna vrednost treh letnikov je bila 1292 µg/l) in signifikantne vsebnosti 2-fenil-etil-acetata (povprečna vrednost treh letnikov je bila 49 µg/l), izoamil acetata, benzaldehida, benzil alkohola, *cis*-3-heksen-1-ola, etil butirata, etil dekanooata, etil dodekanoata, etil heksadekanoata, etil heksanoata in etil oktanoata.

Tabela 2: Vsebnosti hlavnih spojin ($\mu\text{g/l}$) vin Teran letnikov 2011, 2012 in 2013 in njihovi prgi zaznave ((a) Li in sod., 2008; (b) Duarte in sod., 2010; (c) García-Carpintero in sod., 2012a; (d) Rocha in sod., 2004, 2005, (e) Sánchez-Palomo in sod., 2012; (f) García-Carpintero in sod., 2014; (g) Welke in sod., 2014)

	letnik 2011, n=39			letnik 2012, n=22			letnik 2013, n=21			prag zaznave
	min - maks	povprečje		min - maks	povprečje		min - maks	povprečje		
aldehidi										
n-heksaldehid (kapronaldehid)	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		
benzaldehid	n.d. - 91	8±18 ^a A ^g	<LOQ - 10	<LOQ - 10	4±3 ^a A ^g	<LOQ - 75	16±20 ^a B ^g	350 (c, e, f)		
benzil alkohol	42 - 799	164±152 ^a A ^g	67 - 474	163±90 ^a A ^g		42 - 842	285±210 ^a B ^g	200000 (c)		
C6 spojine										
1-heksanol	310 - 2538	1205±454 ^a A ^g	632 - 2218	1227±462 ^a AB ^g		598 - 3008	1522±672 ^a B ^g	8000 (a, b, c, e, f)		
cis-3-heksen-1-ol	15 - 125	50±24 ^a A ^g	18 - 190	55±35 ^a A ^g		23 - 278	103±67 ^a B ^g	400 (c, e, f)		
estri										
2-fenil-etil-acetat	13 - 108	51±24 ^a B ^g	15 - 72	35±16 ^a A ^g		41-90	62±14 ^a C ^g	250 (b, c, e, f)		
etil butanoat (etil butirat)	30 - 301	116±52 ^a B ^g	57 - 104	80±14 ^a A ^g		37 - 245	108±44 ^a B ^g	20 (a, b, c, e, f)		
etil dekanat (etil kaprat)	29 - 237	84±45 ^a B ^g	23 - 84	56±16 ^a A ^g		73 - 291	184±57 ^a C ^g	200 (a, b, c, e, f)		
etil dodekanoat (etil laurat)	n.d. - 46	29±25 ^a A ^g	n.d. - 13	8±4 ^a A ^g		n.d. - 56	40±14 ^a A ^g	3500 (f)		
etil heksadekanoat (etil palmilat)	<LOQ - 717	84±141 ^a A ^g	1 - 152	26±42 ^a A ^g		2 - 751	92±163 ^a A ^g	1500 (a, f)		
etil heksanoat (etil kaproat)	81 - 304	186±49 ^a B ^g	84 - 211	157±36 ^a A ^g		132 - 300	191±43 ^a B ^g	14 (a, b, c, e, f)		
etil oktanat (etil kaprilat)	105 - 376	216±59 ^a B ^g	88 - 259	170±41 ^a A ^g		118 - 253	187±41 ^a A ^g	5 (a, b, c, e, f)		
heksil acetat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	1500 (a, c, e, f)		
izoamil acetat	163 - 803	393±143 ^a B ^g	163 - 563	264±82 ^a A ^g		232 - 609	406±98 ^a B ^g	30 (c, e, f)		
laktoni										
γ -butirolakton	6840 - 18907	14036±3408 ^a B ^g	4444 - 12999	9423±2449 ^a A ^g		8401 - 19879	14512±2983 ^a B ^g	5000 (d)		
ketoni										
β -ionon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	3,5 (b)		

^a prikazane so povprečne vrednosti in standardna deviacija, n.d. pomeni spojina ni bila detektirana, <LOQ pomeni pod mejo kvantitativne določitve metode

^b statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$) so označene z A, B, C

Primerjava med letniki je pokazala, da ima letnik 2012 nekoliko nižje vsebnosti 2-fenil-etil-acetata, izoamil acetata, benzaldehida, etil butirata, etil dekanota, etil dodekanoata, etil heksadekanoata, etil heksanoata, etil oktanoata in γ -butirolaktona kot letnika 2011 in 2013. Najvišje vsebnosti vseh najdenih spojin, razen etil oktanoata smo potrdili pri letniku 2013.

Za oceno senzoričnega prispevka posameznih hlapnih spojin k vonju vina, smo izračunali OAV in ROC vrednosti. Glede na izračune je najpomembnejša hlapna spojina vina Teran etil oktanoat, ki ima sladek, češnjev, sadni vonj. Drugi najpomembnejši hlapni spojini sta izoamil acetat, ki ima sladek, bananin, sadni vonj in etil heksanoat, ki ima sadni, jabolčni in jagodni vonj. Pomembni sta še etil butirata s sadnim vonjem in γ -butirolakton s sladkim, karamelnim in vonjem po praženem. Rezultati so predstavljeni v Tabeli 3.

Tabela 3: OAV (odor activity value) in ROC (relative odor contribution v %) vrednosti hlapnih spojin, signifikantnih za aromo Terana v letih 2011-2013

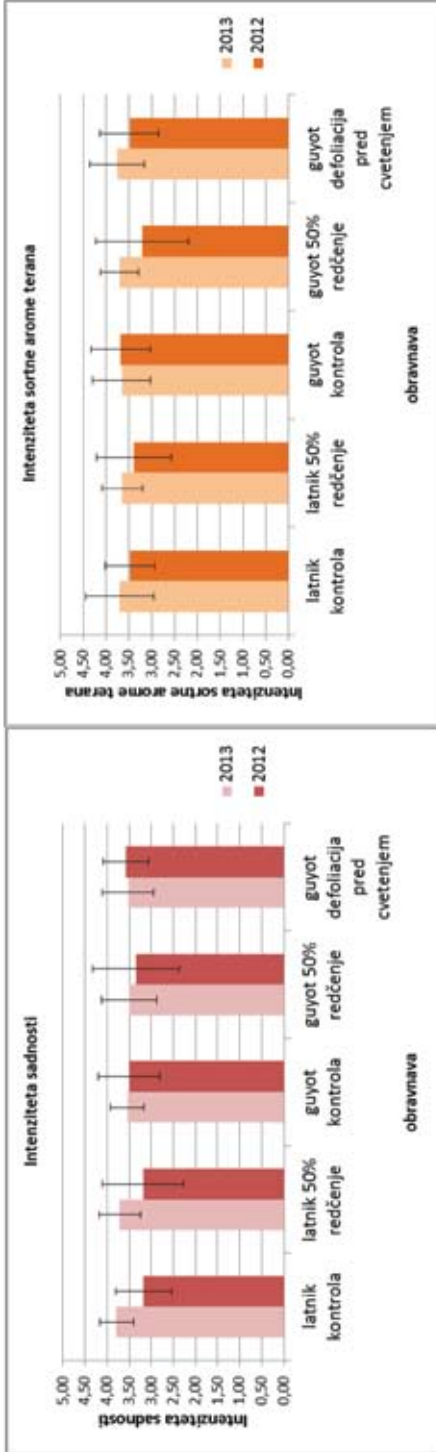
	OAV			ROC (%)		
	2011	2012	2013	2011	2012	2013
Aldehidi						
n-heksaldehid (kapronaldehid)	0	0	0	/	/	/
benzaldehyd	0,02	0,01	0,05	/	/	/
benzil alkohol	0,001	0,001	0,001	/	/	/
C6 spojine						
1-heksanol	0,2	0,2	0,2	/	/	/
cis-3-heksen-1-ol	0,1	0,1	0,3	/	/	/
Estri						
2-fenil-etil-acetat	0,2	0,1	0,2	/	/	/
etil butanoat (etil butirata)	5,8	4,0	5,4	7,4	6,7	7,4
etil dekanota (etil kaprat)	0,4	0,3	0,9	/	/	/
etil dodekanoat (etil laurat)	0,01	0,002	0,01	/	/	/
etil heksadekanoat (etil palmitat)	0,1	0,02	0,1	/	/	/
etil heksanoat (etil kaproat)	13,3	11,2	13,7	17,0	18,8	18,8
etil oktanoat (etil kaprilat)	43,1	33,9	37,3	55,2	56,7	51,2
heksil acetat	0	0	0	/	/	/
izoamil acetat	13,1	8,8	13,5	16,8	14,7	18,6
Laktioni						
γ -butirolakton	2,8	1,9	2,9	3,6	3,1	4,0
Ketoni						
β -ionon	0	0	0	/	/	/

Kljub temu, da je veliko analiziranih spojin v vinu Teran pod OAV, imajo lahko sinergijski učinek in bi lahko imele pozitiven vpliv na njegov vonj. Znano je, da OAV ne daje dokončnega odgovora na to, kako posamezna spojina vpliva na vonj vina. Vsebnost nekaterih spojin se lahko precej razlikuje med vzorci, vendar imajo kljub temu malo ali nič učinka na senzorične lastnosti teh vin. To je lahko posledica maskiranja, oziroma povečanja učinka hlapnih in nehlapnih spojin v vinu pri različnih vsebnostih (Benkowitz in sod., 2012).

V letih 2012 in 2013 smo s pomočjo vinogradniških poskusov želeli preučiti učinek nekaterih ampelotehničnih del v vinogradu na aromatski profil vina Teran. Na območju Dutovelj so bili v dveh poskusnih vinogradih izvedni sledeči postopki: 1 – latnik kontrola (brez ukrepa), 2 - latnik s 50% redukcijo grozdja (odstranitev drugega grozda na vsaki trtni mladiki v fazi obarvanja jagod), 3 – enojni guyot kontrola (brez ukrepa), 4 – enojni guyot s 50% redukcijo grozdja (odstranitev drugega grozda na vsaki trtni mladiki v fazi obarvanja jagod), 5 – enojni guyot z odstranjevanjem listov v predelu grozdov pred cvetenjem (odstranitev 4 do 5 bazalnih listov na vsaki trtni mladiki). V vinu pridelanem iz tega grozdja smo določili vsebnost nekaterih hlapnih spojin. Rezultati so prikazani na Sliki 1 in v Tabeli 4. Vsebnost benzaldehida je bila v letniku 2013 pri poskusu v latniku s 50% redukcijo grozdja nekoliko višja od kontrole, ravno tako vsebnost etil heksadekanoata, le da pri letniku 2012. Vsebnost benzil alkohola je bila v letniku 2012 pri poskusu v enojnem guyotu z odstranjevanjem listov pred cvetenjem nekoliko večja kot pri kontroli, vsebnost etil dekanoata pa pri istem poskusu nekoliko manjša kot pri kontroli. Splošno lahko potrdimo, da ampelotehnična dela niso bistveno vplivala na vsebnost analiziranih hlapnih spojin.

Kljub neznačilnim razlikam v vsebnosti posameznih analiziranih hlapnih spojin različnih vinogradniških poskusov, je senzorična ocena poskusnih vin pokazala pri letniku 2013 višje zaznave sadnih arom pri vzgojni obliki 'latnik' kot pri vzorcih vzgojne oblike 'guyot'. Vzrok je lahko v stopnji zrelosti grozdja, ki posledično lahko vpliva na aromo vina. V vinih letnika 2012 (21 mesecev starana vina) je bila zaznava sadnosti višja pri vzgojni obliki 'guyot' v primerjavi z vzgojno obliko 'latnik'. Najvišjo zaznavo sortne arome vina Teran smo pri letniku 2013 opazili pri vzorcu ampelotehniko guyot z odstranjevanjem listov v predelu grozdja pred cvetenjem.

Tako intenziteta sortne kot tudi sadne arome terana sta bili v letniku 2013 višji kot v letniku 2012, kar nakazuje na dejstvo, da imajo vina Teran v prvem letu zorenja višje zaznave sadnosti in sortnosti v primerjavi s staranimi vini.



Slika 1: senzorična ocena poskusnih vin na parameter intenziteta sadnosti (levo) in intenziteta sorte arome terana (desno) glede na vinogradiška obravnavanja v letniku 2013 in 2012 (ena vinifikacija na obravnavanje, 11 degustatorjev).

Tabela 4: Vpliv ampelotehničnih del v vinogradu na vsebnosti hlajpnih spojin ($\mu\text{g/l}$) v vinih Teran lehnika 2012 in 2013

	2012					2013				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aldehidi										
n-heksaldehid (kapronaldehid)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
benzaldehyd	2±2 ^a	3±2 ^a	4±2 ^a	4±2 ^a	4±2 ^a	3±2 ^a	9±2 ^a	6±2 ^a	8±2 ^a	6±2 ^a
benzil alkohol	180±3 ^a	205±3 ^a	284±3 ^a	266±3 ^a	364±3 ^a	329±3 ^a	359±3 ^a	311±3 ^a	346±3 ^a	292±3 ^a
C6 spojine										
1-heksanol	1278±3 ^a	1346±3 ^a	1379±3 ^a	1343±3 ^a	1242±3 ^a	1285±3 ^a	1337±3 ^a	1232±3 ^a	1253±3 ^a	1215±3 ^a
cis-3-heksen-1-ol	44±1 ^a	49±1 ^a	50±1 ^a	46±1 ^a	52±1 ^a	51±1 ^a	62±1 ^a	58±1 ^a	59±1 ^a	56±1 ^a
Estri										
2-fenil-etil-acetat	50±1 ^a	49±1 ^a	58±1 ^a	54±1 ^a	71±1 ^a	66±1 ^a	66±1 ^a	59±1 ^a	64±1 ^a	57±1 ^a
etil butanoat (etil butirat)	123±2 ^a	120±2 ^a	264±2 ^a	286±2 ^a	129±2 ^a	147±2 ^a	109±2 ^a	114±2 ^a	109±2 ^a	104±2 ^a
etil dekanooat (etil kaprat)	236±6 ^a	310±6 ^a	337±6 ^a	322±6 ^a	163±6 ^a	170±6 ^a	168±6 ^a	169±6 ^a	170±6 ^a	172±6 ^a
etil dodekanoat (etil laurat)	n.d.	33±4 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
etil heksadekanooat (etil palmitat)	10±2 ^a	25±2 ^a	17±2 ^a	14±2 ^a	17±2 ^a	28±2 ^a	22±2 ^a	24±2 ^a	24±2 ^a	25±2 ^a
etil heksanoat (etil kaproat)	156±2 ^a	168±2 ^a	147±2 ^a	145±2 ^a	170±2 ^a	158±2 ^a	153±2 ^a	156±2 ^a	160±2 ^a	159±2 ^a
etil oktanooat (etil kaprilat)	134±3 ^a	137±3 ^a	162±3 ^a	154±3 ^a	127±3 ^a	129±3 ^a	134±3 ^a	131±3 ^a	132±3 ^a	132±3 ^a
heksil acetat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
izoamil acetat	331±2 ^a	325±2 ^a	307±2 ^a	315±2 ^a	329±2 ^a	320±2 ^a	332±2 ^a	345±2 ^a	362±2 ^a	351±2 ^a
laktoni										
γ -butirolakton	13887±2 ^a	14065±2 ^a	12605±2 ^a	12362±2 ^a	14602±2 ^a	13288±2 ^a	14907±2 ^a	14954±2 ^a	15852±2 ^a	15940±2 ^a
ketoni										
β -ionon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Prikazane so vsebnosti in standardna deviacija obnovljivosti metode, n.d. pomeni spojina ni bila detektirana

1 – lathnik kontrola, 2 - lathnik s 50% redukcijo grozdja, 3 – guyot kontrola, 4 – guyot s 50% redukcijo grozdja, 5 - guyot z odstranjevanjem listov v pre-delu grozdja pred cvetenjem

4. SKLEPI

Rezultati naše raziskave kažejo, da so estri dominantna skupina fermentacijskih arom v vinu Teran, ki pomembno prispevajo k njegovi sadni aromi. Na aromatski profil vina Teran je najbolj vplivala spojina etil oktanoat, ki daje vonj po sladkem, češnjah in sadju. Drugi najpomembnejši ester je bil etil heksanoat, z vonjem po jabolkah in jagodah, tretji pa izoamil acetat, s sladkim, sadnim vonjem in vonjem po bananah. Sledila sta še etil butirat s sadnim vonjem in γ -butirolakton s sladkim, karamelnim in vonjem po praženem.

Vinogradniški poskusi z različnimi gojitvenimi oblikami in ampelotehničnimi tehnologijami (latnik, enojni guyot, redčenje grozdja, odstranjevanje listov pred cvetenjem) niso imeli večjega vpliva na vsebnost analiziranih hlapnih spojin. Kljub temu pa so vinogradniški poskusi vplivali na senzorično zaznavo sadnosti in sortnosti vina Teran. Intenziteta sadne in sortne arome vina je bila višja pri mladih vinih (9 mesecev, letnik 2013) kot pri starejših (21 mesecev, letnik 2012), kar nakazuje, da je sadnost in sortnost vina Teran najintenzivnejša v prvem letniku predelave.

5. ZAHVALA

Zahvaljujemo se vinarjem iz Krasa za vzorce in vinarju Borisu Lisjaku za opravljene vinogradniške poskuse in vinifikacije poskusnih vin.

Za pomoč pri izvedbi meritev se avtorji zahvaljujemo Mateji Fortuna, Ivi Kmetič Cegnar in Nadi Bizjak, sodelavkam Centralnega laboratorija Kmetijskega inštituta Slovenije.

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.

6. LITERATURA

- Andujar-Ortiz I., Moreno-Arribas M. V., Martín-Álvarez P. J., Pozo-Bayón M. A. 2009. Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7351-7357.
- Bavčar D., Baša Česnik H., Čuš F., Košmerl T. 2011a. The influence of skin contact during alcoholic fermentation on the aroma composition of Ribolla Gialla and Malvasia Istriana *Vitis vinifera* (L.) grape wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 1801-1808.
- Bavčar D., Baša Česnik H., Čuš F., Vanzo A., Gašperlin L., Košmerl T. 2011b. Impact of Alternative Skin Contact Procedures on the Aroma Composition of White Wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32: 190-203.
- Bavčar D., Baša Česnik H. 2011. Validation of the method for the determination of

- some wine volatile compounds. *Acta agriculturae Slovenica*, 97: 285-293.
- Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines.
- Duarte W. F., Dias D. R., Oliveria J. M., Vilanova M., Teixeira J. A., Almeida e Silva J. B., Schwan R. F. 2010. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. *Food Research International*, 43: 2303-2314.
- Etievant P.X. 1993. Wine. In: *Volatile compounds in food and beverages*. Maarse H. (ed.). New York, Marcel Dekker: 483-545.
- Ferreira V., Fernandez P., Pena C., Escudero A., Cacho J.F. 1995. Investigation of the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 3: 381-392.
- Fornasario S., Tramer F., Žiberna L., Passamonti S. 2012. Biološka uporabnost in aktivnost pigmentov grozdja pri živalih: implikacije za zdravje ljudi, Simpozij AGROTUR, Ljubljana, 28. November 2012, pp. 7-13.
- García-Carpintero E. G., Gómez Gallego M. A., Sánchez-Palomo E., González Viñas. 2012a. Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chemistry*, 134: 851-863.
- García-Carpintero E.G., Sánchez-Palomo E., Gómez Gallego M. A., González-Viñas M. A. 2012b. Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines. *Food Chemistry*, 131: 90-98.
- García-Carpintero E. G., Sánchez-Palomo E., Oliveria González Viñas M. A. 2014. Volatile composition of Bobal red wines subjected to alcoholic/malolactic fermentation with oak chips. *Food Science and Technology*, 55: 586-594.
- Li H., Tao Y. S., Wang H., Zhang L. 2008. Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *European Food Research and Technology*, 227: 287-292.
- Pino J. A., Queris O. 2011. Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry*, 125: 1141-1146.
- Revi M., Badeka A., Kontakos S., Kontominas M.G. 2014. Effect of packaging material on enological parameters and volatile compounds of dry white wine. *Food Chemistry*, 152: 331-339.
- Rocha S.M., Coutinho P., Delgadillo I., Cardoso A.D., Coimbra M. A. 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.
- Rocha S.M., Rodrigues F., Coutinho P., Delgadillo I., Cardoso A.D., Coimbra M. A. 2004. Volatile composition of Baga red wine. Assessment of the identification of the would be impact odorants. *Analytica Chimica Acta*, 513, 1: 257-262.
- Sánchez-Palomo E., Gómez García-Carpintero E., Gómez Gallego M. A., González Viñas M.A. 2012. Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. *The Aroma of Rojal Red Wines from La Mancha Region – Determination of Key Odorants*. Salih B., Çelikbiçak Ö. (eds.). Published online, InTech: 147-170.
- Vanzo A., Šuklje K., Jenko M., Čuš F., Bavčar D., Lisjak K. 2012. Polifenolni potencial terana. *Bioaktivne spojine Terana*, Simpozij AGROTUR, Ljubljana, 28. November 2012, pp. 29-50.
- Welke J. E., Zanusi M., Lazzarotto M., Alcaraz Zini C. 2014. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. *Food Research International*, 59: 85-99.

HLAPNI FENOLI IN BIOGENI AMINI V VINIH TERAN

Helena BAŠA ČESNIK¹, Klemen LISJAK², Andreja RAKAR³,
Mojca ŽORŽ⁴, Romina ŽABAR⁵, Mitja MARTELANC⁶,
Lorena BUTINAR⁷, Paolo SIVILOTTI⁸, Polonca TREBŠE⁹,
Mladen FRANKO¹⁰

1, 2 Kmetijski inštitut Slovenije
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Univerza v Novi Gorici

¹ dr.

² dr.

³ dr.

⁴ dr.

⁵ dr.

⁶ dr.

⁷ doc. dr.

⁸ izr. prof. dr.

⁹ prof. dr.

¹⁰ prof. dr.

IZVLEČEK

V Teranu, pridelanem na Krasu, smo analizirali hlapne fenole: 4-etilfenol, 4-vinilfenol, 4-etilgvajakol in 4-vinilgvajakol. Triletno spremljanje vina (letnik 2011, 2012 in 2013) je pokazalo, da so vse omenjene nezaželene spojine prisotne v Teranu, vendar njihove vsebnosti ne vplivajo negativno na senzorične lastnosti Terana. Delež vzorcev, ki so imeli vsebnost hlapnih fenolov nad pragom zaznave v obdobju 2011–2013, so znašali: 7.3 % za 4-etilfenol, 98.8 % za 4-vinilfenol 25.6 % za 4-etilgvajakol in 91.5 % za 4-vinilgvajakol. Podatki iz literature so pokazali, da so vsebnosti hlapnih fenolov v Teranu primerljive z vsebnostmi hlapnih fenolov v rdečih vinih, proizvedenih v svetu. V Teranu smo analizirali tudi 11 različnih biogenih aminov. Skoraj pri vseh vzorcih smo določili putrescin in etanolamin, pri pribl. 60 % deležu vzorcev smo določili tudi tiramin, histamin in metilamin, zadnjega v nizkih koncentracijah. Pri tretjini vzorcev smo določili kadaverin in butilamin ter pri desetini vzorcev 2-metilbutilamin. Triptamin smo določili le pri enem vzorcu, heksilamina pa nismo določili pri nobenem vzorcu. Izvedli smo tudi mikrobiološko analizo.

Ključne besede: vino, biogeni amini, hlapni fenoli, Teran

Volatile phenols and biogenic amines in wine Teran

ABSTRACT

Volatile phenols, 4-ethylphenol, 4-vinylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-vinylguaiacol were analyzed in Teran wine produced in Karst region. Three year monitoring (vintage 2011, 2012, 2013) showed that all four undesirable compounds are present in Teran wine, however their content does not negatively influence sensory characteristics of wine. The percentage of samples, which showed contents of volatile phenols above odour threshold values were 7.3 % for 4-ethylphenol, 98.8 % for 4-vinylphenol, 25.6 % for 4-ethylguaiacol and 91.5 % for 4-vinylguaiacol during 2011 – 2013 period. Data from literature showed that volatile phenols contents in Teran are comparable with volatile phenols contents in red wines produced worldwide. In Teran we also analyzed 11 different biogenic amines. Almost in all samples putrescine and ethanolamine were determined, in approx. 60 % of the samples we determined also tyramine, histamine, and methylamine, the latter in low concentrations. In one-third of the samples were determined cadaverine and butylamine, and in the tenth of the samples 2-methylbutylamine. Tryptamine was detected only in one sample, hexylamine was not detected. Microbiological analysis was also performed.

Keywords: wine, biogenic amines, volatile phenols, Teran

1. UVOD

Nezaželene arome vina so eden izmed najbolj kritičnih problemov v enologiji. Zmanjšujejo senzorično kakovost vina in povzročajo gospodarske izgube v njegovi proizvodnji. Ena izmed nezaželenih arom je tako imenovani značaj vina »Brett«, ki je povezan s prisotnostjo etilfenolov (4-etilfenol in 4-etilgvajakol) in vinilfenolov (4-vinilfenol in 4-vinilgvajakol) v vinu (Pizarro in sod., 2012). Nizka vsebnost teh spojin pozitivno vpliva na kompleksno aromo vina, po drugi strani pa vsebnost nad senzoričnim pragom negativno vpliva na celotno aromo vina (Silva in sod., 2011). 4-etilfenol daje vinu vonj po konjskem znoju in usnju (Larcher in sod., 2007). 4-etilgvajakol daje vinu vonj po opečenem kruhu in dimu (García-Carpintero in sod., 2014). 4-vinilfenol prispeva vonj po obližu, tudi ko je pod pragom zaznave, vendar manj negativno, ko je v vinu prisoten tudi 4-vinilgvajakol. 4-vinilgvajakol prispeva k pikantni aromi. Mešanice

etilfenolov v rdečem vinu dajejo stabilne vonje in vonje po živalih (Larcher in sod., 2007). Po podatkih iz literature so pragi zaznave sledeči: 440 $\mu\text{g/l}$ za 4-etilfenol, 180 $\mu\text{g/l}$ za 4-vinilfenol, 33 $\mu\text{g/l}$ za 4-etilgvajakol in 40 $\mu\text{g/l}$ za 4-vinilgvajakol (Lópezin sod., 2002). Nekateri avtorji poročajo celo o višjih pragih zaznave za rdeča vina: 620 $\mu\text{g/l}$ za 4-etilfenol in 140 $\mu\text{g/l}$ za 4-etilgvajakol (Alañón in sod., 2013). Za 4-vinilgvajakol so poročali celo o pragu zaznave 10 mg/l (García-Carpintero in sod., 2012) in za vinilfenole 770 $\mu\text{g/l}$ (Pour Nikfardjam in sod., 2009).

Hlapni fenoli nastajajo predvsem pri metabolizmu hidroksicimetnih kislin s kvasovkami *Brettanomyces/Dekkera*, ki vključuje zaporedno delovanje dveh encimov. Prvi, cinamat dekarboksilaza, cepi fenolne kisline neposredno v vinilfenol in vinilgvajakol (*p*-kumarna kislina se razcepi v 4-vinilfenol in ferulna kislina se razcepi v 4-vinilgvajakol). Potem vinilfenol reduktaza pretvori 4-vinilfenol v 4-etilfenol in 4-vinilgvajakol v 4-etilgvajakol (Oelofse in sod., 2009; Saez in sod., 2011; Silva in sod., 2011; Valentão in sod., 2007). Znano je, da lahko te kvasovke rastejo med skladiščenjem steklenic vina v daljšem časovnem obdobju, tako da nastali 4-etilfenol in 4-etilgvajakol lahko presežata senzorične zaznave po prvih mesecih skladiščenja (Renouf in sod., 2007). Primerna higiena in žveplanje vina ter sodov lahko preprečijo razvoj teh nezaželenih kvasovk (Valentão in sod., 2007).

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 aromi vina in mikrobiološke stabilnosti. Kljub pozitivnemu vplivu na kakovost vina, pa so nekateri sevi MKB odgovorni tudi za nastanek različnih bolezní vina. Tudi tvorba biogenih aminov je večinoma posledica mikrobiološke aktivnosti nekaterih sevov MKB med vinifikacijo (Konig in Frohlich, 2009; Petri s sod., 2013). Med biogenimi amini so histamin, tiramin in putrescin najpogostejši v vinu. Njihova koncentracija se navadno poveča med JMKF. 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).

Zakonodaja nekaterih držav dovoljuje zavrnitev vina z vsebnostjo histamina, ki je višja od zakonskih omejitev. Zgornje meje za histamin v vinu so v nekaterih evropskih državah naslednje (mg/l , histamin): Nemčija (2), Nizozemska (3), Finska (5), Belgija (od 5 do 6), Francija (8), Švica in Avstrija (10) (Smit s sod., 2008).

Da bi na Krasu ugotovili nivo spojin, ki jih ne želimo v vinu, smo izvedli monitoring biogenih aminov in hlapnih fenolov v vinu. Tako smo v letih od 2011 do 2013 spremljali vsebnosti hlapnih fenolov in biogenih aminov v Teranu, pridelanem na Krasu. Delo je potekalo v okviru projekta AGROTUR, katerega cilj je ocena trenutnih tehnologij Terana in izboljšanje njegove mikrobiološke kvalitete.

2. MATERIAL IN METODE

2.1 Vzorčenje

Vzorce vina Teran smo zbrali iz sodov iz nerjavečega jekla ali lesenih sodov kraških pridelovalcev vina. V treh letih smo odvzeli 82 vzorcev vin različnih proizvajalcev (39 letnika 2011, 22 letnika 2012 in 21 letnika 2013), 9 mesecev po fermentaciji in po končani mlečnokislinski fermentaciji.

2.2 Analitske metode

Osnovne fizikalno-kemijske parametre Terana smo določili s standardnimi EEC- metodami (Evropska Unija, 1990).

Ekstrakcijo hlapnih fenolov iz vina smo izvajali z dietiletrom, določitev v ekstraktih pa s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom.

Za analizo vsebnosti biogenih aminov smo vzorce vina razredčili z metanolom in vzorec derivatizirali z ortoftalaldehidom ob prisotnosti 2-merkptoetanola in boratnega pufra s pH-vrednostjo 10,5. Tako smo dobili fluorescirajoče derivate biogenih aminov, ki smo jih nato določali z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (Agilent 1100, HP), v povezavi z fluorescenčnim detektorjem (G1321A, Agilent 1100, HP). Detekcija je potekala pri valovni dolžini 445 nm, medtem ko je vzbujanje fluorescenca potekalo pri valovni dolžini 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 MRS (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.

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Osnovni fizikalno-kemijski parametri Terana letnikov 2011, 2012 in 2013 so prikazani v Tabeli 1. Teran je vino z zmernim nivojem alkohola in povišano kislostjo (nižjimi pH-vrednostmi). Nižji pH je lahko neugoden za rast kvasovk *Brettanomyces/Dekkera*, vendar nizka vsebnost alkohola in nizka vsebnost SO₂ lahko povečata tveganje za mikrobiološko kvarjenje vina. Pri številnih avtorjih se je pokazalo, da je 0,8 mg/l molekularnega SO₂ optimalna meja za nadzor skoraj vseh kvasovk in bakterij (Du Toit in sod., 2005). Ker pa je vsebnost prostega SO₂, določena v Teranu, nizka, je molekularna vsebnost SO₂ veliko nižja od tiste, ki je potrebna za zaviranje rasti kvasovk *Brettanomyces/Dekkera*.

Tabela 1: Standardni fizikalno-kemijski parametri Terana, letniki 2011, 2012 in 2013

	letnik 2011	letnik 2012	letnik 2013
	povprečje	povprečje	povprečje
alkohol (vol. %)	12,01	11,95	12,06
molekularni SO ₂ (mg/l)	0,35	0,40	0,35
prosti SO ₂ (mg/l)	13	12	12
skupni SO ₂ (mg/l)	43	40	35
pH-vrednost	3,37	3,26	3,33
skupne kisline (g/l, vinska kislina)	7,5	8,0	7,5
hlapne kisline (g/l, očetna kislina)	0,62	0,45	0,73
reducirajoči sladkor (g/l)	2,5	1,2	1,3

Rezultati vsebnosti hlapnih fenolov in njihovih pragov zaznave so podani v Tabeli 2. V Teranu smo določili visoke vsebnosti 4-vinilfenola, nižje vsebnosti 4-etilfenola in 4-vinilgvajakola ter najnižje vsebnosti 4-etilgvajakola. Delež vzorcev nad pragom zaznave (Alañón in sod., 2013; Lópezin sod., 2002) je bil v obdobju 2011–2013, 7,3 % za 4-etilfenol, 98,8 % za 4-vinilfenol, 25,6 % za 4-etilgvajakol in 91,5 % za 4-vinilgvajakol.

Tabela 2: Vsebnosti hlapnih fenolov ($\mu\text{g/l}$) v Teranu v letnikih 2011, 2012 in 2013 ((a) Alañón in sod., 2013; (b) Lópezin sod., 2002)

	2011	povprečje 2011	2012	povprečje 2012	2013	povprečje 2013	prag zaznave
4-etilfenol	6 - 465	86±113	23 - 593	230±166	6 - 953	265±263	620 (a)
4-vinilfenol	366 - 3438	1141±576	423 - 2454	1454±640	90 - 3376	1360±844	180 (b)
4-etilgvajakol	6 - 441	54±98	6 - 479	85±102	9 - 250	90±78	140 (a)
4-vinilgvajakol	28 - 750	125±123	53 - 460	150±87	19 - 345	110±87	40 (b)

Povprečne vsebnosti so znašale v obdobju 2011–2013 153 $\mu\text{g/l}$ za 4-etilfenol, 1265 $\mu\text{g/l}$ za 4-vinilfenol, 69 $\mu\text{g/l}$ za 4-etilgvajakol in 128 $\mu\text{g/l}$ za 4-vinilgvajakol.

Primerjava rezultatov s podatki iz literature je pokazala, da smo določili podobne vsebnosti 4-etilgvajakola v Teranu kot Španci v rdečem vinu, staranem v hrastovih sodih. Tudi vsebnosti 4-etilfenola, 4-vinilfenola in 4-vinilgvajakola so primerljive z vsebnostmi v vinih navedenimi v literaturi. Primerjava je prikazana v tabeli 3.

Tabela 3: Primerjava vsebnosti hlapnih fenolov ($\mu\text{g/l}$) s podatki iz literature ((a) Pizarro in sod., 2012, (b) Pizarro in sod., 2007, (c) Domínguez in sod., 2002, (d) Smit in sod., 2003, (e) Díez in sod., 2004, (f) López in sod., 2002, (g) García-Carpintero in sod., 2012, (h) Renouf in sod., 2007)

	4-etilfenol	4-vinilfenol	4-etilgvajakol	4-vinilgvajakol
rdeče vino Teran	6–953	90–3438	6–479	19–750
rdeče vino (a)	101–133	n. a.	88–105	n. a.
rdeče vino (b)	7–84	730–4385	42–65	49–54
rdeče vino (c)	97–782	1430–2174	72–255	282–880
rdeče vino Tannat (d)	170–1120	n. a.	120	n. a.
rdeče vino Modra frankinja (e)	149–435	n. a.	81–152	n. a.
špansko rdeče vino, starano v hrastovih sodih (f)	8.6–1500	8.1-1998	0,53–420	5.4–236
rdeče vino Moravia Dulce (g)	n. d.	n. a.	n. d.	287–473
arhivska vina (letniki 1909–1981) iz območja Bordeaux (h)	1040–6410	n. a.	122–975	n. a.

n. a. 'spojina ni bila analizirana'

n. d. 'spojina ni bila določena'

Nižje vrednosti pH v vinih Teran bi lahko omejile rast kvasovk *Brettanomyces/Dekkera*, kar bi lahko zmanjšalo možnosti za nastanek hlapnih fenolov. Rezultati naših analiz so pokazali, da več kot 90 % vzorcev Terana vsebuje 4-etilfenol pod senzoričnim pragom. Vendar pa je treba poudariti, da so vina vzorčena v spomladanskem času, ko so temperature v vinskih kletih še vedno nizke, kar bi tudi lahko zaviralo rast nezaželenih mikroorganizmov. V literaturi navajajo, da je bila vsebnost 4-etilfenola v steklenicah staranih vin Teran 1016, 678 ter 616 $\mu\text{g/l}$ za letnike 2007, 2008 in 2009 (Čuš in sod., 2011).

Pred stekleničenjem vina je treba ustrezno korigirati SO₂ oziroma vino filtrirati, kar preprečuje rast kvasovk *Brettanomyces/Dekkera* ter nastajanje nezaželenih hlapnih fenolov. Renouf in sod. (2007) so našli *B. bruxelensis*, najbolj prevladujočo kvasovko, ki lahko raste med dolgotrajnim shranjevanjem vina v steklenicah in proizvaja 4-etilfenol in 4-etilgvajakol v količinah, ki presegajo prage zaznave. Uporaba 1,0 µm-filtra večinoma zadrži oz. odstrani kvasovke in tako prepreči naraščanje vsebnosti hlapnih fenolov nekaj let po stekleničenju.

Rezultati vsebnosti biogenih aminov so podani v tabeli 4. V Teranu smo določili najvišje vsebnosti putrescina (do 78,71 mg/l), in sicer pri 97,5 % deležu vzorcev, ter etanolamina (do 37,5 mg/l) pri vseh vzorcih. V približno 60 % deležu vzorcev smo določili tudi prisotnost tiramina (do 10,77 mg/l), histamina (do 13,86 mg/l) in metilamina, s tem da so bile za metilamin izmerjene bistveno nižje koncentracije (do 1,2 mg/l). Kadaverin smo določili v letniku 2011 le pri enem vzorcu, medtem ko smo ga pri letniku 2012 in 2013 določili pri približno tretjini vzorcev, s tem da so bile koncentracije višje v letniku 2012 (do 9,9 mg/l) v primeravi z letnikom 2013 (do 1,92 mg/l). Pri približno tretjini vzorcev smo določili tudi butilamin v nizkih koncentracijah (do 1,85 mg/l). V zelo nizkih koncentracijah in le pri približno desetini vseh vzorcev smo določili 2-metilbutilamin (pod 1,16 mg/l). Triptamin smo določili le v enem vzorcu, heksilamina pa nismo določili pri nobenem vzorcu.

Tabela 4: Območja vsebnosti biogenih aminov (mg/l) v Teranu v letnikih 2011, 2012 in 2013

	2011	2012	2013	2011–2013
putrescin	0,01–78,71	1,79–11,83	4,3–31,79	0,01–78,71
kadaverin	0,01–0,66	1,8–9,9	0,088–1,92	0,01–9,9
etanolamin	9,03–30,67	9,76–37,5	9,06–19,1	9,03–37,5
histamin	0,003–12,77	0,5–13,86	0,075–7,71	0,003–13,86
metilamin	0,004–1,2	0,2–1,12	0,013–0,27	0,004–1,2
tiramin	0,01–10,77	0,6–7,6	0,067–6,27	0,01–10,77
butilamin	n. d.	0,1–1,85	0,022–0,24	0,1–1,85
triptamin	n. d.	n. d.	0,041–0,19	0,041–0,19
2-metilbutilamin	n. a.	0,2–1,16	0,047–0,23	0,047–1,16
izopentilamin	n. a.	n. d.	0,092–4,69	0,092–4,69
heksilamin	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.

n. a. 'spojina ni bila analizirana'

n. d. 'spojina ni bila detektirana (koncentracija pod mejo zaznavnosti)'

Povprečne vsebnosti so bile v obdobju 2011–2013 15,97 mg/l za putrescin, 0,67 mg/l za kadaverin, 18,74 mg/l za etanolamin, 2,63 mg/l za histamin, 0,36 mg/l za metilamin, 1,72 mg/l za tiramin, 0,24 mg/l za 2-metilbutilamin, 0,20 mg/l za izopentilamin.

Pri 5% deležu vzorcev je bila izmerjena koncentracija za histamin višja od priporočenih maksimalnih dovoljenih vrednosti v Avstriji in Švici (10 mg/l) ter pri 7,5 % od priporočenih vrednosti v Franciji (8 mg/l). Pri četrtini vzorcev je bila višja od priporočenih vrednosti v Belgiji (5 mg/l), pri 35% deležu vzorcev je bila višja od priporočenih vrednosti na Nizozemskem (3 mg/l) in pri 40% deležu vzorcev od priporočene vrednosti v Nemčiji (2 mg/l).

Koncentracije tiramina, metilamina in kadaverina so bile znotraj območij, ki jih za rdeča vina navajajo literaturni viri, medtem ko so bili podatki za etanolamin pri pribl. 40 % deležu vzorcev in za putrescin pri 20 % deležu vzorcev vina letnika 2011 višji od navedenih v literaturi. Podatkov za butilamin, 2-metilbutilamin in izopentilamin v literaturi nismo zasledili.

Tabela 5: Primerjava vsebnosti biogenih aminov (mg/l) s podatki iz literature ((i) Tuberose in sod., 2015, (j) García-Marino in sod., 2010, (k-m) Landete in sod., 2005, (p) Marcobal in sod., 2006, (r) Anli in sod., 2004 in (s) Vazquez-Lasa in sod, 1998))

	metilamin	etanolamin	triptamin	izopentilamin	putrescin	kadaverin	histamin	tiramin
rdeče vino Cannonau (i)	0,9 ± 0,56	7,55 ± 6,29	0,05	0,10	20,5 ± 10,2	2,13 ± 0,56	6,61 ± 1,54	9,06 ± 2,86
kakovostno rdeče vino, območje Castilla y León, Španija (j)		/			0.51–25.03		1.72–8.86	
rdeče vino Tempranillo (k)					7,6 ± 2,1		2,5 ± 1,2	2,6 ± 1,1
rdeče vino Bobal (l)					3,5 ± 1,4		2,3 ± 1,0	2,0 ± 0,8
rdeče vino Gamacha (m)					7,4 ± 2,1		1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2
redeče vino Merlot (n)		4,64 ± 0,10 (letnik 2004) 16,90 ± 0,70 (letnik 2005)			1,08 ± 0,10 (letnik 2004) 4,47 ± 0,15 (letnik 2005)			
redeče vino Syrah (o)		7,34 ± 0,30 (letnik 2004) 0,66 ± 0,06 (letnik 2005)			0,73 ± 0,11 (letnik 2004) 4,67 ± 0,52 (letnik 2005)			
rdeče vino, Španija (p)					0.00–55.00	0.0–14.0	0–25	0.0–19.0
rdeče kakovostno vino, Turčija (r)					n. d.–5.92	nd–3.94	nd–1.97	nd–0.29
mlado rdeče vino, Rioja, Španija (s)					32.97	0.61	8.72	4.98
Rioja crianza red wines (Vazquez-Lasa et al. (1998))					31.35	1.74	6.67	5.78

n. d. 'spojina ni bila detektirana'

V tretjini testiranih vzorcev nismo zasledili MKB na selektivnem gojišču MRStj, v tretjini vzorcev smo zasledili od $2,2 \times 10^2$ do $1,12 \times 10^3$ CFU/ml, v preostalih vzorcih so bile plošče neštevne. 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).

4. SKLEPI

Etilfenoli (4-etilfenol in 4-etilgvajakol) in vinilfenoli (4-vinilfenol in 4-vinilgvajakol), ki prispevajo k nezaželeni aromi, so prisotni v Teranu. Med triletnim monitoringom Teranov letnikov 2011, 2012 in 2013 smo ugotovili, da sta vsebnosti 4-etilfenola in 4-etilgvajakola v glavnem pod senzoričnim pragom zaznave. Vsebnosti 4-vinilfenola in 4-vinilgvajakola pa so v glavnem nad senzoričnim pragom zaznave. Nekateri fenoli, posebno 4-vinilgvajakol, bi lahko imeli pozitiven vpliv na aromo vina, s prispevanjem vonja po klinčkih in popru (Williams on sod., 1980; Rocha in sod., 2005). Ugotovili smo, da so podatki, ki smo jih o vsebnosti hlapnih fenolov dobili za Teran, primerljivi s podatki iz literature za rdeča vina v svetu. Ker pa smo vsebnost hlapnih fenolov določali spomladi, pred stekleničenjem vina, je treba opozoriti, da morajo proizvajalci Terana posvetiti posebno skrb pripravi vina za stekleničenje in dolgotrajno staranje. Tveganje za rast kvasovk *Brettanomyces/Dekkera* in tvorbo hlapnih fenolov lahko proizvajalci zmanjšajo z vzdrževanjem higienskih razmer v kleti, filtracijo vina preko $1,0 \mu\text{m}$ -filtra in s pravilnim žveplanjem vina.

V triletnem obdobju spremljanja biogenih aminov v Teranu smo določili 10 različnih biogenih aminov, katerih vsebnosti so bile (razen za putrescin in etanolamin) primerljive z objavljenimi podatki za rdeča vina, medtem ko podatkov za butilamin, 2-metilbutilamin in izopentilamin v literaturi nismo zasledili.

Glede priporočenih maksimalnih dovoljenih vrednosti za histamin, smo pri 5 % deležu vzorcev izmerili višje vsebnosti od maksimalnih dovoljenih vrednosti v Avstriji in Švici (10 mg/l) ter pri 7,5 % deležu vzorcev od priporočenih vrednosti v Franciji (8 mg/l). Pri četrtini vzorcev je bila višja od priporočenih vrednosti v Belgiji (5 mg/l), pri 35 % deležu vzorcev je bila višja od priporočenih vrednosti na Nizozemskem (3 mg/l) in pri 40% deležu vzorcev od priporočene vrednosti v Nemčiji (2 mg/l).

5. 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 hlapnih fenolov se avtorji zahvaljujemo Mateji Fortuna, sodelavki Centralnega laboratorija Kmetijskega inštituta Slovenije.

6. LITERATURA

- Alañón, M. E., Schumacher, R., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, I. J., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S. 2013. Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines part I: Volatile compounds and sensorial properties. *Food Research International*, 51: 325–334.
- Anli, R. E., Vural, N., Yilmaz, S., Vural, Y. H. 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 53–62.
- 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, pp. 5–24.
- Díez, J., Domínguez, C., Guillén, D. A., Veas R., Barroso, C. G. 2004. Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1025: 263–267.
- Domínguez, C., Guillén, D. A., Barroso, C. G. 2002. Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta*, 458: 95–102.
- Du Toit, W., Pretorius, I., Lonvaud-Funel, A. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 862–871.
- Evropska Unija: Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines.
- García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., Gómez Gallego, M. A., González-Viñas, M. A. 2012. Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines. *Food Chemistry*, 131: 90–98.
- García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., Oliveria González Viñas, M. A. 2014. Volatile composition of Bobal red wines subjected to alcoholic/malolactic fermentation with oak chips. *Food Science and Technology*, 55: 586–594.
- García-Marino, M., Trigueros, Á, Escribano-Bailón, T. 2010. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 455–462.
- Konig, H., Frohlich, J. 2009. Lactic acid bacteria. V: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Heidelberg, str. 3–29.
- Landete, J. M., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I. 2005. Biogenic amines in wines from three spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1119–1124.
- Larcher, R., Nicolini, G., Puecher, C., Bertoldi, D., Moser, S., Favaro, G. 2007. Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with a coulometric array detector. *Analytica Chimica Acta*, 582: 55–60.
- Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199: 9–13.

- López, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966: 167–177.
- Marcobal, A., Martín-Alvarez, P. J., Polo, M. C., Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V. 2006. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, 69: 391–396.
- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., Du Toit, M.. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology*, 26: 377–385.
- Petri, A., Pfannebecker, J., Frolich, J., König, H. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*, 33: 48–54.
- Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., González-Sáz, J. M. 2007. Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1166: 1–8.
- Pizarro, C., Sáenz-González, C., Pérez-del-Notario, N., González-Sáiz, J. M. 2012. Optimisation of a sensitive method based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1244: 37–45.
- Pour Nikfardjam, M., May, B., Tschiersch, C. 2009. Analysis of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiaacol in wines from the Württemberg region (Germany). *Mitteilungen Klosterneuburg*, 59: 84–89.
- Renouf, V., Perello, M.-C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A. 2007. Survival of wine microorganisms in the bottle during storage. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58: 379–386.
- 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 Science and Food Agriculture*, 85: 199–205.
- Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E. 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28: 503–509.
- Silva, I., Campos, F. M., Hogg, T., Couto, J. A. 2011. Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 471–475.
- Valentão, P., Seabra, R. M., Lopes, G., Silva, L. R., Martins, V., Trujillo, M. E., Velázquez, E., Andrade, P. B. 2007. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, 100: 64–70.
- Vazquez-Lasa, M. B., Iñiguez-Crespo M., González-Larraina, M., González-Guerrero, A. 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 229–229.
- Smit, A., Cordero Otero, R., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S., Van Rensburg, P. J. 2003. Enhancing Volatile Phenol Concentrations in wine by expressing various phenolic acid decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4909–4915.
- Smit, A. Y., du Toit, W. J., du Toit, M. 2008. Biogenic amines in wine: understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29:109–127.
- Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., Mamei, S. 2015. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, 175: 29–35.
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B. 1980. Hydroxylated linalool derivatives of volatile monoterpenes of muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 766–711.

OSTANKI FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV IN KOVINE V VINU TERAN

Helena BAŠA ČESNIK¹, Vida ŽNIDARŠIČ PONGRAC²,
Špela VELIKONJA BOLTA³, Klemen LISJAK⁴

1,2, 3, 4 Kmetijski inštitut Slovenije

¹ dr.

² mag.

³ dr.

⁴ dr.

IZVLEČEK

V grozdju sorte Refošk, pridelanem na Krasu, smo spremljali vsebnost ostankov fitofarmaceutskih sredstev (FFS). V Teranu, pridelanem na Krasu, pa smo analizirali vsebnosti ostankov FFS in kovin. Izvajali smo triletni monitoring (2011–2013), v katerem smo analizirali 73 vzorcev grozdja in 82 vzorcev vina. Vsebnosti ostankov FFS v grozdju niso presegale mejnih vrednosti. Poleg tega smo v grozdju določili le aktivne snovi, ki so jih vsebovala sredstva, dovoljena v integrirani pridelavi. Ravno tako smo v vinu določili le aktivne snovi, ki so jih vsebovala sredstva, dovoljena v integrirani pridelavi grozdja. Skoraj 33 % vzorcev vina ni vsebovalo ostankov FFS.

V vzorcih vina Teran smo določali vsebnosti bakra (Cu), železa (Fe), cinka (Zn), kadmija (Cd), svınca (Pb) in arzena (As). Izmerjene koncentracije kovin v vinu so bile v vseh treh letih pod predpisanimi najvišjimi dopustnimi vrednostmi, z izjemo dveh vzorcev v letu 2011 ter enega v letu 2013, v katerih smo izmerili preseženo vsebnost bakra.

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

Plant protection product residues and heavy metals in wine Teran

ABSTRACT

Residues of plant protection products were monitored in grapes of Refošk variety, produced in the Karst. In Teran produced in Karst, plant protection product residues and heavy metals were analysed. Three year monitoring (2011-2013) was performed. During that period 73 grape samples and 82 wine samples were analysed. Plant protection product residues were not exceeding maximum residue limits (MRLs). Beside that, only active substances from plant protection products allowed in integrated pest management were found. In wine also only active substances from plant protection products allowed in integrated pest management of grapes were determined. In almost 33% of wine samples residues of plant protection products were not found.

In Teran wines we measured the content of copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn), cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As). The concentrations of these metals were all below the prescribed maximum values with the exception of two samples in year 2011 and one in 2013 for which exceeded concentrations of copper were found.

Keywords: grapes, wine, Teran, plant protection product residues, biogenic amines, volatile phenols, heavy metals

1. UVOD

Vinska trta je rastlina, ki jo napadajo številni paraziti. Najpogostejši rastlinojedi insekti so molji in pršice. Še resneje jo ogrožajo bolezn, ki jih povzročajo glive, kot so peronospora, oidij in siva plesen (Oliva in sod., 1999). Zato je uporaba fitofarmaceutskih sredstev (FFS) v vinogradih običajna praksa, če želimo povečati pridelek. Nezaželena posledica uporabe teh sredstev so njihovi ostanki v plodovih in posledično vinu, pridelanem iz grozdja (Cunha in sod., 2009). Pojav in vsebnosti ostankov FFS v grozdju in posledično v vinih so odvisni od škodljivcev vinske trte, značilnih za vsako vinorodno regijo, načina pridelave grozdja (konvencionalna, integrirana, ekološka), koncentracije FFS pri škropljenju ter od časovnega obdobja in klimatskih pogojev od zadnjega škropljenja do pobiranja pridelka (Čuš in sod., 2010a). Nekateri ostanki FFS imajo negativen vpliv na človekovo zdravje, zato je treba preverjati njihove vsebnosti, da bi se zaščitilo potrošnika.

Povišane vsebnosti kovin v vinu so lahko posledica vinogradniških ukrepov (uporaba gnojil, fitofarmaceutskih sredstev na osnovi 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, 2013).

Cilj tega prispevka je predstaviti vsebnost ostankov FFS v rdečem grozdju sorte Refošk (*Vitis vinifera* L.) in vinu Teran ter vsebnost kovin v vinu Teran, proizvedenem na Krasu v letih 2011–2013. Rezultate smo primerjali z literaturnimi podatki o vsebnosti nezaželenih spojin v grozdju in vinih.

2. MATERIAL IN METODE

2.1 Vzorčenje

Grozdje Refošk smo vzorčili neposredno v vinogradih na čezmejnem Krasu, v času obiranja pridelka v letih 2011, 2012 in 2013. Odvzeli smo približno 10–15 naključno izbranih grozdov za en laboratorijski vzorec. Ti so bili zamrznjeni do analize. V treh letih smo odvzeli 73 vzorcev grozdja (18 letnika 2011, 29 letnika 2012 in 26 letnika 2013).

Vzorci vina Teran smo zbrali iz sodov iz nerjavečega jekla ali lesenih sodov kraških pridelovalcev vina. V treh letih smo odvzeli 82 vzorcev vin različnih proizvajalcev (39 letnika 2011, 22 letnika 2012 in 21 letnika 2013), 9 mesecev po fermentaciji in po končani mlečnokislinski fermentaciji.

Vino, v katerem smo analizirali ostanke FFS, ni bilo nujno pridelano iz grozdja, odvzetega za analizo na ostanke FFS.

2.2 Analitske metode

Ekstrakcijo za določanje ostankov FFS smo izvajali z mešanico topil (acetone, petroleter in diklorometan), čiščenje ekstraktov z gelsko permeacijsko kromatografijo in določitev s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC/MS) ter s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC/MS/MS). Vzorce smo analizirali na prisotnost 215 različnih aktivnih spojin.

Za analizo bakra (Cu), železa (Fe) in cinka (Zn) smo uporabili vzorec, ki smo mu odparili alkoholno frakcijo. Navedene kovine smo nato določali s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS, Analyst 800,

Perkin Elmer). Za analizo kadmija (Cd), svine (Pb) in arzena (As) smo razgradili vzorec s pomočjo ultračiste koncentrirane dušikove kisline v mikrovalovnem sistemu (Millipore, ETHOS 1600), analizo pa smo izvedli z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo (ETAAS, Analyst 600, Perkin Elmer).

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Ostanki FFS – grozdje

V vzorcih grozdja smo določili 21 aktivnih spojin. Vse določene aktivne snovi so bile dovoljene v integrirani pridelavi grozdja. Seznam FFS-jev in njihova uporaba za najdene aktivne substance sta predstavljena v tabeli 1. Preseženih maksimalnih dovoljenih količin (Maximum residue levels, MRLs) ostankov FFS v grozdju nismo določili. Večina najdenih substanc sodi v skupino fungicidov. Le 3 aktivne spojine sodijo v skupino insekticidov. Rezultati so predstavljeni v tabeli 2.

Tabela 1: Trgovsko ime za FFS in njihova uporaba za aktivne substance, določene v grozdju in vinu

aktivna snov	FFS – trgovsko ime*	uporaba proti*
azoksistrobin	QUADRIS, UNIVERSALIS	oidiju, črni pegavosti, rdečemu listnemu ožigu, peronospori
benalaksil	GALBEN C, GALBEN M	peronospori
benalaksil-M	FANTIC F WG	peronospori
boskalid	CANTUS WG, COLLIS	oidiju, sivi plesni
ciprodinil	SWITCH 62,5 WG	sivi plesni
deltametrin	DECIS 2,5 EC, GAT DECLINE 2,5 EC	križastemu in pasastemu grozdnemu sukaču, ameriškem škržatku
dimetomorf	ACROBAT MZ WG, FORUM STAR	peronospori
famoksadon	EQUATION PRO	peronospori
fenheksamid	TELDOR SC 500	sivi plesni
fludioksonil	SWITCH 62,5 WG	sivi plesni
folpet	FANTIC F WG, FOLPAN 80 WDG, FORUM STAR, MELODY COMBI WG 65,3, MELODY COMBI WP 43,5, MIKAL FLASH, MIKAL PREMIUM F, MOMENTUM-F, PERGADO-F, RIDOMIL GOLD COMBI PEPITE, UNIVERSALIS, VALIS-F	oidiju, črni pegavosti, rdečemu listnemu ožigu, peronospori

iprovalikarb	MELODY COMBI WP 43,5 , MELODY COMBI WG 65,3, MELODY DUO WG 66,8A, MIKAL PREMIUM F	peronospori
klorpirifos	PYRINEX 25 CS	križastemu in pasastemu grozdnemu sukaču, ameriškem škražatku
kvinksofen	CRYSTAL, POSTALON 90 SC	oidiju
mandipropamid	PERGADO-C, PERGADO-F, PERGADO MZ, REVUS	peronospori
metalaksil-M	RIDOMIL GOLD COMBI PEPITE, RIDOMIL GOLD MZ PEPITE, RIDOMIL GOLD PLUS 42,5 WP	peronospori
metoksifenozyd	RUNNER 240 SC	križastemu in pasastemu grozdnemu sukaču
tebukonazol	FALCON EC 460, FOLICUR EW 250, MYSTIC 250 EC, NATIVO 75 WG, ORIUS 25 EW, TEBUSHA 25% EW	oidiju
tiametoksam	ACTARA 25 WG	ameriškem škražatku
zoksamid	AMELINE FLOW, ELECTIS 75 WG	peronospori

* Tehnološka navodila za integrirano pridelavo grozdja za leto 2011, 2012 in 2013, MAFF

V obdobju 2011–2013 smo določili aktivne snovi v 68 vzorcih grozdja (93,2 %). Kljub temu, da smo ostanke določili v velikem številu vzorcev, je le en vzorec (1,4 %) vseboval ostanke na nivoju 50–100 % MRL-ja in le 23 vzorcev (31,5 %) je vsebovalo ostanke na nivoju 10–50 % MRL-ja. Vsi ostali vzorci (58,9 %) so vsebovali ostanke na nižjem nivoju od 10 % MRL-ja. Ostanke nismo določili v 5 vzorcih (6,8 %).

Tabela 2: Določene aktivne spojine in njihove vsebnosti v grozdju v letih 2011–2013

aktivna snov	uporaba	LOQ grozdje (mg/kg)	vsebnost v grozdju 2011 n = 18			vsebnost v grozdju 2012 n = 29			vsebnost v grozdju 2013 n = 26			MRL grozdje (mg/kg)
			min-maks (mg/kg)	povprečje		min-maks (mg/kg)	povprečje		min-maks (mg/kg)	povprečje		
azoksistrobin	fungicid	0,01	0,03–1,11	0,32	-	0,05–0,08	0,06	0,04–0,11	0,08	-	2	
benalaksil + benalaksil-M	fungicid	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-	0,3	
boskalid	fungicid	0,01	0,04–0,07	0,06	0,03–0,08	0,05	0,01–0,34	0,12	0,12	-	5	
ciprodinil	fungicid	0,01	0,01–1,80	0,42	0,12–0,21	0,17	0,03–0,56	0,23	0,23	-	5	
deltametrin	insektici	0,03	-	-	-	-	0,05–0,06	0,06	0,06	-	0,2	
dimetomorf	fungicid	0,01	0,01–0,03	0,02	0,02–0,13	0,08	0,01–0,13	0,05	0,05	-	3	
famoksadon	fungicid	0,01	-	-	-	-	0,05	-	-	-	2	
fenheksamid	fungicid	0,01	0,10–0,51	0,26	-	-	0,01–0,07	0,04	0,04	-	5	
fludioksoni	fungicid	0,02	0,03–1,12	0,35	0,04–0,08	0,06	0,02–0,32	0,10	0,10	-	4	
folpet	fungicid	0,02	0,03–1,85	0,41	0,04–2,99	1,01	0,02–3,21	0,56	0,56	-	10	
iprovalkarb	fungicid	0,01	0,05	-	0,17	-	-	-	-	-	2	
klorpirifos	insekticid	0,01	0,02–0,10	0,06	0,02–0,24	0,09	0,02–0,03	0,03	0,03	-	0,5	
klotianidin	metaboli tiametoksama	0,01	-	-	0,01	-	-	-	-	-	0,7	
kvinkoksifen	fungicid	0,01	0,02	0,02	0,01–0,04	0,03	0,01–0,03	0,02	0,02	-	1	
mandipropamid	fungicid	0,01	0,01–0,13	0,07	-	-	0,01–0,03	0,02	0,02	-	2	
metalaksil + metalaksil-M	fungicid	0,02	0,02–0,13	0,06	0,04–0,09	0,06	0,02	-	-	-	1	
tebukonazol	fungicid	0,05	-	-	0,06–0,17	0,11	-	-	-	-	2	
tiametoksam	insekticid	0,01	-	-	0,01–0,02	0,02	-	-	-	-	0,9	
zoksamid	fungicid	0,01	0,07	-	-	-	0,04	-	-	-	5	

Najpogosteje določena aktivna snov v obdobju 2011–2013 je bil folpet v 57 vzorcih grozdja (78,1 %). 15 vzorcev grozdja (20,5 %) je vsebovalo ostanke folpeta na nivoju 50–100 % MRL-ja, 42 vzorcev grozdja (57,5 %) je vsebovalo ostanke folpeta na nivoju, nižjem od 10 % MRL-ja.

Rezultate smo primerjali s podatki iz literature, za grozdje, vzorčeno v okviru integrirane pridelave (IP) v letu 2006 po celotni Sloveniji (Baša Česnik in sod., 2008). V grozdju iz IP so določili naslednje spojine, ravno tako kot mi: azoksistrobin (0,02–0,04 mg/kg), ciprodinil (0,01–0,40 mg/kg), fludioksonil (0,02–0,03 mg/kg), folpet (0,02–6,0 mg/kg), fosalon (0,01–0,02 mg/kg), klorpirifos (0,02–0,13 mg/kg) ter metalaksil in metalaksil-M (0,05–0,18 mg/kg). V grozdju Refošk smo določili vsebnost deltametrina, ki ga leta 2006 v IP niso določili. So pa leta 2006 po vsej Sloveniji določili vsebnosti klorotalonila (0,01–0,73 mg/kg), iprodiona (0,01–0,30 mg/kg), krezoksim-metila (0,01 mg/kg), miklobutanila (0,02 mg/kg), fosalona (0,01–0,02 mg/kg), pirimetanila (0,01–0,53 mg/kg) in trifloksistrobina (0,02–0,09 mg/kg), ki jih mi nismo določili.

Že Farris in sod. (1992) so poročali o ostankih folpeta (0,5 mg/kg) in klorotalonila (0,23–0,60 mg/kg) v grozdju iz Italije. Navarro in sod. (2001) so poročali o ostankih klorpirifosa (0,14 mg/kg) v grozdju Monastrell iz področja Jumilla (Španija). Cabras in sod. (1997) so poročali o ostankih ciprodinila (1,03 mg/kg), fludioksonila (0,78 mg/kg), pirimetanila (1,11 mg/kg) in tebukonazola (0,42 mg/kg) v grozdju Vermentino letnika 1996 iz Italije. Otero in sod. (2003) so poročali o ostankih ciprodinila (0,14–1,45 mg/kg), folpeta (0,09–0,40 mg/kg), fludioksonila (0,17–0,61 mg/kg), fenheksamida (0,52 mg/kg), metalaksila (0,14–0,21 mg/kg) in pirimetanila (2,33 mg/kg) v grozdju s področja Rías Baixas (Galicia, Španija). Z izjemo klorotalonila in pirimetanila smo te aktivne spojine določili tudi v grozdju Refošk.

Ostanki FFS – vino

V vinu smo določili 12 aktivnih substanc. Vse določene aktivne snovi so bile dovoljene v integrirani pridelavi grozdja. Seznam FFS-jev in njihova uporaba za najdene aktivne substance sta predstavljena v tabeli 1. Večina najdenih substanc sodi v skupino fungicidov. Le 1 aktivna spojina sodi v skupino insekticidov. Rezultati so predstavljeni v tabeli 3.

V letih 2011–2013 smo določili aktivne snovi v 55 vzorcih vina (67,1 %). Ostankov nismo določili v 27 vzorcih vina (32,9 %). V treh zaporednih letnikih: 2011, 2012 in 2013 smo najpogosteje določili aktivno snov ciprodinil (37 vzorcev, 45,1 %).

Tabela 3: Določene aktivne spojine in njihove vsebnosti v vinu v letih 2011–2013

aktivna snov	uporaba	LOQ vino (mg/l)	vsebnost v vinu 2011 n = 39		vsebnost v vinu 2012 n = 22		vsebnost v vinu 2013 n = 21	
			min-maks (mg/l)	povprečje (mg/l)	min-maks (mg/l)	povprečje (mg/l)	min-maks (mg/l)	povprečje (mg/l)
azoksistrobin	fungicid	0,03	0,04–0,15	0,10	0,04	-	-	
boskalid	fungicid	0,01	0,01–0,23	0,07	0,01	0,01	-	
ciprodinil	fungicid	0,01	0,01–0,21	0,06	0,01–0,07	0,03	0,01–0,13	
dimetomorf	fungicid	0,01	0,01–0,10	0,04	0,01–0,06	0,03	0,01–0,05	
fenheksamid	fungicid	0,01	0,01–0,02	0,01	-	-	0,01–0,05	
fludioksoni	fungicid	0,01	0,01–0,09	0,03	0,01–0,03	0,02	0,01–0,03	
iprovalikarb	fungicid	0,01	0,03	-	-	-	-	
mandipropamid	fungicid	0,01	-	-	-	-	0,01–0,05	
metalaksi + metalaksi-M	fungicid	0,02	0,03–0,12	0,07	0,02–0,03	0,03	0,02	
metoksifenozid	insekticid	0,01	0,01	-	-	-	-	
tebukonazol	fungicid	0,02	0,02–0,03	0,03	-	-	-	

Rezultate triletnega monitoringa smo primerjali z rezultati v vinih s trgovskih polic (Čuš in sod., 2010b). V vinu s trgovskih polic so ravno tako določili 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), metalaksila in metalaksila-M (0,03–0,06 mg/l) ter prosimidona (0,03–0,05 mg/l). V Teranu smo določili vsebnosti iprovalikarba in tebukonazola, ki jih v vinu s trgovskih polic niso. Ti dve substanci smo v Teranu določili le v letniku 2011, in to v 3 vzorcih (3,7 % vseh vzorcev). Njuna vsebnost je bila majhna. FFS z aktivno snovjo iprovalikarb proizvajalci uporabljajo proti peronospori (*Plasmopara viticola*) in tebukonazol proti oidiju (*Uncinula necator*). Za zatiranje obeh plesni obstajajo tudi drugi pripravki, npr. tisti, ki vsebujejo aktivno snov folpet.

Cabras in Angioni (2000) sta poročala o ostankih azoksistrobina v vinu, proizvedenem brez maceracije (0,13 mg/l) in v vinu, proizvedenem z maceracijo (0,09 mg/l), ciprodinila v vinu, proizvedenem brez maceracije (0,18 mg/l) in v vinu, proizvedenem z maceracijo (0,21 mg/l), fludioksonila v vinu, proizvedenem brez maceracije (0,23 mg/l) in v vinu, proizvedenem z maceracijo (<0,05 mg/l) ter tebukonazola v vinu, proizvedenem brez maceracije (0,16 mg/l) in v vinu, proizvedenem z maceracijo (0,22 mg/l). Angioni in sod. (2011) so poročali o ostankih boskalida (1,00 mg/l) in iprovalikarba (0,36 mg/l) v rdečem vinu Carignano iz Italije. Zhang in sod. (2009) so poročali o ostankih azoksistrobina v rdečem (0,02–0,03 mg/l) in belem vinu (0,002–0,02 mg/l), ciprodinila v rdečem (0,003 mg/l) in belem vinu (0,002–0,003 mg/l), fludioksonila v rdečem vinu (0,001 mg/l), iprovalikarba v belem vinu (0,003 mg/l) in tebukonazola v rdečem (0,009–0,02 mg/l) ter belem vinu (0,006–0,02 mg/l). Vsebnosti ostankov FFS iz literature so primerljive z vsebnostmi ostankov FFS v Teranu, razen za boskalid, ki so ga v literaturi našli pri veliko višjih koncentracijah.

Kovine – vino

Analize kovin v vzorcih vina Teran so pokazale, da so koncentracije cinka, svinca, kadmija in arzena v vinu pod predpisanimi najvišjimi dopustnimi vrednostmi in samo v 3 od 82 vzorcev smo izmerili vsebnost bakra, ki je višja od maksimalno dopustne. Zadnje je verjetno posledica uporabe prevelike količine bakrovega sulfata za odpravljanje napak vina, kot je vodikov sulfid (H₂S). Izmerjene koncentracije bakra in cinka v vinih 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. 2011–2013 je bila precej nižja od maksimalne 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 vinih Teran je bila določena povprečna koncentracija svinca 13 $\mu\text{g/l}$ in tudi najvišja izmerjena vrednost (59 $\mu\text{g/l}$) je pod evropskim povprečjem. Povprečna koncentracija kadmija v vzorcih vina Teran (0,3 $\mu\text{g/l}$) je 33-krat nižja od maksimalno dovoljene, trikrat nižja od povprečne koncentracije, ki jo v svoji študiji navajajo madžarski raziskovalci (1,06 $\mu\text{g/l}$) (Ajtony in sod., 2008) ter primerljiva z navedeno 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 (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 tabeli 4.

Tabela 4: Vsebnosti kovin v vzorcih Terana

kovina	največja dovoljena koncentracija	povprečna koncentracija v Teranu	najmanjša koncentracija v Teranu	največja koncentracija v Teranu	število vzorcev, ki presežajo največjo dovoljeno koncentracijo
baker - Cu	1 mg/l	0,26 mg/l	0,02 mg/l	1,89 mg/l	3
železo - Fe	-	1,38 mg/l	0,32 mg/l	4,72 mg/l	
cink - Zn	5 mg/l	0,55 mg/l	0,08 mg/l	2,68 mg/l	0
svinec - Pb	150 $\mu\text{g/l}$	13 $\mu\text{g/l}$	5 $\mu\text{g/l}$	59 $\mu\text{g/l}$	0
kadmij - Cd	10 $\mu\text{g/l}$	0,3 $\mu\text{g/l}$	0,1 $\mu\text{g/l}$	1,1 $\mu\text{g/l}$	0
arzen - As	200 $\mu\text{g/l}$	<10 $\mu\text{g/l}$	-	-	0

4. ZAKLJUČKI

Vsebnost ostankov FFS v grozdju Refošk na čezmejnem Krasu ne predstavlja tveganja za potrošnika, saj MRL-ji niso bili preseženi. Vse aktivne snovi, določene v grozdju, so bile dovoljene v IP. To pomeni, da so proizvajalci FFS-je uporabljali pravilno in v skladu z dobro kmetijsko prakso.

Najpogosteje določena aktivna snov v grozdju je bil folpet. Razloga sta verjetno dva: FFS-ji z aktivno snovjo folpet so poceni, poleg tega pa ima folpet širok spekter delovanja (tabela 1) in je aktivna snov v številnih pripravkih. Zanimivo je, da folpeta v vinu nismo določili. Vzorci vina sicer niso bili nujno pridelani iz grozdja, v katerih smo spremljali ostanke

FFS, vendar je kljub temu razlog verjetno hitra fotolitska in hidrolitska degradacija folpeta med vinifikacijo (Čuš in sod., 2010a). V vinu smo določili še ciprodinil, fenheksamid, metalaksil in tebukonazol, ki so med vinifikacijo perzistentni (Čuš in sod., 2010a).

Mejne vrednosti za ostanke FFS v vinih sicer niso določene, a se ostanki med procesom vinifikacije zmanjšajo. Skoraj 33 % vzorcev vina ostankov ni vsebovalo.

Rezultati ostankov FFS v grozdju Refošk in vinu Teran so primerljivi s podatki iz literature.

Glede na izmerjene vsebnosti kovin lahko zaključimo, da so vina Teran za potrošnika varna, saj so bile izmerjene koncentracije kovin pod predpisanimi najvišjimi dopustnimi vrednostmi. Izjema je presežena vsebnost bakra v treh vzorcih, kar je verjetno posledica uporabe prevelike količine bakrovega sulfata za odpravljanje napak vina.

5. ZAHVALA

Zahvaljujemo se kraškim vinogradnikom za vzorce grozdja in vina. Za pomoč pri izvedbi meritev se avtorji zahvaljujemo Mateji Fortuna in Marjeti Černe Kanc, sodelavkama Centralnega laboratorija Kmetijskega inštituta Slovenije.

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.

6. LITERATURA

- Ajtoni, 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.
- Angioni, A., Dedola, F., Garau, V. L., Schirra, M., Caboni, P. 2011. Fate of iprovali-carb, indoxacarb and boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6806–6812.
- Baša Česnik, H., Gregorčič, A., Čuš, F. 2008. Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. *Food Additives and Contaminants*, 25: 438–443.
- 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 and Food Chemistry*, 45: 2708–2710.

- Cabras, P. in Angioni, A. 2000. Pesticide residues in grapes, wine and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 967–973.
- Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, International Organisation of Vine and Wine (OIV), Edition 2013, Annex C: Maksimum acceptable limits of various substances.
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Alves, A., Oliveira, M. B. P. P. 2009. Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *Journal of Chromatography A*, 1216: 119–126.
- Čuš, F., Baša Česnik, H., Velikonja Bolta, Š., Gregorčič, A. 2010a. Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control*, 21: 1512–1518.
- Čuš, F., Baša Česnik, H., Velikonja Bolta, Š., Gregorčič, A. 2010b. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. *Food Control*. 2010, 21: 150–154.
- 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.
- Navarro, S., Oliva, J., Navarro, G., Barba, A. 2001. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole and vinclozolin in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*: 52, 35–40.
- Oliva, J., Navarro, S., Barba, A., Navarro, G. 1999. Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 833: 43–51.
- 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 Chromatogr 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.
- Ribéreau-Gayon et al., *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*, J. Wiley & Sons Ltd., 2000.
- Zhang, K., Wong, J. W., Hayward, D. G., Sheldia, P., Krynetsky, A. J., Schenck, F. J., Webster, M. G., Ammann, J. A., Ebeler, S. 2009. Multiresidue pesticide analysis of wines by dispersive solid-phase extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4019–4029.

MOŽNOSTI ZA ZMANJŠEVANJE SOLI V KRAŠKEM PRŠUTU – VPLIV NA KAKOVOSTNE PARAMETRE IN SPREJEMLJIVOST ZA POTROŠNIKE

Martin ŠKRLEP¹, Marjeta ČANDEK-POTOČAR²,
Boris POTOČNIK³, Maja PREVOLNIK POVŠE⁴,
Nina BATOREK LUKAČ⁵, Marjeta ŽEMVA⁶, Klemen LISJAK⁷

1, 2, 5, 7 Kmetijski inštitut Slovenije

3 absolvent Univerze v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

4 Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

6 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

¹ doc. dr.

² izr. prof. dr.

⁴ doc. dr.

⁶ dr.

⁷ dr.

IZVLEČEK

Vpliv zmanjšanja vsebnosti soli na kakovost kraškega pršuta smo preučevali v dveh poskusih (v dveh komercialnih obratih). Zmanjšanje smo dosegli s skrajšanjem faze soljenja. V prvem poskusu smo običajno 14-dnevno soljenje skrajšali na 11 oz. 8 dni, v drugem pa 18-dnevno soljenje na 6 dni. Trajanje soljenja je bilo prilagojeno vhodni masi stegen (=11,5 kg). Kakovost stegen in izgube med predelavo so bile v skladu s pravili konzorcija. Po zaključenem zorenju smo določili/izmerili kemijsko sestavo ter reološke in senzorične lastnosti pršuta. Izvedli smo tudi potrošniško analizo. V prvem poskusu smo s 4 dni krajšo fazo soljenja dosegli 12 %, z 8 dni krajšo fazo pa 30 % zmanjšanje vsebnosti soli. V drugem poskusu je bila vsebnost soli pri skrajšanem soljenju 40 % manjša v primerjavi z običajnim. Manj slani pršuti so imeli hkrati manj suhe snovi, višji indeks proteolize in večjo aktivnost vode (a_w) ter so bili mehkejši in bolj pastozni, kar lahko pripisujemo povečani proteolizi. Rezultati senzorične analize so dodatno potrdili kemijske in instrumentalne meritve. Najkrajše preizkušeno soljenje (najmanjša vsebnost soli) pri nekaterih lastnostih ni imelo pozitivnega učinka in je nakazalo omejitve oziroma potrebo po spremembah tudi v drugih fazah proizvodnje. Potrošniška analiza je pokazala, da potrošniki dobro zaznavajo razlike v slanosti in pozitivno sprejemajo manj slan izdelek.

Ključne besede: pršut, redukcija soli, proteoliza, kakovost izdelka, potrošniška analiza

Possibilities for reducing salt content in “Kraški pršut” dry ham – effect on quality parameters and consumer acceptance

SUMMARY

Two experiments (with two different producers) were carried out to study the effect of salt reduction on dry-cured ham quality. The reduction was achieved by shortening the salting phase from standard 14-day salting to 8 or 11 days in experiment 1 and from standard 18-day salting to 6 days in experiment 2. Salting duration was also decided in view of the weight of green hams (=11.5 kg). Consortium rules were respected in regard to raw material quality and processing losses. At the end of processing, chemical composition, rheological and sensory analyses were carried out, additionally, consumer study was performed. In experiment 1, four and eight days shorter salting phase resulted in 12 % and 30 % salt reduction, respectively, as compared to the standard salting. In the second experiment shorter salting period resulted in 40 % lower salt content. Lower salt content was associated with lower dry matter content, higher proteolysis index and higher water activity (a_w) and affected texture properties; less salty hams were softer and pastier, which can be attributed to increased proteolysis. The results of sensory analysis were in accordance with chemical and instrumental measurements. The shortest salting (the lowest salt level) showed some negative effects on quality and thus indicated the limitations and a need for adaptations in other stages of processing. Survey with consumers showed that majority of consumers is able to recognise lower saltiness and also appreciates less salty product.

Key words: dry-cured ham, salt reduction, proteolysis, product quality, consumer study

1. UVOD IN PREGLED LITERATURE

Kraški pršut je gastronomska posebnost in mesnina z največjim ugledom in prepoznavnostjo pri slovenskem potrošniku (Čandek-Potokar in Arh, 2004). Spada v skupino mediteranskih pršutov, za katere je značilen dolgotrajen postopek predelave brez dimljenja, ki obsega suho soljenje z uporabo grobe morske soli, podaljšano soljenje ali počitek ter nato sušenje in zorenje (Scolari in sod., 2003). Edini dovoljeni dodatek predelavi kraškega pršuta je morska sol, ki pomembno prispeva k razvoju značilnih

senzoričnih lastnosti pršuta (tekstura, okus) ter hkrati služi kot sredstvo za konzerviranje, saj zmanjšuje aktivnost vode ter spodbuja izgubo vode (Toldrá, 2002). Po pravilih konzorcija vsebnost soli v rezini pršuta (ki vsebuje maščobno in mišično tkivo) ne sme presegati 7,5 %. V eni izmed naših nedavnih raziskav (Škrlep in sod., 2012) smo za kraški pršut ugotovili vsebnosti 7,6 % in 6,7 % NaCl v mišicah *biceps femoris* (BF) in *semimembranosus* (SM). Koncentracija soli v kraškem pršutu je tako bistveno večjakot v italijanskih pršutih Parma ali San Daniele, ki vsebujeta 4-6 % NaCl v mišičnem tkivu (De Angelis, 2012; Manzocco in sod., 2013; Benedini in sod., 2012), nekaterih avtorji navajajo tudi manjše vsebnosti (Laureati in sod., 2014). Zauživanje večjih količin soli je problematično z zdravstvenega vidika, saj povečuje tveganje za nastanek bolezni srca in ožilja. Trendi zdrave prehrane v zadnjem času narekujejo zmanjševanje zauživanja soli ter omejeno uporabo v proizvodnji mesnin (Ruusunen in Puolanne, 2005). Zmanjšanje vsebnosti soli pa nima samo pozitivnih aspektov. Med predelavo pršuta sol učinkuje kot pomemben zaviralec proteolitičnih encimov (Sárraga, 1992), zato lahko njeno prekomerno in/ali nenadzorovano zmanjšanje privede (poleg zmanjšane stabilnosti) tudi do resnih pomanjkljivosti v kakovosti izdelkov, povezanih s prekomerno proteolizo (Parolari in sod., 1994), ki je lahko povezana s pojavom premehke teksture in nezaželenih arom oz. okusov. V literaturi lahko najdemo različne strategije za zmanjšanje vsebnosti soli, ki vključujejo zmanjševanje količine soli, zamenjavo NaCl z drugimi solmi in spremembe oziroma prilagoditve pogojev v predelavi (Gou in sod., 1996; Guardia in sod., 2006; Armenteros in sod., 2009a, 2009b). Vsaka strategija predstavlja nov tehnološki izziv za predelovalce in lahko bistveno vpliva na kakovost pršuta (Čandek-Potokar in Škrlep, 2012). V naši raziskavi smo kot ukrep za zmanjšanje koncentracije soli v pršutu preverili skrajševanje faze soljenja. Cilj raziskave je bil ugotoviti, kolikšno zmanjšanje vsebnosti soli dosežemo pri različnem trajanju faze soljenja ter kako zmanjšanje soli vpliva na kemijske, reološke in senzorične lastnosti pršuta.

2. MATERIAL IN METODE

2.1 Zasnova poskusov

Za določitev vpliva trajanja soljenja na kakovost pršuta smo izpeljali dva ločena poskusa v obratih dveh komercialnih proizvajalcev kraškega pršuta. Uporabili smo stegna standardnih pitanih prašičev (teže 110-120 kg). Predelava je potekala skladno s predpisi konzorcija, razlike med poskusom 1 in 2 pa so bile v izvoru surovine, dolžini faz soljenja, počitka in zorenja. Stegna smo najprej krojili na predpisano obliko (v poskusu 1 je bila teža krojenih stegen $12,0 \pm 1,0$ kg; v poskusu 2 pa $11,2 \pm 0,3$ kg), čemur je sledila faza soljenja (običajno 14-18 dni, 2-4 °C; sol je edini dovoljeni dodatek). Soljenju je sledila faza počivanja v kontrolirani

atmosfera (4-6 °C, 70-85 % relativne vlažnosti-RV), med katero pride do izenačevanja koncentracije soli v izdelku ter zniževanja vodne aktivnosti, kar daje izdelku mikrobiološko stabilnost. Sledila je faza sušenja (14-20 °C, 60-80 % RV). Ko je bil dosežen predpisan osušek 25 % (glede na celotno serijo) smo odprto površino zamazali z mešanico svinjske masti, riževe moke in začimb in s tem preprečili prekomerno izsuševanje v fazi zorenja. Znotraj posameznega poskusa je bila edina razlika v procesu predelave vezana na dolžino faze soljenja. V poskusu 1 smo poleg kontrolne skupine z običajnim (14-dnevnim) soljenjem oblikovali še dve poskusni skupini s skrajšano fazo soljenja in sicer z 11 (srednje dolgo soljenje) in 8 dnevi (kratko soljenje). V poskusu 2 smo poleg običajnega soljenja, ki je v tem primeru trajalo 18 dni, preizkusili še skrajšano soljenje, ki je trajalo 6 dni (kratka faza soljenja). Ob koncu faze zorenja smo iz osrednjega dela pršuta odvzeli vzorec za nadaljnje kemijske, reološke in senzorične analize.

2.2 Vzorčenje in kemijske analize

Za kemijsko analizo smo iz rezine (debeline 2 cm) izrezali vzorce mišic BF in SM, jih očistili maščobnega in vezivnega tkiva in homogenizirali s pomočjo laboratorijskega mlinčka (IKA M120, IKA Werke, Staufen, Nemčija) po predhodnem zamrzovanju v tekočem dušiku. V vzorcih smo določili vsebnost vode in suhe snovi (ISO 6496, 1999), soli (s pomočjo aparata DL53 General Purpose Titrator, Mettler-Toledo, GmbH, Schwarzenbach, Švica) ter celokupnega in nebeljakovinskega dušika (ISO 5983-2, 2005; z aparatom Kjeltex 2300 Nitrogen Analyser, Foss Analytical, Hileroed, Denmark) kot je opisano v Škrlep in sod. (2012). Aktivnost vode (a_w) je bila določena v akreditiranem laboratoriju za higieno živil Veterinarske fakultete v Ljubljani. Indeks proteolize smo izračunali kot količnik med nebeljakovinskim in celokupnim dušikom.

2.3 Teksturne (reološke) lastnosti

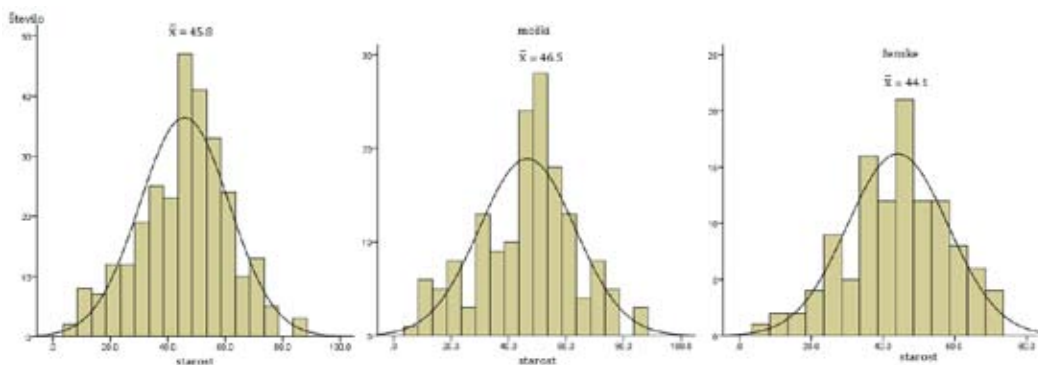
Teksturne (reološke) lastnosti pršuta smo v obeh poskusih izmerili s teksturometrom (Texture Analyzer, Ametek Lloyd Instruments, Ltd, Bognor Regis, Združeno kraljestvo), opremljenim s 50-kg obremenitveno celico in okroglo kompresijsko ploščico premera 50 mm. Za analizo instrumentalne teksture smo uporabili dve 15-mm rezini – eno za preizkus TPA (angl. »*texture profile analysis*«), drugo za preizkus SR (angl. »*stress-relaxation*«). Na obeh rezinah smo iz mišic BF in SM natančno izrezali kocke dimenzije 2×2×1,5 cm (3 ponovitve iz vsake rezine). Pri preizkusu smo za določitev SR vzorce za 90 sekund stisnili pravokotno na smer vlaknen za 25 % pri TPA pa za 50 % prvotne višine. Pri obeh preizkusih smo hitrost premikanja kompresijske ploščice nastavili na 1 mm/s. Izmerili smo relaksacijski indeks, trdoto, kohezivnost, vzmetnost ali elastičnost, gumijavost in žvečljivost kot je opisano v Škrlep in sod. (2012).

2.4 Senzorična analiza

Senzorično kakovost pršuta smo ocenjevali po metodi kvantitativne opisne analize s pomočjo senzoričnega panela. V poskusu 1 je panel štel 8 članov, strokovnjakov s področja predelave pršuta, vsi vzorci so bili ocenjeni v istem dnevu, vsak vzorec pa je bil ocenjen le enkrat. V poskusu 2 je sodeloval 10-članski senzorični panel sestavljen iz predhodno treniranih prostovoljcev. V vsaki ocenjevalni seriji so bili ocenjeni 4 vzorci, vsak vzorec pa je bil ocenjen v treh ponovitvah. Nabor lastnosti za ocenjevanje je bil enak v obeh poskusih. Panelisti so senzorične lastnosti ocenjevali na 90-mm nestrukturirani skali glede na intenzivnost senzorične zaznave. Za ocenjevanje je vsak panelist dobil 1 mm debelo rezino pršuta, na kateri je ločeno za mišici BF in SM ocenil slanost, sladkost, kislost, grenkost, pastoznost, sočnost, topljivost in prisotnost tujih okusov.

2.5 Potrošniška analiza

Potrošniško analizo smo organizirali med obiskovalci kmetijsko-živilskega sejma AGRA 2014. Obiskovalci (prostovoljci) so v oceno dobili dve rezini pršuta (običajno in skrajšano soljenje) in podali oceno (bolj, manj, enako) glede slanosti, topljivosti in všečnosti. Anketa je zajela 288 oseb, od tega 58 % moških in 42 % žensk, povprečne starosti 45,8 let (distribucija prikazana na sliki 1).



Slika 1: Starostna distribucija anketirancev

2.6 Statistična analiza

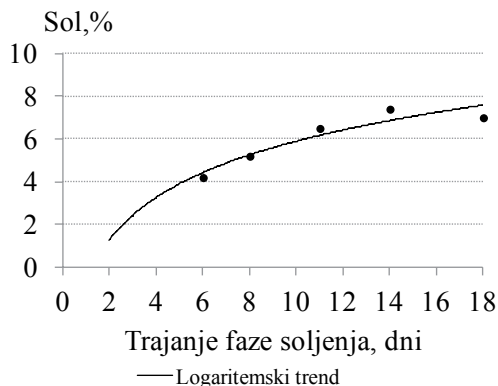
Pri obdelavi podatkov smo uporabili statistični program SAS (SAS Institute Inc, Cary, ZDA), poskusa pa smo obravnavali ločeno. Za analizo variance smo uporabili proceduro GLM, v model pa smo vključili fiksni vpliv skupine (trajanja soljenja). V primeru statistično značilnega vpliva ($P < 0,05$) smo povprečne vrednosti primerjali z uporabo Tukey-jevega testa. Za prikaze smo uporabili povprečne ocene obeh mišic za posamez-

no lastnost. Za grafični prikaz reoloških in senzoričnih lastnosti (slika 3, 4) smo uporabili normalizirane vrednosti, pri katerih smo vrednosti preučevanih lastnosti pretvorili na skalo 0-1 (vrednosti, izmerjene na različnih skalah, so prilagojene na enako skalo).

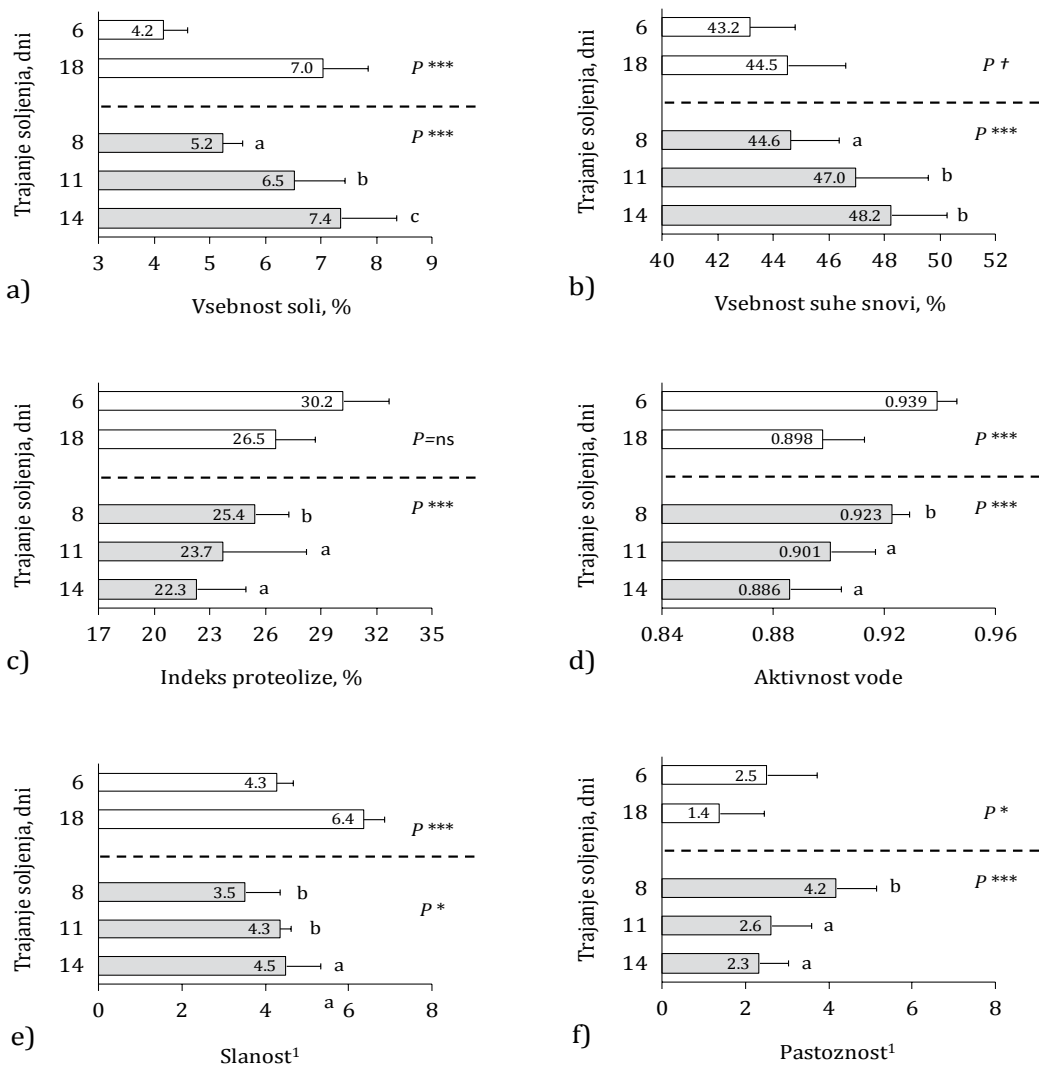
3. REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Kemijske lastnosti pršuta

S skrajšanjem faze soljenja smo dosegli znatno zmanjšanje vsebnosti soli v končnem izdelku (Slika 2). V poskusu 1 smo z 11- in 8- dnevnim soljenjem dosegli 12 oziroma 30 % manj soli v primerjavi z običajnim 14-dnevnim soljenjem. V poskusu 2, kjer smo običajno soljenje skrajšali iz 18 na 6 dni, pa smo dosegli 40 % redukcijo soli v izdelku. Ti rezultati (slika 2) kažejo na dejstvo, da navzemanje soli poteka nelinearno glede na trajanje faze soljenja (Picouet in sod., 2012) in je bolj intenzivno v prvih dneh. Znatno redukcijo soli torej lahko dosežemo le s precejšnjim skrajšanjem te faze (v našem primeru iz običajnih 14-18 dni na 6-8 dni). Kot posledica skrajšanja soljenja so imeli manj slani pršuti tudi manj suhe snovi (Slika 3b), povečano proteolizo (Slika 3c) in višjo a_w (Slika 3d).



Slika 2: Vsebnosti soli v kraškem pršutu glede na trajanje faze soljenja



Slika 3: Vpliv trajanja soljenja na lastnosti kraškega pršuta.¹ senzorična ocena (nestrukturirana skala); □ poskus 1, ■ poskus 2. Značilen vpliv trajanja soljenja na določeno lastnost označuje *; ns – neznačilen vpliv; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,0001$.

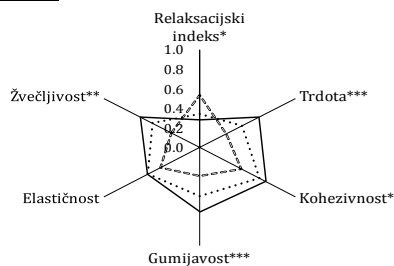
Zmanjšanje vsebnosti soli je bilo pričakovano, dosegli smo relativno veliko zmanjšanje, ki je predvsem v drugem poskusu (soljenje le 6 dni) vodila do (pre)visoke vrednosti a_w in s tem povečanega obsega proteolize. Po navedbah literature (Flores in sod., 2013; Desmond, 2006) je v sušenih mesnih izdelkih možno zmanjšati količino soli za 30 do 50 % brez negativnega vpliva na senzorične lastnosti, pri čemer pa je potrebna precejšnja mera poznavanja in adaptacij v tehnologiji predelave, da se zagotovi ustrezna stabilnost in senzorična kakovost izdelka. Tako so na primer

Schivazappa in sod. (2013) pri pršutih s 25 % zmanjšanjem soli dosegli ustrezno stabilnost mišice BF ob koncu faze počivanja (*i.e.* $a_w < 0,96$) s podaljševanjem omenjene faze na 145 dni. Te faze v našem poskusu nismo podaljšali, vendar je bila v nekaterih pršutih iz skupine z največjim zmanjšanjem soli (*i.e.* 6dni soljenja) presežena dovoljena vrednost a_w po pravih konzorcija ($a_w < 0,93$). Omenjena vrednost a_w namreč še ne zagotavlja popolne stabilnosti izdelka (Smole, Možina in Bem, 2003).

3.2 Teksturne lastnosti pršuta

V obeh poskusih smo ugotovili značilen vpliv trajanja soljenja na večino instrumentalno določenih teksturnih lastnosti (Slika 4), ki je bil še posebej izrazit v poskusu 2, medtem ko so bile v poskusu 1 razlike značilne le med 14- in 8-dnevnim soljenjem, z izjemo trdote. Nižja vsebnost soli v pršutu je bila povezana z večjim relaksacijskim indeksom, manjšo trdoto, kohezivnostjo, gumijavostjo in žvečljivostjo, kar je v skladu z rezultati kemijske analize ter navedbami iz literature (Toldra, 2002; Ruiz-Ramírez in sod., 2006; Benedini in sod., 2012), ki mehkejšo teksturo povezujejo z večjo vsebnostjo vlage, nižjo vsebnostjo soli in višjo stopnjo proteolize (med drugim gre tu tudi za razgradnjo strukturnih proteinov).

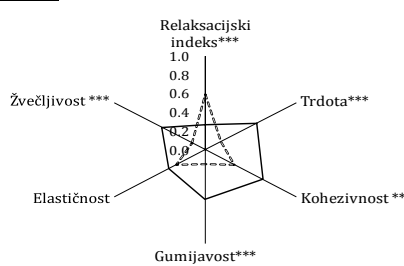
POSKUS 1¹



Trajanje soljenja:

— 14 d (običajno) 11 d (skrajšano) --- 8 d (skrajšano)

POSKUS 2



Trajanje soljenja:

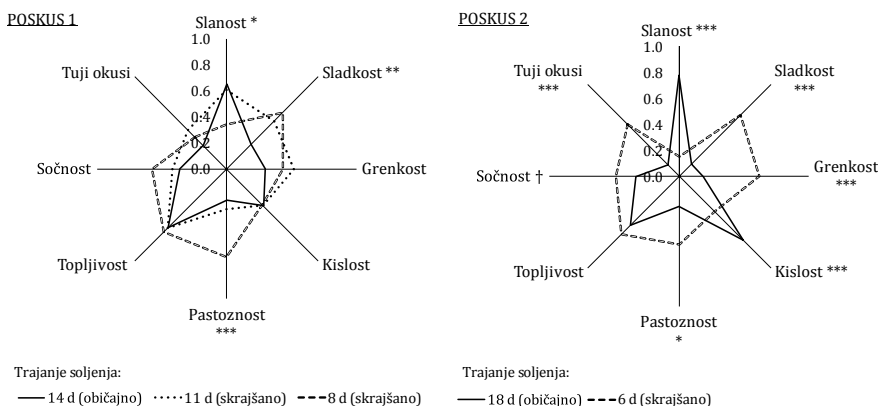
— 18 d (običajno) 11 d (skrajšano) --- 6 d (skrajšano)

Slika 4: Vpliv trajanja soljenja na reološke lastnosti kraškega pršuta (za grafičen prikaz so uporabljene normalizirane vrednosti, prilagojene na skalo 0-1).¹ Med 14-dnevnim (običajnim) in 11-dnevnim soljenjem ni bilo razlik ($P < 0,05$) v reoloških lastnostih; izjema je lastnost trdota, kjer se vsi trije nivoji soljenja med seboj razlikujejo ($P < 0,05$). Značilen vpliv trajanja soljenja na določeno lastnost označuje *, * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,0001$.

3.3 Senzorične lastnosti pršuta

Senzorični panel iz poskusa 1 je zaznal razlike v slanosti, sladkosti in pastoznosti (Slika 5). Ocenjevalci so zaznali, da so pršuti pri skrajšani fazi soljenja manj slani (skladno s kemično analizo), vendar tudi bolj sladki in bolj pastozni. Pršute z 11-dnevnim soljenjem so ocenjevalci

glede slanosti in pastoznosti prepoznali kot podobne standardno soljenim pršutom (i.e. 14 dni), medtem ko so jih glede sladkosti ocenili kot bolj podobne tistim iz kratkega (8-dnevnega) soljenja. Senzorični panel iz poskusa 2 je zaznal večje razlike ($P < 0,05$) v večini preučevanih senzoričnih lastnosti razen v topljivosti, kar je najbrž posledica večjega obsega proteolize (posebej pri manj slanih pršutih) kot v poskusu 1.

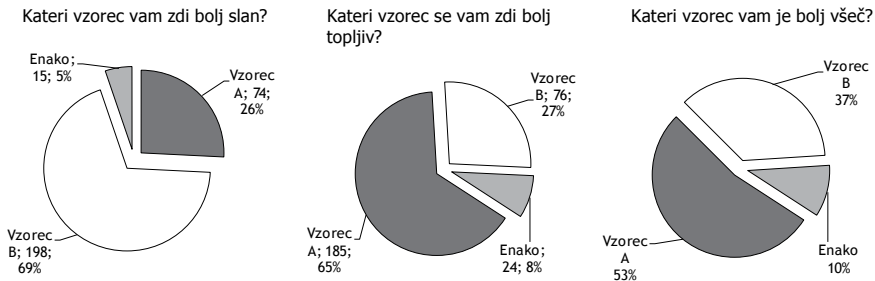


Slika 5: Vpliv trajanja soljenja na senzorične lastnosti kraškega pršuta (za grafičen prikaz so uporabljene normalizirane vrednosti, prilagojene na skalo 0-1). Značilen vpliv trajanja soljenja na določeno lastnost označuje *, * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,0001$.

Rezultati senzoričnega ocenjevanja so skladni z rezultati kemijskih in teksturnih analiz. Manj slani pršuti so se izkazali tudi za bolj pastozne in sočne, kar se sklada z rezultati za indeks proteolize in vsebnost suhe snovi. Nižja vsebnosti soli v pršutu je bila pričakovano povezana z nižjo senzorično slanostjo, vendar tudi z nižjo kislostjo ter večjo sladkostjo in grenkostjo pršutov. Omenjeni parametri kažejo na povečano intenzivnost encimske aktivnosti pri zmanjšani vsebnosti soli v pršutu. Zaradi povečane proteolize nastajajo razgradni produkti beljakovin, ki vplivajo na okus pršuta (Toldra in Flores, 1998). Naši rezultati nakazujejo prekomerno intenzivnost proteolize, saj so bili ob nižji slanosti bolj zaznavni tudi nekateri negativni okusi (grenkoba, tuji okusi). Čeprav je imelo izrazito znižanje vsebnosti soli (za 40 % oziroma na 4,2 %) v poskusu 2 že negativen vpliv na senzorično kakovost izdelka, pa tuji literaturni viri (Benedini in sod., 2012; Manzocco in sod., 2013; Laureati in sod., 2014) navajajo podobno nizke koncentracije v standardnih proizvodih (i.e. dovoljena vsebnost soli v BF po pravilih konzorcija Parma je 4,4 do 6,2 %), s čimer nakazujejo, da je ob ustreznih prilagoditvi tehnologije predelave možno doseči dobro kakovost izdelkov (Schivazappa in sod., 2013).

3.4 Potrošniška analiza

Potrošniška analiza (Slika 6), v katero smo vključili vzorce iz skupine s standardnim in kratkim soljenjem, je pokazala, da potrošniki relativno dobro (69 %) ločijo pršut različne slanosti. Prav tako je večina (65 %) pravilno ocenila večjo topljivost pri pršutih z manjšo vsebnostjo soli. Dobri polovici anketirancev (53 %) je bil manj slan pršut tudi bolj všeč. Med spoloma ni bilo pomembne razlike v zaznavanju slanosti (rezultati niso prikazani), so pa ženske nekoliko bolj zaznavale topljivost vzorca kot moški (73 % vs. 60 %), moškim pa je bil v primerjavi z ženskami nekoliko bolj všeč slan pršut (40 % vs. 30 %).



Slika 6. Rezultati potrošniške ankete glede slanosti, topljivosti in všečnosti vzorcev (vzorec A – kratko soljenje; vzorec B – standardno soljenje).

4. ZAKLJUČEK

Z raziskavo smo dokazali, da je skrajševanje faze soljenja uspešen ukrep za zmanjšanje vsebnosti soli v pršutu, vendar je za zaznaven učinek potrebno precejšnje skrajšanje. Rezultati so pokazali značilen vpliv trajanja soljenja na večino kemijskih, teksturnih in senzoričnih lastnosti. Potrebno je poudariti, da najkrajše preizkušeno soljenje (najnižja vsebnosti soli) pri nekaterih lastnostih ni imelo pozitivnega učinka. To kaže, da je bila dosežena spodnja meja skrajševanja ter da bi bilo za boljše kontrolo a_w in procesa proteolize potrebno prilagoditi tudi druge faze proizvodnega procesa (npr. podaljšati fazo počivanja), čemur bi bilo potrebno posvetiti nadaljnje raziskave. Zanimiva je tudi ugotovitev, da imajo potrošniki raje manj slan izdelek (čepprav obstajajo nekatere razlike med moškimi in ženskami ter med različnimi starostnimi skupinami), kar je pomembna informacija in spodbuda za proizvajalce, da uvedejo spremembe v tehnologiji predelave.

5. ZAHVALA

Raziskave so bile financirane iz sredstev Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 ter sofinancirane iz sredstev ARRS (P4-0133; L4-5521). Poskusi so bili izpeljani v pršutarnah članicah konzorcija kraškega pršuta (KRAS d.d. in Pršutarna Lokev na Krasu d.o.o.) s pomočjo njihovih tehnologov, za kar se jim iskreno zahvaljujemo. Prav tako iskrena hvala udeležencem senzoričnih panelov.

6. LITERATURA

- Armenteros M., Aristoy M.C., Barat J.M., Toldrá F., 2009a. Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. *Food Chem.* 117, 627-33.
- Armenteros M., Aristoy M.C., Barat J.M., Toldrá F., 2009b. Biochemical and sensory properties of dry-cured loins as affected by partial replacement of sodium by potassium, calcium and magnesium. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9699-705.
- Benedini R., Parolari G., Toscani T., Virgili R., 2012. Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content. *Meat Sci.* 90, 431-7.
- Čandek-Potokar M., Arh M., 2004. Evaluating market prospects for Prekmurje dry ham in relation to consumption characteristics of dry meat products in Slovenia. *Options Méditerranéennes* 76, 327-32.
- Čandek-Potokar M., Škrlep M., 2012. Factors in pig production that impact the quality of dry-cured ham: a review. *Animal* 6(2), 327-38.
- De Angelis M., 2012. Parma ham. Well being and diet: nutritional values. Consortium del Prosciutto di Parma: 33 p. <http://www.prosciuttodiparma.com/pdf/Parma%20Ham%20Well%20being%20and%20diet.pdf>(11.7. 2014)
- Desmond E., 2006. Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci.* 74, 188-96.
- EC 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union, L404: 9-25
- Flores M., Olivares A., Corral S., 2013. Health trends affect the quality of traditional meat products in Mediterranean area. *Acta Agriculturae Slovenica, Suppl.* 4, S183-8.
- Gou P., Guerrero L., Gelabert J., Arnau J., 1996. Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented asusages and dry-cured pork loin. *Meat Sci.* 42, 37-48.
- Guàrdia M.D., Guerrero L., Gelabert J., Gou P., Arnau J., 2006. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Sci.* 73, 484-90.
- ISO 6496. Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content. 1999: 1-7
- ISO 5983-1. Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. Part 1: Kjeldahl method. 2005: 1-10
- Laureati M., Buratti S., Giovanelli G., Corazzin M., Lo Fiego D., Pagliarini E., 2014. Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Sci.* 96, 288-94.

- Manzocco L., Anese M., Marzona S., Innocente S., Lagazio C., Nicoli M.C., 2013. Monitoring dry-curing of S. Daniele ham by magnetic resonance imaging. *Food Chem.* 141, 2246-52.
- Parma ham – specifications. http://www.prosciuttodiparma.com/en_UK/consortium/specifications (14.8.2014)
- Parolari G., Virgili R., Schivazappa C., 1994. Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Sci.* 38(1), 117-22.
- Picouet P., Gou P., Fulladosa E., Santos-Gracés E., Arnau J., 2012. Estimation of NaCl diffusivity by computer tomography in the Semimembranosus muscle during salting of fresh and frozen/thawed hams. *LWT – Food Sci. Technol.* 51, 275-80.
- Ruiz-Ramírez J., Arnau J., Serra X., Gou P., 2006. Effect of pH₂₄, NaCl content and proteolysis index on the relationship between water content and texture parameters in *biceps femoris* and *semimembranosus* muscles in dry-cured ham. *Meat Sci.* 72, 185-194.
- Ruusunen M., Puolanne E., 2005. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci.* 70(3), 531-41.
- Sárraga C., 1992. Meat proteinases and their relation with curing. In: New technologies for meat and meat products. Smulders F.J.M., Toldrá F., Flores J., Prieto M. (eds.). Nijmegen, AudetTijdschriften BV: 233-46.
- Scolari G., Sarra P.J., Baldini P., 2003. Mikrobiologija suhega mesa. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B, Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo, 351-62.
- Schivazappa C., Pinna A., Virgili R., 2013. Effect of salt reduction on the length of the resting stage of Italian typical dry-cured ham. *Acta Agriculturae Slovenica, Suppl.* 4, S189-92.
- Smole Možina S., Bem Z., 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B, Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo, 47-86.
- Škrlep M., Čandek-Potokar M., Žlender B., Robert N., Santé-Lhoutellier V., Gou P., 2012. PRKAG3 and CAST genetic polymorphisms and quality of dry-cured hams – III. Associations in Slovenian dry-cured ham Kraški pršut and their dependence on processing. *Meat Sci.* 92(4), 360-5.
- Toldrá F., Etherington E., 1988. Examination of cathepsin B, cathepsin D, cathepsin H and cathepsin L activities in dry cured hams. *Meat Sci.* 23(1), 1-7.
- Toldra F., Flores M., 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Crit. Rev. Food Sci.* 38(4), 331-52.
- Toldrá F., 2002. Dry-cured meat products. Trumbull, Food & Nutrition Press Inc.: 244 p.







IL PROGETTO AGROTUR

Il Carso si contraddistingue per le sue caratteristiche climatiche e geologiche uniche, per l'eccezionale varietà della sua flora e della sua fauna, per il suo paesaggio tipico e per i frutti e i prodotti tradizionali che produce. Tutto questo lo rende unico e riconoscibile a livello mondiale. Adottando un approccio integrato, il progetto Agrotur (<http://www.agrotur.it>) ha voluto migliorare la qualità e la riconoscibilità del vino Terrano e del prosciutto ai quali il territorio deve la sua fama. Nel corso dei tre anni di durata del progetto, grazie all'integrazione delle attività sia in senso orizzontale (tra istituti di ricerca) che verticale (con i consumatori finali, i viticoltori, gli abitanti locali ...) abbiamo svolto una serie di attività per il miglioramento della qualità e della riconoscibilità turistica del Carso, dei suoi frutti e prodotti tipici e dei loro effetti benefici sulla salute. Utilizzando le più recenti tecniche di analisi abbiamo esaminato dettagliatamente i componenti bioattivi del vino Terrano e dell'uva Terrano/Refošk di tre annate e i loro influssi positivi sulla salute; contemporaneamente abbiamo studiato approfonditamente il suolo viticolo del Carso – la terra rossa, l'entomofauna (gli insetti) e le conseguenze negative che l'agricoltura può esercitare sull'ambiente carsico. Grazie a prove applicate, volte al miglioramento della qualità del Terrano e del prosciutto »kraški pršut«, realizzate con la collaborazione dei viticoltori e dei produttori di prosciutto, sono state acquisite nuove conoscenze che potranno essere d'aiuto ai produttori locali nell'attività agricola, nella promozione e nella commercializzazione dei prodotti tipici del Carso.

Nei laboratori degli istituti di ricerca, partner del progetto, sono stati analizzati in tre anni più di 60.000 diversi componenti, composti, sostanze attive. Grazie a queste analisi sono state acquisite nuove conoscenze riguardanti i prodotti del Carso, la loro coltivazione, lavorazione e il modo in cui le nuove tecnologie possono contribuire al loro miglioramento. I risultati delle analisi sono stati illustrati nel corso di quattro convegni organizzati nell'ambito del progetto e pubblicati nei rispettivi atti, in riviste tecniche e scientifiche e in molte tesi di laurea scritte nell'ambito del

progetto dagli studenti dell'Università di Nova Gorica. Negli atti dell'ultimo convegno sono state presentate le ricerche e le analisi fondamentali e applicative del progetto, svolte sul Terrano/Refošk e sul prosciutto »kraški pršut«.

Il turismo è un settore produttivo molto importante per il Carso, per questo motivo uno degli obiettivi del progetto Agrotur è stata la creazione di un nuovo marchio transfrontaliero, »Kras-destinacija avtohtonih produktov/Carso, la destinazione dei prodotti autoctoni«. Il nostro scopo è stato quello di sostenere tutte le attività esistenti sul territorio nel campo dell'agriturismo e di promuovere i prodotti tradizionali. All'interno del progetto è stata creata una rete che riunisce tutti coloro che offrono delle possibilità di pernottamento (il cosiddetto hotel transfrontaliero diffuso: <http://www.hoteldobregaterana.si/>), attraverso la quale gli agriturismi del Carso sloveno e di quello italiano possono proporre i propri servizi di pernottamento e i propri prodotti. Lo scopo che questa rete si prefigge è aumentare la riconoscibilità del Carso e il numero dei turisti che lo visita, ottimizzando così l'economia locale e mantenendo la campagna carsica attiva e disponibile nei confronti delle aziende agricole.

Naturalmente il progetto non avrebbe avuto successo senza la collaborazione attiva dei produttori locali di Terrano, che hanno creato dei consorzi sia sul lato sloveno che su quello italiano. Le attività di promozione svolte dai viticoltori del Carso di entrambi i paesi hanno avuto un ruolo cruciale per il miglioramento della riconoscibilità del Carso e del Terrano sia a livello locale che all'estero. Grazie al loro aiuto e al loro lavoro, il progetto ha acquisito significato e ha portato a dei risultati reali, raggiungendo lo scopo previsto dai finanziamenti destinati per i progetti transfrontalieri dal programma Slovenia-Italia 2007-2013.

Dott. Klemen Lisjak, responsabile del progetto Agrotur

LA PECULIARITÀ DEL TERRANO

La viticoltura e la produzione vinicola del Carso hanno una tradizione plurimillenaria: la coltivazione della vite risale, infatti, ai tempi dell'antichità. Le condizioni del clima e del suolo favorevoli e lo sviluppo rapido e dinamico della viticoltura e della produzione vinicola nel Carso, in particolare nell'ultimo decennio, permettono di preservare l'ambiente vinicolo, la tradizione locale, i desideri dei clienti e l'alta qualità del vino.

Questa è la patria del Terrano, vino che negli ultimi anni ha raggiunto un livello qualitativo invidiabile e si conferma quale particolarità a livello locale e internazionale.

La regione è bella e merita di essere visitata per le sue numerose attrattive legate al vino e non solo. Oltre alla località di Lipizza, le grotte di San Canziano e la grotta di Corgnale, il Carso offre anche una ricca e variegata gamma di specialità enogastronomiche, tra cui svetta il vino Terrano.

Siamo consapevoli del fatto che il Terrano è parte del nostro patrimonio culturale, della nostra tradizione e della nostra storia, ed è perciò un'attività economica importante che sul Carso copre una larga parte del reddito nazionale e contribuisce a mantenere vive le campagne.

È merito soprattutto dell'uomo se il Carso ha queste caratteristiche, perché ha saputo utilizzare le opportunità che gli venivano offerte dalla scienza moderna e dalla natura. Se facciamo un passo indietro possiamo quindi affermare in modo deciso che il Carso è una regione vitivinicola che, nel corso di una tradizione millenaria, ha conosciuto molte attività tecniche: esse portano la testimonianza della coltura del vitigno Terrano/Refošk, varietà autoctona che sul Carso, grazie alle specifiche condizioni ecologiche e pedologiche della zona, produce quel particolare vino che i carsolini chiamano Terrano.

Negli ultimi anni i viticoltori hanno sviluppato nei confronti delle viti e del vino un approccio particolare, dovuto soprattutto al fatto che la col-

tura delle viti si svolge sul suolo familiare, rendendo così ogni bicchiere di Terrano particolare e unico. Questa è la storia del Terrano, l'orgoglio di noi carsolini e soprattutto dei viticoltori e dei produttori di vino, per i quali è fonte di gioia e il fulcro della loro esistenza.

Siamo sempre più convinti del fatto che il valore del Terrano non si rifletta soltanto solo nel suo bouquet che ricorda i frutti di bosco freschi, talvolta anche troppo maturi, ma anche nell'armonia, nel suo sapore pieno, fruttato, minerale e nobile.

Siamo consapevoli del fatto che la storia dello sviluppo della viticoltura e della produzione vinicola proseguirà anche in futuro, per questo motivo vogliamo trarre vantaggio dai finanziamenti che ci vengono offerti dall'EU e dal nostro paese. Grazie al progetto AGROTUR abbiamo acquisito molte conoscenze necessarie per la produzione di un'uva e di un Terrano di alta qualità. Ci rendiamo conto del fatto che nei nostri vigneti e nelle nostre cantine custodiamo un ricco patrimonio e quindi è nostra responsabilità, un privilegio e un'opportunità per poter usufruire di questo potenziale e contribuire per migliorarlo.

Dott. Friderik Vodopivec

L'INFLUENZA DEGLI ANTOCIANI DEL VINO ROSSO SUL CERVELLO E LE FUNZIONI COGNITIVE

Stefano FORNASARO¹, Lovro ZIBERNA², Federica TRAMER³, Sabina PASSAMONTI⁴

1, 2, 3, 4 Università degli Studi di Trieste

¹ Dott., ² Dott., ³ Prof.ssa, ⁴ Prof.ssa

RIASSUNTO

Il consumo moderato di vino rosso riduce il rischio di malattie cardiovascolari, neurodegenerative, proliferative (cancro) ed altre. Le più recenti informazioni scientifiche indicano che tra le numerose sostanze bioattive presenti nel vino rosso, gli antociani sembrano avere gli effetti protettivi più pronunciati. Essi agiscono da anti-ossidanti, anti-infiammatori, anti-microbici e anti-cancro. Si riassumono qui le informazioni scientifiche più recenti sulla bioattività degli antociani, che consentono di affermare che il consumo moderato di vino può essere considerato un corretto stile di vita che promuove il mantenimento della nostra salute.

Parole chiave: antociani, dieta sana, polifenoli, vino rosso

Influence of anthocyanins in red wines on brains and cognitive capability

ABSTRACT

Moderate consumption of red wine reduces the risk of cardiovascular, neurodegenerative, cancer, and some of the other diseases. Among numerous bioactive compounds in the red wine, the most recent information show that anthocyanins have the most pronounced health protective benefits. Anthocyanins have anti-oxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-carcinogenic activities. Here we review the red wine anthocyanins and their bioactivity. Modern dietary guidelines for

healthy lifestyle promotion shall include moderate consumption of red wine as an essential part of the daily nutrition.

Keywords: anthocyanins, healthy diet, polyphenols, red wine

1. INTRODUZIONE

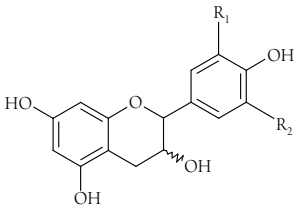
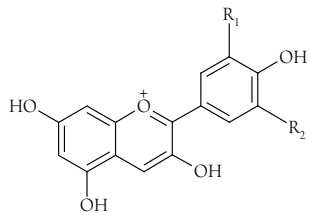
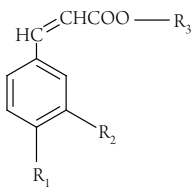
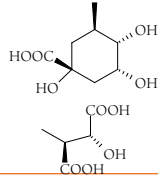
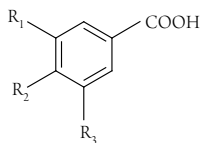
Il consumo di vino è ritenuto essere un importante fattore che influenza il processo dell'invecchiamento e dell'aspettativa di vita. Inoltre, sembra avere un impatto positivo sulle malattie tipiche dell'età senile, che spesso si associano (Chrysohoou and Stefanadis 2013). I pigmenti rossi del vini, detti antociani, sono un gruppo di numerose molecole, appartenenti alla classe chimica dei flavonoidi. Sono dotati di particolare bioattività. Diversamente da certe vitamine, che hanno pure azione anti-ossidante e che sono comunque essenziali per la vitalità della cellula, gli antociani non svolgono un ruolo vitale, ma diversi studi hanno indicato che l'assunzione prolungata di piccole quantità, per esempio attraverso il moderato consumo di vino, si collega ad effetti benefici su diverse malattie croniche neurodegenerative associate a perdita di capacità cognitive (Letenneur 2004) e malattie cardiovascolari (Di Castelnuovo, Rotondo et al. 2002). C'è perciò in questo momento un notevole interesse scientifico volto a comprendere come gli antociani agiscano proteggendo le cellule dalla senescenza o dall'attivazione di meccanismi legati alle malattie. A causa della loro particolare struttura chimica, gli antociani sono assorbiti nel sangue in quantità molto bassa. Ciononostante, essi possono entrare nelle cellule, legarsi a bersagli molecolari e influenzare certe funzioni cellulari. Perciò sono considerati dei nutraceutici: sostanze presenti nella dieta che agiscono similmente ai farmaci.

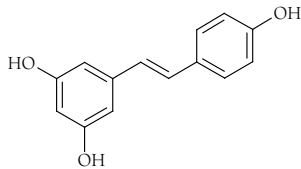
2. LE SOSTANZE BIOATTIVE DEL VINO

Il vino contiene più di 500 sostanze: acqua, etanolo, zuccheri (glucosio e fruttosio), glicerolo, acidi organici (ac. tartarico, malico, lattico, ecc.), composti aromatici, pectine, aminoacidi, polifenoli, vitamine, composti solforati e derivati dell'azoto (Soleas, Diamandis et al. 1997).

Tra le sostanze bioattive si annovera un ampio gruppo di polifenoli (vedi tabella 1), suddivisi in flavonoidi (antociani, catechina, epicatechina, quercetina ed altri), non-flvonoidi, come gli acidi fenolici (ac. *p*-cumarico, cinnamico, caffeico, gentsico, ferulico e vanillico) e stilbeni (resveratrolo e polidatina) (Waterhouse 2002).

Tabella1. Strutture chimiche dei polifenoli del vino rosso. Tratto da (Corder, Douthwaite et al. 2001; Waterhouse 2002; Dell'Agli, Busciala et al. 2004).

Chemical structure	Subgroup
FLAVONOIDS	
	Flavanols (flavan-3-ols) catechin (epicatechin) $\begin{matrix} R_1 \\ -H \end{matrix} \begin{matrix} R_2 \\ -OH \end{matrix}$ galocatechin (epigallocatechin) $\begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$
	Flavonols quercetin $\begin{matrix} R_1 \\ -OH \end{matrix} \begin{matrix} R_2 \\ -H \end{matrix}$ myricetin $\begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$ kaempferol $\begin{matrix} -H \\ .H \end{matrix}$
	Anthocyanidins cyanidin $\begin{matrix} -OH \\ -H \end{matrix} \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}$ delphinidin $\begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$ peonidin $\begin{matrix} -OCH_3 \\ -H \end{matrix}$ petunidin $\begin{matrix} -OCH_3 \\ -OH \end{matrix}$ malvidin $\begin{matrix} -OCH_3 \\ CH_3 \end{matrix}$
	NON-FLAVONOIDS
	Hydroxycinnamicacids caffeic acid $\begin{matrix} -OH \\ R_1 \end{matrix} \begin{matrix} -OH \\ R_2 \end{matrix} \begin{matrix} R_3 \\ -H \end{matrix}$ ferulic acid $\begin{matrix} -OH \\ -OCH_3 \end{matrix} \begin{matrix} -H \\ -H \end{matrix}$ coumaric acid $\begin{matrix} -OH \\ -H \end{matrix} \begin{matrix} -H \\ -H \end{matrix}$ chlorogenic acid $\begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$
	caftaric acid $\begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$ 
	Derivates of benzoic acid benzoic acid $\begin{matrix} -H \\ -H \end{matrix} \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} \begin{matrix} -H \\ R_3 \end{matrix}$ gallic acid $\begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix} \begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$ vanillic acid $\begin{matrix} -H \\ -OH \end{matrix} \begin{matrix} -OCH_3 \\ -OH \end{matrix}$ protocatechuic acid $\begin{matrix} -H \\ -OH \end{matrix} \begin{matrix} -OH \\ -OH \end{matrix}$



Stilbenoids

resveratrol

2.1 Gli antociani

Il tipico colore rosso del vino è dato dalla presenza di antociani, pigmenti presenti anche nella frutta e verdura. Sono molecole idrofile relativamente grandi (massa molecolare di circa 500 Da). Sono state descritte non meno di 400 varianti chimiche. Gli antociani più comuni nel vino sono malvidina, cianidina, peonidina, delphinidina, pelargonidina e petunidina, legati ad una o due molecole di glucosio, ed altri piccole molecole (esteri di ac. acetico, cumarico e caffeico).

Le evidenze scientifiche indicano che essi agiscono nelle cellule animali come se fossero dei farmaci molto particolari. Infatti, dopo il loro assorbimento dal sistema gastro-intestinale, che è molto limitato, essi si distribuiscono nel fegato e nei reni, dove subiscono delle limitate modificazioni chimiche e sono molto rapidamente eliminati con la bile e l'urina. Valutando queste caratteristiche dal punto di vista fisiologico-farmacologico, sembra che gli organismi animali si difendano dagli antociani, limitando al minimo il loro assorbimento e provvedendo alla loro rapida eliminazione.

Eppure le piccole quantità di antociani, che passano nel sangue poco dopo il loro arrivo nel sistema digestivo, dimostrano di avere un'efficace azione di protezione della salute (He, Liang et al. 2012).

Approfondimento: aspetti di farmacocinetica e biodisponibilità degli antociani

La principale caratteristica degli antociani è la loro limitata biodisponibilità, che si traduce in concentrazioni plasmatiche molto basse (0.1-1 μM) (Manach, Williamson et al. 2005). Ciò è dovuto sia al limitato assorbimento dall'intestino che al rapido passaggio attraverso gli organi escretori, seguito da eliminazione nella bile e urina (Vanzo, Vrhovsek et al. 2011). Recenti dati, ottenuti somministrando a soggetti umani volontari una piccola dose (0.5 g, equivalente a 1,114 μmol) di cianidina-3-O-glucoside (C3G) marcata ($^{13}\text{C}_5$, innocua), indicano una biodisponibilità del 12 % della dose somministrata. In dettaglio, 5.4 % è stata eliminata nell'urina, 6.9 % nell'espriato (*in english: breath*), 32 % nelle feci (Czank, Cassidy et al. 2013). Un altro studio ha pure esaminato i metaboliti degli antociani che si formano nel colon, grazie all'azione della flora bat-

terica, e sono assorbiti. Il principale di questi (alla concentrazione plasmatica di 11 nmol/L) è il protocatechuic acid-3-O-glucuronide; un altro composto è l'acido ippurico (1,962 nmol/L nel plasma) (de Ferrars, Czank et al. 2014). Si ritiene che anche questi composti abbiano azione biologica.

3. EFFETTI DEGLI ANTOCIANI SULLA SALUTE

Il consumo regolare e moderato di vino rosso è legato a una riduzione del rischio di sviluppare malattie neurodegenerative, cardiovascolari e proliferative (cancro). Ciò è stato attribuito alle proprietà anti-ossidanti e anti-infiammatorie dei polifenoli del vino rosso (red wine polyphenols, RWP), ma molti dettagli meccanicistici sono ancora da chiarire. Infatti, sembra più plausibile che questi importanti effetti sistemici siano da attribuire non all'azione anti-ossidante diretta, ma ad effetti indiretti che si amplificano a cascata. Molte evidenze sperimentali indicano che gli antociani possono modulare le vie di segnalazione intracellulare, che regolano funzioni vitali, come la proliferazione cellulare e la risposta a stimoli esterni (Ndiaye, M., M. Chataigneau, et al. 2005; Calabrese, V., C. Cornelius, et al. 2012). Gli antociani dimostrano effetti ormetici, per cui a basse concentrazioni proteggono le cellule, mentre a maggiori concentrazioni sono citotossici (Ristow 2014).

4. GLI EFFETTI DEGLI ANTOCIANI SUL CERVELLO

Alcune osservazioni epidemiologiche indicano che chi consuma il vino in moderazione ha una ridotta incidenza di deficit cognitivi in tarda età oppure di demenza vera e propria, rispetto a chi non consuma vino (de Rijk, Breteler et al. 1997; Orgogozo, Dartigues et al. 1997; Commenges, Scotet et al. 2000). Sono osservazioni confermate da più recenti studi, in cui l'apporto di polifenoli dell'uva era controllato (Krikorian, Shidler et al. 2010; Krikorian, Boespflug et al. 2012). Ulteriori verifiche sono state ottenute in modelli sperimentali in vitro o in animali (Dajas, Rivera et al. 2003; Zhu, Choi et al. 2007; Echeverry, Arredondo et al. 2010; Basli, Soulet et al. 2012). Sono pochi ancora gli studi clinici che utilizzano gli antociani come integratori dell'alimentazione (Albarracin, Stab et al. 2012).

I deficit cognitivi e della demenza e il morbo di Parkinson derivano da danni strutturali a carico delle cellule nervose, causati da un'eccessiva formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Sebbene i ROS si formino normalmente e la cellula li usi per regolare alcune sue funzioni di base, quando si supera una determinata soglia, essi sono tossici. Si ritiene che effetti protettivi dei polifenoli dell'uva siano dovuti alla loro

capacità di interagire con bersagli cellulari coinvolti nel controllo della resistenza a neurotossine (Zhu, Choi et al. 2007; Granzotto and Zatta 2014), della produzione endogena di ROS ed altre molecole altamente reattive (le specie reattive dell'azoto, RNS), (Calabrese, Cornelius et al. 2012), mediatori dell'infiammazione che promuovono la formazione di ROS e RNS (Kao, Ou et al. 2010; Spilisbury, Vauzour et al. 2012), del differenziamento ed eccitabilità neuronale (Spencer 2008).

A questi effetti si aggiungono altri a carico del sistema vascolare cerebrale, che portano ad un aumento del flusso ematico e quindi dell'apporto di ossigeno, con attivazione della neurogenesi nell'ippocampo, una delle aree cerebrali più importanti per le nostre funzioni cognitive (Williams and Spencer 2012).

5. LA QUESTIONE DELLA PRESENZA DEGLI ANTOCIANI NEL CERVELLO

Gli antociani possono distribuirsi nel cervello (sia nella corteccia cerebrale che nel cervelletto) di suini la cui dieta era stata arricchita con estratti di mirtillo (Kalt, Blumberg et al. 2008). Dati simili sono stati ottenuti anche in ratti (el Mohsen, Marks et al. 2006). Si sa che gli antociani possono essere assorbiti nello stomaco e raggiungere il cervello dopo pochi minuti (Passamonti, Vrhovsek et al. 2005). Perciò si deduce che gli antociani possono attraversare la barriera emato-encefalica e penetrare nel sistema nervoso centrale, grazie a meccanismi specifici di trasporto, che promuovono il loro passaggio attraverso le membrane biologiche (Ziberna, Fornasaro et al. 2013).

4.1 Il lavoro in Agrotur

Nell'ambito del progetto Agrotur, abbiamo esaminato la presenza di antociani ed altri composti che si formano nel colon grazie all'azione della flora batterica intestinale sui polifenoli nel cervello. Abbiamo realizzato degli esperimenti in ratti anestetizzati, previo espletamento delle procedure di autorizzazione in conformità alle disposizioni di legge nazionale ed europea. Gli esperimenti non hanno causato alcun disagio o dolore agli animali e hanno avuto una durata molto breve (20-25 min), in modo da non causare stress ed alterare le funzioni fisiologiche (in particolare la barriera emato-encefalica, che separa il compartimento ematico dal cervello). Sono state somministrate piccole quantità di sostanze pure per via endovenosa. Dopo sacrificio istantaneo degli animali, gli organi e i fluidi biologici sono stati prelevati e sottoposti a procedure analitiche per misurare e caratterizzare i composti trovati. Centinaia di analisi sono state svolte presso il Centro Ricerca e Innovazione della Fondazione Edmund Mach (San Michele all'Adige, Trento), e in particolare

nel Dipartimento di Qualità alimentare e Nutrizione (Responsabile: dott. Fulvio Mattivi), avvalendoci dell'infrastruttura tecnica della Piattaforma metabolomica (Responsabile: dott.ssa Urška Vrhovšek).

I risultati ottenuti sono riportati in due articoli scientifici che saranno pubblicati nel corso del 2015. In sintesi, abbiamo misurato nel cervello quantità rilevanti dei composti somministrati, tra cui antociani intatti e alcuni loro prodotti di trasformazione. Di particolare interesse è l'osservazione del rapido passaggio di tutte queste molecole dal sangue al cervello.

Altre prove realizzate in vitro, utilizzando colture cellulari di astrociti (cellule presenti nel cervello, che svolgono funzione di supporto e nutrimento per le cellule nervose), hanno dimostrato che la quercetina, un flavonoide molto simile agli antociani, può entrare nelle cellule mediante sistemi di trasporto multipli. Questi dati indicano perciò che i flavonoidi hanno dei bersagli nel cervello.

4.2 Innovazione e impatto

I risultati di queste ricerche hanno fornito informazioni finora mancanti, sulla possibilità che i pigmenti del vino possano entrare nel cervello e agire direttamente sulle cellule. Questi dati sono di particolare importanza per il vino Terrano, in cui la concentrazione di antociani è molto elevata, e si cerca di produrre uve che ne siano ancora più ricche. Perciò, l'obiettivo di produrre vini ricchi di pigmenti non è giustificabile solo con argomenti che riguardano il gusto o il corpo del vino, o il suo valore di mercato, ma anche da argomenti legati alla salute.

Queste informazioni sono utili ai produttori, che, conoscendo meglio le proprietà del vino, possono decidere come migliorarlo e promuoverlo presso i loro clienti.

Conoscere le proprietà fondamentali del vino e delle sue azioni nell'organismo umano consente di formulare delle raccomandazioni ben fondate su come consumare il vino, per ricavarne benefici e non incorrere in danni alla propria salute. E' un messaggio molto importante da trasmettere soprattutto ai giovani, che sono esposti al rischio dell'abuso di alcol.

5. RACCOMANDAZIONI SUL CONSUMO DEL VINO

Il consumo tradizionale del vino, che si incontra nei Paesi mediterranei, ha effetti prevalentemente positivi sulla salute. Queste sono le caratteristiche del consumo "mediterraneo" di vino: i) dosi moderate; ii) assunzione distribuita nella settimana (piccole quantità ogni giorno); iii) basso uso di liquori; iv) preferenza per il vino rosso; v) consumo di vino ai pasti; vi) evitato il consumo smodato (Gea, Bes-Rastrollo et al. 2014).

Le linee guida italiana raccomandano di non superare 24-36 g di etanolo puro/die per i maschi adulti. Ciò corrisponde a 200-300 mL di vino (12 % etanolo, volume) al giorno. Per le donne, si indica non più di

12-24 g (100-200 mL di vino rosso). Alcuni Paesi raccomandano assunzioni leggermente superiori, come i Paesi Bassi e la Spagna (entrambi 40 g e 24 g). D'altra parte, alcuni Paesi hanno invece soglie ancora minori, come la Danimarca (21 g e 14 g), la Polonia (20 g e 10 g) e la Slovenia (20 g e 10 g). (NHMRC, 2009; Robins and British Medical Association, 1995).

6. RINGRAZIAMENTI

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

Gli autori ringraziano tutti i viticoltori dei consorzi Združenje Konzorcij kraških pridelovalcev terana e Consorzio Tutela Vini Collio e Carso che hanno fornito i campioni d'analisi.

7. BIBLIOGRAFIA

- Albarracin, S. L., B. Stab, et al. (2012). "Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease." *Nutr Neurosci***15**(1): 1-9.
- Basli, A., S. Soulet, et al. (2012). »Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection.« *Oxidative Medicine and Cellular Longevity***2012**(2): 1-14.
- Calabrese, V., C. Cornelius, et al. (2012). »Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity.« *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics***1822**(5): 753-783.
- Chrysohoou, C. and C. Stefanadis (2013). »Longevity and diet. Myth or pragmatism?« *Maturitas***76**(4): 303-7.
- Commenges, D., V. Scotet, et al. (2000). »Intake of flavonoids and risk of dementia.« *Eur J Epidemiol***16**(4): 357-63.
- Corder, R., J. A. Douthwaite, et al. (2001). »Endothelin-1 synthesis reduced by red wine.« *Nature***414**(6866): 863-4.
- Czank, C., A. Cassidy, et al. (2013). »Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ¹³C-tracer study.«
- Dajas, F., F. Rivera, et al. (2003). »Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids.« *Neurotox Res***5**(6): 425-32.
- de Ferrars, R. M., C. Czank, et al. (2014). »The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans.« *Br J Pharmacol***171**(13): 3268-82.
- de Rijk, M. C., M. M. Breteler, et al. (1997). »Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study.« *Arch Neurol***54**(6): 762-5.
- Dell'Agli, M., A. Busciala, et al. (2004). »Vascular effects of wine polyphenols.« *Cardiovasc Res***63**(4): 593-602.
- Di Castelnuovo, A., S. Rotondo, et al. (2002). »Meta-Analysis of Wine and Beer Consumption in Relation to Vascular Risk.« *Circulation***105**: 2836-2844.

- Echeverry, C., F. Arredondo, et al. (2010). »Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study.« *J Agric Food Chem***58**(4): 2111-2115.
- el Mohsen, M., J. Marks, et al. (2006). »Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats.« *The British journal of nutrition***95**(1): 51-58.
- Gea, A., M. Bes-Rastrollo, et al. (2014). »Mediterranean alcohol-drinking pattern and mortality in the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) Project: a prospective cohort study.« *Br J Nutr***111**(10): 1871-80.
- Granzotto, A. and P. Zatta (2014). »Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition.« *Front Aging Neurosci***6**: 95.
- He, F., N. N. Liang, et al. (2012). »Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression.« *Molecules***17**(2): 1571-601.
- Kalt, W., J. B. Blumberg, et al. (2008). »Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs.« *J Agric Food Chem***56**(3): 705-12.
- Kao, T.-K., Y.-C. Ou, et al. (2010). »Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia.« *Life Sciences***86**(9-10): 315-321.
- Krikorian, R., E. L. Boespflug, et al. (2012). »Concord Grape Juice Supplementation and Neurocognitive Function in Human Aging.« *J Agric Food Chem*.
- Krikorian, R., M. D. Shidler, et al. (2010). »Blueberry supplementation improves memory in older adults.« *J Agric Food Chem***58**(7): 3996-4000.
- Letenneur, L. (2004). »Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results.« *Biol Res***37**(2): 189-93.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). »Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.« *Am J Clin Nutr***81**(1): 230S-42S.
- Ndiaye, M., M. Chataigneau, et al. (2005). »Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery.« *FASEB J***19**(3): 455-7.
- Orgogozo, J. M., J. F. Dartigues, et al. (1997). »Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area.« *Rev Neurol (Paris)***153**(3): 185-92.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2005). »Fast access of some grape pigments to the brain.« *J Agric Food Chem***53**(18): 7029-34.
- Ristow, M. (2014). »Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits.« *Nat Med***20**(7): 709-11.
- Soleas, G. J., E. P. Diamandis, et al. (1997). »Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention.« *J Clin Lab Anal***11**(5): 287-313.
- Spencer, J. P. E. (2008). »Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance.« *Proc Nutr Soc***67**(2): 238-252.
- Spilsbury, A., D. Vauzour, et al. (2012). »Regulation of NF-κB activity in astrocytes: effects of flavonoids at dietary-relevant concentrations.« *Biochemical and biophysical research communications***418**(3): 578-583.
- Vanzo, A., U. Vrhovsek, et al. (2011). »Exceptionally Fast Uptake and Metabolism of Cyanidin 3-Glucoside by Rat Kidneys and Liver.« *Journal of natural products*.

- Waterhouse, A. L. (2002). »Wine phenolics.« *Ann N Y Acad Sci***957**: 21-36.
- Williams, R. J. and J. P. Spencer (2012). »Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease.« *Free Radic Biol Med***52**(1): 35-45.
- Zhu, J. T. T., R. C. Y. Choi, et al. (2007). »Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: a comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing beta-amyloid-induced cell death.« *J Agric Food Chem***55**(6): 2438-2445.
- Ziberna, L., S. Fornasaro, et al. (2013). *Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters*. R. R. Watson, V. R. Preedy and S. Zibadi. San Diego, Academic Press: 489-511.

COME POSSIAMO MIGLIORARE LA QUALITÀ DELLE UVE TERRANO-REFOŠK – RISULTATI DI CINQUE SPERIMENTAZIONI

Paolo SIVILOTTI¹, Lorena BUTINAR², Branka ŠKVARČ³
Martina SOBAN⁴, Adrian MONTES GUTIÉRREZ⁶,
Marina KOBAXHIDZE⁵, Andreja VANZO⁷, Klemen LISJAK⁸

1, 2, 3, 4, 5 Università di Nova Gorica, Centro di ricerca sul Vino

6 Batumi Shota Rustaveli State University, Batumi, Georgia

7, 8 Istituto Agrario della Slovenia

¹ Prof. associato

² Dott.ssa

⁶ Dott.

⁷ Prof. associato

⁸ Dott.

RIASSUNTO

Nell'area vitiviticola del Carso-Karst, sono state impostate cinque sperimentazioni con il fine di verificare come le pratiche agronomiche potevano contribuire al miglioramento della qualità delle uve Terrano-Refošk. Le tecniche applicate hanno permesso di ottimizzare il rapporto tra la superficie fogliare e la produzione. La riduzione della produzione ottenuta attraverso la defogliazione pre-fioritura, il diradamento dei grappoli, la scacchiatura e lo stress idrico da moderato a forte, ha mostrato di essere efficace al fine di migliorare i parametri di base della maturazione ma anche l'accumulo di polifenoli nelle bacche d'uva.

Parole chiave: Terrano-Refošk, diradamento dei grappoli, defogliazione pre-fioritura, scacchiatura, rapporto area fogliare/produzione, stress idrico, polifenoli, antociani

How we can improve the quality of grapes cv. refošk – overview of five different ampelotechnic trials

ABSTRACT

In the area of Karst, five experiments were set up with the aim to find out how selected viticultural techniques could impart an improvement in grape quality. All techniques had an effect over the ratio between leaf area and yield. The crop reduction, obtained both by pre-flowering leaf removal, cluster thinning or shoot thinning and moderate-to-strong water stress demonstrated to be really effective in order to improve the basic maturation but also the accumulation of phenolics in the grape berries.

Keywords: Refošk, cluster thinning, shoot thinning, pre-flowering leaf removal, leaf area-to-yield rate, drought, polyphenols, anthocyanins.

1. INTRODUZIONE

In diverse realtà vitivinicole del mondo i viticoltori riconoscono l'importanza dell'equilibrio della pianta per ottenere una migliore qualità dalle uve. Molte sperimentazioni sono state condotte allo scopo di comprendere quale sia il migliore compromesso tra la chioma (fonte di carboidrati) e la produzione di uva (dove parte dei soluti viene accumulata). Tra gli indici proposti dai ricercatori, il più utilizzato è sicuramente il rapporto area fogliare/produzione, e Kliewer e Dokoozlian (2005) hanno riportato come valori compresi tra 0.8 e 1.4 m²/kg possono essere considerati ottimali per molte varietà di vite e per diversi sistemi di allevamento. Più di recente, Reynolds et al. (2007) hanno evidenziato come la scelta di una forma di allevamento condiziona il rapporto tra foglie esposte e ombreggiate, e quindi anche l'attività fotosintetica totale della pianta. L'utilizzo di una forma di allevamento potrebbe quindi modificare i valori dell'indice di equilibrio tra area fogliare e produzione, poiché l'efficienza fotosintetica cambia sensibilmente in relazione alla percentuale relativa di foglie esposte alla radiazione solare o ombreggiate.

Quando le bacche d'uva vengono esposte alla luce del sole, il metabolismo primario e secondario subisce dei cambiamenti. Normalmente si osserva un aumento dei solidi solubili (Zoecklein et al. 1992; Bergqvist et al., 2001), degli antociani e di altri polifenoli (Sternad Lemut et al. 2013, Lee and Skinkis 2013). Come possiamo aumentare l'esposizione dei frutti alla luce? Come discusso sopra, l'utilizzo di una particolare forma di allevamento può ridurre la percentuale di foglie ombreggiate

ma anche aumentare la quantità di luce che raggiunge i grappoli. Più semplicemente, nelle forme di allevamento a controspalliera è possibile agire attraverso la defogliazione della zona dei grappoli.

Parlando sempre di equilibrio tra chioma e produzione, è facile intuire come per molte varietà vi siano problemi di eccesso di produzione (Guidoni et al. 2002; Dami et al. 2006). Zoecklein et al. (1992) hanno evidenziato come un valore basso del rapporto tra chioma e produzione conduceva ad una riduzione dell'accumulo di zuccheri nelle bacche alla vendemmia. Molti produttori sanno che durante l'estate devono intervenire per correggere la produzione diradando i grappoli al fine di raggiungere un corretto rapporto tra chioma e produzione. Il diradamento dei grappoli è la principale pratica viticola utilizzata per ridurre la produzione e migliorare quindi l'accumulo di zuccheri e di polifenoli nelle bacche d'uva (Reynolds 1989; Bubola 2011). Possiamo anche facilmente intuire come uno degli effetti del diradamento dei grappoli, sia una compensazione tra il minore numero di grappoli ed il peso medio grappolo (Sivilotti e Lavrencic 2010), anche se questo effetto non è sempre confermato (Gatti et al. 2012a).

Un'altra tecnica utilizzata per ridurre la produzione è stata proposta negli ultimi anni e prevede la defogliazione della zona dei grappoli in pre-fioritura (Tardaguila et al. 2008; Poni et al. 2009; Palliotti et al. 2012). Caspari et al. (1998) hanno spiegato come la defogliazione pre-fioritura riduce la disponibilità di carboidrati per i fiori e quindi per l'allegagione, e quello che si ottiene sono dei grappoli più spargoli e quindi una ridotta produzione. Sternad Lemut et al (2013), Lee e Skinkis (2013) e Diago et al (2012) hanno osservato un contenuto più alto di flavonoidi – principalmente flavonoli – nelle uve dove era stata applicata la defogliazione pre-fioritura. Inoltre, Gatti et al. (2012a) ha mostrato che la defogliazione pre-fioritura assicura una maggiore acidità titolabile nelle uve alla raccolta; questo risultato è interessante in uno scenario di cambiamenti climatici, visto che le temperature elevate durante l'estate tendono a ridurre sensibilmente i valori di questo parametro.

Infine, un'ulteriore strada percorribile per controllare il carico produttivo è la scacchiatura. L'eliminazione dei tralci in sovrannumero permette di ottenere un miglioramento della fotosintesi della chioma e del microclima del grappolo poiché vi è una maggiore esposizione alla luce del sole. Questa pratica può essere adottata per ridurre la produzione e quindi per migliorare la qualità delle uve (Gatti et al. 2012b).

Diversamente dalle tecniche di gestione della chioma, anche lo stress idrico può essere utilizzato per ridurre la produzione ed ottenere nel contempo un aumento della concentrazione di sostanze polifenoliche (Sivilotti et al. 2005; Castellarin et al. 2007).

Sulla base di quanto presentato in questa lunga introduzione, nelle stagioni 2012 e 2013 sono state condotte cinque sperimentazioni nella zona del Carso con lo scopo di valutare gli effetti di diverse tecniche agronomiche sulla produzione e sulla qualità delle uve Terrano/Refošk (Vitis vinifera L.) e dei vini Terrano.

2. MATERIALI E METODI

Nelle stagioni 2012 e 2013 sono state messe in campo 5 sperimentazioni nel territorio del Carso nell'ambito del progetto AGROTUR/Agroturistica carsica. Come già evidenziato in un precedente articolo (Sivilotti et al. 2012), le prove di carattere viticolo volevano investigare l'effetto di alcune tecniche agronomiche sull'equilibrio area fogliare/produzione, e quindi di riflesso sulla qualità delle uve e dei vini Terrano.

Tabella 1: presentazione delle sperimentazioni viticole

prova	sito	Scopo (anno)	Forma di allevamento	trattamenti
1	Dutovlje	Come la riduzione della produzione ottenuta con la PFLR o il CT poteva influenzare la maturazione delle uve (2012-13).	Guyot (fig 1)	1. UNT , non trattato
				2. PFLR , defogliazione pre-fioritura effettuata 10 giorni prima della fioritura (25.5.2012; 28.5.2013). Per ogni tralcio sono state rimosse 4-5 foglie.
				3. CT , diradamento dei grappoli all'invaiaitura (2.8.2012; 21.8.2013).
2	Dutovlje	Come la forma di allevamento (pergola tradizionale o Guyot) ed il diradamento dei grappoli influenzano la qualità delle uve alla raccolta (2012).	Guyot e pergola (fig 1 e 2)	1. Guyot UNT
				2. Guyot CT , diradamento dei grappoli all'invaiaitura (2.8.2012)
				3. Pergola UNT
				4. Pergola CT diradamento dei grappoli all'invaiaitura (2.8.2012).
3	Dutovlje	Come la scacchiatura può ridurre la produzione e quindi migliorare la qualità delle uve (2012).	Guyot (fig. 3)	1. UNT , non trattato 2. SC , scacchiatura effettuata dopo il germogliamento eliminando i doppi germogli sul capo a frutto e i germogli in eccesso sulla testa della vite.
4	Komen	Trovare l'equilibrio tra chioma e produzione che permetta di migliorare la qualità delle uve (2012).	Guyot (fig. 4)	1. FCFB (tutta la chioma, tutti i grappoli), non trattato
				2. FCHB (tutta la chioma, metà grappoli), grappoli eliminati all'inizio dell'invaiaitura (1.8.2012)
				3. HCFB (metà chioma, tutti i grappoli), 40% della chioma eliminata all'inizio dell'invaiaitura (1.8.2012)
				4. HCHB (metà chioma, metà grappoli), 40% della chioma e metà dei grappoli eliminati all'inizio dell'invaiaitura (1.8.2012)
5	Krajna vas	Come lo stress idrico influenza la maturazione delle uve (2012)	Guyot (fig.5)	1. MF (stress idrico da moderato a forte)
				2. FS (stress idrico da forte a severo)

Per quanto attiene alla prima sperimentazione, è stata calcolata la variazione percentuale della produzione e dei parametri di maturazione tecnologica rispetto al controllo non trattato. Il profilo antocianico alla

raccolta è stato determinato utilizzando il metodo descritto in Mattivi et al. (2006). È stata inoltre calcolata la somma di antociani di- e tri-sostituiti, e di quelli idrossilati (OH-) o metossilati (OCH₃-). Nelle sperimentazioni 2, 4, 5 è stato valutato l'effetto dei trattamenti sui parametri di maturazione tecnologica. È stata inoltre valutato il contenuto di polifenoli totali ed antociani con il metodo descritto da Iland (2004) per le prove 2 e 4, mentre nel caso delle sperimentazioni 3, 4 e 5 sono stati determinate le proantocianidine a basso (LMWP) ed alto peso molecolare (HMWP) e gli antociani con i metodi descritti da Rigo et al. (2000).



*Figura 1: Guyot: **UNT**-non trattato, **PFLR**-defogliazione pre-fioritura, **CT**-diradamento grappoli*



*Figura 2: Pergola: **UNT**-non trattato, **CT**-diradamento dei grappoli*



*Figura 3: scacchiatura, **SC**: dopo il germogliamento sono stati eliminati i doppi germogli e quelli sovrannumero sulla testa della vite.*



Figura 4: equilibrio chioma/produzione: **FCFB** – chioma intera, tutti i grappoli; **FCHB** – chioma intera, diradamento dei grappoli; **HCFB** – chioma ridotta, tutti i grappoli; **HCHB** – chioma ridotta, diradamento dei grappoli.



Figura 5: stress idrico: **MF**-da moderato a forte, **FS**-da forte a severo.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 defogliazione precoce (PFLR) vs diradamento dei grappoli (CT)

Come già precedentemente riportato in Sivilotti et al. (2012), le tecniche di defogliazione pre-fioritura ed il diradamento dei grappoli contribuiscono a ridurre la produzione e quindi a migliorare l'equilibrio con l'area fogliare. I risultati ottenuti nel 2012 e 2013 hanno subito l'effetto del decorso meteorologico delle due annate, e nel 2013 la produzione media inferiore ha vanificato tutti i vantaggi di diradamento, e anche per quanto riguarda la defogliazione precoce l'effetto è risultato inferiore.

Nella prima stagione 2012 è stato evidenziato un chiaro effetto della tesi PFLR sul peso del grappolo e del trattamento CT sul numero di grappoli (tabella 2).

I cambiamenti nei parametri produttivi, hanno influenzato anche i parametri fondamentali di maturazione delle uve. Nell'annata 2012, il dira-

damento dei grappoli ha portato ad un aumento degli zuccheri ed a una riduzione dell'acidità titolabile rispetto al controllo non trattato. Anche la defogliazione precoce ha fornito risultati simili, ma l'effetto è stato più moderato. Nella stagione successiva il 2013, non vi sono stati degli effetti evidenti della defogliazione pre-fioritura e del diradamento dei grappoli, e addirittura per quanto riguarda quest'ultimo trattamento il comportamento è stato opposto rispetto alla stagione precedente.

Tabella 2 – variazione percentuale della produzione e dei parametri di maturazione tecnologica per i trattamenti di diradamento dei grappoli (CT) e di defogliazione precoce (PFLR) rispetto alla tesi di controllo (UNT) nelle stagioni 2012 e 2013.

anno	confronti	numero grappoli	peso grappolo	produzione	TSS (Brix)	acidità titolabile	pH
2012	CT vs UNT	-34%	-8%	-40%	+17%	-21%	+4%
	PFLR vs UNT	-8%	-41%	-40%	+3%	-4%	+4%
2013	CT vs UNT	-9%	-6%	-14%	-15%	-5%	-3%
	PFLR vs UNT	+8%	-25%	-22%	+1%	-3%	+1%

Per entrambe le tesi CT e PFLR si è osservato un aumento degli antociani e del contenuto di tannini nelle bucce e nei vinaccioli. Un evidente aumento del contenuto di tannini (LMWP e HMWP) è stato osservato soprattutto per i vinaccioli. Nelle bucce vi è stato un incremento delle proantocianidine HMWP nel caso del trattamento PFLR in confronto con il testimone UNT (Tabella 3). Per quanto riguarda il trattamento PFLR si è osservato un aumento sensibile del contenuto in tannini, e quindi la tecnica risulta interessante al fine di aumentare il contenuto di tannini nelle uve di Terrano.

Tabella 3 – variazione percentuale del contenuto di proantocianidine a basso (LMWP) e alto peso molecolare (HMWP) e di antociani totali nelle bucce e nei vinaccioli alla raccolta, per i trattamenti di diradamento dei grappoli (CT) e di defogliazione precoce (PFLR) rispetto al testimone (UNT) nella stagione 2012.

anno	confronti	bucce (mg/kg)			vinaccioli (mg/kg)	
		LMWP	HMWP	anthociani	LMWP	HMWP
2012	CT vs UNT	-0,8%	+107%	+33%	+99%	+127%
	PFLR vs UNT	+75%	+133%	+65%	+199%	+290%

Il contenuto di antociani liberi totali è risultato simile nei trattamenti CT e PFLR, ma tendenzialmente maggiore rispetto al controllo UNT. In entrambi i trattamenti CT e PFLR, c'è stato un cambiamento nella composizione antocianica, con un maggiore aumento di monomeri tri-sostituiti e metossilati (OCH₃-) rispetto al controllo. Questa modificazione nella composizione indica che probabilmente c'è stato uno spostamento nella biosintesi degli antociani indotto sia dal diradamento dei grappoli che dalla defogliazione pre-fioritura.

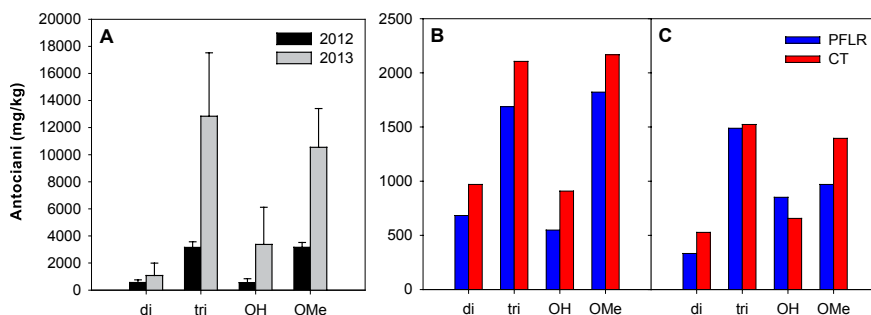


Figura 6: (A) profilo antocianico nelle uve del testimone non trattato (UNT) nelle stagioni 2012 e 2013. Nelle figura (B, 2012) e (C, 2013) è rappresentato l'aumento di antociani nei trattamenti **PFLR** defogliazione precoce) e **CT** (diradamento dei grappoli) rispetto al controllo UNT. Vengono presentati gli antociani raggruppati come di- e tri-sostituti, idrossilati (OH-) e metossilati (OCH_3 -). Le barre rappresentano l'errore standard ($n=4$).

3.2 confronto tra sistemi di allevamento: pergola vs Guyot

Come già detto, l'importanza della forma di allevamento è cruciale per la produzione e per la qualità delle uve. La forma di allevamento tradizionale a "pergola" permette di ottenere una maggiore produzione poiché un maggior numero di gemme viene mantenuto con la potatura. Inoltre, le foglie sono meglio distribuite nello spazio e sono così più efficienti rispetto alla forma a Guyot dove la chioma è più stretta e condotta verticalmente.

Il 12 settembre 2012 (15 giorni prima della vendemmia), sono stati raccolti campioni di uve, che sono stati analizzati per determinare i parametri di maturazione tecnologica ed il contenuto di polifenoli. Come ci si poteva aspettare, il diradamento dei grappoli in entrambe le forme di allevamento ha provocato un aumento del peso delle bacche e dell'accumulo degli zuccheri, ed una riduzione dell'acidità titolabile (tabella 4). Nel caso del Guyot, il diradamento dei grappoli ha fornito un aumento sensibile del contenuto di zuccheri solubili (da 16.4 a 19.2 °Brix) mentre per quanto riguarda la pergola, si è osservata una significativa riduzione dell'acidità titolabile (da 17.5 a 14.3 g/L). Sulla base dei valori di maturazione tecnologica, possiamo ipotizzare che nel caso della pergola il rapporto chioma/produzione è sbilanciato a causa dell'elevata produzione (dati non disponibili). Per questo motivo, anche riducendo la produzione con il diradamento dei grappoli, l'aumento di zuccheri è stato più limitato. Al contrario, per il Guyot la riduzione della produzione ha permesso un maggiore incremento di zuccheri, il che significa che solamente in queste condizioni si raggiunge un buon equilibrio tra chioma e produzione.

Relativamente ai polifenoli, è apparso uno scenario un po' diverso. Per entrambe le forme di allevamento, il diradamento dei grappoli ha incrementato la concentrazione di antociani e polifenoli totali. Il più alto livello di antociani è stato trovato per il Guyot diradato, ma per quanto riguarda i polifenoli totali, i valori più alti sono emersi nel caso della pergola. Quello che possiamo ipotizzare è che il livello produttivo abbia influenzato la maturazione delle uve (ritardata per la pergola), ma fortunatamente la maggiore esposizione dei grappoli in quest'ultima forma di allevamento ha creato i presupposti per un maggiore accumulo di polifenoli nelle bacche.

Table 4 – modificazioni nei parametri produttivi e di maturazione tecnologica indotte dalla forma di allevamento e dal diradamento nella stagione 2012. (UNT, non trattato; CT, diradamento dei grappoli; ant., antociani; pol., polifenoli totali).

trattamenti		peso acino (g)	TSS (°Brix)	acidità titolabile (g/L)	pH	ant (mg/kg)	pol (mg/kg)
Guyot	UNT	159	16,4	13,5	2,80	1218	1512
	CT	169	19,2	12,1	2,95	2023	1754
CT vs UNT		+6%	+17%	-10%	+5%	+66%	+16%
Pergola	UNT	147	15,9	17,5	2,89	1461	1607
	CT	153	16,8	14,3	2,90	1803	1884
CT vs UNT		+4%	+6%	-18%	+4%	+23%	+17%

3.3 Effetto della scacchiatura

La scacchiatura viene effettuata a inizio stagione al fine di ottenere una riduzione del numero potenziale di tralci fruttiferi. A riguardo delle diverse componenti dell'area fogliare, vi è una maggiore riduzione delle foglie principali poiché vi sono meno tralci sviluppati/pianta e, come normalmente succede per il Terrano-Refošk, non è stata osservata una compensazione con una maggior ricrescita di femminelle (tabella 5). Così alla fine l'area fogliare totale è risultata ridotta del 25% nel trattamento con scacchiatura; in ogni caso, l'area fogliare rimasta risulta meno ombreggiata e quindi più efficiente. Per il trattamento SC, la produzione è risultata inferiore di un 17%, e questo era legato principalmente ad un minore numero di grappoli (-14 %) solo in parte compensato da un maggior peso grappolo (+4%). Legato alla minore produzione, si è ottenuto un aumento del 14% dei solidi solubili (° Brix).

Tabella 5 – effetto della scacchiatura (SC) sulle componenti dell'area fogliare (AF) e della produzione nell'anno 2012.

trattamenti	AF femminelle (m ²)	AF tralci principali (m ²)	AF totale (m ²)	numero grappoli	peso medio grappolo (g)	produzione (kg/pianta)	Peso 100 bacche (g)	TSS (Brix)
UNT	1,62	2,13	3,75	12,6	292	3,69	121	18,3
SC	1,59	1,23	2,82	10,5	303	3,18	193	20,9
SC vs UNT	-2%	-42%	-25%	-17%	+4%	-14%	+59%	+14%

La riduzione di produzione ottenuta con la scacchiatura ha stimolato un aumento della concentrazione di polifenoli estraibili alla raccolta. Inoltre, nella tabella 6, si può notare come con la scacchiatura abbia permesso di ottenere un aumento di proantocianidine a basso (+36% nelle bucce e +6% nei vinaccioli) e alto peso molecolare (+17% sia nelle bucce che nei vinaccioli), ed anche degli antociani estraibili (+17%).

Tabella 6 – Effetto della scacchiatura (SC) sulla composizione in proantocianidine a basso (LMWP) e alto peso molecolare (HMWP) e in antociani totali nelle bucce e nei vinaccioli alla raccolta nella stagione 2012.

trattamenti	bucce (mg/kg)			vinaccioli (mg/kg)	
	LMWP	HMWP	antociani	LMWP	HMWP
UNT	252	1782	448	526	603
SC	343	2079	522	556	703
SC vs UNT	+36%	+17%	+17%	+6%	+17%

Quanto è stato sopra discusso per quanto riguarda diradamento dei grappoli e defogliazione pre-fioritura, può essere applicato anche al caso della scacchiatura; qualsiasi tecnica che permetta un aumento delle proantocianidine nelle bucce è favorevole per una migliore qualità dei vini dopo la vinificazione.

3.4 effetto del rapporto chioma/produzione

A riguardo del quarto esperimento, la maggior parte dei dati relativi alla produzione ed ai parametri tecnologici di maturazione sono stati presentati da Sivilotti et al. (2012) e da Tronkar (2014). Dal confronto fra i trattamenti, quello che emerge subito è il positivo effetto del diradamento dei grappoli sull'accumulo di antociani alla raccolta. Tra i trattamenti, solo HCFB è risultato troppo sbilanciato, e alla raccolta la concentrazione di antociani e polifenoli totali è risultata significativamente ridotta (figura 7).

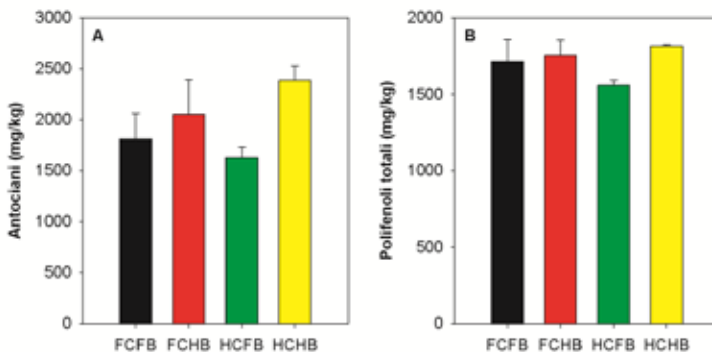


Figura 7 – concentrazione di antociani (A) e polifenoli totali (B) nelle bacche d'uva alla raccolta. Le barre rappresentano l'errore standard (n=3). (FCFB – chioma intera, tutti i grappoli; FCHB - chioma intera, diradamento dei grappoli; HCFB - chioma ridotta, tutti i grappoli; HCHB - chioma ridotta, diradamento dei grappoli).

Per quanto attiene ai trattamenti a chioma intera, la riduzione della produzione (FCHB) ha aumentato sensibilmente la concentrazione di proantocianidine da vinaccioli senza influenzare invece la componente delle bucce (Tabella 7). I trattamenti a chioma intera hanno mostrato un maggiore contenuto di proantocianidine da bucce rispetto alla chioma ridotta, a prescindere dal diradamento dei grappoli. Per quanto riguarda i trattamenti a chioma ridotta, il diradamento dei grappoli ha evidenziato un minor contenuto in proantocianidine sia per le bucce che per i vinaccioli. Questo risultato può essere spiegato facilmente, poiché molto probabilmente il diradamento dei grappoli ha migliorato il rapporto chioma/produzione permettendo una migliore maturazione delle uve ed una riduzione del contenuto dei tannini.

Tabella 7 – Effetto della riduzione della chioma e del diradamento dei grappoli sulla composizione in proantocianidine a basso (LMWP) e alto peso molecolare (HMWP) nelle bucce e nei vinaccioli alla raccolta nell'annata 2012. (FCFB – chioma intera, tutti i grappoli; FCHB - chioma intera, diradamento dei grappoli; HCFB - chioma ridotta, tutti i grappoli; HCHB - chioma ridotta, diradamento dei grappoli).

		bucce (mg/kg)		vinaccioli (mg/kg)	
		LMWP	HMWP	LMWP	HMWP
Tutta la chioma	FB	413 ± 33	2065 ± 167	246 ± 34	301 ± 42
	HB	409 ± 33	2171 ± 176	395 ± 55	488 ± 68
FCHB vs. FCFB		-1 %	+5 %	+61 %	+62 %
metà chioma	FB	384 ± 31	1878 ± 152	401 ± 56	491 ± 68
	HB	348 ± 28	1397 ± 113	286 ± 40	329 ± 46
HCHB vs. HCFB		-9 %	-26 %	-29 %	-33 %

3.5 effetto dello stress idrico

La maggior parte dei risultati riguardanti i parametri di maturazione tecnologica e la struttura polifenolica alla raccolta sono stati già presentati in Sivilotti et al. (2014). Non sono state osservate molte differenze nei parametri di maturazione tecnologica tra i trattamenti di stress da moderato a forte (MF) e da forte a severo (FS), ma per quanto riguarda la componente polifenolica, lo stress più severo ha portato ad un aumento delle proantocianidine da bucce ed a una riduzione di quelle da vinaccioli. Come riportato nella pubblicazione poc'anzi citata, valori troppo bassi dei tannini da vinaccioli devono essere evitati poichè una minima concentrazione è richiesta per ottenere un vino con caratteristiche sensoriali bilanciate.

Tabella 8 – Variazione percentuale del contenuto in proantocianidine a basso (LMWP) e alto peso molecolare (HMWP) nelle bucce e nei vinaccioli per effetto dello stress idrico nella stagione 2012. (MF, stress da moderato a forte; FS, stress da forte a severo).

trattamenti	bucce mg/kg		vinaccioli mg/kg	
	LMWP	HMWP	LMWP	HMWP
FS vs MF	+29,3%	+72,6%	-30,6%	-34,4%

4. CONCLUSIONI

La gestione della chioma e lo stress idrico hanno permesso di ottenere importanti miglioramenti nella maturazione delle uve, principalmente per quanto riguarda la componente polifenolica delle bucce e dei vinaccioli. Un buon equilibrio tra chioma e produzione è cruciale al fine di ottenere uve di qualità e quindi vini più apprezzati. Nelle sperimentazioni condotte negli anni 2012 e 2013, tutte le tecniche applicate avevano lo scopo di ridurre la produzione e quindi migliorare la matrice polifenolica e di tannini delle uve. La defogliazione pre-fioritura ha permesso di ottenere un aumento del contenuto in tannini delle uve (sia da bucce che da vinaccioli), utile per garantire l' invecchiamento dei vini Terrano. A riguardo delle forme di allevamento, il Guyot ha mostrato risultati più interessanti rispetto alla tradizionale pergola, che ha trovato comunque vantaggio dal diradamento dei grappoli. Le tecniche di diradamento dei grappoli (nelle diverse prove) e la scacchiatura hanno evidenziato le loro potenzialità nel migliorare l'equilibrio chioma/produzione e aumentare la concentrazione di sostanze polifenoliche. Anche lo stress idrico ha contribuito a migliorare la qualità delle uve, ma è necessario evitare condizioni eccessivamente stressanti poichè sono dannose per l'equilibrio polifenolico.

Per concludere, vi sono possibilità ulteriori in futuro per migliorare la qualità dei vini Terrano e quindi potenziare la reputazione nel mercato del vino internazionale.

5. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano le aziende “Lisjak”, “Vodopivec”, “Štoka” and “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.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bergqvist, J.; Dokoozlian, N.K., Ebisuda, N. 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 1-7.
- Bubola, M.; Peršurić, Đ.; Kovačević Ganić, K. 2011. Impact of cluster thinning on productive characteristics and wine phenolic composition of cv. Merlot. *Journal of Food Agriculture & Environment* 9: 36-39.
- Caspari, H.W.; Lang, A.; Alspach, P. 1998. Effects of Girdling and Leaf Removal on Fruit Set and Vegetative Growth in Grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 359–366.
- 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.
- Diago, M. P.; Ayestaran, B.; Guadalupe, Z.; Poni S.; Tardaguila J. 2012. Impact of prebloom and fruit set basal leaf removal on the flavonol and anthocyanin composition of Tempranillo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63: 367-376.
- Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S. 2012a. Effects of Cluster Thinning and Preflowering Leaf Removal on Growth and Grape Composition in cv. Sangiovese. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63: 325–332.
- Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi S.; Merli, M.C.; Poni, S. 2012. Scacchiatura della vite, effetti e scelte in funzione della produzione. *Informatore agrario*, 64: 38 - 42
- 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.
- Iland, P.; Bruer, N.; Edwards, G.; Caloghris, S.; Wilkes, E. 2004. *Chemical Analysis of Grapes and Wine Techniques and Concepts*. 118 pp. 2nd Edition. P. Iland Wine Promotions Pty Ltd. Adelaide, Australia.
- 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.
- Lee, J.; Skinkis, P. 2013. Oregon “Pinot noir” grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chemistry*, 139: 893–901.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. and Velasco, R., (2006) Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7692–7702.
- Palliotti, A.; Gardi, T.; Berrios, J.B.; Civardi, S.; Poni, S. 2012. Early source limitation as a tool for yield control and wine quality improvement in a high-yielding red *Vitis vinifera* L. cultivar. *Scientia Horticulturae*, 145: 10-16.

- 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.
- Reynolds, A.G.; Schlosser, J.; Sorokowsky, D.; Roberts, R.; Willwerth, J.; de Savigny, C. 2007. Magnitude of Viticultural and Enological Effects. II. Relative Impacts of Cluster Thinning and Yeast Strain on Composition and Sensory Attributes of Chardonnay Musqué. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 25–41.
- Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovšek U., Mattivi F. 2000. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 48(6): 1996–2002.
- Sivilotti P., Butinar L., Jež A., Šuklje K., Vanzo A. and Lisjak K. 2014. Stress idrico nei vigneti del Carso ed effetti sulla qualità delle uve. In *Kraško okolje*. K. Lisjak & L. Butinar (Eds.). 53-63. Vipava, Slovenia.
- Sivilotti, P.; Butinar, L.; Jez, A.; Tronkar, J.; Turk, M.; Vanzo, A.; Lisjak, K. 2012. Odkrivanje učinkov vinogradniških tehnologij pri sorti Refošk. In "Bioaktivne spojine terana". K. Lisjak (Ed.). 15-27. Ljubjana, Slovenia.
- Sivilotti, P.; Lavrenčič, P. 2010. Vpliv obremenitve in različnega termina trgatve na kemično sestavo in organoleptične lastnosti vina Merlot. In "Vinarski dan 2010". F. Čuš F. & L. Marinček (Eds.), pp. 95-106. Ljubjana, Slovenia.
- Sternad Lemut, M.; Sivilotti, P.; Franceschi, P.; Wehrens, R.; Vrhovsek, U. 2013. The use of metabolite profiling to study grape skin polyphenolic behaviour as a result of canopy microclimate manipulation in "Pinot noir" vineyard. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61: 8976–8986.
- 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.
- Tronkar J., 2014. Vpliv razmerja med obremenitvijo in listno površino grma vinske trte na kakovost grozdja in vsebnost polifenolov pri sorti 'Refošk' (V.vinifera). Diplomsko delo, 44 str. Univerza v Nova Gorica, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo.
- Zoecklein, B.W.; Wolf, T.K.; Duncan, N.W.; Judge, J.M.; Cook, M.K. 1992. Effects of Fruit Zone Leaf Removal on Yield, Fruit Composition, and Fruit Rot Incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 139–148.

EFFETTO DI TECNICHE AGRONOMICHE SULL'ACCUMULO DI ANTOCIANINE E SULL'ESPRESSIONE DI PROTEINE TRASPORTATRICI IN VITIS VINIFERA CV. REFOŠK

Sonia PATUI¹, Carlo PERESSON², Alberto BERTOLINI³, Enrico BRAIDOT⁴, Marco ZANCANI⁵, Sabina PASSAMONTI⁶, Paolo SIVILOTTI⁷, Lorena BUTINAR⁸, Andreja VANZO⁹, Klemen LISJAK¹⁰, Angelo VIANELLO¹¹, Elisa PETRUSSA¹²

1,2,3,4,5,11,12 Università di Udine, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Sezione di Biologia vegetale

6 Università di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita

7,8 Università di Nova Gorica, Centro di ricerca sul Vino

9,10 Istituto Agrario della Slovenia

¹ Dott.ssa, ² Dott., ³ Dott., ⁴ Prof., ⁵ Prof., ⁶ Prof.ssa, ⁷ Prof.associato, ⁸ Dott.ssa
⁹ Prof.associato, ¹⁰ Dott., ¹¹ Prof., ¹² Dott.ssa

SOMMARIO

Il presente lavoro, svolto nel corso delle annate 2012 e 2013, si è prefisso di studiare alcuni aspetti biochimici relativi all'accumulo di antocianine nella buccia in piante di *Vitis vinifera* (cv. Refošk) sottoposte a differenti tecniche di gestione della chioma, quali il diradamento dei grappoli e la defogliazione effettuata prima della fioritura. Entrambe le pratiche, modificando l'equilibrio tra area fogliare e produzione di uva a favore delle foglie, risultano favorevoli a migliorare la qualità delle uve e quindi del vino.

È noto che, durante la maturazione, antocianine e altri flavonoidi sono accumulati all'interno del vacuolo delle cellule tegumentali, mediante meccanismi che possono coinvolgere trasportatori di membrana. Per comprendere se il livello di espressione di tali proteine possa essere correlato al profilo delle antocianine e modulato da uno specifico equilibrio tra area fogliare e produzione, sono state impostate due analisi parallele sulla buccia della bacca in maturazione: i) profilo delle antocianine mediante HPLC-DAD; ii) test immunologico ELISA dell'espressione di diverse proteine coinvolte nel trasporto di membrana, quali ABCC1, GST, MATE e bilitranslocasi (BTL)-simile.

Complessivamente, i risultati ottenuti nelle due annate hanno permesso di evidenziare che i trattamenti agronomici di gestione della chioma era-

no in grado di stimolare solo parzialmente la concentrazione di pigmenti nella buccia, in quanto questo parametro è stato fortemente influenzato dall'andamento stagionale. In parallelo, il livello di espressione delle proteine studiate è stato influenzato dalla maturazione o dai diversi trattamenti agronomici in maniera non omogenea tra le due annate considerate. In particolare, nel 2013 il profilo dei trasportatori, quali MATE, AB-CC1 e BTL-simile, e della GST risultava essere correlato all'incremento delle antocianine durante la maturazione, mentre non era modulato dal tipo di gestione della chioma.

In conclusione, la condizione climatica dell'annata risulta essere uno dei fattori principali di variabilità nella maturazione fenolica nell'uva Refošk; tuttavia è possibile suggerire che anche i trasportatori responsabili dell'accumulo di questi pigmenti ne possano in parte regolare la concentrazione finale.

Parole chiave: antocianine, defogliazione precoce, diradamento dei grappoli, maturazione della bacca, Refošk, trasportatori di membrana.

Effect of agronomic techniques on anthocyanin accumulation and transporter expression in *vitis vinifera* cv. Refošk

ABSTRACT

The present research, performed in the seasons 2012 and 2013, aimed at studying the biochemical aspects of anthocyanin accumulation in the skin of *Vitis vinifera* (cv.Refošk) grape berry under different canopy management techniques, such as cluster thinning and pre-flowering leaf removal, in order to improve wine quality by balance between leaf area and production.

It is well-known that, during ripening, anthocyanins and other flavonoids are accumulated inside the vacuole of tegument cells, through mechanisms involving membrane transporters. In order to understand whether the expression level of these proteins could be related to the anthocyanin profile and affected by a specific leaf area/ yield ratio, two parallel analysis were performed on the skin berry during maturation: i) anthocyanin profile by HPLC-DAD; ii) protein expression level by immunology ELISA test on different proteins involved in membrane transport, such as AB-CC1, GST, MATE and bilitranslocase (BTL)-like.

Taken together, the results of the two seasons evidence that both the agronomic techniques could stimulate only partially the pigment concentra-

tion in the skin, since this parameter was strongly affected by seasonal trend. Similarly, the protein expression pattern was not homogeneously influenced in the two seasons by maturation steps or agronomic practices. In particular, in the season 2013 the profiles of the putative transporters, such as MATE, ABCC1 and BTL-like, and of GST, were correlated with anthocyanin content during maturation, whereas they were not influenced by canopy management.

In conclusion, the seasonal climatic trend represents one of the main factors of variance in polyphenol maturity in Refošk grape berry; however, also the transporters responsible for pigment accumulation could affect partially their final concentration.

Keywords: anthocyanins, berry maturation, cluster thinning, early leaf removal, membrane transporters, Refošk.

1. INTRODUZIONE

Durante la maturazione delle varietà a bacca nera di *Vitis vinifera*, diverse classi di flavonoidi (antociani, flavonoli, catechine e proantocianidine) sono sintetizzati e accumulati nella buccia. Questi composti svolgono fondamentali ruoli fisiologici, contribuendo alla formazione del colore e in parte dell'aroma del vino, e sono particolarmente apprezzati per gli effetti sulla salute umana (Boss & Davies, 2009). Concentrazione e composizione delle antocianine nell'uva matura rappresentano i principali indicatori di qualità del colore per la successiva vinificazione; di conseguenza un notevole interesse si è sviluppato verso la comprensione dei meccanismi biochimici responsabili della pigmentazione dell'uva e della sua regolazione. Durante l'accumulo di questi composti intervengono, oltre agli enzimi delle vie di biosintesi, diversi enzimi di membrana necessari per il loro trasporto dal citoplasma verso il vacuolo, sito di accumulo finale (Petruša et al. 2013). Recentemente, è stato proposto che i principali candidati del trasporto attivo di membrana in *Vitis* possano essere: trasportatori del tipo ATP-Binding Cassette sottofamiglia 1 (ABCC1) (Francisco et al. 2013) che, insieme alle Glutathione-S-Trasferasi (GST), accumulano malvidina monoglucoside; trasportatori Multidrug And Toxin compound Extrusion (MATE) che trasportano preferenzialmente antocianine acilate (Gomez et al. 2011). Nelle varietà Merlot e Tocai Friulano è stato inoltre riportato il coinvolgimento di una proteina simile alla bilitranslocasi di mammifero (BTL-simile) nel trasporto di antocianine e flavonoli (Braidot et al. 2008; Bertolini et al. 2009) (Fig. 1).

In questo contesto, con la presente ricerca si è voluto studiare se il processo di maturazione dell'uva Refošk e la sua modulazione, mediante interventi agronomici atti a migliorare la qualità del vino, potessero influenzare la concentrazione dei flavonoidi nella buccia e, analogamente, il livello di espressione delle proteine potenzialmente coinvolte nel loro accumulo.

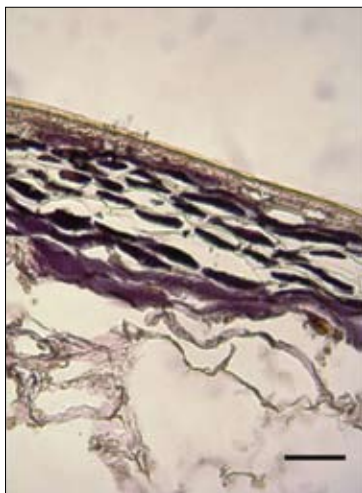


Figura 1 – Immunolocalizzazione del trasportatore BTL-like in sezioni fissate di buccia d'uva alla stadio di raccolta. La localizzazione della proteina è individuata dal colore violetto presente nelle cellule epidermiche e sub-epidermiche della buccia. Barra di riferimento = 50 μm .

2. MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

L'analisi dell'espressione proteica e dell'accumulo di antociani nelle bucce di *Vitis vinifera* cv. Refošk nel corso della maturazione è stata effettuata nelle annate 2012 e 2013. La sperimentazione è stata condotta in un vigneto allevato a Guyot in località Dutovlje presso l'azienda Lisjak. All'interno del vigneto sono state impostate tre tesi a confronto: controllo non defogliato (**UN**); defogliazione precoce 10 giorni prima della fioritura (4-5 foglie/germoglio) (**PFLR**); diradamento dei grappoli all'invaiaitura (1 grappolo/germoglio) (**CT**). È stato impostato uno schema sperimentale completamente randomizzato, con 3 repliche per ogni trattamento e per ogni data di prelievo. Durante le due annate 2012 e 2013, sono stati effettuati tre e cinque prelievi, rispettivamente: **pre-invaiaitura** (6 agosto 2013); **invaiaitura** (*véraison*) (circa il 50 % bacche invaiate, 14 agosto 2012 e 21 agosto 2013); **maturazione precoce** (7 settembre 2012 e 6 settembre 2013); **pre-maturazione piena** (20 settembre 2013); **piena maturazione** (28 settembre 2012 e 27 settembre 2013).

Un campione rappresentativo di 5-6 grappoli per un totale di 100 bacche 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 le successive analisi strumentali.

Le bucce ottenute dalla bacca d'uva congelata sono state polverizzate in azoto liquido in mortaio e utilizzate sia per l'estrazione delle antocianine libere (5 g di peso fresco per ogni campione), sia per l'estrazione delle proteine totali (3 g di peso fresco per ogni campione).

Estrazione e analisi cromatografica delle antocianine libere mediante HPLC

Le antocianine totali sono state estratte dalla polvere di buccia in metanolo a 4 °C, con rapporto bucce/solvente 1:10 (p:v). L'estrazione è stata condotta per 4 ore al buio e a temperatura ambiente. Gli estratti sono stati quindi centrifugati a 3000×g per 5 min a 4°C. I precipitati sono stati nuovamente sottoposti a estrazione per 1 ora e centrifugati. Entrambi i surnatanti sono stati riuniti e insufflati con azoto e conservati a -80 °C. Aliquote ottenute da tali estratti metanolici sono state portate a secco a bassa pressione e temperatura inferiore ai 40 °C. I campioni sono stati ricostituiti nella fase eluente dell'analisi cromatografica, filtrati con un filtro in PVDF da 0.22 µm e immediatamente analizzati. Per la caratterizzazione e quantificazione delle antocianine è stato utilizzato un cromatografo Agilent 1100 HPLC abbinato a un DAD, connesso a una ChemStation Agilent NDS (Vanzo & Vrhovšek, 2005). Le diverse classi di antocianine identificate sono state espresse come mg/kg equivalenti di malvidina.

Estrazione delle proteine totali e analisi immunochimica di proteine trasportatrici e del traffico vescicolare dei flavonoidi

Le proteine totali sono state estratte dalla polvere di buccia (3 g per campione) secondo i metodi modificati di Conlon & Salter (2007) e Song et al. (2006), mediante tampone alcalino caldo e successiva precipitazione in acetone acidificato. La concentrazione della proteina è stata misurata con il metodo di Bradford.

Per il test immunochimico, mediante saggio ELISA, sono stati saggiati 5 µg di proteina/pozzetto in micropiastra, incubati con differenti anticorpi primari: anti-BTL di mammifero prodotto contro il peptide EFT-YQLTSSPTC, corrispondente alla sequenza 235-246 della bilitranslocasi di mammifero (Passamonti et al. 2005); anti-GST classe tau (*TaGSTU1-1*) di *Triticum aestivum*; anti-MATE, prodotto da coniglio immunizzato contro il peptide AALSIRVSNELGYGHPRAAK, corrispondente alla sequenza della permeasi 1 di antocianine di vite, come descritto in Gomez et al. (2011) (Proteogenix); anti-ABCC1 di *A. thaliana* (Agrisera). La reazione immunochimica è stata valutata mediante saggio colorimetrico della fosfatasi alcalina.

Analisi statistica

I dati del test ELISA e dell'analisi cromatografica sono stati sottoposti ad analisi della varianza (software STATISTICA, versione 8).

3. RISULTATI

Profilo delle antocianine totali e dei trasportatori di flavonoidi nella buccia d'uva cv. Refošk durante la maturazione nell'annata 2012

L'analisi del profilo degli antociani all'HPLC ha confermato che, nella buccia d'uva Refošk, si accumulano diverse classi di antocianine. Le forme più rappresentate sono, rispettivamente, quelle glicosilate di malvidina, cianidina, delphinidina, peonidina e petunidina, e, in misura minore, quelle acilate e cumarilate (Tab. 1).

	28.09.12			20.09.13		
	UN	PFLR	CT	UN	PFLR	CT
DPgl	425±197	798±358	1029±217	2940±1994	3620±1258	3384±1755
CNgl	127±65	302±39	432±159	0±0	0±0	0±0
PTgl	504±143	861±246	1102±149	2731±1292	32121094	3120±1272
PNgl	434±113	942±222	1100±98	645±372	807±201	961±637
MVgl	2224±245	3180±227	3127±99	7169±923	7495±2163	7860±1712
DPgl-ac	88±37	142±50	137±22	477±388	578±232	521±273
CNgl-ac	24±10	46±1	56±16	56±54	69±18	76±53
PTgl-ac	118±40	183±37	17515	511±310	591±219	558±226
PNgl-ac	69±16	145±41	1334	74±33	84±26	104±57
MVgl-ac	550±45	789±3	543±40	1299±233	1367±405	1437±337
DPgl-coum	72±9	110±25	104±10	341±132	365±117	356±103
MV-caffeoat	24±4	25±1	18±1	31±14	27±5	35±10
CNgl-coum	29±2	41±3	52±12	29±18	73±20	82±46
PTgl-coum	93±14	132±22	108±11	322±47	325±84	331±60
PNgl-coum	89±13	183±44	154±12	106±19	103±27	120±35
MVgl-coum	600±218	737±82	434±57	1174±266	1020±143	1112±215

Tabella 1. Profilo di antociani liberi nella buccia di uve cv. Refošk in piena maturazione (28.09.2012) e in pre-maturazione piena (20.09.2013) da viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT). I valori sono espressi in mg/Kg equivalenti di malvidina.

Nell'annata 2012 il contenuto di antocianine aumentava significativamente nel passaggio tra la fase di invaiatura a quella successiva di maturazione precoce (Fig. 2), con un valore iniziale di circa 2 e 9 g/kg, rispettivamente, mentre subiva un lieve calo alla raccolta. I trattamenti CT e PFLR hanno evidenziato un effetto positivo sull'accumulo di antocianine, solo nella fase finale di raccolta.

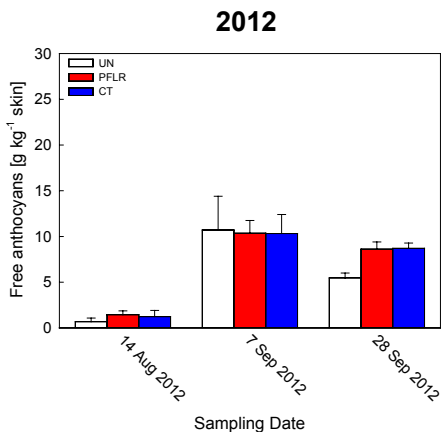


Figura 2 - Accumulo di antociani liberi nella buccia di uve cv. Refošk nell'annata 2012.

Viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT). Fase di invaiatura: 14 agosto 2012.

Il saggio immunochimico ELISA con anticorpi in grado di reagire specificatamente contro diversi trasportatori ha permesso di evidenziare il livello d'espressione di tali enzimi nella buccia durante la maturazione dell'annata 2012 (Fig. 3 e Tab. 2). In particolare, l'espressione dei trasportatori attivi di membrana quali BTL-simile, MATE e ABCC1 non era influenzata dalle fasi di maturazione, in quanto il livello di tali proteine era già elevato nella fase di invaiatura, rimanendo costante o addirittura calando (trattamento PFLR) nelle fasi successive.

Viceversa, la quantità espressa di GST, che si ipotizza legarsi alle antocianine sintetizzate per favorirne il trasporto mediante la ABCC1, aumentava durante le fasi della maturazione, con un andamento correlato all'accumulo degli antociani nella buccia. I trattamenti agronomici non hanno, tuttavia, modulato positivamente l'espressione di tale proteina, come invece si è verificato per le antocianine accumulate. Al contrario, il trattamento PFLR ha causato, rispetto alla tesi di riferimento, una riduzione generale nella concentrazione proteica in tutte le proteine considerate, ad eccezione del MATE alla vendemmia.

2012

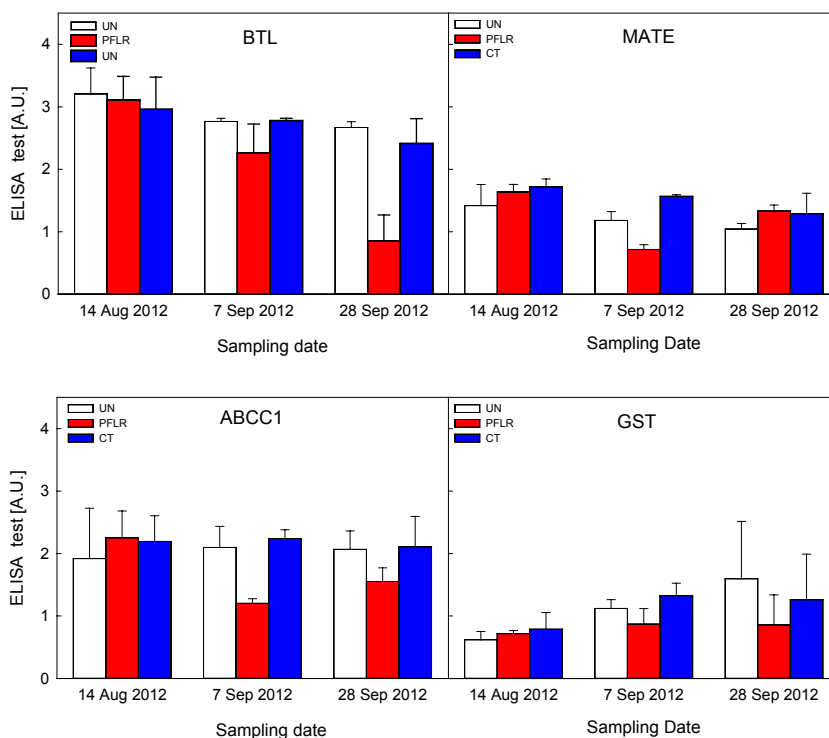


Figura 3 - Profilo dell'espressione di trasportatori nella buccia di uve cv. Refošk nell'annata 2012. Viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT). Fase di invaiatura: 14 agosto 2012.

Tabella 2. Medie e deviazioni standard complessive della vendemmia 2012 relative all'espressione di enzimi coinvolti nel trasporto di antociani nella buccia di uve cv. Refošk, in funzione della data e del trattamento agronomico. ANOVA a due vie relativa a data e trattamento.

Data	Elisa test (A.U.)	Trattamento	Elisa test (A.U.)	Data x Trattamento
14/08/12	1,90±0,22 ^a	UN	1,83±0,22 ^a	F 3,71
07/09/12	1,72±0,35 ^{ab}	PFLR	1,47±0,40 ^b	
28/09/12	1,59±0,41 ^b	CT	1,91±0,24 ^a	
F	4,45	F	9,96	
P	0,027*	P	0,001**	P 0,023*

Profilo delle antocianine totali e dei trasportatori di flavonoidi nella buccia d'uva cv. Refošk durante la maturazione nell'annata 2013

Nell'annata 2013 i punti di campionamento sono stati 5 (2 in più rispetto al 2012), poichè si voleva seguire meglio la maturazione delle uve anche nella fase precedente l'invaiaatura.

Come atteso, in preinvaiaatura, quando le bacche non erano ancora colorate, la concentrazione delle antocianine non era rilevabile (Fig. 4); successivamente, l'aumento più significativo si è verificato tra l'invaiaatura e le prime fasi di maturazione, in maniera simile all'annata 2012. In generale, le condizioni climatiche dell'annata 2013 erano risultate più favorevoli per l'accumulo di antociani, in quanto i valori totali erano raddoppiati rispetto a quelli misurati nell'annata precedente (ca. 20 g/kg). Nella fase finale, tuttavia, la quantità misurata di pigmenti si è ridotta drasticamente, molto probabilmente a causa dell'infezione di botrite che com'è noto contribuisce al decremento della matrice polifenolica.

A differenza del 2012, i trattamenti agronomici CT e PFLR non hanno stimolato l'accumulo delle antocianine. In tutte le date di campionamento non si è verificata, infatti, una variazione significativa rispetto ai campioni provenienti da vigne non trattate (UN). Nell'annata 2013 le temperature basse durante la fase di fioritura hanno influenzato negativamente l'allegagione, in modo particolare per la tesi UN. Questo ha comportato un sostanziale livellamento della produzione tra le tesi a confronto e tale effetto potrebbe giustificare la mancanza di differenza a livello di profilo degli antociani.

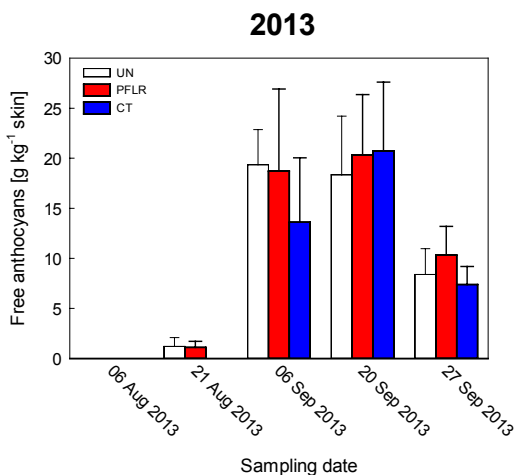


Figura 4 - Accumulo di antociani liberi nella buccia di uve cv. Refošk nell'annata 2013.

Viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT). Fase di invaiaatura: 21 agosto 2013.

Per quanto riguarda il grado di espressione delle proteine, è stato osservato un comportamento differente nell'annata 2013 (Fig. 5 e Tab. 3). La concentrazione di ABCC1 è risultata, infatti, dipendere dalla maturazione, mostrando un incremento durante le diverse date di campionamento,

in analogia all'andamento delle antocianine della buccia. A tal proposito nell'annata 2012, più calda, sarebbe stato utile avere un altro punto di campionamento prima dell'invaiaitura per confermare il trend osservato nel 2013, poiché molto probabilmente il livello di espressione dei trasportatori sarebbe stato più basso. L'espressione di MATE aumentava tra la fase di pre-invaiaitura e la fase di invaiaitura. Nelle fasi successive la concentrazione non variava, similmente al 2012.

La quantità espressa di GST era correlata alla maturazione anche nell'annata 2013, oltre ad essere modulata positivamente dal trattamento agronomico CT. Allo stesso modo il livello di espressione della proteina BTL-simile, associata ad un trasporto attivo secondario dei flavonoidi, è stato influenzato positivamente dalla maturazione, anche se risultava depressa dai trattamenti di gestione della chioma.

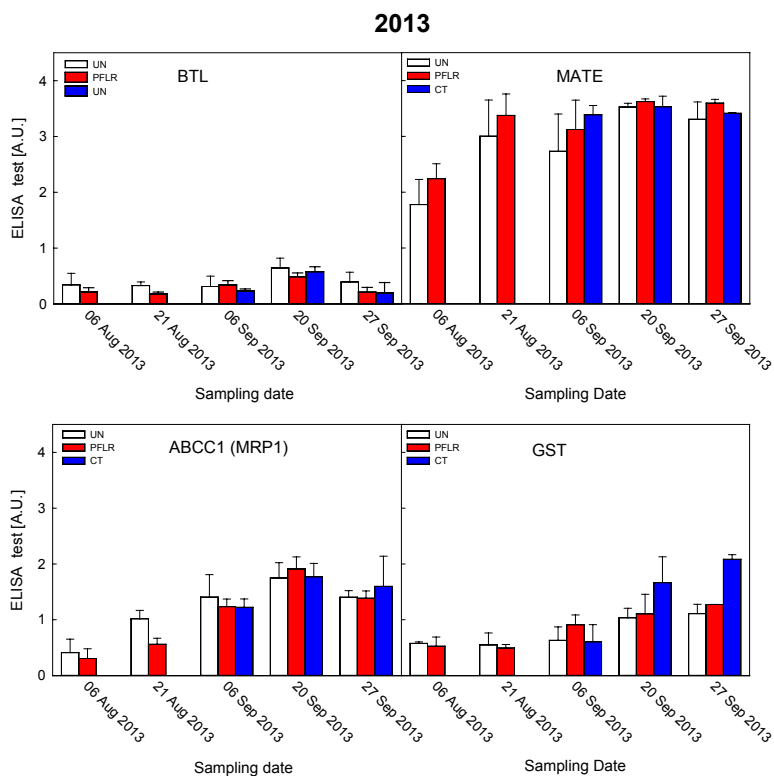


Figura 5 - Profilo dell'espressione di trasportatori nella buccia di uve cv. Refošk nell'annata 2013. Viti non defogliate (UN), defogliate in pre-fioritura (PFLR) o sottoposte a diradamento dei grappoli (CT). Fase di invaiaitura: 21 agosto 2013.

Tabella 3. Medie e deviazioni standard complessive della vendemmia 2013 relative all'espressione di enzimi coinvolti nel trasporto di antociani nella buccia di uve cv. Refošk, in funzione della data e del trattamento agronomico. ANOVA a due vie relativa a data e trattamento.

Data	Elisa test (A.U.)	Trattamento	Elisa test (A.U.)	Data x Trattamento
06/08/13	0,80±0,12 ^e	UN	1,31±0,37 ^b	
21/08/13	1,19±0,17 ^d			
06/09/13	1,34±0,14 ^c	PFLR	1,35±0,37 ^b	
20/09/13	1,80±0,13 ^a	CT	1,69±0,26 ^a	
27/09/13	1,66±0,14 ^b			
F	61,00	F	3,06	F 0,69
P	<0,001***	P	0,064	P 0,655

4. CONCLUSIONI

I risultati delle sperimentazioni condotte nelle due annate su uve di Refošk, anche se risultano di difficile interpretazione a causa del diverso andamento climatico stagionale, evidenziano che trasportatori e proteine coinvolte nel trasporto delle antocianine, a livello cellulare, sono espresse nelle fasi precoci di maturazione (principalmente tra la fase di pre-invaiatura e quella di invaiatura). Successivamente, negli stadi finali della maturazione, quando si verifica un massiccio incremento dei pigmenti nella buccia, sembra non essere necessaria una ulteriore sintesi proteica *ex-novo*.

Viceversa, si potrebbe ipotizzare che nelle fasi finali di maturazione l'accumulo sia imputabile a processi che non necessitano energia, sfruttando invece meccanismi passivi basati sul gradiente di concentrazione dei metaboliti. L'analisi immunologica ELISA, peraltro, può solo evidenziare il pattern proteico della buccia in maturazione e non l'attività effettiva degli enzimi studiati, che potrebbe anche essere ulteriormente regolata durante le fasi finali della maturazione. Infine, l'aumento del rapporto area fogliare rispetto alla produzione, causato dai trattamenti viticoli CT e PFLR, sembra modulare in maniera parziale la costituente proteica della buccia.

5. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano l'azienda "Lisjak" per la collaborazione sperimentale, la Prof. V. Čurin e il dott. U. Rajčević (SI) per l'anticorpo anti-BTL, la Dott.ssa M. Brazier (UK) per l'anticorpo anti-GST, il Dott. A. Filippi per il test ELISA. Si ringrazia il progetto europeo 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).

6. 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
- Boss P.K., Davies C. 2009. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries grapevine. In: *Molecular Physiology & Biotechnology*, Roubelakis-Angelakis, Kalliopi A. (Ed.), 263-292.
- 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
- Francisco R.M., Regalado A., Ageorges A.s., Burla B.J., Bassin B., Eisenach C., Zarrouk O., Vialet S., Marlin T.r.s., Chaves M.M., Martinoia E., Nagy R. 2013. ABCG1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *The Plant Cell*, 25: 1840-1854.
- Gomez C., Conejero, G., Torregrosa L., Cheynier V., Terrier N., Ageorges A. 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant Journal*, 67: 960-970.
- 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
- Petrusa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 14950-14973.
- 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
- Vanzo A., Vrhovšek U. 2005. Antocijanini - 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

POTENZIALE POLIFENOLICO DELL'UVA REFOŠK E DEL VINO TERRANO DEL CARSO

Klemen LISJAK¹, Paolo SIVILOTTI², Dejan BAVČAR³,
Andreja VANZO⁴

1, 3, 4 Istituto Agrario della Slovenia
2 Università di Nova Gorica

¹Dott., ²Prof.associato·³ Dott.·⁴Prof.associato

RIASSUNTO

Il Terrano è un vino protetto dalla dicitura di denominazione tradizionale riconosciuta, che viene prodotto dall'uva della varietà Refošk/Terrano nella regione vitivinicola del Carso. Il vino è riconoscibile dal suo intenso colore rosso-violaceo (derivante dall'alto contenuto di coloranti rossi – gli antociani) e da una composizione tannica mediamente ricca. In relazione all'alta concentrazione di antociani che presenta, a questo vino viene attribuito un effetto benefico sulla salute umana. Nell'ambito dello studio del potenziale fenolico dell'uva, sono state analizzate la concentrazione di polifenoli estraibili nell'uva Refošk e la concentrazione di polifenoli nei vini Terrano delle annate 2011, 2012 e 2013. I risultati della ricerca triennale hanno mostrato come l'uva della varietà Refošk contenga molti antociani estraibili (in media dai 1528 mg/kg ai 1929 mg/kg). La concentrazione media di proantocianidine estraibili a basso p.m. (tannini) nell'uva si attestava dai 492 ai 958 mg/kg mentre quella dei tannini estraibili ad alto p.m. si aggirava tra i 1920 mg/kg ai 2306 mg/kg. Un maggiore contributo in peso dei vinaccioli nell'uva dell'annata 2013 ha influito positivamente sulla concentrazione dei tannini nei vinaccioli. I campioni di uva delle stesse annate con un livello maggiore di peso secco contenevano anche più antociani estraibili, polifenoli totali e, soprattutto nelle bucce, anche più tannini ad alto p.m., che influiscono positivamente sulla struttura del vino e negativamente sulla percezione del gusto amaro. Nei vini Terrano dell'annata 2011 sono state determinate le concentrazioni medie più alte dei singoli gruppi fenolici. Nei vini di un anno delle annate 2011-2013 sono state rilevate delle concentrazioni medie di antociani totali che si aggiravano in un range dai 669 ai 936 mg/L e delle concentrazioni di antociani liberi dai 209 ai 325 mg/L. Questi dati classificano il Terrano fra i vini con una concentrazione di antociani al di sopra della media. La concentrazione media di resveratrolo nei vini delle annate 2011-2013 è stata di 6,1-9,5 mg/L. La concentrazione dei

tannini nei vini era significativamente diversa da un'annata all'altra e da produttore a produttore. Le caratteristiche del vino Terrano si riflettono anche nei suoi parametri chimici di base. Questi hanno confermato in tutte le annate le caratteristiche tipiche del Terrano: un contenuto medio di alcol (in media 12 vol.%), un livello maggiore di estratto, un tasso di acidità totale maggiore e la presenza "obbligatoria" di acido lattico.

Parole chiave: uva Refosco, vino Terrano, antociani, polifenoli, proantocianidini (tannini) dell'uva a basso p.m. e ad alto p.m., resveratrolo

Polyphenol potential of Refošk grapes and teran wines from Karst

ABSTRACT

The Teran wine is a protected wine that has a recognized traditional designation and is produced from the Refošk grape in the wine-producing region of Karst. This wine is known for its distinctive purple-red colour (due to high levels of red pigment – anthocyanins) and for the medium-rich tannin composition. Due to its high content of anthocyanins, the Teran wine is attributed to have positive effects on human health. In the framework of the research of the grape phenolic potential, the content of extractable polyphenols in the Refošk grape and the content of polyphenols in Teran wines of vintages 2011, 2012 and 2013 were analyzed.

The results of a three-year study have shown that the Refošk grape variety contains high levels of extractable anthocyanins (on average from 1528 mg/kg to 1929 mg/kg). The average content of low molecular weight proanthocyanidins (tannins) ranged 492–958 mg/kg, while the extractable high molecular weight tannins content ranged 1920–2306 mg/kg. A higher percentage by mass of seeds in the grapes of the 2013 vintage had a positive effect on the contents of tannins in the grape seeds. Grape samples of the same vintage containing more total soluble solids also contained more extractable anthocyanins, total polyphenols and, especially inside the skins, a higher amount of high molecular weight tannins, which have a positive effect on the structure of the wine as well as on the perception of bitterness. In the Teran wines of the 2011 vintage, the average content of total anthocyanins was determined to be 669–936 mg/L, while the content of free anthocyanins was determined to be 209–325 mg/L. These data place the Teran wine among wines with an above-average content of anthocyanins. The average content of resveratrol in wines of vintages 2011–2013 ranged 6.1–9.5 mg/L. The levels of tannins in wines were considerably different in regard to different vintages as

well as different wine producers. The particularities of the Teran wine are also expressed in basic chemical parameters. They were used to confirm the typical properties of Teran wines for all the vintages: medium alcohol content (averaging 12 % vol.), a higher extract, increased total acids, and the mandatory presence of lactic acid.

Key words: Refošk grape, Teran wine, anthocyanins, polyphenols, low and high molecular grape proanthocyanidins (tannins), resveratrol

1. INTRODUZIONE

I composti polifenolici dell'uva sono fondamentali per la formazione delle tipiche caratteristiche sensoriali del vino. All'interno dei flavonoidi, i composti polifenolici più presenti nei vini rossi, troviamo gli antociani e le proantocianidine (tannini dell'uva). Gli antociani conferiscono al vino il colore rosso (Ribéreau-Gayon, 1982), dalle proantocianidine dipendono invece la stabilità del colore (Somers, 1971) il gusto amaro e l'astringenza del vino (Robichaud e Noble, 1990).

Il contenuto di antociani e proantocianidine e la loro distribuzione tra bucce e vinaccioli dipendono soprattutto dalla varietà, ma anche dalle caratteristiche climatiche e pedologiche del vigneto (Mattivi et al., 2009). Le proantocianidine vengono estratte dalle bucce e dai vinaccioli durante la macerazione, durante la quale si ha anche la fermentazione alcolica. L'alcol che si sviluppa (etanolo) è un ottimo solvente per la estrazione delle proantocianidine dai vinaccioli. La struttura delle molecole delle proantocianidine influisce sulla loro astringenza e sul gusto amaro (Gawel, 1988). In generale i monomeri sono più amari che astringenti, mentre le molecole più grandi di proantocianidine sono più astringenti. Oltre alla varietà e alle condizioni geo-climatiche durante il periodo di maturazione dell'uva, il contenuto e la composizione delle proantocianidine nel vino vengono influenzate anche dalle tecniche agronomiche, dal grado di maturazione delle uve e dalle tecniche di vinificazione (durata e tecnica della macerazione, comma to eliminate temperatura, tasso di alcol, ceppo dei lieviti ecc.). I flavonoidi sono delle molecole antiossidanti importanti anche per la salute dell'uomo, (Rodrigo et al., 2011).

Poiché il Carso presenta delle caratteristiche geografiche, geologiche e climatiche peculiari/uniche, lo scopo della presente ricerca è stato quello di studiare la composizione polifenolica dell'uva della varietà Refošk/Terrano in condizioni climatiche diverse (annate 2011, 2012, 2013), e in siti diversi del Carso transfrontaliero.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Campionatura dell'uva e del vino

Campioni rappresentativi di uva della varietà Refošk/Terrano sono stati raccolti nel periodo della vendemmia delle annate 2011 (n=18), 2012 (n=31) e 2013 (n=26) nelle vigne del Carso sloveno e italiano. L'uva è stata campionata nei giorni: 20.9.2011, 21.9.2012 e 25.9.2013. I campioni di vino Terrano sono stati prelevati dalle botti in acciaio inox o dalle botti in legno dei produttori del Carso. Nel corso dei tre anni sono stati analizzati 82 vini di produttori diversi (38 dell'annata 2011, 22 dell'annata 2012 e 17 dell'annata 2013). La campionatura e l'analisi dei vini sono state eseguite 10 mesi dopo la fermentazione alcolica e dopo la fermentazione malolattica.

2.2 Estrazione dei polifenoli dall'uva

Subito dopo il campionamento, l'uva è stata raffreddata a 4°C e sono stati preparati gli estratti separati da bucce e vinaccioli. Si è usato un metodo di estrazione che simula il processo di vinificazione in condizioni da laboratorio (Mattivi e coll., 2002). Le bucce e i vinaccioli di 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) contenente 100 mg/L SO₂, 5 g/L di acido tartarico e con un pH di 3.2. Durante l'estrazione i campioni sono stati rimescolati 1 volta al giorno. Gli estratti sono stati insufflati con azoto e conservati a 4°C fino alle analisi spettrofotometriche, effettuate 10 mesi dopo l'estrazione.

2.3 Analisi spettrofotometrica degli estratti dell'uva e del vino

Le analisi 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, USA) secondo il metodo di Di Stefano e coll. (1989), in condizioni ottimizzate (Rigo e coll., 2000).

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

Le proantocianidine ad alto p.m. sono state espresse in mg/kg cianidina di peso fresco dell'uva negli estratti o in mg/L cianidina nei vini. Le proantocianidine a basso p.m. reattive con la vanillina sono state espresse in mg/kg (+)-catechina di peso fresco dell'uva negli estratti o in mg/L (+)-catechina nei vini.

2.4 Analisi di antociani monomerici e stilbeni (resveratroli) nei vini HPLC-DAD

Gli antociani nei vini sono stati analizzati utilizzando la cromatografia liquida ad alta pressione con detector multiplo (HPLC-DAD) (Agilent Technologies 1100) (Vanzo e Vrhovšek, 2005). Abbiamo valutato i singoli antociani nel vino in mg/L espressi in malvidina 3-glucoside.

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

2.6 Parametri fisico-chimici di base nell'uva e nel vino

I parametri fisico-chimici di base dell'uva sono stati stabiliti con metodi ufficiali OIV (Compendium of international methods of wine and must analyses, Volume 1) ed EU (Commission regulation EEC N. 2676/90).

I parametri chimici di base dei vini sono stati stabiliti con metodi ufficiali EU (Commission regulation EEC N. 2676/90, EC 335/2005), con l'eccezione dei parametri zuccheri riduttori e acidi volatili, che sono stati determinati con metodi interni. Sia le analisi dei parametri chimici di base che le analisi dei diversi gruppi di polifenoli nei vini sono state effettuate 10 mesi dopo la vendemmia.

3. RISULTATI

3.1 Parametri fisico-chimici di base nell'uva Terrano delle annate 2011, 2012 in 2013

La qualità dell'uva dipende in larga misura dalle condizioni climatiche dell'annata. I risultati dei parametri fisico-chimici di base hanno mostrato grandi differenze tra le annate 2011, 2012 e 2013 (Figura 1). La concentrazione media di solidi solubili totali (zucchero) era più alta (21.7 ° Brix) nel periodo della vendemmia dell'anno 2011; contemporaneamente la concentrazione di acidi totali e di acido malico è stata la più bassa. La concentrazione media più bassa di solidi solubili è stata rilevata nell'annata 2012 e il motivo va ricercato nella maggiore produzione per ceppo (carico medio superiore a 15 grappoli). È possibile che il più alto livello di solidi solubili nel 2012 sia stato influenzato dal periodo prolungato di stress idrico forte o molto forte per mancanza di piogge nel Carso durante la stagione estiva (Sivilotti et al., 2014). Questo fattore ha influito molto probabilmente anche sul peso delle bacche. Il peso medio di 100 bacche nel 2012 è stato di 193,8 g, nel 2013 addirittura di 217,7 g. La concentrazione media più alta di acidi totali (12,1 g/L) e di acido malico (7,1g/L) è stata determinata nell'annata 2013 (Figura 1).

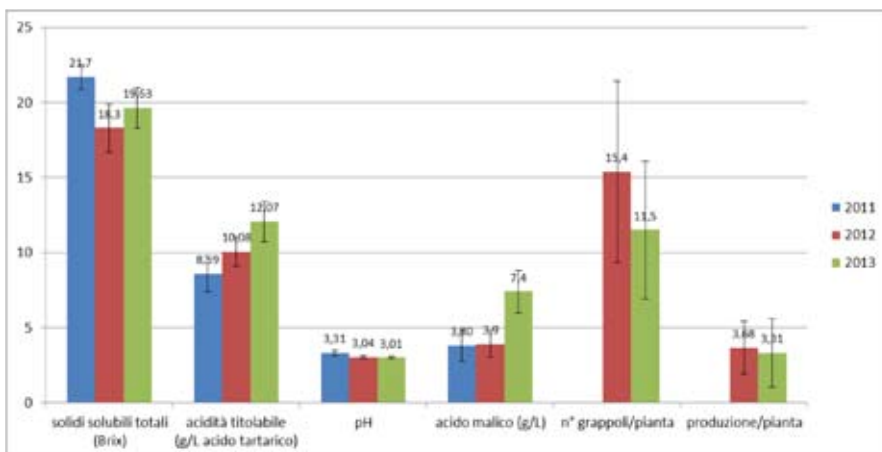


Figura 1: Parametri fisico-chimici di base dell'uva nelle annate 2011, 2012 in 2013 nel Carso durante il periodo della vendemmia. Gli istogrammi rappresentano i valori medi, mentre le barre la deviazione standard.

3.2 Potenziale polifenolico dell'uva Terrano annate 2011, 2012 in 2013

Il profilo polifenolico delle annate 2011, 2012 e 2013 è rappresentato nella figura 2. Il valore medio più alto di antociani e proantocianidine ad alto p.m. è stato rilevato nell'uva dell'annata 2012. Nell'uva dell'annata 2011 è stata rilevata la concentrazione media più bassa di proantocianidine a basso p.m. nonché la concentrazione più alta di polifenoli totali. I produttori e gli esperti hanno valutato che questa è stata un'ottima annata, come raramente se ne verificano nel Carso. I risultati di quest'annata presentano un rapporto favorevole tra le proantocianidine a basso e ad alto p.m. ($R=0,22$). Nell'annata 2012 lo stesso rapporto nell'uva era di 0,34; nell'annata 2013 di 0,49. Il rapporto tra le proantocianidine a basso p.m. e ad alto p.m. rispecchia la struttura dei tannini 'corti' (meno polimerizzati) e dei tannini 'lunghi' (più polimerizzati). Il rapporto più basso indica che i tannini sono più maturi.

La concentrazione media di antociani estraibili si aggirava tra i 1528 mg/kg e i 1929 mg/kg di peso fresco. I dati delle annate 1999 e 2000 mostrano una concentrazione media di antociani totali dell'uva di Refošk/Terrano della regione vinicola della Primorska che va dai 1100 ai 1300 mg/kg, determinati con lo stesso metodo di estrazione e di analisi (Vrhovšek et al., 2002). In Montenegro, durante il periodo della vendemmia delle annate 2011 e 2012, sono stati determinati con lo stesso metodo i seguenti valori medi della concentrazione di antociani totali estraibili: 1035 e 862 mg/L nell'uva Cabernet Sauvignon, 960 e 1113 mg/L nell'uva Vranac e 456 e 517 mg/L nell'uva Kratošija (Pajović et al., 2014). I risultati confermano che il Refošk/Terrano è una varietà di uva con una concentrazione di antociani al di sopra della media, valori che gli conferiscono un eccellente potenziale di colore e nutritivo.

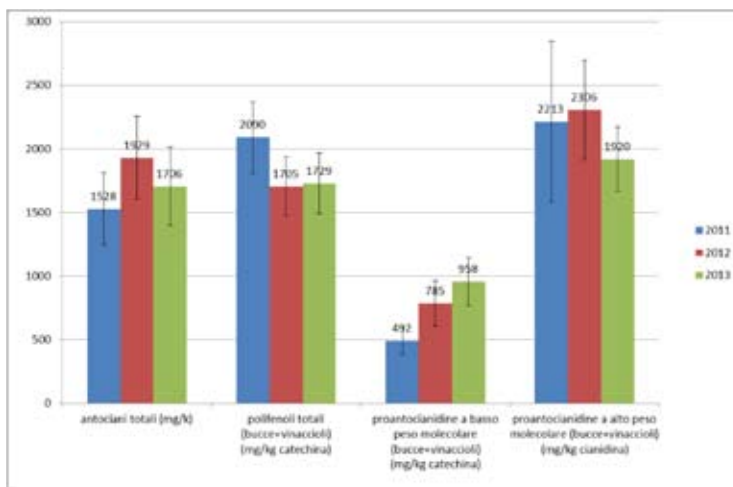


Figura 2: Profilo polifenolico dell'uva nelle annate 2011 (n=18), 2012 (n=31) e 2013 (n=26) nel Carso durante il periodo della vendemmia. . Gli istogrammi rappresentano i valori medi, mentre le barre la deviazione standard.

Anche la concentrazione degli antociani presenti nelle bucce (mg/kg di bucce) variava a seconda delle annate. In media sono stati rilevati 7853 mg di antociani per ogni kg di bucce nel 2011, 13212 mg/kg di bucce nel 2012 e 7853 mg/kg di bucce nell'annata 2013. La concentrazione più alta di proantocianidine a basso p.m. è stata rilevata nell'annata 2013 e potrebbe essere una conseguenza della maggiore percentuale in peso di vinaccioli e bucce nell'uva ovvero nelle bacche (Tabella 1).

Tabella 1: percentuale in peso di vinaccioli e di bucce nell'uva nel periodo della vendemmia

Annata	% vinaccioli*	% bucce*
2011	4,04±0,51**	15,56±2,23
2012	4,46±1,40	15,16±2,52
2013	4,61±0,98	22,48±4,03

* percentuale in peso (su 100 g di acini)

** Deviazione standard

La frazione di vinaccioli dell'uva nella singola annata influisce significativamente sul contenuto di tannini estraibili nell'uva e nel vino. La percentuale maggiore di vinaccioli nell'uva del 2013 ha portato a una concentrazione maggiore di proantocianidine a basso e ad alto p.m. nei vinaccioli dell'uva (Figura 3). Nelle annate 2012 e 2011 non è stata confermata questa correlazione. Non è stata confermata nemmeno la correlazione tra la percentuale in peso di bucce e le proantocianidine estraibili a basso e ad alto p.m. nelle bucce dell'uva.

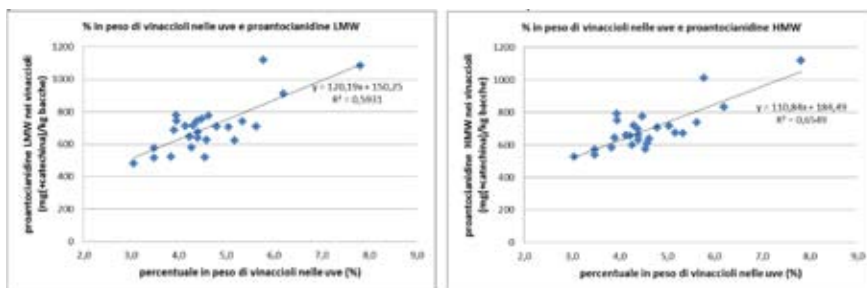


Figura 3: Relazione tra percentuale in peso di vinaccioli e nella bacca e concentrazione di proantocianidine estraibili a basso p.m. (LMWP, sinistra) e ad alto p.m. (HMWP, destra) dei vinaccioli dell'uva.

Nell'annata 2013 abbiamo rilevato la concentrazione più alta di tannini nei vinaccioli, nel 2012 invece la abbiamo riscontrata nelle bucce (Tabella 2). Sia la concentrazione che la qualità dei tannini nei vinaccioli sono parametri molto importanti per la produzione di un vino rosso di qualità. Le proantocianidine a basso p.m. sono responsabili del sapore amaro del vino (Robichaud and Noble, 1990). Nella varietà Refošk/Terrano i vinaccioli contengono in media il 70 % delle proantocianidine mentre le bucce ne contengono il 30 % (Figura 4). Il grado di maturazione dei vinaccioli determina la quantità di tannini estraibili e ha un ruolo chiave per la qualità dell'uva e del vino rosso.

Tabella 2: Concentrazione media di proantocianidine (tannini) nell'uva delle annate 2011, 2012 e 2013 nelle bucce e nei vinaccioli.

	bucce (mg/kg)		vinaccioli (mg/kg)	
	LMWP	HMWP	LMWP	HMWP
2011	138±46*	1503±579	354±108	710±165
2012	270±116	1711±335	515±115	595±118
2013	254±81	1225±228	704±153	695±134

LMWP – proantocianidine a basso p.m. (mg/kg (+)catechina)

HMWP – proantocianidine ad alto p.m. (mg/kg cianidina)

*Deviazione standard

La varietà Refošk, prodotta sul Carso, presenta più di due terzi di tutte le proantocianidine a basso p.m. nei vinaccioli e all'incirca due terzi di tutte le proantocianidine ad alto p.m. nelle bucce. La figura 4 mostra la percentuale di proantocianidine a basso p.m. nei vinaccioli e nelle bucce e la percentuale di proantocianidine ad alto p.m. nei vinaccioli e nelle bucce per le annate 2011, 2012 e 2013. La localizzazione delle proantocianidine è determinata perlopiù dalla varietà, ma è importante anche l'influsso dell'annata.

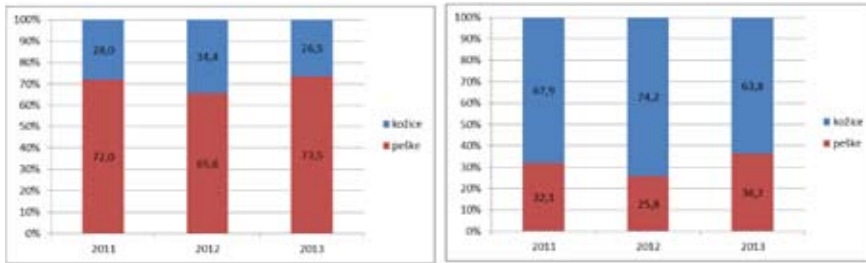


Figura 4: distribuzione delle proantocianidine a basso p.m. (sinistra) e ad alto p.m. (destra) tra i vinaccioli e le bucce nelle annate: 2011, 2012 e 2013.

Le uve con maggior contenuto di solidi solubili - espressi come materia secca (°Brix) – avevano anche negli anni 2012 e 2013 più antociani, polifenoli totali e proantocianidine ad alto p.m. La figura 5 confronta la concentrazione media di polifenoli nel quarto (25 %) dei campioni di uva con il maggior contenuto di zuccheri con i restanti campioni (75 %) che presentano un contenuto di zuccheri più basso. La concentrazione di proantocianidine ad alto p.m.(ovvero dei tannini responsabili della struttura e dell'astringenza del vino) negli anni 2012 e 2013 è stato più alta nell'uva con più zuccheri. Nell'uva dell'annata 2011 è stato rilevato un tasso significativamente più alto di zuccheri rispetto alle annate 2012 e 2013. È stato raggiunto un miglior grado di maturazione dei polifenoli e per questo motivo le differenze tra i campioni di uva di vigne diverse erano meno marcate.

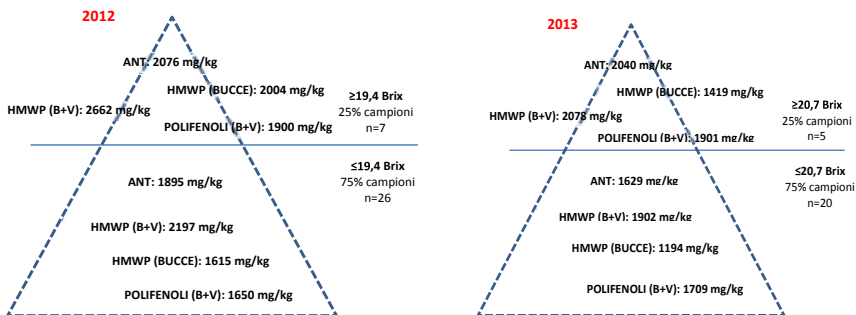


Figura 5: Confronto della concentrazione media di antociani, polifenoli totali e tannini ad alto p.m. nei campioni di uva annata 2012 (sinistra) e 2013 (destra). I campioni con un contenuto di zucchero più alto (sopra la riga) contengono più polifenoli rispetto ai campioni con un contenuto di zucchero più basso (sotto la riga).

ANT- antociani totali nell'uva

HMWP(B+V) – proantocianidine ad alto p.m. (mg/kg cianidina) nell'uva (bucce+vinaccioli)

HMWP(BUCCE) – proantocianidine ad alto p.m. (mg/kg cianidina) nelle bucce

Nelle annate meno buone, che presentano un livello di zuccheri nel vino più basso, le tecniche agronomiche (ad es. il diradamento dei grappoli) possono essere cruciali per il raggiungimento di contenuti maggiori di zuccheri e di una migliore struttura polifenolica dell'uva e del vino. L'uva con un grado di maturazione più alto aumenta così il contenuto di tannini nella buccia, che risultano più polimerizzati e quindi migliorano la qualità sensoriale del vino. Il posticipo della raccolta permette di migliorare la composizione tannica dell'uva, ma diventa molto alto il rischio di peggioramento delle condizioni climatiche durante la vendemmia. Questo dato viene confermato anche dalle date effettive della vendemmia: in tutte e tre le annate i viticoltori hanno raccolto gran parte dell'uva tra il 20 ed il 25 settembre.

3.2 Concentrazione di polifenoli nel vino Terrano

Sono stati rilevati gli antociani totali, i polifenoli totali e le proantocianidine a basso e ad alto p.m. in 38 campioni di vino Terrano dell'annata 2011, in 22 campioni dell'annata 2012 e in 17 campioni dell'annata 2013. I risultati sono presentati nella figura 6.

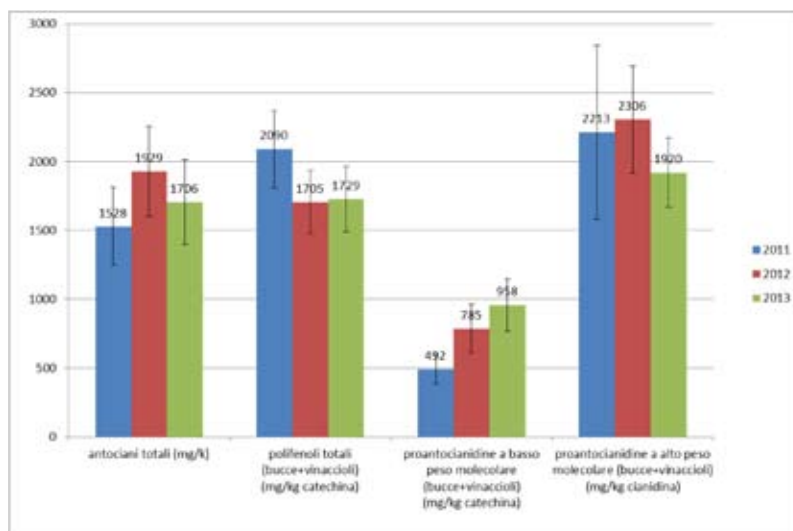


Figura 6: Profilo polifenolico del vino Terrano, annate 2011 (n=38), 2012 (n=22) e 2013 (n=17), campionati nel Carso e analizzati 10 mesi dopo la vendemmia. Gli istogrammi rappresentano i valori medi, mentre le barre la deviazione standard.

Nei vini Terrano dell'annata 2011 sono state determinate in media le concentrazioni più alte dei singoli gruppi di polifenoli. I vini erano ricchi di antociani totali e di proantocianidine a basso e ad alto p.m. Proprio queste ultime conferiscono al vino una struttura piena. L'annata 2011 è stata, per quanto riguarda la qualità sensoriale del vino, al di sopra

della media, come confermano anche le analisi dei polifenoli. Sebbene l'uva dell'annata 2012 contenesse la concentrazione più alta di antociani estraibili (figura 2), nel vino la concentrazione è stata la più bassa di tutte e tre le annate. La causa più probabile va ricercata nella minore estrazione di antociani durante la macerazione dell'uva nelle cantine. Il contenuto tannico varia molto nei singoli vini di produttori diversi (vedasi l'alta deviazione standard rispetto alla media). Questa è la conseguenza sia della spiccata variabilità qualitativa dell'uva che dell'utilizzo nelle cantine di tecniche di vinificazione molto diverse (tempo di macerazione, temperatura, ceppo dei lieviti). Per unificare e migliorare la struttura tannica dell'uva e del vino Terrano sarebbe necessaria una armonizzazione delle tecniche agronomiche e di vinificazione da parte dei produttori del Carso.

Già durante la macerazione i singoli antociani monomerici (liberi) dell'uva si legano con le proantocianidine formando 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 invecchiati di dieci mesi, la concentrazione media degli antociani liberi nell'annata 2011 era di 251 mg/L, nell'annata 2012 di 209 mg/L e nell'annata 2013 di 325 mg/L. Le analisi di 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 (dati non pubblicati), mentre le analisi dei vini Cabernet Sauvignon, Refosco, Terrano 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 studi hanno confermato negli ultimi anni una correlazione tra l'assunzione di alimenti e di bevande ricche di antociani e la prevenzione di malattie croniche quali il cancro, i disturbi cardiovascolari, le malattie neuro-degenerative e il diabete. È dimostrato che gli antociani liberi vengono assorbiti in qualche minuto dallo stomaco dei mammiferi entrando nella circolazione sanguigna (Passamonti e coll., 2003), per mezzo della quale vengono poi assorbiti dal cervello, dal fegato, dai reni e da altri organi, dove sono biologicamente attivi (Passamonti et al., 2005, Vanzo et al., 2008).

Il resveratrolo è una fitoalessina che protegge la buccia delle bacche dallo sviluppo della muffa grigia e dagli effetti negativi delle radiazioni UV. Oltre agli antociani è probabilmente la sostanza bioattiva più conosciuta del vino. La concentrazione media di tutte le quattro forme di resveratrolo nei vini Terrano dell'annata 2011 ammontava a 7,2 mg/L, quello dell'annata 2012 a 9,5 mg/L e quello dell'annata 2013 a 6,1 mg/L (nell'annata 2006 era di 5,0 mg/L, dati non pubblicati). I risultati risultano in accordo con altri studi, dove i valori medi di resveratrolo di tutte le quattro forme nei vini rossi si attestava in un range dai 5 ai 7 mg/L (Mattivi 1993, Vrhovšek 1995).

3.3 Parametri chimici di base nel vino Terrano

Le peculiarità del Terrano si esprimono anche nei suoi principali parametri chimici. In base all'attuale legislazione vitivinicola i requisiti per i singoli parametri disposti dal Disciplinare sloveno sul vino Teran PTP (UL RS 43/00) sono più severi e comprendono: grado alcolico reale (da 10,0 vol % a 13,0 vol %), acidità totale (da 6,0 a 11,0 g/l), estratto senza zuccheri (almeno 25 g/l), zuccheri riduttori (fino a 4,0 g/l), cenere (almeno 2,0 g/l), acidità volatile (fino a 0,9 g/l), solforosa totale (fino a 100 mg/l), solforosa libera (fino a 28 mg/l) e acido lattico (da 1 a 5 g/l). Questi parametri devono essere verificati anche per la pubblicazione della documentazione (decreti) riguardante il commercio di vino. Soltanto il vino che rientra nei parametri sopraindicati, e ha ricevuto una valutazione sensoriale adeguata, può essere commercializzato come Teran PTP. Il Terrano viene quindi classificato tra i vini con un contenuto medio di alcol effettivo e con un maggiore estratto totale. Tipico è soprattutto il contenuto più elevato di acidi totali (caratteristica varietale) e anche di acido lattico a causa della fermentazione malolattica obbligatoria. Sicuramente il Terrano è un vino che presenta un livello di solforosa libera e totale molto basso.

Tabella 4: Parametri chimici di base nel vino Terrano annate 2011, 2012 e 2013

	annata 2011	annata 2012	annata 2013
	n=39*	n=22	n=21
alcol effettivo (vol. %)	12.01**±0.60 A***	11.95±0.58 A	12.06±0.46 A
estratto totale (g/L)	30.0±2.4 B	27.3±1.7 A	27.1±2.6 A
acidità totale (g/L acido tart.)	7.5±0.7 A	8.0±0.8 B	7.5±0.8 AB
acidità volatile (g/L acido acet.)	0.62±0.17 B	0.45±0.11 A	0.73±0.13 C
SO ₂ libera (mg/L)	13±3 B	12±1 A	12±4 A
SO ₂ totale (mg/L)	43±6 B	40±9 B	35±7 A
pH (-)	3.37±13 B	3.26±0.12 A	3.33±0.14 AB
acido lattico (g/L)	2.1±0.4 B	1.5±0.4 A	2.5±0.6 C
zuccheri riduttori (g/L)	2.5±0.7 B	1.2±0.3 A	1.3±0.7 A

* numero campioni, **valore medio ± deviazione standard, ***differenze statistiche indicative rispetto al test LSD ($p \leq 0,05$)

Il rilevamento dei parametri chimici principali nei vini delle annate 2011, 2012 e 2013 ha mostrato dei contenuti simili di alcol effettivo. I vini dell'annata 2011 presentavano un contenuto in estratto totale e una densità relativa maggiori, un contenuto più alto di solforosa libera e un maggiore contenuto di zuccheri riduttori. I vini dell'annata 2013 mostravano un contenuto più elevato di acidi volatili e di acido lattico. Le differenze effettive sono esigue e molto probabilmente devono essere messe in relazione alle differenze climatiche delle diverse annate.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo degli studi sull'uva di Refošk/Terrano e sul vino Terrano è stato quello di valutare in modo preciso sia la varietà che le influenze geoclimatiche delle annate sul profilo polifenolico dell'uva e del vino. Nel corso dei tre anni (2011-2013) nei quali si è svolto lo studio, che comprendeva uve della varietà Refošk/Terrano proveniente da 75 vigneti diversi, e 77 diversi vini Terrano, sono stati valutati il profilo polifenolico dell'uva e del vino e i parametri fisico-chimici di base del vino Terrano. I dati raccolti contribuiranno al miglioramento della qualità del vino Terrano, che rappresenta il principale prodotto della tradizione agricola del Carso.

In conformità con gli studi precedenti sono stati confermati i livelli più alti di antociani nell'uva di Refošk/Terrano del Carso, che conferiscono il tipico colore rosso-violaceo intenso al vino Terrano e contemporaneamente influiscono positivamente sui valori nutrizionali di tale presidio alimentare. L'annata ha avuto un'importanza decisiva per il contenuto di composti polifenolici. Oltre al livello di presenza dei tannini nell'uva, sono molto importanti anche la loro localizzazione (vinaccioli o bucce) e la loro struttura. Le proantocianidine a basso peso molecolare sono più amare, quelle ad alto peso molecolare sono invece più astringenti e danno struttura al vino. Nell'annata 2013, nella quale è risultata maggiore la percentuale in peso di vinaccioli, è stata rilevata una concentrazione più elevata di tannini a basso p.m. nell'uva. Nelle annate 2012 e 2013 abbiamo rilevato nell'uva più matura (contenuto più alto di solidi solubili totali ovvero di zuccheri) e anche una concentrazione maggiore di tannini ad alto p.m. nelle bucce. I tannini ad alto peso molecolare risultano determinanti da un punto di vista sensoriale, in quanto conferiscono al vino struttura e una piacevole astringenza. Siccome nel caso di uva meno matura i tannini mostrano una minore qualità sensoriale, risulta molto importante un adeguato grado di maturazione tecnologica del vino nel periodo della vendemmia. Poiché la produzione di uva nel Carso è stata abbastanza alta (3,3-3,7 kg per vite), sarebbe particolarmente raccomandabile, per ottimizzare il livello di zuccheri e la qualità tannica dell'uva, l'utilizzo della tecnica di diradamento dei grappoli già nel periodo dell'invaiaatura. In questo modo si potrebbe aumentare la concentrazione di tannini polimerizzati nelle bucce e migliorare le qualità sensoriali del vino. Riguardo alle differenze significative nelle concentrazioni di antociani e tannini nei vini Terrano di produttori diversi, sarà necessario armonizzare e unificare ancora di più le tecniche agronomiche e le tecniche di vinificazione. Così facendo sarà possibile migliorare e unificare la qualità del vino Terrano.

La comparazione di parametri chimici di base nei vini ha confermato la conformità con il Disciplinare sloveno sul vino Teran PTP. Questo vino è caratterizzato da una concentrazione media di alcol effettivo (12 vol. %) e questa caratteristica risulta positiva sia per i consumatori che per i produttori in considerazione della tendenza contemporanea alla diminuzione dell'alcol nei vini.

5. RINGRAZIAMENTI

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

Gli autori ringraziano le collaboratrici del Laboratorio enologico presso l'Istituto agrario della Slovenia (KIS), (Mateja Fortuna, Iva Kmetič Ceglar, dr. Katja Šuklje, dr. Mojca Jenko, Nada Bizjak e Bernarda Žitko) per l'aiuto nell'effettuazione delle misurazioni, e tutti i viticoltori dei consorzi Združenje Konzorcij kraških pridelovalcev terana e Consorzio Tutela Vini Collio e Carso che hanno fornito i campioni d'analisi.

6. BIBLIOGRAFIA

- Commission Regulation (EEC), No. 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. 1990. Official Journal of the European Communities, 33, L 272: 1-129.
- Compendium of international methods of wine and must analyses, OIV-International organisation of vine and wine, Volume 1, Edition 2012. Paris
- Di Stefano, R., Cravero, M.C., Gentilini, N. 1989. Methods for the study of wine polyphenols. *L'Enotecnico*, 5: 83-89.
- European Union: Information from European Union institutions and bodies commission, List of quality wines produced in specified regions, 2009/C 187/01, Official Journal from 8.8.2009
- Fornasario S., Tramer F., Žiberna L., Passamonti S. 2012. Biološka uporabnost in aktivnost pigmentov grozdja pri živalih: implikacije za zdravje ljudi, Simpozij AGROTUR, Ljubljana, 28. November 2012, pp. 7-13
- Gawel R. 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Volume 4, Issue 2, 74-95.
- 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., Nicolini, G. 1997. Analysis of polyphenols and resveratrol in Italian wines. *BioFactors*, 6: 445-48.
- Mattivi, F., Prast, A., Nicolini, G. & Valenti, L., 2002. Validazione di un nuovo metodo per la misura del potenziale polifenolico delle uve rosse e discussione del suo campo di applicazione in enologia. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 2/3, 55-74.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D. & Trainotti, D., 2009. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 27-35.
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran, Uradni list št. 16, 15. 2. 2008.
- Pajovic R., Raicevic D., Popovic T., Sivilotti P., Lisjak K., Vanzo A. 2014. Polyphenolic Characterisation of Vranac, Kratosija and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L. cv.) Grapes and Wines from Different Vineyard Locations in Montenegro. *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 35, No. 1.
- Passamonti, S., Vrhovšek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. 2003. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS letters*, vol. 544, str. 210-213.

- Passamonti, S., Vrhovšek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. 2005. Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, str. 7029-7034. [
- Ribéreau-Gayon, P., 1982. The anthocyanins of grapes and wine. In: *Anthocyanins as food colors*. Markakis P., (ed.). Academic Press, New York. pp. 112-118.
- 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.
- Robichaud, J.L. & Noble, A.C., 1990. Astringency and bitterness of the selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 343-353.
- Sivilotti P., Butinar L., Jež A., Šuklje K., Vanzo A. and Lisjak K. 2014. Vpliv vodnega stresa na kakovost grozdja v kraških vinogradih. V: *Kraško okolje*. K. Lisjak & L. Butinar (Urednik). 53-63. Vipava, Slovenija.
- Sternad Lemut, M., Trošt, K., Lisjak, K. 2010. Polifenolni profil slovenskih modrih pinotov in primerjava s povezanimi senzoričnimi lastnostmi = Polyphenol content and related sensory characteristics of Slovenian Pinot Noir wines. V: ČUŠ, Franc (ur.). *Vinarski dan 2010, Ljubljana, 17. november 2010.*, Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije, 2010, str. 29-38,
- Somers, T.C., 1971. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*. 10, 2175-2186.
- 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., Vanzo, A., Koruza, B., Korošec-Koruza, Z.-. 2002. Polifenolni potencial slovenskega rdečega grozdja = Polyphenolic potential of Slovenian red grapes. V: PUCONJA, Mateja (ur.). *Vinogradi in vina za tretje tisočletje? : [vinogradništvo, vinarstvo, ekonomika in trženje : zbornik referatov]*. Ljubljana: Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Ljutomer: Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Celje: Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije, pp. 359-367.
- 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.



PROFILO AROMATICO DEL VINO TERRANO

Helena BAŠA ČESNIK¹, Dejan BAVČAR², Klemen LISJAK³

1, 2, 3 Istituto Agrario della Slovenia

¹Dott., ²Dott., ³Dott.

ABSTRACT

Nella ricerca si è individuato il profilo aromatico del vino Terrano delle annate 2011, 2012 e 2013 prodotto nella regione vinicola della Primorska denominata Carso. La ricerca si è concentrata soprattutto sui composti volatili che si formano durante la fermentazione alcolica ed in particolare sugli esteri. Si è constatato che il tipico aroma fruttato del vino Terrano deriva da un significativo contenuto di ottanoato di etile che conferisce al vino un odore dolce, di ciliegie e di frutta. Il secondo estere più importante è risultato l'esanoato di etile, dall'odore di mele e fragole. Il terzo è stato l'acetato di isoamile, dall'odore dolce, fruttato, di banane. Seguivano ancora il butirrato di etile, dall'odore fruttato e il γ -butirrolattone con un odore dolce, caramellato e tostato. Diverse tecniche viticole (diradamento dei grappoli, defogliatura prima della fioritura) utilizzate in vigna hanno avuto un influsso minimo sul contenuto dei composti volatili analizzati.

Parole chiave: vino, aromi nel vino, esteri, Terrano

Aromatic profile of Terrano

ABSTRACT

The aim of the present work was to present volatile profile of Terrano wine produced in Primorska winegrowing region (Karst) in years 2011, 2012 and 2013. We have focused our research mainly on different groups of volatile compounds formed during alcoholic fermentation, with particular interest to esters. We have determined, that the typical fruity aroma of Terrano is correlated to abundant presence of ethyl octanoate, which gives red cherry, sweet and fruity aroma. As the second most important ester ethyl hexanoate was determined, with its apple and strawberry fruity scent. The third was isoamyl acetate, with banana, fruity and sweet scent. They

were followed by ethyl butyrate, with fruity odour and γ -butyrolactone described as sweet, toast and caramel. Different viticulture techniques (grape thinning, leave removal before flowering) in the vineyard shown only minimal impact on the selective volatile compounds content.

Keywords: wine, aromas in wine, esters, Terrano

1. INTRODUZIONE

Il Terrano è un vino tipico della zona del Carso che fa parte della regione vinicola slovena Primorska. La produzione di questo peculiare vino rosso risale all'Antichità. Il vino Terrano viene prodotto dall'uva della varietà Refošk (*Vitis vinifera* L.), conosciuta per il suo intenso colore rosso-viola-ceo, conferitogli dal ricco contenuto di antociani e di un contenuto più basso di tannini (Vanzo et al., 2012). Grazie al suo ricco contenuto di polifenoli, il Terrano ha un influsso positivo sulla salute e presenta un alto valore alimentare (Fornasaro et al., 2012). Le sue caratteristiche peculiari si esprimono nell'odore fruttato che ricorda la freschezza dei frutti di bosco. Il vino Terrano si consuma perlopiù nel corso di un anno, perciò l'aroma varietale da un contributo importante al suo tipico gusto.

Il vino è una bevanda alcolica, composta di acqua (80-85 % v/v), alcoli (soprattutto etanolo da 9-15 % v/v) e diversi componenti minori (~3 %). Questi componenti minori sono costituiti da acidi organici, zuccheri, fenoli, composti azotati, enzimi, vitamine, lipidi, anioni e cationi anorganici e da molti composti volatili (Revi et al., 2014). I composti volatili ovvero i composti aromatici del vino ne determinano in larga misura anche l'odore e l'aroma con un influsso importante sulla qualità del vino e sulla propensione al consumo degli acquirenti. Tuttavia i composti aromatici presenti nel vino sono molto complessi, soprattutto perché sono composti di gruppi molto diversi. Ad oggi sono stati identificati più di 1000 composti appartenenti a diversi gruppi chimici che coprono un ampio spettro di polarità, solubilità e volatilità: alcoli superiori, aldeidi, esteri etilici di acidi grassi, acidi grassi, chetoni, monoterpeni, fenoli volatili,.... e altri. La concentrazione di questi composti nel vino può variare da qualche ng/l a centinaia di mg/l (Andujar-Ortiz et al., 2009; García-Carpintero et al., 2012b). Sulla presenza, assenza e sulle quantità di composti volatili nel vino influiscono significativamente i fattori produttivi (clima, suolo, varietà, pratiche di produzione dell'uva) e i fattori enologici (stato dell'uva, fermentazione, trattamento successivo alla fermentazione) (Welle et al., 2014).

Non tutti i composti volatili presenti nel vino contribuiscono al suo aroma. L'influsso di un composto volatile sull'odore finale e sull'aroma dipende dal suo contenuto nel vino e dalla sua soglia di percezione. La

soglia di percezione viene definita come la concentrazione più bassa che può essere percepita olfattivamente da almeno la metà dei degustatori che valutano il vino (Welke et al., 2014).

Per la valutazione del contributo sensoriale dei composti aromatici all'odore del vino si utilizza l' "odor activity value" (OAV). L'OAV rappresenta un approccio quantitativo alla valutazione dell'apporto dei composti volatili all'odore. L'OAV calcola il rapporto tra il contenuto del singolo composto e la sua soglia di percezione. Un composto volatile concorre all'odore quando il suo contenuto nel vino è al di sopra della soglia di percezione, quindi quando $OAV > 1$ (Pino e Queris, 2011; Welke et al., 2014). Un altro fattore quantitativo è il "relative odor contribution" (ROC) che rappresenta la quota del contributo di un determinato composto volatile ed è il calcolo del rapporto tra l'OAV del singolo composto e la somma degli OAV dei composti che hanno $OAV > 1$ (Welke et al., 2014).

La valutazione qualitativa del contributo sensoriale viene invece eseguita con dei descrittori dell'odore di ogni composto. Questi descrittori sono stati individuati mediante gascromatografia abbinata a olfattometria (GC-O) che usa come detector il naso umano. Dopo la separazione dei composti nella colonna cromatografica vengono valutati gli odori dei composti. Vengono descritti come odori floreali, fruttati, verdi, di solvente, di plastica, tostati e altri (Welke et al., 2014).

Lo scopo di questo lavoro è di presentare il profilo volatile del vino Terrano prodotto nella regione vinicola Primorska (Carso) dal 2011 al 2013. Le ricerche si sono concentrate soprattutto sui diversi gruppi di composti volatili che si formano durante la fermentazione alcolica, ma anche sull'individuazione dei composti C6 (1-esanolo, *cis*-3-esen-1-olo). L'interesse si è focalizzato in particolar modo sugli esteri, poiché da loro di solito dipende l'odore delle varietà tipicamente non aromatiche (Etievant 1993; Ferreira et al., 1995). Si è scelto questo approccio anche in considerazione del caratteristico odore fruttato del vino Terrano che è solitamente correlato a un elevato contenuto di esteri.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionatura

I campioni di vino Terrano sono stati raccolti dalle botti in acciaio inossidabile o dalle botti in legno dei produttori del Carso. Per ogni campione si è preso 0,75 l di vino. Nel corso dei tre anni sono stati presi 82 vini di diversi produttori (39 dell'annata 2011, 22 dell'annata 2012 e 21 dell'annata 2013), 9 mesi dopo la fermentazione, a fermentazione malolattica conclu-

sa e prima dell'imbottigliamento. Le analisi sono state condotte un mese dopo il campionamento.

2.2 Prove in vigna

Negli anni 2012 e 2013 è stato studiato, mediante delle prove in vigna, l'effetto di alcune pratiche viticole effettuate nei vigneti sul potenziale aromatico del vino Terrano. In due vigneti di prova situati nella zona di Dutovlje sono state messe a confronto le seguenti forme di allevamento e tecnologie viticole: pergola controllo (1), pergola con 50 % di diradamento dei grappoli durante la fase di invaiatura (2), guyot semplice controllo (3), guyot semplice con 50 % di diradamento dei grappoli durante la fase di invaiatura (4), guyot semplice con defogliazione effettuata in pre-fioritura (5).

L'uva dei diversi gruppi è stata vinificata separatamente e sono stati analizzati i composti volatili nei vini di prova dopo un periodo di maturazione di 9 mesi (annata 2013) e di 21 mesi (annata 2012) in contenitori inox. Una commissione di valutazione, composta da 11 degustatori, ha valutato i vini anche da un punto di vista sensoriale, ossia l'intensità dell'aroma varietale del vino Terrano e l'intensità dell'aroma fruttato. Dal calcolo della media sono state escluse la valutazione minima e quella massima.

2.3 Metodi di analisi

I parametri fisico-chimici di base del vino Terrano sono stati stabiliti con metodi standard CEE (Commission Regulation, 1990).

I composti volatili nel vino sono stati analizzati in due fasi. Nella prima si è effettuata l'estrazione con il diclorometano, nella seconda l'individuazione mediante gascromatografia e spettrometria di massa (Bavčar et al., 2011a; Bavčar et al., 2011b; Bavčar e Baša Česnik, 2011).

2.4 Analisi statistica

I dati sono stati raccolti e ordinati con l'utilizzo di Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010) e con l'analisi della varianza (one-way ANOVA) utilizzata per il confronto delle caratteristiche fisico-chimiche e del contenuto di composti aromatici. L'analisi è stata eseguita utilizzando il pacchetto software di statistica Statgraphics® Centurion XVI (StatPoint Technologies).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I parametri fisico-chimici di base del vino Terrano delle annate 2011, 2012 e 2013 sono rappresentati nella Tabella 1. I risultati indicano che non ci sono grandi differenze fra le diverse annate e che queste sono probabilmente dettate soltanto da condizioni climatiche diverse. Possiamo concludere che il vino Terrano contiene un livello moderato di alcol (12% vol), ha un contenuto maggiore di estratto totale e di acidità totale e che presenta dei contenuti sorprendentemente bassi di solforosa libera e totale.

Tabella 1: parametri fisico-chimici standard del Terrano annate 2011, 2012 e 2013

	annata 2011	annata 2012	annata 2013
	n=39	n=22	n=21
alcol (vol. %)	12.01±0.60 ^a A ^β	11.95±0.58 ^a A ^β	12.06±0.46 ^a A ^β
estratto (g/l)	30.0±2.4 ^a B ^β	27.3±1.7 ^a A ^β	27.1±2.6 ^a A ^β
acidità totale (g/l acido tartarico)	7.5±0.7 ^a A ^β	8.0±0.8 ^a B ^β	7.5±0.8 ^a AB ^β
acidità volatile (g/l acido acetico)	0.62±0.17 ^a B ^β	0.45±0.11 ^a A ^β	0.73±0.13 ^a C ^β
SO ₂ libera (mg/l)	13±3 ^a B ^β	12±1 ^a A ^β	12±4 ^a A ^β
SO ₂ totale (mg/l)	43±6 ^a B ^β	40±9 ^a B ^β	35±7 ^a A ^β
pH	3.37±13 ^a B ^β	3.26±0.12 ^a A ^β	3.33±0.14 ^a AB ^β
densità relativa	0.9958±0.0001 ^a B ^β	0.9948±0.0007 ^a A ^β	0.9946±0.0008 ^a A ^β
acido lattico (g/l)	2.1±0.4 ^a B ^β	1.5±0.4 ^a A ^β	2.5±0.6 ^a C ^β
zuccheri riduttori (g/l)	2.5±0.7 ^a B ^β	1.2±0.3 ^a A ^β	1.3±0.7 ^a A ^β

^a-per tutti i dati è presentato il valore medio ± deviazione standard

^β-le differenze statistiche indicative rispetto al test LSD (p≤0,05) sono contrassegnate con A, B, C i

I risultati della ricerca sul contenuto dei composti volatili selezionati sono rappresentati nella Tabella 2. Si è constatato che i vini Terrano contengono degli alti tassi di 1-esanolo (il valore medio delle tre annate è stato di 1292 μg/l) e dei livelli significativi di 2-fenil acetato di etile (il valore medio delle tre annate è stato di 49 μg/l), acetato di isoamile, benzaldeide, alcool benzilico, *cis*-3-esen-1-olo, butirrato di etile, decanoato di etile, dodecanoato di etile, esadecanoato di etile, esanoato di etile e ottanoato di etile.

Tabella 2: Contenuto di composti volatili ($\mu\text{g/l}$) nei vini Terrano delle annate 2011, 2012 e 2013 e rispettive soglie di percezione (la Li et al., 2008; (b) Duarte et al., 2010; (c) García-Carpintero et al., 2012a; (d) Rocha et al., 2004, 2005; (e) Sanchez-Palomo et al., 2012; (f) García-Carpintero et al., 2014; (g) Welke et al., 2014)

	annata 2011, n=39			annata 2012, n=22			annata 2013, n=21			soglia di percezione
	min - max	media		min - max	media		min - max	media		
Aldeidi										
n-saldeide (capraldeide)	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		
benzaldeide	n.d. - 91	8 \pm 18 ^a A ^β		<LOQ - 10	4 \pm 3 ^a A ^β		<LOQ - 75	16 \pm 20 ^a B ^β		350 (c, e, f)
alcol benzilico	42 - 799	164 \pm 152 ^a A ^β		67 - 474	163 \pm 90 ^a A ^β		42 - 842	285 \pm 210 ^a B ^β		200000 (c)
Composti C6										
1-esanolo	310 - 2538	1205 \pm 454 ^a A ^β		632 - 2218	1227 \pm 462 ^a AB ^β		598 - 3008	1522 \pm 672 ^a B ^β		8000 (a, b, c, e, f)
cis-3-esen-1-olo	15 - 125	50 \pm 24 ^a A ^β		18 - 190	55 \pm 35 ^a A ^β		23 - 278	103 \pm 67 ^a B ^β		400 (c, e, f)
Esteri										
2-fenil acetato di etile	13 - 108	51 \pm 24 ^a B ^β		15 - 72	35 \pm 16 ^a A ^β		41-90	62 \pm 14 ^a C ^β		250 (b, c, e, f)
butanoato di etile (butirrato di etile)	30 - 301	116 \pm 52 ^a B ^β		57 - 104	80 \pm 14 ^a A ^β		37 - 245	108 \pm 44 ^a B ^β		20 (a, b, c, e, f)
decanoato di etile (caprato di etile)	29 - 237	84 \pm 45 ^a B ^β		23 - 84	56 \pm 16 ^a A ^β		73 - 291	184 \pm 57 ^a C ^β		200 (a, b, c, e, f)
dodecanoato di etile (laurato di etile)	n.d. - 46	29 \pm 25 ^a A ^β		n.d. - 13	8 \pm 4 ^a A ^β		n.d. - 56	40 \pm 14 ^a A ^β		3500 (f)
esadecanoato di etile (palmitato di etile)	<LOQ - 717	84 \pm 141 ^a A ^β		1 - 152	26 \pm 42 ^a A ^β		2 - 751	92 \pm 163 ^a A ^β		1500 (a, f)
esanoato di etile (caproato di etile)	81 - 304	186 \pm 49 ^a B ^β		84 - 211	157 \pm 36 ^a A ^β		132 - 300	191 \pm 43 ^a B ^β		14 (a, b, c, e, f)
ottanoato di etile (caprilato di etile)	105 - 376	216 \pm 59 ^a B ^β		88 - 259	170 \pm 41 ^a A ^β		118 - 253	187 \pm 41 ^a A ^β		5 (a, b, c, e, f)
acetato di esile	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		1500 (a, c, e, f)
acetato di isoamile	163 - 803	393 \pm 143 ^a B ^β		163 - 563	264 \pm 82 ^a A ^β		232 - 609	406 \pm 98 ^a B ^β		30 (c, e, f)
Lattoni										
γ -butirrolaton	6940 - 18907	14036 \pm 3408 ^a B ^β		4444 - 12999	9423 \pm 2449 ^a A ^β		8401 - 19879	14512 \pm 2983 ^a B ^β		5000 (d)
Chetoni										
β -ionone	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		3,5 (b)

^a sono rappresentati i valori medi e la deviazione standard, n.d. significa che il composto non è stato rilevato, <LOQ significa al di sotto del limite quantitativo del metodo

^β le differenze statistiche indicative rispetto al test LSD ($p \leq 0,05$) sono contrassegnate con A, B, C

Il confronto delle annate ha mostrato che l'annata 2012 ha dei contenuti di 2-fenil acetato di etile, acetato di isoamile, benzaldeide, butirrato di etile, decanoato di etile, dodecanoato di etile, esadecanoato di etile, esanoato di etile, ottanoato di etile e γ -butirrolattone leggermente inferiori rispetto alle annate 2011 e 2013. I contenuti più alti di tutti i composti rilevati, tranne l'ottaonato di etile, sono stati confermati per l'annata 2013.

Per la valutazione del contributo sensoriale dei singoli composti volatili all'odore del vino sono stati calcolati i valori OAV e ROC. In base ai calcoli, il composto volatile più importante nel vino Terrano è l'ottaonato di etile che ha un odore dolce, di ciliegie, fruttato. Al secondo posto tra i composti volatili più importanti ci sono l'acetato di isoamile, che ha un odore dolce, di banane, fruttato, e l'esanoato di etile che ha un odore fruttato, di mela e di fragola. Sono inoltre importanti il butirrato di etile, dall'odore fruttato, e il γ -butirrolattone, dall'odore dolce, caramellato e tostato. I risultati sono presentati nella Tabella 3.

Tabella 3: OAV (odor activity value) e ROC (relative odor contribution in %) del valore dei composti volatili significativi per l'aroma del vino Terrano delle annate dal 2011 al 2013

	OAV			ROC (%)		
	2011	2012	2013	2011	2012	2013
Aldeidi						
n-esaldeide (capraldeide)	0	0	0	/	/	/
benzaldeide	0,02	0,01	0,05	/	/	/
alcool benzilico	0,001	0,001	0,001	/	/	/
Composti C6						
1-esanolo	0,2	0,2	0,2	/	/	/
cis-3-esen-1-olo	0,1	0,1	0,3	/	/	/
Esteri						
2-fenil acetato di etile	0,2	0,1	0,2	/	/	/
butanoato di etile (butirrato di etile)	5,8	4,0	5,4	7,4	6,7	7,4
decanoato di etile (caprato di etile)	0,4	0,3	0,9	/	/	/
dodecanoato di etile (laurato di etile)	0,01	0,002	0,01	/	/	/
esadecanoato di etile (palmitato di etile)	0,1	0,02	0,1	/	/	/
esanoato di etile (caproato di etile)	13,3	11,2	13,7	17,0	18,8	18,8
ottaonato di etile (caprilato di etile)	43,1	33,9	37,3	55,2	56,7	51,2
acetato di esile	0	0	0	/	/	/
acetato di isoamile	13,1	8,8	13,5	16,8	14,7	18,6
Lattoni						
γ -butirrolattone	2,8	1,9	2,9	3,6	3,1	4,0
Chetoni						
β -ionone	0	0	0	/	/	/

Nonostante molti dei composti analizzati nel vino Terrano siano al di sotto dell'OAV, essi possono avere un effetto sinergico e potrebbero influire positivamente sul suo odore. È noto come l'OAV non dia una risposta definitiva sull'influsso esercitato dal singolo composto sull'odore del vino. Il contenuto di alcuni composti può variare molto da campione a campione, ma nonostante questo i composti hanno un effetto esiguo o nullo sulle qualità sensoriali di questi vini. Questa può essere una conseguenza del mascheramento, ovvero dell'aumento dell'effetto dei composti volatili e non volatili nel vino in base a contenuti diversi (Benkwitz et al., 2012).

Negli anni 2012 e 2013 è stato studiato, tramite delle prove in vigna, l'effetto di alcune pratiche viticole sul profilo aromatico del vino Terrano. In due vigneti di prova situati nella zona di Dutovlje sono state eseguite le seguenti procedure: 1-pergola controllo (nessuna modifica), 2 – pergola con 50% di diradamento dei grappoli (rimozione del secondo grappolo da ogni tralcio di vite durante la fase di invaiatura), 3 – guyot semplice controllo (nessuna modifica), 4 – guyot semplice con 50% di diradamento dei grappoli (rimozione del secondo grappolo da ogni tralcio di vite durante la fase di allegagione), 5 – guyot semplice con defogliazione pre-fioritura (rimozione di 4 o 5 foglie basali da ogni tralcio di vite). È stato determinato il contenuto di alcuni composti volatili nel vino prodotto da questa uva. I risultati sono presentati nella Figura 1 e nella Tabella 4. Nell'annata 2013 il contenuto di benzaldeide è risultato essere un po' più alto nella pergola con il 50% di diradamento dei grappoli rispetto alla pergola non diradata, e lo stesso vale anche per esadecanoato di etile ma nell'annata 2012. Nell'annata 2012 il contenuto di alcool benzilico è stato leggermente più alto nella tesi guyot semplice con defogliazione pre-fioritura rispetto al guyot controllo, mentre il contenuto di decanoato di etile nella stessa prova è risultato essere leggermente più basso rispetto a quella di controllo. In generale viene confermato che le pratiche viticole non hanno influenzato in modo sostanziale il contenuto dei composti volatili analizzati.

Nonostante le differenze non indicative nel contenuto dei singoli composti volatili analizzati nei diversi gruppi, la valutazione sensoriale dei vini di prova ha mostrato nell'annata 2013 una percezione degli aromi più alta nella forma di allevamento "pergola" rispetto ai campioni della forma di allevamento "guyot". La causa può essere ricercata nel livello di maturazione dell'uva che può influire sull'aroma del vino. Nei vini dell'annata 2012 (vini invecchiati di 21 mesi) la percezione dell'aroma fruttato è stata maggiore nella forma di allevamento "guyot" rispetto alla forma di allevamento "pergola". La percezione più alta dell'aroma varietale del Terrano dell'annata 2013 è stata osservata nel campione della tecnica guyot con defogliazione pre-fioritura. Sia l'intensità dell'aroma varietale che l'intensità dell'aroma fruttato del Terrano sono stati più

alti nell'annata 2013 rispetto all'annata 2012; ciò dimostra che questi vini nel primo anno di maturazione presentano una percezione più alta dell'aroma fruttato e dell'aroma varietale rispetto ai vini invecchiati.

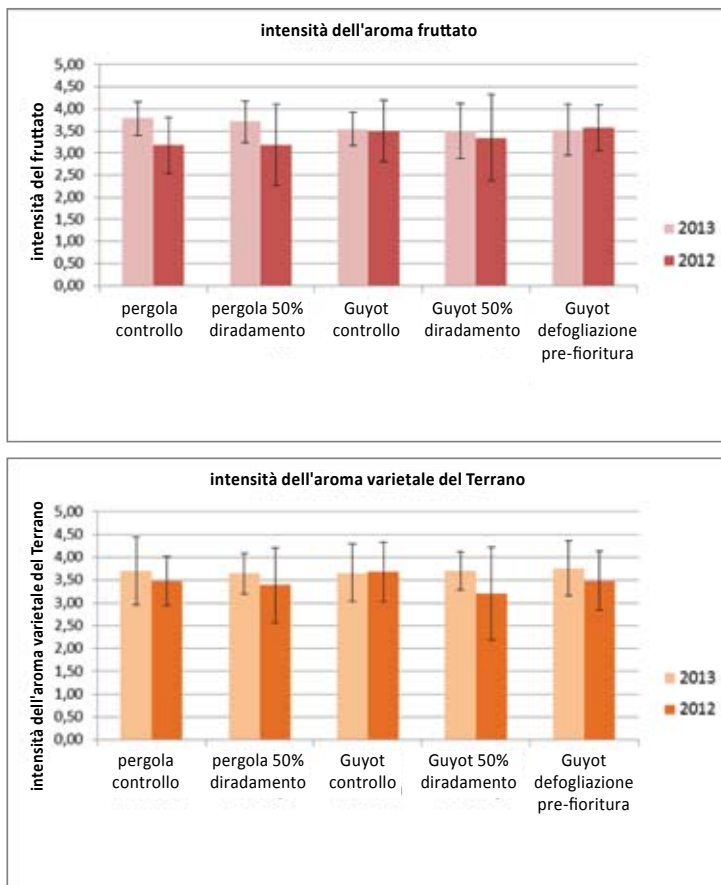


Figura 1: valutazione sensoriale dei vini di prova rispetto al parametro di intensità dell'aroma fruttato (sinistra) e di intensità dell'aroma varietale del Terrano (destra) in base alle pratiche viticole, annate 2013 e 2012 (una vinificazione per ciascun approccio, 11 degustatori).

Tabella 4: *Influsso delle pratiche viticole in vigna sul contenuto dei composti volatili ($\mu\text{g/l}$) nei vini Terrano delle annate 2012 e 2013*

	2012					2013				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aldeidi										
n-saldeide (capraldeide)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
benzaldeide	2±2 ^a	3±2 ^a	4±2 ^a	4±2 ^a	4±2 ^a	3±2 ^a	9±2 ^a	6±2 ^a	8±2 ^a	6±2 ^a
alcool benzilico	180±3 ^a	205±3 ^a	284±3 ^a	266±3 ^a	364±3 ^a	329±3 ^a	359±3 ^a	311±3 ^a	346±3 ^a	292±3 ^a
Composti C6										
1-esanolo	1278±3 ^a	1346±3 ^a	1379±3 ^a	1343±3 ^a	1242±3 ^a	1285±3 ^a	1337±3 ^a	1232±3 ^a	1253±3 ^a	1215±3 ^a
cis-3-esen-1-olo	44±1 ^a	49±1 ^a	50±1 ^a	46±1 ^a	52±1 ^a	51±1 ^a	62±1 ^a	58±1 ^a	59±1 ^a	56±1 ^a
Esteri										
2-fenil acetato di etile	50±1 ^a	49±1 ^a	58±1 ^a	54±1 ^a	71±1 ^a	66±1 ^a	66±1 ^a	59±1 ^a	64±1 ^a	57±1 ^a
butanoato di etile (butirato di etile)	123±2 ^a	120±2 ^a	264±2 ^a	286±2 ^a	129±2 ^a	147±2 ^a	109±2 ^a	114±2 ^a	109±2 ^a	104±2 ^a
decanoato di etile (caprato di etile)	236±6 ^a	310±6 ^a	337±6 ^a	322±6 ^a	163±6 ^a	170±6 ^a	168±6 ^a	169±6 ^a	170±6 ^a	172±6 ^a
dodecanoato di etile (laurato di etile)	n.d.	33±4 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
esadecanoato di etile (palmitato di etile)	10±2 ^a	25±2 ^a	17±2 ^a	14±2 ^a	17±2 ^a	28±2 ^a	22±2 ^a	24±2 ^a	24±2 ^a	25±2 ^a
esanoato di etile (caproato di etile)	156±2 ^a	168±2 ^a	147±2 ^a	145±2 ^a	170±2 ^a	158±2 ^a	153±2 ^a	156±2 ^a	160±2 ^a	159±2 ^a
ottanoato di etile (caprilato di etile)	134±3 ^a	137±3 ^a	162±3 ^a	154±3 ^a	127±3 ^a	129±3 ^a	134±3 ^a	131±3 ^a	132±3 ^a	132±3 ^a
acetato di esile	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
acetato di isoamile	331±2 ^a	325±2 ^a	307±2 ^a	315±2 ^a	329±2 ^a	320±2 ^a	332±2 ^a	345±2 ^a	362±2 ^a	351±2 ^a
Lattoni										
γ -butirrolatone	13887±2 ^a	14065±2 ^a	12605±2 ^a	12362±2 ^a	14602±2 ^a	13288±2 ^a	14907±2 ^a	14954±2 ^a	15852±2 ^a	15940±2 ^a
Chetoni										
β -ionone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Sono rappresentati i contenuti e la deviazione standard della riproducibilità del metodo, n.d. significa che il composto non è stato rilevato
 1 – pergola controllo, 2 – pergola con 50 % di diradamento dei grappoli, 3 – guyot controllo, 4 – guyot con 50 % di diradamento dei grappoli,
 5 – guyot con defogliatura in pre-floritura

4. CONCLUSIONI

I risultati della nostra ricerca indicano che gli esteri sono il gruppo dominante tra gli aromi fermentativi nel vino Terrano che contribuiscono in maniera significativa al suo aroma fruttato. Il composto che ha influito maggiormente sul profilo aromatico del vino Terrano è stato l'ottaonato di etile che conferisce un odore dolce, di ciliegie e frutta. Il secondo estere più importante è stato l'esanoato di etile dall'odore di mele e fragole, mentre il terzo è stato l'acetato di isoamile dall'odore dolce, fruttato, di banane. Seguono il butirrato di etile, che presenta un odore fruttato, e il γ -butirrolattone dall'odore dolce, caramellato e tostato.

Le prove in vigna con diverse forme di allevamento e pratiche viticole (pergola, guyot semplice, diradamento dei grappoli, defogliatura prima della fioritura) non hanno influito significativamente sul contenuto dei composti volatili analizzati. Ciò nonostante queste prove hanno influito sulla percezione sensoriale dell'aroma fruttato e di quello varietale del vino Terrano. L'intensità dell'aroma fruttato e di quello varietale è risultata più alta nei vini giovani (9 mesi, annata 2013) rispetto a quelli vecchi (21 mesi, annata 2012); ciò dimostra che l'aroma fruttato e l'aroma varietale del vino Terrano raggiungono il massimo dell'intensità nel primo anno di lavorazione.

5. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i viticoltori del Carso per i campioni d'analisi e l'azienda "Lisjak" per le prove eseguite in vigna e per la vinificazione dei vini di prova. Gli autori ringraziano le collaboratrici del Laboratorio enologico presso l'Istituto agrario della Slovenia (KIS), Mateja Fortuna, Iva Kmetič Cegnar e Nada Bizjak per l'aiuto nell'esecuzione delle misurazioni.

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

6. BIBLIOGRAFIA

- Andujar-Ortiz I., Moreno-Arribas M. V., Martín-Álvarez P. J., Pozo-Bayón M. A. 2009. Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7351-7357.
- Bavčar D., Baša Česnik H., Čuš F., Košmerl T. 2011a. The influence of skin contact during alcoholic fermentation on the aroma composition of Ribolla Gialla and Malvasia Istriana *Vitis vinifera* (L.) grape wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 1801-1808.

- Bavčar D., Baša Česnik H., Čuš F., Vanzo A., Gašperlin L., Košmerl T. 2011b. Impact of Alternative Skin Contact Procedures on the Aroma Composition of White Wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32: 190-203.
- Bavčar D., Baša Česnik H. 2011. Validation of the method for the determination of some wine volatile compounds. *Acta agriculturae Slovenica*, 97: 285-293.
- Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines.
- Duarte W. F., Dias D. R., Oliveria J. M., Vilanova M., Teixeira J. A., Almeida e Silva J. B., Schwan R. F. 2010. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. *Food Research International*, 43: 2303-2314.
- Etievant P.X. 1993. Wine. In: *Volatile compounds in food and beverages*. Maarse H. (ed.). New York, Marcel Dekker: 483-545.
- Ferreira V., Fernandez P., Pena C., Escudero A., Cacho J.F. 1995. Investigation of the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 3: 381-392.
- Fornasaro S., Tramer F., Žiberna L., Passamonti S. 2012. Biološka uporabnost in aktivnost pigmentov grozdja pri živalih: implikacije za zdravje ljudi, Simpozij AGROTUR, Ljubljana, 28. November 2012, pp. 7-13.
- García-Carpintero E. G., Gómez Gallego M. A., Sánchez-Palomo E., González Viñas. 2012a. Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chemistry*, 134: 851-863.
- García-Carpintero E.G., Sánchez-Palomo E., Gómez Gallego M. A., González-Viñas M. A.. 2012b. Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosi red wines. *Food Chemistry*, 131: 90-98.
- García-Carpintero E. G., Sánchez-Palomo E., Oliveria González Viñas M. A. 2014. Volatile composition of Bobal red wines subjected to alcoholic/malolactic fermentation with oak chips. *Food Science and Technology*, 55: 586-594.
- Li H., Tao Y. S., Wang H., Zhang L. 2008. Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *European Food Research and Technology*, 227: 287-292.
- Pino J. A., Queris O. 2011. Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry*, 125: 1141-1146.
- Revi M., Badeka A., Kontakos S., Kontominas M.G. 2014. Effect of packaging material on enological parameters and volatile compounds of dry white wine. *Food Chemistry*, 152: 331-339.
- Rocha S.M., Coutinho P., Delgadillo I., Cardoso A.D., Coimbra M. A. 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.
- Rocha S.M., Rodrigues F., Coutinho P., Delgadillo I., Cardoso A.D., Coimbra M. A. 2004. Volatile composition of Baga red wine. Assessment of the identification of the would be impact odorants. *Analytica Chimica Acta*, 513, 1: 257-262.
- Sánchez-Palomo E., Gómez García-Carpintero E., Gómez Gallego M. A., González Viñas M.A. 2012. Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. *The Aroma of Rojal Red Wines from La Mancha Region – Determination of Key Odorants*. Salih B., Çelikbiçak Ö. (eds.). Published online, InTech: 147-170.
- Vanzo A., Šuklje K., Jenko M., Čuš F., Bavčar D., Lisjak K. 2012. Polifenolni potencial Terranoa. Bioaktivne spojine Terranoa, Simpozij AGROTUR, Ljubljana, 28. November 2012, pp. 29-50.
- Welke J. E., Zanusi M., Lazzarotto M., Alcaraz Zini C. 2014. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. *Food Research International*, 59: 85-99.

FENOLI VOLATILI E AMMINE BIOGENE NEL VINI TERRANO

Helena BAŠA ČESNIK¹, Klemen LISJAK², Andreja RAKAR³,
Mojca ŽORŽ⁴, Romina ŽABAR⁵, Mitja MARTELANC⁶,
Lorena BUTINAR⁷, Paolo SIVILOTTI⁸, Polonca TREBŠE⁹,
Mladen FRANKO¹⁰

1,2 Istituto Agrario della Slovenia

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Università di Nova Gorica

¹ Dott.ssa, ² Dott., ³ Dott.ssa, ⁴ Dott.ssa, ⁵ Dott.ssa, ⁶ Dott., ⁷ Dott.ssa,

⁸ Prof. Associato, ⁹ Prof.ssa, ¹⁰ Prof.

RIASSUNTO

Sono stati analizzati i fenoli volatili 4-etilfenolo, 4-vinilfenolo, 4-etilguaiacolo e 4-vinilguaiacolo nel Terrano prodotto nel Carso. Un monitoraggio triennale del vino (annate 2011, 2012 e 2013) ha mostrato che i composti indesiderati appena citati sono presenti nel Terrano, tuttavia la loro concentrazione non influisce negativamente sulle sue qualità sensoriali. La percentuale di campioni che contenevano una concentrazione di fenoli volatili al di sopra della soglia di percezione nel periodo 2011-2013 si attestava al 7,3 % per il 4-etilfenolo, al 98,8 % per il 4-vinilfenolo, al 25,6 % per il 4-etilguaiacolo e al 91,5 % per il 4-vinilguaiacolo. I dati riportati in bibliografia indicano che la concentrazione di fenoli volatili nel Terrano è paragonabile a quella dei vini rossi prodotti in altre regioni del mondo.

Nel Terrano abbiamo analizzato anche 11 diverse ammine biogene. In quasi tutti i campioni è stata determinata la putrescina e l'etanolamina, e in circa il 60 % dei campioni è stata determinata anche la tiramina, l'istamina, e la metilamina, quest'ultima in basse concentrazioni. In un terzo dei campioni sono state ritrovate cadaverina e butilamina, e in una decina di campioni anche la 2-metilbutilamina. La triptamina è stata determinata in un solo campione, mentre l'esilamina non è stata trovata in nessun campione. Abbiamo effettuato anche l'analisi microbiologica.

Parole chiave: vino, ammine biogene, fenoli volatili, Terrano

Volatile phenols and biogenic amines in wine Terrano

ABSTRACT

Volatile phenols, 4-ethylphenol, 4-vinylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-vinylguaiacol were analyzed in Terrano wine produced in Karst region. Three year monitoring (vintage 2011, 2012, 2013) showed that all four undesirable compounds are present in Terrano wine, however their content does not negatively influence sensory characteristics of wine. The percentage of samples, which showed contents of volatile phenols above odour threshold values were 7.3 % for 4-ethylphenol, 98.8 % for 4-vinylphenol, 25.6 % for 4-ethylguaiacol and 91.5 % for 4-vinylguaiacol during 2011 – 2013 period. Data from literature showed that volatile phenols contents in Terrano are comparable with volatile phenols contents in red wines produced worldwide. In Terrano we also analyzed 11 different biogenic amines. Almost in all samples putrescine and ethanolamine were determined, in approx. 60 % of the samples we determined also tyramine, histamine, and methylamine, the latter in low concentrations. In one-third of the samples were determined cadaverine and butylamine, and in the tenth of the samples 2-methylbutylamine. Tryptamine was detected only in one sample, hexylamine was not detected. Microbiological analysis was also performed.

Keywords: wine, biogenic amines, volatile phenols, Terrano

1. INTRODUZIONE

La formazione degli aromi indesiderati nel vino è uno dei problemi più spinosi dell' enologia, poiché determina un peggioramento della qualità sensoriale del vino causando perdite economiche per l'azienda. Uno di questi aromi indesiderati è il »Brett« che è collegato alla presenza di etilfenoli (4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo) e di vinilfenoli (4-vinilfenolo e 4-vinilguaiacolo) nel vino (Pizarro et al., 2012). Una bassa concentrazione di questi composti influisce positivamente sull'aroma complesso del vino, viceversa una concentrazione che supera la soglia di percezione ha un influsso negativo sul suo aroma complessivo (Silva et al., 2011). Il 4-etilfenolo conferisce al vino un odore di sudore di cavallo e di cuoio (Larcher et al., 2007). Il 4-etilguaiacolo conferisce al vino un odore di pane tostato e di fumo (García-Carpintero et al., 2014). Il 4-vinilfenolo conferisce un odore di cerotto, anche quando la sua concentrazione è al di sotto della soglia di percezione, tuttavia il suo aroma risulta meno negativo quando nel vino è presente il 4-vinilguaiacolo. Il 4-vinilguaiacolo

dà un aroma piccante. Le miscele di etilfenoli nel vino rosso conferiscono un odore stabile e un odore di animale (Larcher e coll., 2007). La soglia di percezione citata dalla bibliografia è di 440 $\mu\text{g/l}$ per il 4-etilfenolo, di 180 $\mu\text{g/l}$ per il 4-vinilfenolo, di 33 $\mu\text{g/l}$ per il 4-etilguaiacolo e di 40 $\mu\text{g/l}$ per il 4-vinilguaiacolo (Lópezin et al., 2002). Alcuni autori hanno riportato una soglia di percezione persino più alta per quanto riguarda i vini rossi: 620 $\mu\text{g/l}$ per il 4-etilfenolo e 140 $\mu\text{g/l}$ per il 4-etilguaiacolo (Alañón et al., 2013). Per il 4-vinilguaiacolo è stata riportata persino una soglia di percezione di 10 mg/l (García-Carpintero et al., 2012) e di 770 $\mu\text{g/l}$ per i vinilfenoli (Pour Nikfardjam et al., 2009).

I fenoli volatili si formano soprattutto durante il metabolismo degli acidi idrossicinnamici da parte dei lieviti della specie *Brettanomyces/Dekkera* che presentano due enzimi che agiscono in serie. Il primo, la cinnamato decarbossilasi, scinde gli acidi fenolici in vinilfenolo e vinilguaiacolo (l'acido p-cumarico si scinde in 4-vinilfenolo e l'acido ferulico in 4-vinilguaiacolo). In seguito la vinil fenolo reduttasi converte il 4-vinilfenolo in 4-etilfenolo e il 4-vinilguaiacolo in 4-etilguaiacolo (Oelofse et al., 2009; Saez et al., 2011; Silva et al., 2011; Valentão et al., 2007). È noto come questi lieviti possano aumentare nel caso di un prolungato stoccaggio delle bottiglie di vino: il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo che ne derivano possono superare la soglia di percezione dopo i primi mesi di stoccaggio (Renouf et al., 2007). Utilizzando misure igieniche adeguate e la solforosa per la pulizia del vino e delle botti, è possibile impedire lo sviluppo di lieviti indesiderati (Valentão et al., 2007).

Fino ad oggi sono stati isolati dal mosto e dal vino ben 25 diversi tipi di batteri lattici (LB) dei ceppi *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. In seguito alla fermentazione malolattica, l'acido malico si trasforma in acido lattico per opera di questi microrganismi. La fermentazione malolattica (FML) porta principalmente alla disacidificazione biologica, ma modifica anche l'aroma del vino e la stabilità microbiologica. Nonostante gli effetti positivi sulla qualità del vino, alcuni ceppi di batteri lattici sono responsabili di talune malattie del vino. Anche la formazione di ammine biogene è in gran parte dovuta all'attività microbica di alcuni ceppi di batteri lattici durante la vinificazione (Konig e Frohlich, 2009; Petri et al., 2013). Le ammine biogene più comuni nel vino sono: istamina, tiramina e putrescina. Solitamente la loro concentrazione aumenta durante la fermentazione malolattica spontanea. Le altre ammine, come ad esempio la metilammina, l'etilammina, la fenilettilammina, l'isoamilammina e la cadaverina, potrebbero già essere presenti nel mosto di vino, oppure si possono formare o decomporre durante la vinificazione (Lonvaud-FUNEL, 2001).

In alcune nazioni vi sono limiti di legge per il contenuto di istamina nel vino. Questi sono i valori massimi per l'istamina nel vino in alcuni paesi europei (mg / L istamina): Germania (2), Paesi Bassi (3), Finlandia (5), il Belgio (5-6), la Francia (8), Svizzera e Austria (10) (Smit et al., 2008).

Dal 2011 al 2013 abbiamo monitorato le concentrazioni di fenoli volatili

nel vino Terrano prodotto sul Carso. Lo studio è stato svolto nell'ambito del progetto AGROTUR che ha come scopo la valutazione della tecnologia attuale utilizzata nella produzione del Terrano e il miglioramento della qualità microbiologica di questo vino.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionatura

I campioni di vino Terrano sono stati prelevati dalle botti di acciaio inossidabile o di legno dei produttori del Carso. Nel corso di tre anni sono stati presi 82 campioni di vino da diversi produttori (39 per l'annata 2011, 22 per l'annata 2012 e 21 per l'annata 2013), 9 mesi dopo la fermentazione e a fermentazione malolattica conclusa.

2.2 Metodi analitici

I parametri fisico-chimici base del vino Terrano sono stati stabiliti con metodi standard EEC (Unione Europea, 1990). L'estrazione dei fenoli volatili dal vino è stata effettuata con dell'etere dietilico, eseguendo l'individuazione degli estratti mediante gascromatografia e spettrometria di massa. Per l'analisi del contenuto di ammine biogene, i campioni di vino sono stati diluiti con metanolo e ogni singolo campione è stato sottoposto a derivatizzazione con l'ortoftalaldeide in presenza di 2-mercaptoetanololo e con un tampone di borato a pH 10,5. In questo modo sono stati ottenuti i derivati fluorescenti delle ammine biogene che sono stati quantificati mediante la cromatografia liquida HPLC utilizzando un rilevatore a fluorescenza (FLD) (Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo alto, USA). L'analisi è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 445 nm, mentre la rivelazione della fluorescenza è stata effettuata a 356 nm. Come fase mobile sono state utilizzate due soluzioni: (A) il metanolo e (B) una soluzione allo 0,05 M di acetato di sodio e tetraidrofurano 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), con l'aggiunta di 50 mg/L di cicloesimide e il 2 % di succo di pomodoro. Sul terreno di coltura selettivo è stato spalmato da 0,1 a 1 mL di campione e incubato in anaerobiosi alla temperature di 25°C.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I parametri fisico-chimici base del vino Terrano delle annate 2011, 2012 e 2013 sono esposti nella Tabella n.1. Il vino Terrano presenta un livello medio di alcol e un alto tasso di acidità (valori di pH più bassi). Un pH più basso può sfavorire la crescita dei lieviti *Brettanomyces/Dekkera*, tuttavia il basso contenuto di alcol e la concentrazione ridotta di SO₂ possono au-

mentare le possibilità di alterazione del profilo microbiologico del vino. Secondo molti autori il limite ottimale per il controllo di quasi tutti i lieviti e i batteri è di 0,8 mg/l di SO₂ molecolare (Du Toit et al., 2005). Tuttavia, poiché nel Terrano è stata individuata una concentrazione bassa di SO₂ libera, la concentrazione molecolare di SO₂ risulta molto inferiore a quella necessaria per impedire la crescita dei lieviti *Brettanomyces/Dekkera*.

Tabella n.1: parametri fisico-chimici base nel vino Terrano per le annate 2011, 2012 e 2013

	annata 2011	annata 2012	annata 2013
	media	media	media
alcol (vol. %)	12,01	11,95	12,06
SO ₂ molecolare (mg/l)	0,35	0,40	0,35
SO ₂ libera (mg/l)	13	12	12
SO ₂ totale (mg/l)	43	40	35
pH	3,37	3,26	3,33
acidità totale (g/l, acido tartarico)	7,5	8,0	7,5
acidità volatile (g/l, acido acetico)	0,62	0,45	0,73
zuccheri riduttori (g/l)	2,5	1,2	1,3

La Tabella n.2 mostra le concentrazioni di fenoli volatili individuate e le rispettive soglie di percezione. Nel Terrano sono state individuate delle alte concentrazioni di 4-vinilfenolo, e delle concentrazioni minori di 4-etilfenolo e di 4-vinilguaiacolo, mentre le concentrazioni più basse sono risultate quelle di 4-etilguaiacolo.

La percentuale di campioni che hanno riportato valori al di sopra della soglia di percezione (Alañón et al., 2013; López et al., 2002) nel periodo 2011-2013 è stata del 7,3 % per il 4-etilfenolo, del 98,8 % per il 4-vinilfenolo, del 25,6 % per il 4-etilguaiacolo e del 91,5 % per il 4-vinilguaiacolo.

Tabella n.2: Concentrazioni di fenoli volatili (µg/l) nel vino Terrano per le annate 2011, 2012 e 2013 ((a) Alañón et al., 2013; (b) López et al., 2002)

	2011	Media 2011	2012	Media 2012	2013	Media 2013	soglia di percezione
4-etilfenolo	6 - 465	86±113	23 - 593	230±166	6 - 953	265±263	620 (a)
4-vinilfenolo	366 - 3438	1141±576	423 - 2454	1454±640	90 - 3376	1360±844	180 (b)
4-etilguaiacolo	6 - 441	54±98	6 - 479	85±102	9 - 250	90±78	140 (a)
4-vinilguaiacolo	28 - 750	125±123	53 - 460	150±87	19 - 345	110±87	40 (b)

Le concentrazioni medie nel periodo 2011-2013 si sono attestate a 153 $\mu\text{g/l}$ per il 4-etilfenolo, a 1265 $\mu\text{g/l}$ per il 4-vinilfenolo, a 69 $\mu\text{g/l}$ per il 4-etilguaiacolo e a 128 $\mu\text{g/l}$ per il 4-vinilguaiacolo.

Confrontando i risultati del presente lavoro con i dati riportati in bibliografia, è apparso che le concentrazioni di 4-etilguaiacolo individuate nel vino Terrano sono simili a quelle stabilite dagli spagnoli nel vino rosso invecchiato in botti di rovere. Anche le concentrazioni di 4-etilfenolo, 4-vinilfenolo e 4-vinilguaiacolo sono paragonabili a quelle misurate nei vini riportati in bibliografia. Il confronto è presentato nella tabella n.3.

Tabella n.3: Confronto delle concentrazioni di fenoli volatili ($\mu\text{g/l}$) con i dati riportati in bibliografia ((a) Pizarro et al., 2012, (b) Pizarro et al., 2007, (c) Domínguez et al., 2002, (d) Smit et al., 2003, (e) Díez et al., 2004, (f) López et al., 2002, (g) García-Carpintero et al., 2012, (h) Renouf et al., 2007)

	4-etilfenolo	4-vinilfenolo	4-etilguaiacolo	4-vinilguaiacolo
vino rosso Terrano	6 – 953	90 - 3438	6 - 479	19 – 750
vino rosso (a)	101 – 133	n. a.	88 - 105	n. a.
vino rosso (b)	7 – 84	730 - 4385	42 - 65	49 – 54
vino rosso (c)	97 – 782	1430 - 2174	72 - 255	282 - 880
vino rosso Tannat (d)	170 – 1120	n. a.	120	n. a.
vino rosso Franconia (e)	149 – 435	n. a.	81 - 152	n. a.
vino rosso spagnolo, invecchiato in botti di quercia (f)	8.6 – 1500	8.1.1998	0,53 - 420	5.4 - 236
vino rosso Moravia Dulce (g)	n. s.	n. a.	n. s.	287 - 473
vini d'archivio (annate 1909–1981) della regione di Bordeaux (h)	1040 - 6410	n. a.	122 - 975	n. a.

n. a. 'il composto non è stato rilevato'

n. s. 'il composto non è stato quantificato'

I valori di pH bassi, tipici del vino Terrano, potrebbero limitare la crescita dei lieviti *Brettanomyces/ Dekkera* e di conseguenza la formazione di fenoli volatili. Il 90 % dei campioni di vino Terrano ha riportato delle concentrazioni di 4-etilfenolo inferiori alla soglia di percezione, tuttavia va segnalato che i campioni di vino sono stati presi durante la stagione primaverile, quando la temperatura nelle cantine è ancora bassa, e queste condizioni potrebbero aver arrestato la crescita dei microorganismi indesiderati. Le fonti bibliografiche riferiscono che la concentrazione di 4-etilfenolo nelle bottiglie del vino Terrano invecchiato per le annate 2007, 2008 e 2009 è stata di 1016, 678 e 616 $\mu\text{g/l}$ (Čuš et al., 2011).

Per impedire la crescita dei lieviti *Brettanomyces/Dekkera* e la formazione di fenoli volatili indesiderati è necessario, durante l'imbottigliamento, utilizzare in modo adeguato la SO₂ o filtrare il vino. Renouf et al. (2007) hanno segnalato il *B. bruxellensis* come il lievito predominante che può svilupparsi nel corso di una prolungata conservazione del vino nelle bottiglie e che produce delle quantità di 4-etilfenolo e di 4-etilguaiacolo al di sopra della soglia di percezione. L'utilizzo di un filtro 1,0 µm è sufficiente per rimuovere tutti i lieviti ed evitare l'aumento della concentrazione di fenoli volatili negli anni a seguito dell'imbottigliamento.

I risultati del contenuto di ammine biogene sono riportati nella Tabella 4. Nel Terrano sono stati rinvenuti livelli elevati di putrescina (fino a 78,71 mg / l) nel 97,5 % dei campioni, mentre l'etanolammina (37,5 mg / l) in tutti i campioni. In circa il 60 % dei campioni è stata rilevata la presenza di tiramina (fino a 10,77 mg / l), di istamina (fino a 13,86 mg / l) e di metilammina, per la quale sono state misurate concentrazioni molto inferiori (fino a 1,2 mg / l). La cadaverina è stata rilevata solo in un campione dell'annata 2011, mentre nelle annate del 2012 e del 2013 è stata rilevata in un terzo dei campioni, le concentrazioni sono state superiori nel 2012 (fino a 9,9 mg / l) confrontandole con l'annata 2013 (fino a 1,92 mg / l). In circa un terzo dei campioni è stata rilevata la butilammina in basse concentrazioni (fino a 1,85 mg / l). In un decimo di tutti i campioni è stato determinata la 2-metilbutilammina in concentrazioni molto basse. La triptamina è stata rilevata solo in un campione, l'esilammina invece non è stata rilevata in nessun campione.

Tabella 4: Livelli di ammine biogene (mg / l) nel Terrano nelle annate 2011, 2012 e 2013

	2011	2012	2013	2011 – 2013
putrescina	0,01 – 78,71	1,79 – 11,83	4,3 – 31,79	0,01 – 78,71
cadaverina	0,01 – 0,66	1,8 – 9,9	0,088 – 1,92	0,01 – 9,9
etanolammina	9,03 – 30,67	9,76 – 37,5	9,06 – 19,1	9,03 – 37,5
istamina	0,003 – 12,77	0,5 – 13,86	0,075 – 7,71	0,003 – 13,86
metilammina	0,004 – 1,2	0,2 – 1,12	0,013 – 0,27	0,004 – 1,2
tiramina	0,01 – 10,77	0,6 – 7,6	0,067 – 6,27	0,01 – 10,77
butilammina	n.d.	0,1 – 1,85	0,022 – 0,24	0,1 – 1,85
triptamina	n.d.	n.d.	0,041 – 0,19	0,041 – 0,19
2-metilbutilammina	n.a.	0,2 – 1,16	0,047 – 0,23	0,047 – 1,16
izopentilammina	n.a.	n.d.	0,092 – 4,69	0,092 – 4,69
esilammina	n.d.	n.d.	n.a.	n.d.

n.a. il composto non è stato rilevato

n.d. il composto non è stato quantificato

Nei periodi 2011-2013 sono stati riscontrati valori medi pari a 15,97 mg / l di putrescina, 0,67 mg / l per la cadaverina, 18,74 mg / l di etanolamina, 2,63 mg / l per l'istamina, 0,36 mg / l per la metilamina, 1,72 mg / l per la tiramina, 0,24 mg / l di 2-metilbutilamina, 0,20 mg / l per isopentilamina

Nei 5 % dei campioni è stata misurata una concentrazione di istamina superiore ai livelli massimi consentiti in Austria e Svizzera (10 mg / l), mentre nel 7,5 % del valore consentito in Francia (8 mg / l). In un quarto dei campioni la concentrazione era superiore ai valori consentiti in Belgio (5 mg / l), nel 35 % dei campioni è risultata superiore ai valori consentiti in Olanda (3 mg / l) e al 40 % dei campioni rispetto ai valori consentiti in Germania (2 mg / l).

Le concentrazioni di tiramina, metilamina e cadaverina rientravano nel range dei valori citati dalle fonti letterarie per i vini rossi, mentre i dati per l'etanolamina in ca. 40 % dei campioni e la putrescina in campioni del 20 % di vino dell'annata 2011 erano fuori dai valori descritti in letteratura. I dati per la butilamina, 2-metilbutilamina e isopentilamina in letteratura non sono stati riportati.

Tabella 5: Il confronto dei livelli di ammine biogene (mg / l), con i dati dalla letteratura ((i) Tuberoso et al, 2015, (j) Pizarro, et al, 2007, (km) Terreno et al, 2005, (p) Marcobal et al., 2006, (r) Anli et al., 2004 (s), Vazquez-Lasa et al, 1998))

	<i>metil- amina</i>	<i>etanolamina</i>	<i>trip- tam- mina</i>	<i>isopen- tilami- na</i>	<i>putrescina</i>	<i>cadaverina</i>	<i>istamina</i>	<i>tiramina</i>
<i>vino rosso Cannonau</i>	$0,9 \pm 0,56$	$7,55 \pm 6,29$	$0,05$	$0,10$	$20,5 \pm 10,2$	$2,13 \pm 0,56$	$6,61 \pm 1,54$	$9,06 \pm 2,86$
<i>vino rosso di qualità, area Castilla y León, Spagna (j)</i>		$1.50 - 6.66$			$0.51 - 25.03$		$1.72 - 8.86$	
<i>vino rosso Tempranillo (k)</i>					$7,6 \pm 2,1$		$2,5 \pm 1,2$	$2,6 \pm 1,1$
<i>vino rosso Bobal (l)</i>					$3,5 \pm 1,4$		$2,3 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,8$
<i>vino rosso Gamacha (m)</i>					$7,4 \pm 2,1$		$1,1 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$
<i>vino rosso Merlot (n)</i>		$4,64 \pm 0,10$ (annata 2004) $16,90 \pm 0,70$ (annata 2005)			$1,08 \pm 0,10$ (annata 2004) $4,47 \pm 0,15$ (annata 2005)			
<i>vino rosso Syrah (o)</i>		$7,34 \pm 0,30$ (annata 2004) $0,66 \pm 0,06$ (annata 2005)			$0,73 \pm 0,11$ $4,67 \pm 0,52$ (annata 2004) (annata 2005)			

<i>vino rosso, Spagna (p)</i>					0.00–55.00	0.0–14.0	0 – 25	0.0–19.0
<i>vino rosso di qualità, Turchia (r)</i>					nd–5.92	nd–3.94	nd–1.97	nd–0.29
<i>Vino rosso giovane, Spagna (s)</i>					32.97	0.61	8.72	4.98
<i>(Vazquez-Lasa et al. (1998))</i>					31.35	1.74	6.67	5.78

n.d. il composto non è stato quantificato

In un terzo dei campioni analizzati non abbiamo rinvenuto i MKB sul terreno selettivo MRStj, in un terzo dei campioni sono stati osservati da $2,2 \times 10^2$ fino a 1.12×10^2 CFU / mL e nel resto dei campioni non è stato possibile conteggiare le piastre. Nei casi in cui non abbiamo rinvenuto i MKB, anche i livelli di ammine biogene erano bassi. Tra gli altri campioni non abbiamo osservato correlazioni, pertanto in futuro continueremo a determinare i MKB fino al livello di specie. È noto che la formazione di ammine biogene dipende non solo dalla specie ma anche dal ceppo di LAB (Konig e Frohlich, 2009; Petri et al 2013).

4. CONCLUSIONI

Nel vino Terrano sono presenti gli etilfenoli (4-etilfenolo e 4-etilguaiaicolo) e i vinilfenoli (4-vinilfenolo e 4-vinilguaiaicolo) che contribuiscono alla formazione di aromi indesiderati. Nel corso del monitoraggio triennale delle annate 2011, 2012 e 2013 si è constatato che le concentrazioni di 4-etilfenolo e 4-etilguaiaicolo si trovano in generale al di sotto alla soglia di percezione sensoriale, mentre le concentrazioni di 4-vinilfenolo e di 4-vinilguaiaicolo sono in generale superiori alla soglia di percezione sensoriale. Alcuni fenoli, soprattutto il 4-vinilguaiaicolo, potrebbero influire positivamente sull'aroma del vino, conferendo un odore di chiodi di garofano e pepe (Williams et al., 1980; Rocha et al., 2005). Abbiamo constatato che i dati rilevati riguardanti le concentrazioni di fenoli volatili nel vino Terrano sono paragonabili ai dati riportati in bibliografia relativi a vini rossi di altre zone del mondo. Poiché le concentrazioni di fenoli volatili sono state misurate in primavera, prima dell'imbottigliamento del vino, va segnalato che i produttori di vino Terrano devono prestare particolare attenzione alla preparazione del vino per l'imbottigliamento e l'invecchiamento a lungo termine. I produttori possono diminuire il rischio di crescita dei lieviti *Brettanomyces/Dekkera* e di formazione dei fenoli volatili curando le condizioni igieniche delle cantine, filtrando il vino con un filtro $1,0 \mu\text{m}$ e utilizzando correttamente la solforosa.

Nel triennio di monitoraggio delle ammine biogene nel Terrano ne sono state determinate 10 diverse, i cui contenuti sono stati comparabili con i dati pubblicati per i vini rossi ad eccezione di putrescina e etanolamina. Per butilammina, la 2-metilbutilammina e isopentilammina non è stato possibile rinvenire riferimenti in letteratura.

In riferimento ai limiti massimi consentiti per l'istamina, nel 5% dei campioni è stata misurato un livello superiore a quanto ammesso in Austria e Svizzera (10 mg / l) e nel 7,5 % di campioni rispetto ai valori consentiti in Francia (8 mg / l) . In un quarto dei campioni era superiore ai valori consentiti in Belgio (5 mg / l), nel 35 % dei campioni era superiore ai valori consentiti in Olanda (3 mg / l) e nel 40 % dei campioni ai valori consentiti in Germania (2 mg / l).

5. RINGRAZIAMENTI

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

Gli autori ringraziano la collaboratrice del Laboratorio centrale presso l'Istituto agrario della Slovenia (KIS), Mateja Fortuna per l'aiuto fornito nell'effettuazione delle misurazioni.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alañón M. E., Schumacher R., Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto I. J., Díaz-Maroto M. C., Pérez-Coello M. S. 2013. Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines part I: Volatile compounds and sensorial properties. *Food Research International*, 51: 325-334.
- Anli R. E., Vural N., Yilmaz S., Vural Y. H. 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 53-62.
- 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, pp. 5-24.
- Díez J., Domínguez C., Guillén D. A., Veas R., Barroso C. G. 2004. Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1025: 263-267.
- Domínguez C., Guillén D. A., Barroso C. G. 2002. Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta*, 458: 95-102.
- Du Toit W., Pretorius I., Lonvaud-Funel A. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 862-871.

Evropska Unija: **Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines.**

- García-Carpintero E.G., Sánchez-Palomo E., Gómez Gallego M. A., González-Viñas M. A.. 2012. Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines. *Food Chemistry*, 131: 90-98
- García-Carpintero E. G., Sánchez-Palomo E., Oliveria González Viñas M. A. 2014. Volatile composition of Bobal red wines subjected to alcoholic/malolactic fermentation with oak chips. *Food Science and Technology*, 55: 586-594
- García-Marino M., Trigueros Á, Escribano-Bailón T. 2010. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 455-462.
- Konig H., Frohlich J. 2009. Lactic acid bacteria. V: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Heidelberg, str. 3-29.
- Landete J.M., Ferrer S., Polo L., Pardo I. 2005. Biogenic amines in wines from three spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1119-1124.
- Larcher R., Nicolini G., Puecher C., Bertoldi D., Moser S., Favaro G. 2007. Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with a coulometric array detector. *Analytica Chimica Acta*, 582: 55-60.
- Lonvaud-Funel A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199: 9-13.
- López R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V. 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966: 167-177.
- Marcobal A., Martín-Alvarez P.J., Polo M.C., Muñoz R., Moreno-Arribas M.V. 2006. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, 69: 391-396.
- Oelofse A., Lonvaud-Funel A., Du Toit M.. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology*, 26: 377-385.
- Petri A., Pfannebecker J., Frolich J, König H. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*, 33: 48-54.
- Pizarro C., Pérez-del-Notario N., González-Sáz J. M. 2007. Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1166: 1-8.
- Pizarro C., Sáenz-González C., Pérez-del-Notario N., González-Sáiz J. M. 2012. Optimisation of a sensitive method based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1244: 37-45.
- Pour Nikfardjam M., May B., Tschiersch C. 2009. Analysis of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol in wines from the Württemberg region (Germany). *Mitteilungen Klosterneuburg*, 59: 84-89.
- Renouf V., Perello M.-C., De Revel G., Lonvaud-Funel A. 2007. Survival of wine microorganisms in the bottle during storage. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58: 379-386.
- 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 Science and Food Agriculture*, 85: 199-205.

- Saez J. S., Lopes C. A., Kirs V. E. 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28: 503-509.
- Silva I., Campos F. M., Hogg T., Couto J. A. 2011. Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 471-475.
- Valentão P., Seabra R. M., Lopes G., Silva L. R., Martins V., Trujillo M. E., Velázquez E., Andrade P. B. 2007. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, 100: 64-70.
- Vazquez-Lasa M.B., Iñiguez-Crespo M., González-Larraina M., González-Guerrero A. 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 229-229.
- Smit A., Cordero Otero R., Lambrechts M. G., Pretorius I. S., Van Rensburg P. J. 2003. Enhancing Volatile Phenol Concentrations in wine by expressing various phenolic acid decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4909-4915.
- Smit A.Y., du Toit W.J., du Toit M. 2008. Biogenic amines in wine: understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29:109–127.
- Tuberoso C.I.G., Congiu F., Serreli G., Mameli S. 2015. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, 175: 29–35.
- Williams P. J., Strauss C. R., Wilson B. 1980. Hydroxylated linalool derivatives of volatile monoterpenes of muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 766–711.

RESIDUI DI FITOFARMACI E METALLI NEL VINO TERRANO

Helena BAŠA ČESNIK¹, Vida ŽNIDARŠIČ PONGRAC²,
Špela VELIKONJA BOLTA³, Klemen LISJAK⁴

1,2, 3, 4 Istituto Agrario della Slovenia

¹ Dott., ² M.Sc., ³ Dott., ⁴ Dott.

RIASSUNTO

Nel territorio del Carso è stato studiato il contenuto di residui da fitofarmaci nelle uve di Refošk, mentre per quanto riguarda il vino Terrano, è stato invece analizzato sia il contenuto di residui di fitofarmaci che il contenuto di metalli. Nel corso di un monitoraggio triennale (2011-2013) sono stati analizzati 73 campioni di uva e 82 campioni di vino. In nessun campione il contenuto di residui di fitofarmaci nell'uva ha superato i valori limite. Inoltre, nell'uva sono stati individuati soltanto le sostanze attive contenute in prodotti ammessi nella produzione integrata. Allo stesso modo, anche nel vino sono state ritrovate soltanto le sostanze attive contenute in prodotti consentiti nella produzione integrata dell'uva. Quasi il 33% dei campioni di vino non conteneva residui di fitofarmaci. Nei campioni di vino Terrano sono stati determinati i contenuti di rame (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), cadmio (Cd), piombo (Pb) e arsenico (As). Le concentrazioni di metalli misurate nel vino sono risultate in tutti e tre gli anni inferiori ai valori massimi consentiti, ad eccezione di tre campioni del 2011 e di un campione del 2013 nei quali è stato misurato un livello di rame in eccesso.

Parole chiave: uva, vino, Terrano, residui di fitofarmaci, amine biogene, fenoli volatili, metalli

Plant protection product residues and heavy metals in wine Terrano

ABSTRACT

Residues of plant protection products were monitored in grapes of Refošk variety, produced in the Karst. In Terrano produced in Karst, plant protection product residues and heavy metals were analysed. Three year monitoring (2011-2013) was performed. During that period 73 grape samples and 82 wine samples were analysed. Plant protection product residues were not exceeding maximum residue limits (MRLs). Beside that, only active substances from plant protection products allowed in integrated pest management were found. In wine also only active substances from plant protection products allowed in integrated pest management of grapes were determined. In almost 33% of wine samples residues of plant protection products were not found.

In Terrano wines we measured the content of copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn), cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As). The concentrations of these metals were all below the prescribed maximum values with the exception of two samples in year 2011 and one in 2013 for which exceeded concentrations of copper were found.

Keywords: grapes, wine, Terrano, plant protection product residues, biogenic amines, volatile phenols, heavy metals

1. INTRODUZIONE

La pianta della vite viene attaccata da molti parassiti: tra gli insetti, i più frequenti sono le tignole e gli acari. Ma ancora più pericolose sono le malattie causate da funghi come la peronospora, l'oidio e la muffa grigia (Oliva et al., 1999). Per questo motivo l'utilizzo di fitofarmaci nei vigneti è una pratica comune, se si desidera portare a casa il raccolto. L'effetto indesiderato del loro utilizzo è rappresentato dai residui lasciati da tali prodotti nelle bacche d'uva, e quindi nel vino (Cuhna et al., 2009). La presenza e il livello dei residui di fitofarmaci nell'uva, e conseguentemente nel vino, dipendono dall'aggressività dei diversi patogeni in ogni regione vinicola, dal metodo di produzione dell'uva (convenzionale, integrato, biologico), dalla concentrazione dei fitofarmaci durante l'irrorazione, nonché dal periodo e dalle condizioni climatiche dall'ultima irrorazione fino alla raccolta del prodotto (Čuš et al., 2010a). Poiché alcuni residui di fitofarmaci hanno un impatto negativo sulla salute dell'uomo, risulta necessario monitorarne la concentrazione, al fine di proteggere il consumatore.

Concentrazioni elevate nel contenuto di metalli nel vino possono essere legate a alcune misure viticole (uso di fertilizzanti e di fitofarmaci a base di metalli, soprattutto di rame), dal metodo di trasformazione dell'uva in vino (estensione del periodo di fermentazione del mosto, contatto del mosto e del vino con attrezzatura enologica in leghe metalliche) oppure da misure per la stabilizzazione del vino o volte a prevenirne l'intorbimento (uso di prodotti enologici). I valori massimi del contenuto in metalli nel vino sono stabiliti nell'appendice C (Annali OIV, 2013).

Lo scopo di questo articolo è di presentare il contenuto di residui di fitofarmaci nell'uva a bacca nera della varietà Refošk (*Vitis vinifera* L.) e nel vino Terrano, e la presenza di metalli nel vino Terrano del Carso prodotto tra gli anni 2011-2013. I risultati sono stati confrontati con i dati delle fonti bibliografiche riguardanti il contenuto di composti indesiderati nell'uva e nei vini.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionatura

È stato effettuato un campionamento di uve di Refošk direttamente nei vigneti del Carso transfrontaliero, nel periodo delle vendemmie 2011, 2012 e 2013. Sono stati raccolti circa 10-15 grappoli appositamente selezionati per ottenere un campione rappresentativo per il laboratorio. I campioni sono stati congelati fino al momento dell'analisi. In tre anni sono stati raccolti 73 campioni di uva (18 nell'annata 2011, 29 nell'annata 2012 e 26 nell'annata 2013).

I campioni di vino Terrano sono stati prelevati dalle botti in acciaio inox o dalle botti in legno dei produttori del Carso. In tre anni sono stati raccolti 82 vini di diversi produttori (39 nell'annata 2011, 22 nell'annata 2012 e 21 nell'annata 2013), 9 mesi dopo la fine della fermentazione alcolica e a fermentazione malolattica conclusa.

Il vino sul quale abbiamo analizzato i residui di fitofarmaci non era necessariamente prodotto dall'uva utilizzata per l'analisi di tali residui.

2.2 Metodi di analisi

Ai fini della determinazione dei residui di fitofarmaci, è stata effettuata un'estrazione con una miscela di solventi: acetone, etere di petrolio e diclorometano. La purificazione degli estratti è stata effettuata mediante cromatografia a gel-permeazione mentre l'individuazione dei diversi residui è stata ottenuta mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS) e cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS/MS).

I campioni sono stati analizzati per verificare la presenza di 215 diversi composti attivi. Per l'analisi del rame (Cu), del ferro (Fe) e dello zinco

(Zn) è stato utilizzato un campione dal quale era stata separata la frazione alcolica. I metalli sopraindicati sono stati poi individuati mediante spettrometria di assorbimento atomico a fiamma (FAAS, Analyst 800, Perkin Elmer). Per l'analisi del cadmio (Cd), del piombo (Pb) e dell'arsenico (As), il campione è stato scomposto con acido nitrico concentrato ultrapuro in un sistema a microonde (Millipore, ETHOS 1600), mentre l'analisi è stata eseguita mediante spettrometria di assorbimento atomico elettrotermico (ETAAS, Analyst 600, Perkin Elmer).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Residui di fitofarmaci nell'uva

Nei campioni di uva sono stati individuati 21 composti attivi. Tutte le sostanze attive individuate erano consentite nella produzione integrata dell'uva. L'elenco dei fitofarmaci e i loro utilizzi relativi alle sostanze attive rinvenute sono presentati nella tabella 1. La quantità di residui di fitofarmaci presente nell'uva non superava i limiti consentiti (Maximum residue levels, MRLs). La maggior parte delle sostanze rinvenute rientra nel gruppo dei fungicidi. Soltanto 3 composti attivi rientrano nel gruppo degli insetticidi. I risultati sono presentati nella tabella 2.

Tabella 1: Nome commerciale dei fitofarmaci e loro utilizzo in relazione alle sostanze attive individuate nell'uva e nel vino

Sostanza attiva	fitofarmaci – nome commerciale*	utilizzato contro*
azoxystrobin	QUADRIS, UNIVERSALIS	oidio, Eutypa lata, Pseudopeziza tracheiphila, peronospora
benalaxil	GALBEN C, GALBEN M	peronospora
benalaxil-M	FANTIC F WG	peronospora
boscalid	CANTUS WG, COLLIS	oidio, muffa grigia
ciprodinil	SWITCH 62,5 WG	muffa grigia
deltametrina	DECIS 2,5 EC, GAT DECLINE 2,5 EC	tignola e tignoletta della vite, Scaphoideus titanus
dimetomorf	ACROBAT MZ WG, FORUM STAR	peronospora
famoxadone	EQUATION PRO	peronospora
fenexamide	TELDOR SC 500	muffa grigia
fludioxonil	SWITCH 62,5 WG	muffa grigia
folpet	FANTIC F WG, FOLPAN 80 WDG, FORUM STAR, MELODY COMBI WG 65,3, MELODY COMBI WP 43,5, MIKAL FLASH, MIKAL PREMIUM F, MOMENTUM-F, PERGADO-F, RIDOMIL GOLD COMBI PEPITE, UNIVERSALIS, VALIS-F	oidio, Eutypa lata, Pseudopeziza tracheiphila, peronospora

iprovalicarb	MELODY COMBI WP 43,5 , MELODY COMBI WG 65,3, MELODY DUO WG 66,8A, MIKAL PREMIUM F	peronospora
clorpirifos	PYRINEX 25 CS	tignola e tignoletta della vite, Scaphoideus titanus
quinoxifen	CRYSTAL, POSTALON 90 SC	oidio
mandipropamid	PERGADO-C, PERGADO-F, PERGADO MZ, REVUS	peronospora
metalaxil-M	RIDOMIL GOLD COMBI PEPITE, RIDOMIL GOLD MZ PEPITE, RIDOMIL GOLD PLUS 42,5 WP	peronospora
metoxifenozide	RUNNER 240 SC	tignola e tignoletta della vite
tebuconazolo	FALCON EC 460, FOLICUR EW 250, MYSTIC 250 EC, NATIVO 75 WG, ORIUS 25 EW, TEBUSHA 25% EW	oidio
tiametoxam	ACTARA 25 WG	Scaphoideus titanus
zoxamide	AMELINE FLOW, ELECTIS 75 WG	peronospora

* Istruzioni tecnologiche per la produzione integrata di uva per il 2011, 2012 e 2013, MAFF

Nel periodo 2011-2013 sono state ritrovate sostanze attive in 68 campioni di uva (93,2 %). Nonostante i residui siano stati individuati in un elevato numero di campioni, soltanto un campione (1,4 %) conteneva residui ad un livello tra il 50 e il 100 % del MRL e soltanto 23 campioni (31,5 %) contenevano dei residui ad un livello tra il 10 e il 50 % del MRL. Tutti i restanti campioni (58,9 %) contenevano residui ad un livello inferiore al 10 % del MRL. In 5 campioni (6,8 %) non sono stati individuati residui.

Tabella 2: Composti attivi individuati e loro contenuti nell'uva nel periodo 2011-2013

principio attivo	utilizzo	LOQ uva (mg/kg)	contenuto nell'uva 2011 n=18			contenuto nell'uva 2012 n=29			contenuto nell'uva 2013 n=26			MRL uva (mg/kg)
			min-max (mg/kg)	media	min-max (mg/kg)	media	min-max (mg/kg)	media				
azoxystrobin	fungicida	0,01	0,03 - 1,11	0,32	0,05 - 0,08	0,06	0,04 - 0,11	0,08	2			
benalaxil+benalaxil-M	fungicida	0,01	0,01	-	-	-	-	-	0,3			
boscalid	fungicida	0,01	0,04 - 0,07	0,06	0,03 - 0,08	0,05	0,01-0,34	0,12	5			
ciprodinil	fungicida	0,01	0,01 - 1,80	0,42	0,12 - 0,21	0,17	0,03 - 0,56	0,23	5			
deltametrina	insetticida	0,03	-	-	-	-	0,05 - 0,06	0,06	0,2			
dimetomorf	fungicida	0,01	0,01 - 0,03	0,02	0,02 - 0,13	0,08	0,01 - 0,13	0,05	3			
famoxadone	fungicida	0,01	-	-	-	-	0,05	-	2			
fenexamide	fungicida	0,01	0,10 - 0,51	0,26	-	-	0,01 - 0,07	0,04	5			
fludioxonil	fungicida	0,02	0,03 - 1,12	0,35	0,04 - 0,08	0,06	0,02 - 0,32	0,10	4			
folpet	fungicida	0,02	0,03 - 1,85	0,41	0,04 - 2,99	1,01	0,02 - 3,21	0,56	10			
iprovalicarb	fungicida	0,01	0,05	-	0,17	-	-	-	2			
clorpirifos	insetticida	0,01	0,02 - 0,10	0,06	0,02 - 0,24	0,09	0,02 - 0,03	0,03	0,5			
clothianidin	metabolita di tiamectoxam	0,01	-	-	0,01	-	-	-	0,7			
quinoxifen	fungicida	0,01	0,02	0,02	0,01 - 0,04	0,03	0,01 - 0,03	0,02	1			
mandipropamid	fungicida	0,01	0,01 - 0,13	0,07	-	-	0,01 - 0,03	0,02	2			
metaxil+metaxil-M	fungicida	0,02	0,02 - 0,13	0,06	0,04 - 0,09	0,06	0,02	-	1			
tebuconazolo	fungicida	0,05	-	-	0,06 - 0,17	0,11	-	-	2			
tiametoxam	insetticida	0,01	-	-	0,01 - 0,02	0,02	-	-	0,9			
zoxamide	fungicida	0,01	0,07	-	-	-	0,04	-	5			

La sostanza attiva individuata con maggior frequenza nel periodo 2011-2013 è stato il folpet ritrovato in 57 campioni di uva (78,1 %). 15 campioni di uva (20,5 %) contenevano residui di folpet ad un livello compreso tra il 50 e il 100% del MRL e 42 campioni di uva (57,5 %) contenevano dei residui di folpet al di sotto del 10 % del MRL.

I nostri risultati sono stati confrontati con i dati delle fonti bibliografiche riguardanti l'uva campionata nell'ambito della produzione integrata nel 2006 in tutta la Slovenia (Baša Česnik et al., 2008). Secondo questi dati, nell'uva della produzione integrata sono stati ritrovati i seguenti composti, individuati anche nella presente ricerca: azoxystrobin (0,02 – 0,04 mg/kg), ciprodinil (0,01 – 0,40 mg/kg), fludioxonil (0,02 – 0,03 mg/kg), folpet (0,02 – 6,0 mg/kg), fosalone (0,01 - 0,02 mg/kg), clorpirifos (0,02 - 0,13 mg/kg), metalaxil e metalaxil-M (0,05 - 0,18 mg/kg). Nell'uva Refošk è stato determinato anche il contenuto di deltametrina, che non era invece stato determinato nel 2006 per la produzione integrata. Nel 2006, invece, in tutta la Slovenia è stato determinato il contenuto di clorotalonil (0,01 - 0,73 mg/kg), iprodione (0,01 - 0,30 mg/kg), kresoxim-metile (0,01 mg/kg), miclobutanil (0,02 mg/kg), fosalone (0,01 - 0,02 mg/kg), pirimetanil (0,01 - 0,53 mg/kg) e trifloxystrobin (0,01 - 0,53 mg/kg) che non è stato determinato nel corso della presente ricerca.

Già Farris et al. (1992) avevano riportato dei residui di folpet (0,5 mg/kg) e clorotalonil (0,23-0,60 mg/kg) nell'uva italiana. Navarro et al. (2001) hanno riportato dei residui di clorpirifos (0,14 mg/kg) nell'uva Monastrell della zona di Jumilla (Spagna). Cabras et al. (1997) hanno riportato dei residui di ciprodinil (1,03 mg/kg), fludioxonil (0,78 mg/kg), pirimetanil (1,11 mg/kg) e tebuconazolo (0,42 mg/kg) nell'uva italiana Vermentino dell'annata 1996. Otero et al. (2003) hanno riportato dei residui di ciprodinil (0,14-1,45 mg/kg), folpet (0,09-0,40 mg/kg), fludioxonil (0,17-0,61 mg/kg), fenexamide (0,52 mg/kg), metalaxil (0,14-0,21 mg/kg) e pirimetanil (2,33 mg/kg) nell'uva della zona di Rias Baixas (Galizia, Spagna). Ad eccezione del clorotalonil e del pirimetanil questi composti attivi sono stati individuati anche nell'uva di Refošk.

Residui di fitofarmaci nel vino

Nel vino sono stati individuati 12 principi attivi. Tutti i principi attivi individuati erano consentiti nella produzione integrata dell'uva. La tabella 1 presenta l'elenco dei fitofarmaci e il loro utilizzo in relazione ai principi attivi rinvenuti. La maggior parte delle sostanze rinvenute appartiene al gruppo dei fungicidi. Soltanto un composto attivo appartiene al gruppo degli insetticidi. I risultati sono presentati nella tabella 3.

I principi attivi sono stati individuati negli anni 2011-2013 in 55 campioni di vino (67,1%). I residui non sono stati individuati in 27 campioni di vino (32,9%). In tre annate consecutive, 2011, 2012 e 2013, il principio attivo individuato con maggiore frequenza è stato il ciprodinil (37 campioni, 45,1%).

Tabella 3: Composti attivi individuati e loro contenuti nei vini nel periodo 2011-2013

principio attivo	utilizzo	LOQ vino (mg/L)	contenuto nel vino 2011 n=39		contenuto nel vino 2012 n=22		contenuto nel vino 2013 n=21	
			min-max (mg/L)	media (mg/L)	min-max (mg/L)	media (mg/L)	min-max (mg/L)	media (mg/L)
azoxystrobin	fungicida	0,03	0,04 - 0,15	0,10	0,04	-	-	-
boscalid	fungicida	0,01	0,01 - 0,23	0,07	0,01	0,01	0,01	-
ciprodinil	fungicida	0,01	0,01 - 0,21	0,06	0,01 - 0,07	0,03	0,01 - 0,13	0,06
dimetomorf	fungicida	0,01	0,01 - 0,10	0,04	0,01 - 0,06	0,03	0,01 - 0,05	0,03
fenexamid	fungicida	0,01	0,01 - 0,02	0,01	-	-	0,01 - 0,05	0,02
fludioxonil	fungicida	0,01	0,01 - 0,09	0,03	0,01 - 0,03	0,02	0,01 - 0,03	0,02
iprovalcarb	fungicida	0,01	0,03	-	-	-	-	-
mandipropamid	fungicida	0,01	-	-	-	-	0,01 - 0,05	0,04
metaxil+metaxil-M	fungicida	0,02	0,03 - 0,12	0,07	0,02 - 0,03	0,03	0,02	-
metoxifenozide	insetticida	0,01	0,01	-	-	-	-	-
tebuconazolo	fungicida	0,02	0,02 - 0,03	0,03	-	-	-	-

I risultati del monitoraggio triennale sono stati confrontati con i risultati dei vini al commercio (Čuš et al. 2010b). Anche nei vini del commercio è stato determinato il contenuto di: azoxystrobin (0,04 mg/l), boscalid (0,01 - 0,17 mg/l), ciprodinil (0,01 - 0,44 mg/l), dimetomorf (0,01 - 0,04 mg/l), fenexamide (0,02 - 0,17 mg/l), fludioxonil (0,02 - 0,21 mg/l), metalaxil e metalaxil-M (0,03 - 0,06 mg/l), procimidone (0,03 - 0,05 mg/l). Nel vino Terrano è stato determinato il contenuto di iprovalicarb e tebuconazolo, che invece non sono stati determinati nei vini del commercio. I fitofarmaci con la sostanza attiva iprovalicarb vengono utilizzati dai viticoltori per combattere la peronospora (*Plasmopara viticola*), il tebuconazolo viene invece utilizzato contro l'oidio (*Erysiphe necator*). Per contrastare entrambi esistono anche altri preparati, ad es. quelli che contengono folpet come sostanza attiva.

Cabras e Angioni (2000) hanno riportato dei residui di azoxystrobin nel vino prodotto senza macerazione (0,13 mg/l) e nel vino prodotto con macerazione (0,09 mg/l), di ciprodinil nel vino prodotto senza macerazione (0,18 mg/l) e nel vino prodotto con macerazione (0,21 mg/l), di fludioxonil nel vino prodotto senza macerazione (0,23 mg/l) e nel vino prodotto con macerazione (<0,05 mg/l) e di tebuconazolo nel vino prodotto senza macerazione (0,16 mg/l) e nel vino prodotto con macerazione (0,22 mg/l). Angioni et al. (2011) hanno riportato dei residui di boscalid (1,00 mg/l) e di iprovalicarb (0,36 mg/l) nel vino rosso Carignano di provenienza italiana. Zhang et al. (2009) hanno riportato residui di azoxystrobin nel vino rosso (0,02-0,03 mg/l) e bianco (0,002-0,02 mg/l), di ciprodinil nel vino rosso (0,003 mg/l) e bianco (0,002-0,003 mg/l), di fludioxonil nel vino rosso (0,001 mg/l), di iprovalicarb nel vino bianco (0,003 mg/l) e di tebuconazolo nel vino rosso (0,009-0,02 mg/l) e bianco (0,006-0,02 mg/l). I contenuti di residui di fitofarmaci descritti dalle fonti bibliografiche sono paragonabili ai contenuti dei residui ritrovati nel vino Terrano, eccetto per quanto riguarda il boscalid che, nelle fonti bibliografiche, è stato rinvenuto in concentrazioni maggiori.

Metalli nel vino

Le analisi dei metalli presenti nei campioni di vino Terrano hanno mostrato concentrazioni di zinco, piombo, cadmio e arsenico inferiori ai valori massimi consentiti, e soltanto in 3 degli 82 campioni è stata misurata una quantità di rame superiore al limite massimo consentito. Questo è probabilmente dovuto ad un eccessivo utilizzo di solfato di rame per la correzione di errori del vino, ad esempio di acido solfidrico (H₂S). Le misurazioni della concentrazione di rame e zinco nei vini Terrano sono conformi alle aspettative e ai dati delle fonti bibliografiche (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Paneque et al., 2010). Il contenuto medio di metalli pesanti (piombo, cadmio, arsenico) nei campioni di Terrano delle annate

2011-2013 era più bassa rispetto alla concentrazione massima consentita, un dato molto positivo per i consumatori del vino Terrano. In una precedente ricerca Ribéreau-Gayon et al. (2000) avevano evidenziato un contenuto medio di piombo nei vini europei di 63 $\mu\text{g/l}$, in quelli australiani di 28 $\mu\text{g/l}$ e in quelli americani di 24 $\mu\text{g/l}$. Nei vini Terrano è stata determinata una concentrazione media di piombo di 13 $\mu\text{g/l}$ e anche il valore massimo misurato (59 $\mu\text{g/l}$) risulta inferiore alla media europea. La concentrazione media di cadmio nei campioni di vino Terrano (59 $\mu\text{g/l}$) è 33 volte inferiore al valore massimo consentito, tre volte inferiore alla concentrazione media indicata nel loro studio da ricercatori ungheresi (1,06 $\mu\text{g/l}$) (Ajtony et al., 2008) e paragonabile alla concentrazione indicata in uno studio sui vini del sud Italia (0,25 - 0,38 $\mu\text{g/l}$) (Galgano et al., 2008). La concentrazione di arsenico misurata era, in tutti i campioni di vino Terrano, al di sotto del limite di quantificazione - LOQ (LOQ = 10 $\mu\text{g/l}$), coincidente anche con i risultati dello studio ungherese (Ajtony et al., 2008) e greco (Galani-Nikolakaki et al., 2002). I risultati dell'analisi dei metalli presenti nel vino sono raccolti nella Tabella 4.

Tabella 4. Contenuti dei metalli nei campioni di vino Terrano.

Metallo	concentrazione massima consentita	concentrazione media nel vino Terrano	concentrazione minima nel vino Terrano	concentrazione massima nel vino Terrano	numero di campioni che superano la concentrazione massima consentita
Rame - Cu	1 mg/l	0,26 mg/l	0,02 mg/l	1,89 mg/l	3
Ferro - Fe	-	1,38 mg/l	0,32 mg/l	4,72 mg/l	-
Zinco - Zn	5 mg/l	0,55 mg/l	0,08 mg/l	2,68 mg/l	0
Piombo - Pb	150 $\mu\text{g/l}$	13 $\mu\text{g/l}$	5 $\mu\text{g/l}$	59 $\mu\text{g/l}$	0
Cadmio - Cd	10 $\mu\text{g/l}$	0,3 $\mu\text{g/l}$	0,1 $\mu\text{g/l}$	1,1 $\mu\text{g/l}$	0
Arsenico- As	200 $\mu\text{g/l}$	<10 $\mu\text{g/l}$	-	-	0

4. CONCLUSIONI

Il contenuto di residui di fitofarmaci nell'uva Refošk del Carso italiano non rappresenta un rischio per i consumatori, poiché gli MRL non sono stati superati. Tutte le sostanze attive individuate nell'uva erano consentite per la produzione integrata. Ciò significa che i produttori hanno utilizzato i fitofarmaci in modo corretto e conformemente alle buone pratiche agricole.

La sostanza attiva individuata con maggiore frequenza nell'uva è stata il folpet. Le motivazioni sono probabilmente due: i fitofarmaci che contengono questa sostanza attiva sono economici, inoltre il folpet ha un ampio

spettro d'azione (tabella 1) ed è presente in molti preparati. È interessante il fatto che il folpet non sia stato individuato nel vino. I campioni di vino non erano necessariamente ricavati dall'uva nella quale sono stati analizzati i residui di fitofarmaci, ma il motivo è probabilmente la rapidità della degradazione fotolitica e idrolitica del folpet nel corso della vinificazione (Čuš et al., 2010a). Nel vino sono stati individuati anche il ciprodinil, la fenexamide, il metalaxil e il tebuconazolo, che persistono invece durante la vinificazione (Čuš et al., 2010a).

Non esistono valori limite per i residui di fitofarmaci nei vini, ma questi diminuiscono durante il processo di vinificazione. Quasi il 33 % dei campioni di vino non conteneva residui. I risultati riguardanti i residui di fitofarmaci nell'uva Refošk e nel vino Terrano sono paragonabili ai dati derivanti dalle fonti bibliografiche.

In base al contenuto misurato dei metalli analizzati è possibile concludere che i vini Terrano sono sicuri per i consumatori, in quanto le concentrazioni di metalli rilevate sono inferiori ai valori massimi consentiti. Fanno eccezione tre campioni con un contenuto di rame superiore alla media, probabilmente come conseguenza dell'utilizzo di una quantità troppo elevata di solfato di rame per la correzione degli errori del vino.

5. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i viticoltori del Carso per i campioni di uva e di vino. Gli autori ringraziano le collaboratrici del Laboratorio enologico presso l'Istituto agrario della Slovenia (KIS), Mateja Fortuna e Marjeta Černe Kanc, per l'aiuto nell'esecuzione delle misurazioni. Il presente lavoro rientra nelle attività del progetto AGROTUR, finanziato nell'ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013 dal Fondo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ajtoni, 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.
- Angioni A., Dedola F., Garau V.L., Schirra M., Caboni P. 2011. Fate of iprovalicarb, indoxacarb and boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6806-6812.
- Baša Česnik H., Gregorčič A., Čuš F. 2008. Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. *Food Additives and Contaminants*, 25: 438-443.
- 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 and Food Chemistry*, 45: 2708-2710.
- Cabras P. in Angioni A. 2000. Pesticide residues in grapes, wine and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 967-973.
- Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, International Organisation of Vine and Wine (OIV), Edition 2013, Annex C: Maksimum acceptable limits of various substances.
- Cunha S. C., Fernandes J. O., Alves A., Oliveira M. B. P. P. 2009. Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *Journal of Chromatography A*, 1216: 119-126.
- Čuš F., Baša Česnik H., Velikonja Bolta Š., Gregorčič A. 2010a. Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control*, 21: 1512-1518.
- Čuš F., Baša Česnik H., Velikonja Bolta Š., Gregorčič A. 2010b. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. *Food Control*. 2010, 21: 150-154.
- 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.
- Navarro S., Oliva J., Navarro G., Barba A. 2001. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole and vinclozolin in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*: 52, 35-40.
- Oliva J., Navarro S., Barba A., Navarro G. 1999. Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 833: 43-51.
- 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 Chromatogr 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.
- Ribéreau-Gayon et al., *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*, J. Wiley & Sons Ltd., 2000
- Zhang K., Wong J.W., Hayward D.G., Sheldia P., Krynitsky A. J., Schenck F. J., Webster M.G., Ammann J.A., Ebeler S. 2009. Multiresidue pesticide analysis of wines by dispersive solid-phase extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4019-4029.

POSSIBILITÀ DI RIDUZIONE DEL CONTENUTO DI SALE NEL PROSCIUTTO CRUDO “KRAŠKI PRŠUT” - EFFETTO SUI PARAMETRI DI QUALITÀ E ACCETTABILITÀ DA PARTE DEI CONSUMATORI

Martin ŠKRLEP¹, Marjeta ČANDEK-POTOKAR²,
Boris POTOČNIK³, Maja PREVOLNIK POVŠE⁴,
Nina BATOREK LUKAČ⁵, Marjeta ŽEMVA⁶, Klemen LISJAK⁷

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Istituto Agrario della Slovenia

¹ Prof.associato, ² Prof.associato, ⁴ Prof.associato ⁶ Dott., ⁷ Dott.

RIASSUNTO

L'effetto del contenuto di sale sulla qualità del prosciutto “kraški pršut” è stato studiato tramite due esperimenti, condotti in due impianti commerciali. La diminuzione del contenuto di sale è stata ottenuta con la riduzione del tempodi salagione. Nel primo esperimento la salagione è stata ridotta dai soliti 14 giorni a 11 o 8 giorni, mentre nel secondo esperimento sono stati confrontati due tempi di salagione: 18 e 6. La durata della salagione è stata adattata in base al peso delle cosce fresche(=11,5 kg). La qualità delle carni e le perdite durante il processo di lavorazione erano conformi agli standard del consorzio. Al termine della maturazione sono state determinate: la composizione chimica, le caratteristiche reologiche e i parametrisensoriali del prosciutto. E' stato condotto inoltre il consumer test. Nel primo esperimento, con una fase di salagione ridotta di 4 giorni, il contenuto di sale è diminuito del 12 %, mentre la riduzione di 8 giorni ha portato aad una diminuzione del 30 %. Nel secondo esperimento, la ridotta fase di salagione ha comportato una contrazione del contenuto di sale pari al 40 %. Il minore contenuto di sale nei prosciutti è stato associato a un minore contenuto di sostanza secca, un più alto indice di proteolisi e una maggiore attività dell'acqua (a_w), facendo sì che i prosciutti meno salati fossero più morbidi e pastosi, caratteristiche che potrebbero essere ascritte all'aumento dell'attività proteolitica. I risultati dell'analisi sensoriale confermano ulteriormente i risultati delle determinazioni chimiche e strumentali. La salagione più breve, con conseguente minore contenuto di sale, ha mostrato un effetto negativo su alcune caratteristiche che denotano la necessità di un cambiamento anche in

altre fasi del processo produttivo. Il consumer test, ha dimostrato che i consumatori, non solo sono in grado di distinguere il differente contenuto di sale, ma anche accettano di buon grado anche un prodotto meno salato.

Parole chiave: prosciutto, riduzione del sale, proteolisi, qualità del prodotto, consumer test

Possibilities for reducing salt content in “Kraški pršut” dry ham – effect on quality parameters and consumer acceptance

SUMMARY

Two experiments (with two different producers) were carried out to study the effect of salt reduction on dry-cured ham quality. The reduction was achieved by shortening the salting phase from standard 14-day salting to 8 or 11 days in experiment 1 and from standard 18-day salting to 6 days in experiment 2. Salting duration was also decided in view of the weight of green hams (=11.5 kg). Consortium rules were respected in regard to raw material quality and processing losses. At the end of processing, chemical composition, rheological and sensory analyses were carried out, additionally, consumer study was performed. In experiment 1, four and eight days shorter salting phase resulted in 12 % and 30 % salt reduction, respectively, as compared to the standard salting. In the second experiment shorter salting period resulted in 40 % lower salt content. Lower salt content was associated with lower dry matter content, higher proteolysis index and higher water activity (a_w) and affected texture properties; less salty hams were softer and pastier, which can be attributed to increased proteolysis. The results of sensory analysis were in accordance with chemical and instrumental measurements. The shortest salting (lowest salt level) showed some negative effects on quality and thus indicated the limitations and a need for adaptations in other stages of processing. Survey with consumers showed that majority of consumers is able to recognise lower saltiness and also appreciates less salty product.

Key words: dry-cured ham, salt reduction, proteolysis, product quality, consumer study

1. INTRODUZIONE ESTATO DELL'ARTE

Il “Kraški pršut” è una particolarità gastronomica che gode di ottima fama e riconoscibilità tra i consumatori sloveni (Čandek-Potokar e Arh, 2004). Questo salume rientra nel gruppo dei prosciutti mediterranei che si contraddistingue per un lungo processo di lavorazione senza affumicatura, una salagione prolungata, utilizzo di sale marino grezzo secco, riposo con successiva asciugatura e maturazione (Scolari et al., 2003). La lavorazione del prosciutto “kraški pršut” consente l'utilizzo esclusivo di sale marino, che ha un ruolo importante nello sviluppo delle caratteristiche organolettiche del prosciutto (struttura, gusto). Allo stesso tempo il sale svolge un ruolo importante nella conservazione del prodotto, perché riduce l'attività dell'acqua e ne favorisce la perdita (Toldrá, 2002). Gli standard del consorzio stabiliscono che il contenuto di sale in una fetta di prosciutto (composti di grasso e muscolo), non deve superare il 7,5 %. In una delle nostre più recenti ricerche (Škrlep et al., 2012) è stato appurato che il contenuto di sale nel “kraški pršut” ammonta a 7,6 % e 6,7 % di NaCl, rispettivamente nei muscoli *Biceps femoris* (BF) e *Semimembranosus* (SM). Dai dati emerge che la concentrazione di sale nel prosciutto “kraški pršut” è sostanzialmente maggiore rispetto ai prosciutti italiani quali Parma e San Daniele, che contengono dal 4 al 6 % di NaCl nel tessuto muscolare (De Angelis, 2012; Manzocco et al., 2013; Benedini et al., 2012), sebbene alcuni autori indichino anche valori inferiori (Laureati et al., 2014). Da un punto di vista dietetico, l'assunzione di maggiori quantità di sale è problematica, poiché aumenta i rischi d'insorgenza di malattie cardiovascolari. Le più recenti tendenze salutistiche indicano la necessità di un'ulteriore riduzione del sale assunto con la dieta, il cui consumo si dovrebbe limitare alla sola quantità ingerita con i salumi (Ruusunen e Puolanne, 2005). Tuttavia, la riduzione del contenuto di sale nei prodotti trasformati, se da un lato migliora le qualità dietetiche, dall'altro peggiora le proprietà tecnologiche. Durante la lavorazione del prosciutto il sale agisce da importante inibitore di enzimi proteolitici (Sárraga, 1992), dunque una sua eccessiva e/o incontrollata riduzione, potrebbero portare non solo a una ridotta stabilità, ma anche a un decadimento qualitativo legato a una proteolisi eccessiva (Parolari et al., 1994), con conseguente mollezza della carne e sviluppo di aromi o gusti indesiderati. Dalla letteratura emergono diverse strategie di riduzione del contenuto di sale, che includono: la riduzione della quantità del sale, la sostituzione di NaCl con altri tipi di sale, la modifica o l'adattamento delle condizioni di lavorazione (Gou et al., 1996; Guardia et al., 2006; Armenteros et al., 2009a, 2009b). Ogni strategia rappresenta una nuova sfida tecnologica per i lavoratori e può avere un impatto significativo sulla qualità del prosciutto (Čandek-Potokar e Škrlep, 2012). Nel nostro studio abbiamo voluto testare la riduzione della concentrazione del sale nel prosciutto, riducendo la fase di salagione. Lo studio ambiva verificare quindi l'effetto di differenti tempi di salagione, e della conseguente riduzione del contenuto di sale, sulle caratteristiche chimiche, tecnologiche e sensoriali del prosciutto.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Impostazione degli esperimenti

Per stabilire l'effetto che la durata della salagione ha sulla qualità del prosciutto, sono stati effettuati due esperimenti presso gli impianti di due produttori di prosciutto "kraški pršut". Sono state utilizzate cosce di maiali allevati secondo le usuali tecniche (peso 110-120 kg). La lavorazione si è svolta secondo gli standard del consorzio. I due esperimenti (1 e 2), si differenziavano sostanzialmente per: l'origine della materia prima, la durata della salagione, del riposo e della maturazione. Inizialmente le cosce sono state rifilate al fine di ottenere la forma stabilita (nell'esperimento n.1 il peso delle cosce era di $12,0 \pm 1,0$ kg, mentre nell'esperimento n. 2 il peso era di $11,2 \pm 0,3$ kg). Alla fase di rifilatura è seguita la fase di salagione (solitamente 14-18 giorni, a temperatura di 2-4 °C); va sottolineato che ai prodotti è stato aggiunto esclusivamente sale. Alla salagione è poi seguita la fase di riposo (4-6 °C con un'umidità relativa - UR del 70-85 %), durante la quale l'attività dell'acqua si riduce e si uniforma la concentrazione del sale nel prodotto, conferendo stabilità microbiologica allo stesso. E' seguita poi la fase dell'asciugatura (14-20 °C, UR del 60-80 %). Al raggiungimento del calo di peso della coscia del 25 % (media per l'intera serie), la superficie scoperta è stata ricoperta con la sugna, un impasto di grasso di maiale, farina di riso e spezie, al fine di evitare l'asciugamento eccessivo durante la fase di maturazione. Come già rilevato, l'unica differenza nel processo di lavorazione che abbiamo apportato nell'esecuzione delle due prove sperimentali, è stata la durata della fase di salagione. Nell'esperimento n.1 il gruppo di controllo con la salagione standard (14 giorni) è stato confrontato con due gruppi: uno sottoposto a salagione ridotta a 11 giorni (salagione di media durata) e un altro a 8 giorni (salagione breve). Nell'esperimento n. 2 abbiamo utilizzato un gruppo sottoposto a salagione standard di 18 giorni ed un gruppo a salagione molto breve di 6 giorni (fase di salagione breve). Al termine della fase di salagione, abbiamo prelevato un campione dalla parte centrale di ogni prosciutto per sottoporlo ad analisi chimiche, reologiche e sensoriali.

2.2 Campionamento e analisi chimiche

Per l'analisi chimica abbiamo prelevato, da una fetta dello spessore di 2 cm, campioni dei muscoli BF e SM, pulendoli dal tessuto grasso e connettivo. I campioni così ottenuti sono stati congelati con azoto liquido e omogeneizzati con l'aiuto del mulino da laboratorio (IKA M120, IKA Werke, Staufen, Germania). Come descritto da Škrlep et al. (2012), sui campioni è stato determinato il contenuto di acqua e sostanza secca (ISO 6496, 1999), il contenuto di sale (tramite apparecchio DL53 General Purpose Titrator, Mettler-Toledo, GmbH, Schwarzenbach, Svizzera), nonché il contenuto di azoto non proteico e totale (ISO 5983-2, 2005; tramite strumento Kjeltac 2300 Nitrogen Analyser, Foss Analytical, Hi-

lerod, Denmark). L'attività dell'acqua (a_w) è stata determinata nel laboratorio accreditato per l'igiene alimentare della Facoltà di Veterinaria di Lubiana. L'indice di proteolisi è stato calcolato in base al rapporto tra il contenuto di azoto non proteico e il contenuto di azoto totale.

2.3 Caratteristiche reologiche.

Le caratteristiche reologiche sono state misurate, in entrambi gli esperimenti, con uno strumento specifico (Texture Analyzer, Ametek Lloyd Instruments, Ltd, BognorRegis, Regno Unito), dotato di una cella di carico da 50 kg e di una piastra di compressione dal diametro di 50 mm. Il campione per l'analisi proveniva da due fette da 15 mm - una per l'analisi TPA (*»textureprofileanalysis«*) e l'altra per l'analisi SR (*»stressrelaxtion«*). Da entrambe le fette sono state campionati i muscoli BF e SM e ridotti a dadini delle dimensioni di 2×2×1,5 cm (3 serie per fetta). Per la prova SR, i campioni sono stati schiacciati per 90 secondi, perpendicolarmente alla direzione delle fibre, fino a ridurre l'altezza iniziale del 25 %, mentre per la TPA, la procedura di preparazione del campione prevedeva di ridurre l'altezza iniziale del 50 %. In entrambi gli esperimenti la velocità di movimento della piastra di compressione è stata impostata a 1 mm/s. Come descritto da Škrlep et al. (2012), una volta terminato il test si è proceduto al calcolo dell'indice di rilassamento, della durezza, della coesione, dell'elasticità, della gommosità e della masticabilità.

2.4 Analisi organolettiche

La qualità organolettica del prosciutto è stata valutata con l'ausilio dei test sensoriali di analisi quantitativa-descrittiva. Il test sensoriale di analisi quantitativa-descrittiva comprendeva, per l'esperimento n.1 un gruppo di 8 persone, esperte nella produzione del prosciutto, che hanno valutato tutti i campioni nell'arco dello stesso giorno. Ciascun campione è stato valutato una volta sola. Per l'esperimento n. 2, è stato coinvolto un gruppo di 10 valutatori, composto da volontari precedentemente addestrati. In ciascuna serie di valutazioni sono stati valutati 4 campioni, ripetendo per tre volte la valutazione di ogni campione. I descrittori di qualità presi in esame, erano uguali in entrambi gli esperimenti. L'analisi sensoriale è stata condotta considerando una scala non strutturata di 90 mme prendendo come base l'intensità della percezione sensoriale. Ai fini della valutazione, ciascun partecipante ha ricevuto una fetta di prosciutto di 1 mm che serviva a valutare, separatamente per i muscoli BF e SM, la salinità, la dolcezza, l'acidità, l'amarrezza, la pastosità, la succosità, la scioglievolezza e la presenza di gusti estranei.

2.5 Studi sui consumatori

Gli studi sui consumatori sono stati svolti in occasione della fiera agrolimentare AGRA 2014. I visitatori della fiera (tutti volontari) hanno ricevuto due fette di prosciutto (una proveniente dal gruppo “salagione standard” e l'altra da quello “salagione ridotta”). I consumatori hanno valutato: la salinità, la scioglievolezza il gradimento, utilizzando espressioni come: più, meno, uguale. Il sondaggio ha incluso 288 persone di età media di 45,8 anni, di cui il 58 % erano uomini e il 42 % donne (vedi figura n. 1).

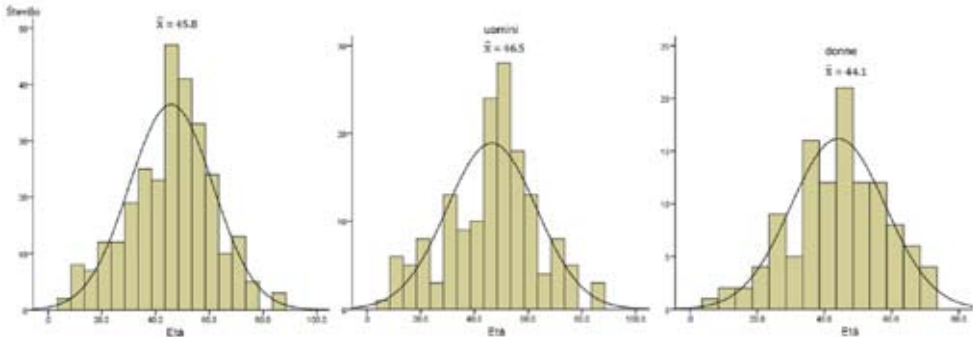


Figura n. 1: Distribuzione degli intervistati in base all'età.

2.6 Analisi statistica

Per l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il programma statistico SAS (SAS Institute Inc, Cary, ZDA). Le analisi per i singoli esperimenti sono state svolte separatamente. È stata utilizzata la procedura GLM, inserendo nel modello l'effetto “durata della salagione”. In caso di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) i valori medi sono stati comparati con l'aiuto del test di Tukey. Nelle rappresentazioni grafiche sono state utilizzate le valutazioni medie di ogni singola caratteristica, relative a entrambi i muscoli. Nel grafico delle caratteristiche reologiche e sensoriali (Figura n. 3, n. 4) sono stati utilizzati i dati normalizzati con i valori delle caratteristiche studiate, proiettati su una scala da 0 a 1 (i valori, misurati su scale diverse, sono stati adattati a un'unica scala).

3. RISULTATI CON DISCUSSIONE

3.1 Caratteristiche chimiche del prosciutto

Con la riduzione della salagione si è ottenuta una considerevole riduzione del contenuto di sale nel prodotto finale (Figura n. 2). Nell'esperimento n. 1, la riduzione della salagione dal tempo standard di 14 giorni a 11 e 8 giorni ha portato a una riduzione del contenuto di sale del 12 e 30 % rispettivamente. Nell'esperimento n. 2, la riduzione della salagione dal

tempo standard di 18 giorni a 6 giorni, ha portato a una riduzione del contenuto di sale nel prodotto pari al 40 %. Dai risultati (Figura n. 2) si evince che l'assorbimento del sale non procede in modo lineare rispetto alla durata della salagione (Picouet et al., 2012) ma risultapiù intensodurante i primi giorni. È possibile dunque ottenere una notevole riduzione del saleriducendo drasticamente la fase di salagione (nello specifico dai 14-18 giorni standarda un minimo di 6-8 giorni). Come conseguenza diretta della riduzione della fase di salagione, i prosciutti meno salati avevano un minore contenuto di sostanza secca (Figura n. 3b), un indice di proteolisi più elevato (Figura n. 3c) e presentavano una maggioreattività dell'acqua a_w (Figura n. 3d).

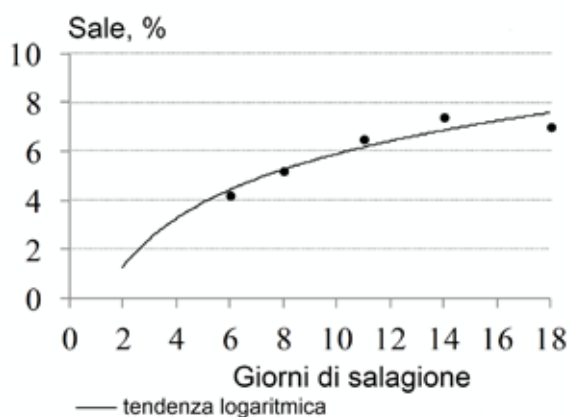


Figura 2: Contenuto di sale nel “kraški pršut” in base alla durata della salagione

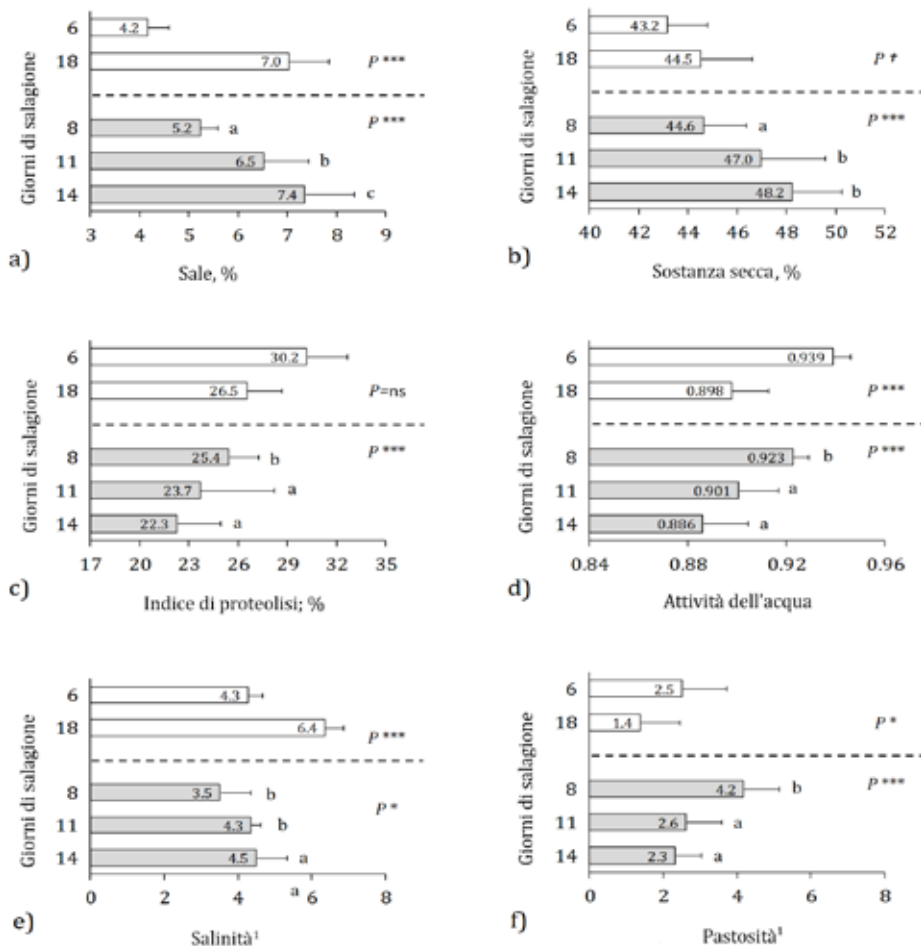


Figura n. 3: Impatto della durata di salagione sulle caratteristiche (del "kraški pršut".¹ valutazione sensoriale (scala non strutturata); ■ esperimento n. 1, □ esperimento n. 2. La significatività statistica dell'effetto della durata di salagione su una determinata caratteristica è definito da *: ns – non significativo; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,0001$.

Anche se la riduzione del contenuto di sale era attesa, abbiamo comunque ottenuto una riduzione rilevante, specie nel secondo esperimento (salagione di soli 6 giorni) che ha portato a un primo valore di a_w probabilmente troppo alto e, di conseguenza, ad un elevato indice di proteolisi. Da quanto indicato in letteratura (Flores et al., 2013; Desmond, 2006), è possibile ridurre la quantità di sale nei salumi essiccati, dal 30 al 50 %, senza incidere negativamente sulle caratteristiche organolettiche. Tale pratica richiede una buona conoscenza e adattamenti della tecnologia di

lavorazione, affinché si possa garantire un'adeguata stabilità microbiologica e la giusta qualità organolettica del prodotto. Ad esempio, estendendo la fase di riposo a 145 giorni, Schivazappa et al. (2013) hanno ottenuto, alla fine della fase del riposo, la stabilità microbiologica del muscolo BF (i.e. $a_w < 0,96$), sebbene la riduzione di sale fosse pari al 25 %. Nel presente esperimento la fase di riposo non è stata estesa, tuttavia alcuni prosciutti del gruppo con la maggiore riduzione del sale (6 giorni di salagione) hanno dimostrato un valore di a_w superiore agli standard prescritti dal consorzio ($a_w < 0,93$). Il valore di a_w , infatti, è tale da non garantire ancora la completa stabilità del prodotto (Smole, Možina in Bem, 2003).

3.2 Caratteristiche reologiche del prosciutto

In entrambi gli esperimenti è stato rilevato un effetto significativo della durata di salagione sulla maggior parte delle caratteristiche reologiche, stabilite in modo strumentale (Figura n. 4). L'effetto della durata della salagione è stato più marcato nell'esperimento n. 2, mentre nell'esperimento n. 1, con l'eccezione della durezza, sono emerse differenze evidenti solo tra la salagione di 14 e 8 giorni. Il contenuto ridotto di sale nel prosciutto ha comportato un maggiore indice di rilassamento e minori valori di durezza, coesione, gommosità e masticabilità, in accordo con i risultati riscontrabili in letteratura (Toldra, 2002; Ruiz-Ramírez et al., 2006; Benedini et al., 2012). Dai risultati emerge che una struttura più morbida è la conseguenza diretta di un maggiore contenuto di umidità, un ridotto contenuto di sale e di un più alto indice di proteolisi (trattandosi, tra l'altro, anche di decomposizione delle proteine strutturali).

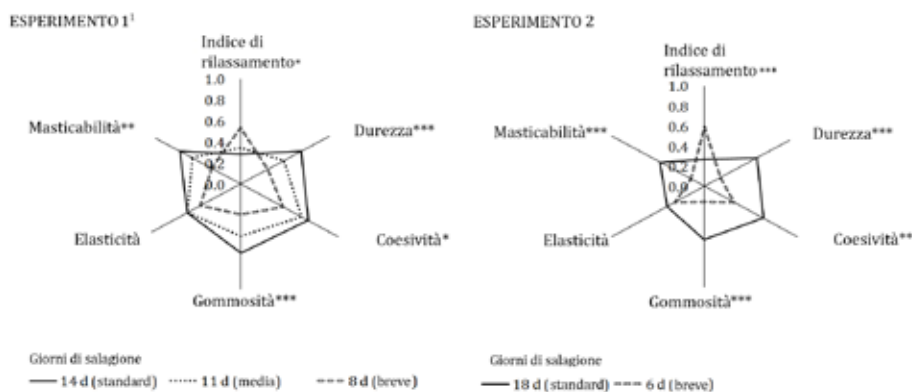


Figura 4: Effetto della durata di salagione sulle caratteristiche reologiche del "kraški pršut" (nella rappresentazione grafica sono stati utilizzati valori normalizzati, proiettati su scala 0-1). ¹ Durante la salagione (tradizionale) di 14 e quella ridotta di 11 giorni non sono state registrate differenze ($P < 0,05$) nelle caratteristiche reologiche con l'eccezione della durezza, che presenta differenze a tutti e tre i livelli di salagione ($P < 0,05$). La significatività statistica della durata della salagione su una determinata caratteristica è definito da *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; *** - $P < 0,0001$.

3.3 Caratteristiche sensoriali del prosciutto

Il gruppo che ha partecipato, nell'esperimento n. 1, al test sensoriale di analisi quantitativa-descrittiva, ha notato differenze nella salinità, dolcezza e pastosità (Figura n. 5). I panelisti hanno notato che i prosciutti con una fase di salagione ridotta, risultavano meno salati (in accordo con l'analisi chimica), più dolci e più pastosi. I valutatori hanno riconosciuto al prosciutto sottoposto ad una salagione di 11 giorni, caratteristiche simili ai prosciutti dalla salagione standard (14 giorni), in termini di salinità e pastosità, mentre la dolcezza era più simile a quella riscontrabile nei prosciutti con una salagione breve (8 giorni). Nell'esperimento n. 2, i panelisti hanno notato, nella maggior parte delle caratteristiche sensoriali studiate, differenze più spiccate tra i gruppi rispetto a quanto riscontrato nell'esperimento 1, ($P < 0,05$) ad eccezione della scioglievolezza. Tale risultato può probabilmente ricondurre a una maggiore proteolisi, soprattutto nei prosciutti meno salati, riscontrata rispetto all'esperimento n. 1.

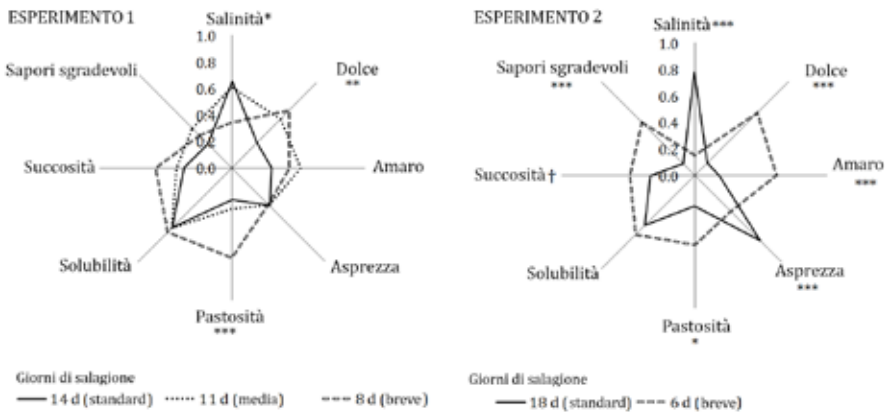


Figura 5: Effetto della durata di salagione sulle caratteristiche organolettiche del "kraški pršut" (nella rappresentazione grafica sono stati utilizzati valori normalizzati, proiettati su scala 0-1). La significatività statistica della durata della salagione su una determinata caratteristica è definito da *, * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,0001$.

I risultati della valutazione sensoriale sono in accordo con i risultati delle analisi chimiche e textuometriche. I prosciutti meno salati si sono rivelati più pastosi e succosi, concordemente con i risultati ottenuti per l'indice di proteolisi e per il contenuto di sostanza secca. Il ridotto contenuto di sale è stato, prevedibilmente, in accordo con la ridotta salinità, la ridotta acidità, nonché con la maggiore dolcezza e amarezza dei prosciutti. I parametri indicati mostrano una maggiore intensità nell'attività enzimatica conseguente alla riduzione del contenuto di sale nel prosciutto. Il gusto del prosciutto, come noto, è influenzato da un aumento della proteolisi, che provoca la decomposizione delle proteine (Toldra e Flores, 1998). I nostri risultati mostrano un'eccessiva attività proteolitica, dovuta

ta a una salinità inferiore che ha comportato, di conseguenza, anche in un gusto sgradevole (amarezza, gusti estranei). Nonostante fosse noto che una forte riduzione del contenuto di sale nell'esperimento n. 2 (per una riduzione totale di 40 %, pari al contenuto finale di 4,2 %) avrebbe avuto un impatto negativo sulla qualità sensoriale del prodotto, fonti bibliografiche (Benedini et al., 2012; Manzocco et al., 2013; Laureati et al., 2014) indicano concentrazioni di sale simili a quelle del presente studio anche in prosciutti a marchio DOP (cioè il contenuto di sale in BF secondo gli standard del consorzio di Parma varia da 4,4 a 6,2 %). Ciò indica che con un corretto adattamento della tecnologia di produzione è possibile ottenere una buona qualità dei prodotti (Schivazappa et al., 2013).

3.4. Studi sui consumatori

Dallo studio sui consumatori (Figura n. 6), nel quale sono stati inclusi i campioni dal gruppo con la salagione standard e quella breve, è emerso che i consumatori distinguono relativamente bene (69 %) il prosciutto di salinità diversa. La maggioranza (65 %) ha riscontrato una maggiore scioglievolezza nei prosciutti con un contenuto di sale inferiore. Inoltre, poco più della metà degli intervistati (53 %), ha preferito il prosciutto meno salato. Non c'è stata una differenza significativa tra donne e uomini per quanto riguarda la percezione della salinità (risultati non tabulati), sebbene le donne percepissero meglio la scioglievolezza rispetto agli uomini (73 % vs. 60 %). In confronto alle donne gli uomini, invece, sembrano aver gradito maggiormente il prosciutto più salato (40 % vs. 30 %).

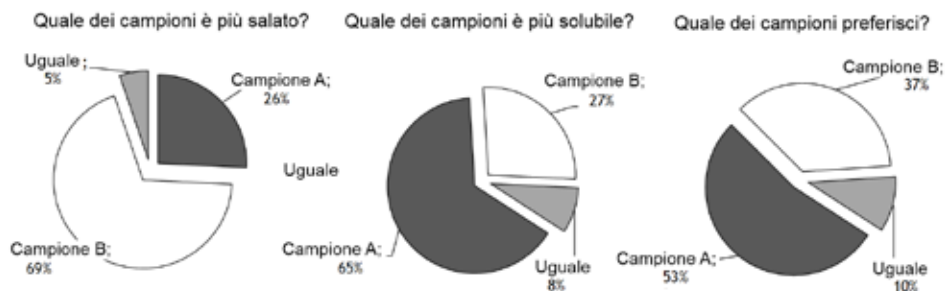


Figura n. 6: I risultati dello studio sui consumatori riguardo alla salinità, la scioglievolezza e l'apprezzamento dei campioni (campione A - salagione breve; campione B - salagione standard).

4. CONCLUSIONE

Gli studi effettuati hanno dimostrato che la riduzione della fase di salagione riduce significativamente il contenuto di sale nel prosciutto, sebbene, per avere un effetto percepibile, bisognerebbe ridurlo drasticamente. I risultati hanno dimostrato un impatto significativo della riduzione di salagione sulla maggioranza delle caratteristiche chimiche, textometriche e sensoriali. Il periodo di salagione più breve (con conseguente minore contenuto di sale), ha avuto un impatto negativo su alcune caratteristiche studiate. Questo dimostra che è stato sfiorato il limite minimo della riduzione della fase di salagione. Se si vuole ottenere un migliore controllo sull'attività dell'acqua (a_w) e sul processo di proteolisi, è necessario adattare anche le altre fasi del processo produttivo (ad. es. estendere la fase di riposo), il che richiede ulteriori studi. Lo studio sui consumatori ha suscitato molto interesse, soprattutto per il risultato relativo alla preferenza verso un prodotto meno salato (anche se esistono alcune differenze tra uomini e donne e tra i diversi gruppi di età). Il dato ottenuto è un'informazione importante e rappresenta un incentivo per i produttori, che dovranno mostrarsi pronti a introdurre cambiamenti nella tecnologia di produzione.

5. RINGRAZIAMENTI

Gli studi sono stati finanziati dal Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013 e cofinanziati dai fondi ARRS (P4-0133; L4-5521). Gli esperimenti sono stati condotti nei prosciuttifici membri del consorzio del "kraški pršut" (KRAS d.d. e Pršutarna Lokev na Krasu d.o.o.), in collaborazione coi loro esperti che ringraziamo per la collaborazione. Ringraziamo inoltre i partecipanti/volontari che hanno partecipato ai test sensoriali di analisi quantitativa-descrittiva.

6. BIBLIOGRAFIA

- Armenteros M., Aristoy M.C., Barat J.M., Toldrá F., 2009a. Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. *Food Chem.* 117, 627-33.
- Armenteros M., Aristoy M.C., Barat J.M., Toldrá F., 2009b. Biochemical and sensory properties of dry-cured loins as affected by partial replacement of sodium by potassium, calcium and magnesium. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9699-705.
- Benedini R., Parolari G., Toscani T., Virgili R., 2012. Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content. *Meat Sci.* 90, 431-7.
- Čandek-Potokar M., Arh M., 2004. Evaluating market prospects for Prekmurje dry ham in relation to consumption characteristics of dry meat products in Slovenia. *Options Méditerranéennes* 76, 327-32.

- Čandek-Potokar M., Škrlep M., 2012. Factors in pig production that impact the quality of dry-cured ham: a review. *Animal* 6(2), 327-38.
- De Angelis M., 2012. Parma ham. Well being and diet: nutritional values. Consortium del Prosciutto di Parma: 33 p. <http://www.prosciuttodiparma.com/pdf/Parma%20Ham%20Wellbeing%20and%20diet.pdf> (11.7. 2014)
- Desmond E., 2006. Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci.* 74, 188-96.
- EC 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union, L404: 9-25
- Flores M., Olivares A., Corral S., 2013. Health trends affect the quality of traditional meat products in Mediterranean area. *Acta Agriculturae Slovenica, Suppl.* 4, S183-8.
- Gou P., Guerrero L., Gelabert J., Arnau J., 1996. Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented asusages and dry-cured pork loin. *Meat Sci.* 42, 37-48.
- Guàrdia M.D., Guerrero L., Gelabert J., Gou P., Arnau J., 2006. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Sci.* 73, 484-90.
- ISO 6496. Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content. 1999: 1-7
- ISO 5983-1. Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. Part 1: Kjeldahl method. 2005: 1-10
- Laureati M., Buratti S., Giovanelli G., Corazzin M., Lo Fiego D., Pagliarini E., 2014. Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Sci.* 96, 288-94.
- Manzocco L., Anese M., Marzona S., Innocente S., Lagazio C., Nicoli M.C., 2013. Monitoring dry-curing of S. Daniele ham by magnetic resonance imaging. *Food Chem.* 141, 2246-52.
- Parma ham– specifications. http://www.prosciuttodiparma.com/en_UK/consortium/specifications (14.8.2014)
- Parolari G., Virgili R., Schivazappa C., 1994. Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Sci.* 38(1), 117-22.
- Picouet P., Gou P., Fulladosa E., Santos-Gracés E., Arnau J., 2012. Estimation of NaCl diffusivity by computer tomography in the Semimembranosus muscle during salting of fresh and frozen/thawed hams. *LWT – Food Sci. Technol.* 51, 275-80.
- Ruiz-Ramírez J., Arnau J., Serra X., Gou P., 2006. Effect of pH₂₄, NaCl content and proteolysis index on the relationship between water content and texture parameters in *biceps femoris* and *semimembranosus* muscles in dry-cured ham. *Meat Sci.* 72, 185-194.
- Ruusunen M., Puolanne E., 2005. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci.* 70(3), 531-41.
- Sárraga C., 1992. Meat proteinases and their relation with curing. In: New technologies for meat and meat products. Smulders F.J.M., Toldrá F., Flores J., Prieto M. (eds.). Nijmegen, Audet Tijdschriften BV: 233-46.
- Scolari G., Sarra P.J., Baldini P., 2003. Mikrobiologija suhega mesa. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B, Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo, 351-62.

- Schivazappa C., Pinna A., Virgili R., 2013. Effect of salt reduction on the length of the resting stage of Italian typical dry-cured ham. *Acta agriculturae Slovenica, Suppl. 4*, S189-92.
- Smole Možina S., Bemž., 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B, Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo, 47-86.
- Škrlep M., Čandek-Potokar M., Žlender B., Robert N., Santé-Lhoutellier V., Gou P., 2012. PRKAG3 and CAST genetic polymorphisms and quality of dry-cured hams – III. Associations in Slovenian dry-cured ham Kraški pršut and their dependence on processing. *Meat Sci. 92(4)*, 360-5.
- Toldrá F., Etherington E., 1988. Examination of cathepsin B, cathepsin D, cathepsin H and cathepsin L activities in dry cured hams. *Meat Sci. 23(1)*, 1-7.
- Toldra F., Flores M., 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Crit. Rev. Food Sci. 38(4)*, 331-52.
- Toldrá F., 2002. Dry-cured meat products. Trumbull, Food & Nutrition Press Inc.: 244 p.



Kmetijski
inštitut
Slovenije



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE



ZDRUŽENJE



KONZORCIJ
KRAŠKIH
PRIDELOVALCEV
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. Project funded under the Cross-Border Cooperation Programme Italy-Slovenia 2007-2013 by the European Regional Development Fund and national funds.



REPUBLIKA SLOVENIJA
**SLUŽBA VLADE REPUBLIKE SLOVENIJE ZA RAZVOJ
IN EVROPSKO KOHEZIJSKO POLITIKO**



Ministero dell'Economia
e delle Finanze