

Sintesi dei composti fenolici nell'uva: peculiarità del Sangiovese⁽¹⁾

Accademico prof. R. Di Stefano
rocco.distefano@tin.it

Malgrado i notevoli progressi compiuti nel campo della biosintesi dei composti fenolici dell'uva (Jeong *et al.*, 2006) non sono stati ancora chiariti i motivi per cui la sintesi delle diverse classi di polifenoli proceda in modo diverso (più propriamente con una cinetica diversa) sia nelle diverse cultivar (Mattivi *et al.*, 1990), sia nei diversi organi della vite (Di Stefano e Maggiorotto, 1995). In riferimento ai composti in questione, la cultivar Sangiovese rappresenta un caso a parte, differenziandosi sensibilmente dalle cultivar comunemente impiegate a livello nazionale ed internazionale per la produzione di vini rossi. Benché alcuni (forse fra i più importanti) aspetti della composizione delle uve di questa cultivar rimangano ancora poco definiti, è possibile, da quanto noto, programmare processi di vinificazione mirati ad ottenere livelli qualitativi elevati.

L'esame di alcuni aspetti della biosintesi dei composti fenolici nell'uva servirà a comprendere, se pure in modo incompleto e a volte ipotetico, le peculiarità del Sangiovese.

Evoluzione delle diverse classi di composti fenolici nell'acino d'uva:

Gli eventi connessi con la sintesi dei polifenoli durante la maturazione dell'uva possono essere così riassunti:

- gli acidi idrossicinnamici legati all'acido tartarico (HCTA), un flavonolo (quercetina-3-glucuronide) e le proantocianidine sono già presenti nei bottoni fiorali e nei fiori;
- la sintesi degli HCTA a livello di polpa (in cui prevale l'acido caffeil tartarico, CTA, mg/L di succo), e di buccia (in cui può prevalere il CTA o l'acido p-cumaril tartarico, p-CuTA, mg/acino), probabilmente, continua fino alla fase verde, poi i contenuti di questi acidi subiscono una lenta diminuzione che continua fino alla raccolta (risultati non pubblicati). Tale diminuzione può essere dovuta all'aumento del volume dell'acino, a reazioni di degradazione o al loro impiego come intermedi nella sintesi di altri polifenoli. Non si può escludere, tuttavia, che i processi di sintesi, se attivi, non siano in grado di compensare quelli che portano alla diminuzione del contenuto di questi composti;
- il tenore in proantocianidine della buccia sembra diminuire da prima dell'invasatura alla raccolta (Hanlin e Downey, 2009). Anche per questi composti, non si può escludere una continuazione della

(1) Lavoro presentato alla Tornata dell'Accademia Italiana della Vite e del Vino, tenuta a Siena in data 11 giugno 2011.

sintesi e che la diminuzione osservata sia solo apparente, in quanto la risposta alle reazioni impiegate per la loro determinazione (trasformazione in antocianidine per riscaldamento in ambiente acido, grado di polimerizzazione medio, reazione con proteine) varia al variare della loro struttura (risultato delle reazioni che avvengono durante il processo di maturazione). Qualcuna di queste reazioni sarà oggetto di ipotesi più avanti. Il rapporto (-)-epigallocatechina/(-)-epicatechina e il grado di polimerizzazione medio apparente delle proantocianidine subiscono scarse variazioni (una modesta diminuzione) dalla fase verde alla raccolta (Hanlin e Downey, 2009). Si ritiene possibile, soprattutto nell'ultima fase della maturazione, la combinazione delle proantocianidine con sostanze non fenoliche, con antociani e il loro coinvolgimento in reazioni di ossidazione (RAS, H₂O₂). Le modalità con cui avviene la sintesi delle proantocianidine resta ancora ipotetica (Xie e Dixon, 2005);

- il contenuto in flavanoli complessivi (monomeri, oligomeri e polimeri) estraibili dai semi dell'uva con solventi o con tamponi ad elevato tenore in SO₂, generalmente, aumenta dalla fase verde all'invasatura e, in certe condizioni ambientali, anche oltre; poi subisce una sensibile diminuzione che riguarda soprattutto i flavanoli monomeri che non può essere imputata alla diminuzione assoluta di questi composti ma a reazioni che avvengono a loro carico durante la maturazione del seme e che ne condizionano l'estraibilità. Si tratta, probabilmente di reazioni di ossidazione radicaliche (Kennedy et al., 2000) con formazione di chinoni che potrebbero reagire, oltre che con gli altri flavanoli, anche con le strutture proteiche e polisaccaridiche presenti. I complessi formati sarebbero insolubili;

- la sintesi della quercetina-3-glucuronide, generalmente, si conclude intorno o poco dopo l'invasatura. Pur presente nell'acino verde, la sintesi vera e propria della quercetina-3-glucoside inizia in prossimità dell'invasatura, prima della miricetina-3-glucoside, ma si conclude prima di quest'ultima e prima della raccolta (risultati non pubblicati). La sintesi dei flavonoli richiede l'esposizione diretta o indiretta alla luce del sole (Haselgrove et al., 2000; Spayd et al., 2002; Downey et al., 2004). Negli acini oscurati la sintesi inizia con molto ritardo ed è molto più lenta (risultati non pubblicati). In condizioni di temperatura elevata sembra che anche questi composti subiscano degradazione (risultati non pubblicati);

- la sintesi degli antociani inizia in prossimità dell'invasatura. Il loro tenore complessivo aumenta rapidamente a partire da questo evento per poi proseguire più lentamente fino alla raccolta. In certi ambienti, da uno stadio più o meno avanzato della maturazione, sembra subire un arresto e poi una diminuzione, soprattutto se le temperature durante tale periodo sono elevate (Mori et al., 2007). Considerato che i geni coinvolti nella biosintesi dei polifenoli continuano ad essere espressi anche quando le temperature ambiente o dell'acino sono elevate e che, di conseguenza, anche in queste

condizioni la sintesi degli antociani è possibile, è stato riportato (Mori et al., 2007) che la diminuzione osservata è il frutto di reazioni di degradazione, la cui natura (se idrolitiche o di ossidazione) non è stata precisata, se queste superano la sintesi. Durante la maturazione, in condizioni climatiche favorevoli (temperature non eccessivamente alte, sensibile escursione termica, nelle uve a prevalenza di antociani triossigenati nell'anello laterale, si osserva un incremento delle percentuali della malvidina-3-glucoside e dei suoi derivati acilati (p-cumarati in particolare) e un decremento dei diossigenati e degli altri triossigenati. Il tenore in antociani delle uve, pertanto, è sensibilmente condizionato dalle variabili climatiche (luminosità, temperatura,), ambientali e colturali.

Aspetti biosintetici che condizionano la composizione dei polifenoli dell'uva.

Dalla fioritura all'invasatura, generalmente, nelle diverse parti dell'acino, predomina la via biosintetica dei flavonoidi diossigenati all'anello laterale (via della diidroquercetina). La (-)-epicatechina, infatti, è il monomero di estensione più rappresentato delle proantocianidine delle bucce. In certe cultivar (Shiraz e Cabernet Sauvignon) e in certi ambienti (dell'Australia) (Hanlin e Downey, 2009), nello stesso periodo fisiologico, è risultata importante, fino a prevalere, la via dei flavonoidi triossigenati all'anello laterale (via della diidromiricetina) da cui hanno origine le prodelfinidine (i cui monomeri di estensione sono rappresentati soprattutto da (-)-epigallocatechina). Anche per i flavonoli l'inizio della sintesi della quercetina (diossigenata) avviene prima della miricetina (triossigenata). È dall'invasatura che nella maggior parte delle cultivar (soprattutto in quelle a prevalenza di antociani triossigenati) la via dei flavonoidi triossigenati prevale su quella dei diossigenati che può diventare marginale anche nel caso dei flavonoli (risultati non pubblicati). In certe cultivar, tuttavia, anche dopo l'invasatura, la via dei flavonoidi diossigenati prevale su quella dei triossigenati. Fra i due estremi (netta prevalenza della via dei diossigenati o dei triossigenati), si collocano cultivar in cui entrambe le vie sono importanti dopo l'invasatura. È il caso del Sangiovese i cui antociani sono costituiti da percentuali abbastanza simili dei 3-glucosidi della cianidina, della peonidina, della delfinidina, della petunidina e della malvidina (in ordine di idrossilazione e di metilazione) (fig. 1). Inoltre, nelle cultivar in cui le percentuali degli antociani diossigenati superano o sono simili a quelle dei triossigenati, le percentuali complessive dei derivati acetati e p-cumarati (acilati) degli antociani è sempre molto bassa (nel Sangiovese di solito, non raggiunge 5% del totale). Le cultivar in cui prevale la via dei flavonoidi triossigenati, generalmente, tendono a sintetizzare quantità di antociani più elevate delle cultivar in cui prevale la via dei diossigenati (es., Cabernet Sauvignon, alto produttore, Nebbiolo, medio produttore di antociani). I flavonoli mostrano lo stesso trend degli antociani: nelle cultivar in

cui prevale la via dei triossigenati: la miricetina-3-glucoside verso la fine della maturazione, può prevalere sulla quercetina-3-glucoside e sulla quercetina-3-glucuronide. Non sono note le percentuali della (-)-epigallocatechina e della (-)-epicatechina delle proantocianidine delle bucce di Sangiovese. Sulla base delle poche notizie riportate in letteratura, si può prevedere che la composizione in monomeri costitutivi delle proantocianidine dei semi, a differenza di quelli delle bucce, non presenti differenze sensibili nelle diverse cultivar (assenza di triossigenati, percentuale importante di (+)-catechina e di (-)-epicatechina gallato, oltre che di (-)-epicatechina fra i monomeri costitutivi e di (-)-epicatechina gallato e (-)-epicatechina, oltre che di (+)-catechina, fra i monomeri terminali). Il grado di polimerizzazione medio delle proantocianidine dei semi riportato in letteratura (Hanlin e Downey, 2009), determinato per floroglucinolisi, si è dimostrato privo di significato alla luce delle ricerche più recenti (risultati non pubblicati).

Più che nelle cultivar a prevalenza di antociani triossigenati, nelle cultivar in cui prevale la via dei flavonoidi diossigenati la biosintesi dei polifenoli si rivela condizionata in quantità e in profilo dalle variabili ambientali, climatiche e colturali. Questo implica una più attenta scelta del livello produttivo e delle variabili colturali per realizzare una composizione fenolica idonea alla produzione di vini di qualità. I motivi delle differenze biosintetiche fra le due classi estreme e intermedie di cultivar (sulla base della sintesi dei flavonoidi diossigenati e triossigenati), non sono noti. Sulla base di quanto riportato in letteratura, come sopra accennato, si può ipotizzare che la via dei flavonoidi diossigenati sia la favorita in tutte le classi di cultivar prima dell'invasatura, quando è ancora attiva la sintesi delle proantocianidine nelle bucce e sia meno favorita della via dei flavonoidi triossigenati dall'invasatura alla maturazione quando è attiva la sintesi degli antociani e dei flavonoli glucosilati. Nelle cultivar in cui, anche dopo l'invasatura, la via dei diossigenati è più attiva di quella dei triossigenati pare evidente che, in quanto la via dei diossigenati è meno favorita in questo periodo, il contenuto assoluto di antociani sarà potenzialmente più basso e il profilo antocianico potrà subire variazioni rispetto a quello standard, soprattutto in corrispondenza di stress durante l'invasatura, quando la velocità di sintesi delle molecole diossigenate in queste cultivar dovrebbe superare quella delle triossigenate. Anche nel Sangiovese, cultivar intermedia, questi fenomeni possono assumere particolare rilevanza e render conto della variabilità nel contenuto assoluto di metaboliti fenolici sintetizzati che si osserva in pratica al variare delle condizioni ambientali, climatiche e colturali. Sebbene cultivar intermedia, a differenza di quelle in cui prevale la sintesi degli antociani diossigenati, il Sangiovese possiede una buona tendenza alla sintesi degli antociani, anche se sensibilmente inferiore a quella del Cabernet Sauvignon.

La composizione delle proantocianidine della buccia rappresenta un altro fattore che condiziona le reazioni che durante il processo di maturazione contribuiscono alla diminuzione dell'astringenza dei

tannini. La classe biosintetica a cui appartengono le uve (ad alto rapporto (-)-epigallocatechina/(-)-epicatechina come il Cabernet Sauvignon o viceversa come presumibilmente il Sangiovese), sicuramente, gioca un ruolo importante a tale riguardo. Benché le prodelfinidine (le proantocianidine costituite da (-)-epigallocatechina), potenzialmente, siano più astringenti delle procianidine (le proantocianidine costituite da (-)-epicatechina) a causa della maggior possibilità che i tre gruppi –OH degli anelli laterali offrono al legame con le proteine, la loro maggiore ossidabilità le rende più adatte alla formazione di orto-chinoni per le reazioni di ossidazione che hanno luogo nel corso della maturazione (produzione di H₂O₂). Questi possono essere ridotti nuovamente a fenoli per reazione con peptidi contenenti gruppi –SH liberi con formazione di derivati meno astringenti dei tannini da cui derivano. Tale ipotesi, supportata in via ipotetica da lavori sui meccanismi di detossificazione che le cellule utilizzano (Muzolf-Panek et al., 2008), spiegherebbe perché è più facile ottenere vini poco astringenti da uve con percentuali importanti di prodelfinidine (Shiraz, Cabernet Sauvignon,) e perché, inversamente, è difficile ottenere vini poco astringenti da uve a presumibile prevalenza di procianidine.

Influenza del processo di vinificazione

Il processo di vinificazione e il risultato delle vinificazioni sono fortemente condizionati dalla struttura e dai profili delle diverse classi di composti fenolici presenti nelle uve. La fase prefermentativa si rivela particolarmente critica in quanto allo schiacciamento dell'acino iniziano i processi di ossidazione enzimatica catalizzati dalle polifenolossidasi (PPO). I substrati di questi enzimi (gli HCTA) vengono ossidati a orto-chinoni, reattivi elettrofili, che subiscono riduzione a fenoli per reazione con glutazione ridotto (G-SH, agente nucleofilo) o con antociani sotto forma carbinolo e flavanoli. Nel primo caso si forma l'acido 2-S-glutationil caffeil tartarico, nel secondo derivati simili (soprattutto con la malvidina) o orto chinoni degli antociani e dei flavanoli che possono originare polimeri bruni o reagire con reattivi nucleofili ritornando a fenoli. Nel Sangiovese, come in tutte le cultivar con percentuali sensibili di antociani diossigenati, le possibilità di ossidazione degli antociani sono sensibili in quanto l'elevata velocità di diffusione dalle bucce al mosto porta i diossigenati ad essere presenti nel mosto quando è massima l'attività delle PPO. La malvidina-3-glucoside la cui velocità di diffusione segue da vicino quella dei diossigenati, come sopra accennato, viene meno coinvolta nelle reazioni di ossidazione catalizzate dalle PPO e forma con gli intermedi di ossidazione pigmenti dal colore rosso con tonalità porpora. I 3-glucosidi della delphinidina e della petunidina, che potenzialmente possono formare orto chinoni, sono meno coinvolti degli antociani diossigenati nelle reazioni di ossidazione in quanto la loro velocità di diffusione è più bassa a causa del maggior numero di sostituenti e di –OH nell'anello laterale. Per

queste trasformazioni che in parte continuano all'inizio e durante la fermentazione il profilo antocianico del vino derivato dalle cultivar a prevalenza di molecole diossigenate (diversamente da quello delle cultivar a prevalenza di triossigenate) può differire notevolmente da quello dell'uva. Generalmente, nel Sangiovese, nel passaggio da uva a vino, la percentuale della malvidina aumenta sensibilmente e altrettanto sensibilmente diminuiscono le percentuali dei 3-glucosidi della cianidina e della peonidina (fig. 2). Le percentuali dei 3-glucosidi della delphinidina e della petunidina, per quanto sopra riportato, subiscono più modeste variazioni. È prevedibile che anche le percentuali dei derivati acilati, in particolare dei derivati p-cumarati diminuiscano in quanto questi ultimi sono meno estraibili e in quanto i corrispondenti derivati della cianidina e della peonidina eventualmente estratti in fase prefermentativa vengono coinvolti nelle reazioni di ossidazione. I lieviti contribuiscono alla diminuzione degli antociani meno estraibili (3-glucosidi della delphinidina e della petunidina, derivati p-cumarati) che vengono maggiormente trattenuti dalle strutture delle membrane e delle pareti. Il profilo antocianico che il vino possiede alla fine della fermentazione alcolica non subisce variazioni sensibili in maturazione. La fermentazione malolattica può indurre la diminuzione della percentuale dei derivati p-cumarati o del tenore complessivo in antociani ma non sembra avere influenza rilevante sul profilo antocianico. La natura dei pigmenti antocianici che si formano durante il processo di maturazione del vino dipende dalle modalità con cui esso è stato condotto: se con o senza contatto con l'ossigeno (a parte quello assorbito durante i travasi). La struttura dei tannini (proantocianidine) è condizionata più dalla cultivar (rapporto epigallocatechina/epicatechina) e dal processo di maturazione del vino che dai processi prefermentativo e fermentativi. È durante il processo di maturazione dell'uva che si può realizzare un abbattimento più o meno sensibile dell'astringenza dei tannini, altrimenti questo obiettivo deve essere raggiunto in maturazione e affinamento del vino. Non è ancora stata proposta una tecnica di maturazione che consenta di risolvere in tutti i casi il problema dell'abbattimento dell'astringenza dei vini. Le cose si complicano quando insieme alle proantocianidine astringenti sono presenti catechine monomere derivate principalmente dai semi non maturi. È più difficile correggere il sapore amaro comunicato da queste ultime ai vini che l'astringenza dei tannini. Le più recenti acquisizioni sulle reazioni che avvengono a carico delle proantocianidine delle bucce durante la maturazione dell'uva indicano che bisogna cercare di imitarle per realizzare un efficiente abbattimento dell'astringenza dei tannini dei vini (deduzioni personali). A causa della scarsa conoscenza delle prime, tuttavia, non sono state ancora proposte tecniche per realizzare questo obiettivo.

Conclusioni

Da quanto sopra esposto, si deduce che l'uva Sangiovese possiede una composizione antocianica intermedia fra le uve in cui prevalgono le molecole triossigenate o diossigenate. Malgrado la struttura delle proantocianidine della buccia, come per la maggior parte delle cultivar, sia ancora da definire, si è ipotizzato che fra i monomeri di estensione di questi polimeri fenolici la (-)-epicatechina superi sensibilmente la (-)-epigallocatechina, che tale composizione renda più difficile la diminuzione dell'astringenza dei tannini della buccia durante il processo di maturazione dell'uva e che per conseguire questo obiettivo occorra raggiungere livelli di maturità elevati o impiegare a livello di vino tecniche di maturazione che simulino quanto avviene nell'uva in prossimità della maturità. La presenza di percentuali elevate di antociani che, potenzialmente, possono essere coinvolti nelle reazioni di ossidazione catalizzate dalle PPO dell'uva in fase prefermentativa e fermentativa, rende d'altra parte necessaria l'applicazione di tecniche di vinificazione che minimizzino l'effetto di tali reazioni per l'influenza negativa che esse hanno sul tenore complessivo degli antociani del vino. Tali peculiarità compositive, accoppiate alla sensibilità della cultivar in questione alle variabili climatiche, ambientali e colturali, infine, indicano che proprio nella vinificazione delle uve Sangiovese l'applicazione delle conoscenze chimiche, biochimiche e molecolari più recenti possano portare a risultati qualitativi ottimali.

Bibliografia

Calò A., Tomasi D., Cravero M.C., Di Stefano R. –1994- Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*vitis* sp.) attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamiltartarici della buccia di varietà a bacca rossa. Riv. Vitic. Enol., (47:3), 13-25

Di Stefano R., Maggiorotto G. –1995- Antociani, acidi idrossicinnamici e flavonoli del frutto, delle foglie, dei raspi e dei tralci della vite. Riv. Vit. Enol. (48:2), 51-65

Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. –2004- The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. Australian Journal of Grape and Wine Research, **10**, 55–73.

Hanlin R.L., Downey M.O. –2009- Condensed tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. Am. J. Enol. Vitic., (60:1), 13-23

Haselgrove L., Botting D., van Heeswijck R., Høj P.B., Dry P.R., Ford C., Iland P.G. –2000- Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolic

composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries. Australian Journal of Grape and Wine Research, **6**, 141–149.

Jeong S.T., Goto-Yamamoto N., Hashizume K., Esaka M. –2006- Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). Plant Science, **170**, 61-69

Kennedy J. A., Troup J.G., Pilbrow J.R., Hutton D. R., Hewitt D., Hunter C. R., Ristic R, Iland P. G., Jones Graham P. –2000- Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. Australian Journal of Grape and Wine Research, **6**, 244–254.

Mattivi F., Scienza A., Failla O., Vika P., Anzani R., Redesco G., Gianazza E., Righetti P. –1990- A chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Vitis* (special issue), 119-133.

Mori K., Goto-Yamamoto N., Kitayama M., Hashizume K. –2007- Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. J. of Experimental Botany. (58:8), 1935-1945

Muzolf-Panek M., Gliszczyn´ska-S´ wigło A., de Haan, L., Aarts J. M. M. J. G., Szymusiak, H. Vervoort J. M., Tyrakowska B., Rietjens I. M. C. M. –2008- Role of Catechin Quinones in the Induction of EpRE-Mediated Gene Expression. Chem. Res. Toxicol., **21**, 2352–2360

Spaid S.E., Tarara J.M., Mee D.L., Ferguson J.C. 2002- Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. Am. J. Enol. Vitic., (53:3), 171-182

Xie De-Y., Dixon R.A. –2005- Proanthocyanidins biosynthesis – Still more questions than answers. Phytochemistry, **66**, 2127-2144