

## Quercetina in uve e vini Sangiovese: effetto della defogliazione precoce e dei lieviti coinvolti nella fermentazione alcolica

Yuri Romboli<sup>1</sup>, Martina Galardi<sup>1</sup>, Giacomo Buscioni<sup>1,2</sup>, Silvia Mangani<sup>1,2</sup>, Eleonora Mari<sup>1</sup>, Lisa Granchi<sup>1</sup> e Massimo Vincenzini<sup>1</sup>

(1) Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Sez. di Microbiologia, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Italia.

(2) FoodMicroTeam, spinoff of the Università degli Studi di Firenze, Via di Santo Spirito 14, 50125 Firenze, Italia.  
e-mail: yuri.romboli@unifi.it

### Introduzione

I flavonoli sono composti fenolici presenti nelle uve che vengono sintetizzati ed accumulati nelle bucce principalmente in risposta alla radiazione UV (Keller., 2010). La quercetina ed i suoi derivati glicosidici rappresentano i flavonoli più abbondanti nei vini prodotti da uve Sangiovese. Oltre a possedere una ben nota attività antiossidante (Russo et al., 2012), la quercetina concorre nella definizione del colore dei vini, interagendo con gli antociani e dando luogo al fenomeno della copigmentazione (Boulton, 2001). La quercetina però, può essere responsabile anche dell'intorbidamento del vino, con un conseguente depauperamento qualitativo del prodotto e l'insorgenza di problematiche a livello commerciale (Somers e Ziemelis, 1985). Il precipitato che si ritrova nei vini è principalmente costituito dalla forma agliconica della quercetina, che presenta una minore solubilità in vino rispetto ai rispettivi derivati glicosidici. La quercetina aglicone non è presente nelle uve ma si forma durante il processo di vinificazione a seguito dell'idrolisi del legame glicosidico, che può avvenire sia per via chimica che enzimatica (Castillo-Muñoz et al., 2007). In questo senso, i microrganismi coinvolti nel processo di vinificazione possono concorrere alla liberazione della quercetina aglicone in funzione delle loro diverse attività glicosidasiche (Terrier et al., 2009).

Le dinamiche e i fattori che causano l'intorbidamento in seguito alla precipitazione di quercetina non sono ancora ben noti. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto della defogliazione precoce e dei diversi lieviti coinvolti nella fermentazione alcolica sul contenuto di quercetina nelle uve e nei vini Sangiovese. In particolare, la defogliazione è stata condotta in diverse fasi fenologiche della pianta e a diversi livelli di intensità mentre la fermentazione alcolica è stata indotta, in condizioni di laboratorio, mediante inoculo di due ceppi commerciali di *Saccharomyces cerevisiae* e con inoculo sequenziale di un ceppo di *Starmarella bacillaris* e un ceppo di *S. cerevisiae*.

### Materiali e metodi

La sperimentazione ha avuto luogo presso una Azienda Biologica situata nell'areale di produzione del Chianti DOCG nel comune di Fiesole (FI, Toscana, Italia), durante l'annata 2016 in un vigneto impiantato nel 1988 con *Vitis vinifera* L. cv Sangiovese, clone F9. L'impianto presenta un'altitudine di circa 150 m s.l.m. su terreno pianeggiante e prevalentemente argilloso, orientamento dei filari NE/SW e forma d'allevamento cordone speronato (90 cm di altezza da terra) con sesto di 2,5m x 1m.

Il piano sperimentale, riportato nella tabella 1, ha preso in considerazione due filari adiacenti del vigneto nei quali sono stati individuate, per ogni filare, 5 parcelle (12 piante ciascuna). In 4 di esse la defogliazione basale è stata eseguita in due diversi momenti, fioritura (DF) ed allegagione (DA), a due diversi gradi di intensità, fino al terzo (-) e fino al quinto nodo (+). La quinta parcella è stata lasciata come controllo non defogliato (CND). La defogliazione in fioritura è stata effettuata il 27/05/16 (DOY 148), mentre la defogliazione in allegagione il 14/06/2016 (DOY 166). In tutte le parcelle sono stati eseguiti gli interventi agronomici ed i trattamenti fitosanitari come di consueto, seguendo le pratiche ammesse in Agricoltura Biologica.

Tabella 1. Piano sperimentale: parcelle sottoposte a defogliazione basale alla fioritura o all'allegagione (DF e DA) a due diverse intensità (+ e -) e parcella controllo non defogliato (CND).

	Fase fenologica		Intensità della defogliazione basale	
	Fioritura	Allegagione	Fino al 3° nodo	Fino al 5° nodo
CND	-	-	-	-
DF+	X	-	-	X
DF-	X	-	X	-
DA+	-	X	-	X
DA-	-	X	X	-

In prossimità della vendemmia (22/09/2016, DOY 266) sono stati eseguiti dei campionamenti nelle parcelle sperimentali per determinare il grado di maturità tecnologica e fenolica, il peso delle bacche ed i contenuti in flavonoli delle uve. Pertanto, è stato determinato il contenuto zuccherino (rifrattometria), l'acidità totale (titolazione acido-base) ed il pH (OIV, 2015). La maturità fenolica dei campioni è stata valutata secondo il metodo di Saint-Cricq De Gaulejac et al. (1998), determinando di antociani potenziali, antociani estraibili, e ricchezza fenolica totale (RPT). Per la determinazione del contenuto in flavonoli, sono stati raccolti in maniera randomizzata 20 acini per ogni prova in duplicato. Successivamente, dalle 20 bacche sono state separate le bucce, i semi e la polpa. Le bucce sono state asciugate con carta assorbente e pesate. L'estrazione dei composti fenolici dalle bucce degli acini è stata eseguita secondo il metodo descritto da Montealegre et al. (2006). I flavonoli totali sono stati determinati tramite HPLC-DAD, previa estrazione con dietil etere e etil acetato, secondo quanto descritto da Hernández et al. (2005). I flavonoli sono stati quantificati a 340 nm. Le concentrazioni (mg/L) dei flavonoli glicosidi sono state espresse in equivalenti del corrispondente aglicone.

Le uve impiegate per l'allestimento delle microvinificazioni sono state scelte in base al contenuto in flavonoli totali. In particolare, sono state scelte le uve che hanno mostrato un maggior contenuto in flavonoli in risposta al trattamento di defogliazione effettuato (epoca/intensità). Le uve sono state campionate al grado di maturità ritenuta idonea alla loro vinificazione da parte dell'Azienda (26/09/2016, DOY 270). Nello specifico sono stati campionati 30 grappoli secondo uno schema randomizzato all'interno delle parcelle individuate. Una volta in laboratorio, le uve sono state diraspate manualmente, facendo attenzione a non rompere gli acini, poste in un sacchetto e mescolate delicatamente al fine di ottenere una massa quanto più omogenea possibile. Sono state dunque costituite 6 aliquote da 450g di uva ciascuna. Ogni singola aliquota è stata pigiata manualmente in un sacchetto ed il succo, le bucce e i vinaccioli sono stati trasferiti in una beuta da 500 mL fornita di valvola di Müller.

Le fermentazioni alcoliche dei mosti sono state condotte, in doppio, come di seguito descritto: 2 prove inoculate con solo *Saccharomyces cerevisiae* (2 diversi ceppi commerciali, ENARTIS FERM ES 488 e ES 454); 1 prova di inoculo sequenziale di *Starmarella bacillaris* (ceppo 409, collezione del Dipartimento GESAAF dell'Università di Firenze) seguita da *S. cerevisiae* (ceppo commerciale ES488) inoculato dopo 3 giorni. La densità degli inoculi iniziali è stata di  $2 \times 10^6$  cell/mL considerando una resa in mosto di circa il 70% (ovvero 300 mL da 450 g di uva). Nella prova di inoculo sequenziale, *S. cerevisiae* è stato inoculato con una densità di  $5 \times 10^6$  cell/mL. I mosti sono stati solfitati (30 mg/L  $SO_2$ ), addizionati di nutrienti azotati (in due dosi di 20 g/hL Enartis Nutriferm Special, all'allestimento delle fermentazione e al 3° giorno di fermentazione) e posti in termostato (25-27°C) per la durata di 21 giorni. Ogni giorno è stata controllata la cinetica di fermentazione per via gravimetrica.

La cinetica di crescita dei lieviti durante la FA è stata monitorata con prelievi giornalieri da una stessa replica fino a fase stazionaria di *S. cerevisiae* e al momento della svinatura. L'identificazione delle diverse specie di lievito è stata eseguita mediante amplificazione e restrizione dello spaziatore interno trascritto (RFLP-rITS). Glucosio, fruttosio, etanolo, glicerina, acido acetico nei mosti, nei mosti/vini e nei vini sono stati determinati mediante HPLC (Granchi et al., 1998); l'acidità totale ed il pH sono stati determinati secondo le metodiche OIV (2015). Nei vini alla svinatura, sono stati determinati i parametri intensità colorante, tonalità e indice di polifenoli totali come descritto da

Ribéreau-Gayon et al. (2000b). Infine è stata eseguita la determinazione dei flavonoli per HPLC previa estrazione descritta da Hernández et al. (2005).

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante Statistica software (version 7, StatSoft, Tulsa, OK, USA).

### Risultati e discussione

In tabella 2 vengono riportati i risultati della caratterizzazione del grado di maturità tecnologica e fenolica delle uve campionate in prossimità della vendemmia (DOY 266) dalle diverse parcelle sperimentali sottoposte a defogliazione basale.

*Tabella 1: Parametri di maturità tecnologica e fenolica in prossimità della vendemmia delle uve dalle parcelle sperimentali sottoposte a defogliazione basale alla fioritura o all'allegagione (DF e DA) a due diverse intensità (+ e -) e dalla parcella controllo non defogliato (CND)*

	CND	DF+	DF-	DA+	DA-
Zuccheri (g/L)	255,5	260,5	260,5	236,0	260,5
Acidità totale (g/L)	4,90	5,10	4,60	5,60	5,20
pH	3,29	3,29	3,44	3,31	3,26
Antociani potenziali (mg/L)	1876	2007	1778	1551	1867
Antociani estraibili (mg/L)	1095	1248	1081	917	1089
Ricchezza Fenolica Totale (DO <sub>280</sub> )	68,8	77,6	68,8	62,3	66,2

Ad eccezione delle uve DA+ (defogliazione basale fino al 5° nodo eseguita in allegagione), le uve dalle parcelle sottoposte a defogliazione presentavano valori di zuccheri ed acidità totale in linea con quanto riscontrato nelle uve prelevate dalla parcella controllo non defogliato. Le uve della tesi DF+ (defogliazione basale fino al 5° nodo eseguita in fioritura) si distinguevano dalle altre per valori tendenzialmente più elevati di antociani potenziali e estraibili e per valori maggiori dell'indice di ricchezza fenolica totale.

In tabella 3 vengono riportati i dati relativi alle caratteristiche delle bacche campionate e la composizione delle bucce in termini di contenuto e profilo dei flavonoli. La tabella riporta l'analisi statistica della varianza a una via (one-way ANOVA) per confronto tra tutti i campioni di uva e l'analisi della varianza a due vie (two-way ANOVA) effettuata sulle sole prove da parcelle sottoposte a defogliazione basale per comprendere il peso delle variabili "epoca di defogliazione" (E), "intensità di defogliazione" (I) e la loro interazione (ExI) per i parametri considerati. In tabella, CND: parcella controllo non defogliato; DF+: defogliazione in fioritura dalla base del germoglio fino al 5° nodo; DF-: defogliazione in fioritura dalla base del germoglio fino al 3° nodo; DA+: defogliazione in allegagione dalla base del germoglio fino al 5° nodo; DA-: defogliazione in allegagione dalla base del germoglio fino al 3° nodo.

Tabella 2: Caratteristiche degli acini e contenuto in flavonoli delle uve. Valori espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le medie in una stessa riga seguite da differenti lettere sono significativamente diverse (Tukey test a  $p < 0.05$ ); two-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ns non significativo.

	Tesi					two-way ANOVA		
	CND	DF+	DF-	DA+	DA-	E	I	ExI
Peso unitario acino (g)	2,00 $\pm$ 0,07a	1,70 $\pm$ 0,10b	1,90 $\pm$ 0,04ab	1,98 $\pm$ 0,08a	1,84 $\pm$ 0,02ab	ns	ns	*
Peso unitario buccia (g)	0,39 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01	ns	ns	ns
Rapporto buccia/acino	0,20 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	ns	ns	ns
Flavonoli (mg /g buccia)	0,99 $\pm$ 0,09ab	1,40 $\pm$ 0,08a	1,20 $\pm$ 0,17ab	0,90 $\pm$ 0,07b	0,86 $\pm$ 0,15b	**	ns	ns
Flavonoli (mg/kg uva)	193,6 $\pm$ 16,5b	339,1 $\pm$ 46,1a	259,9 $\pm$ 13,6ab	193,2 $\pm$ 19,5b	188,4 $\pm$ 24,1b	**	ns	ns
Quercetine (mg/kg uva)	157,0 $\pm$ 14,9b	280,8 $\pm$ 35,2a	214,3 $\pm$ 10,4ab	159,7 $\pm$ 15,4b	152,3 $\pm$ 22,5b	**	ns	ns
Profilo dei Flavonoli								
Quercetine (%)	81,1 $\pm$ 0,8	82,9 $\pm$ 0,9	82,5 $\pm$ 0,3	82,7 $\pm$ 0,4	80,7 $\pm$ 1,6	ns	ns	ns
Miricetine (%)	15,2 $\pm$ 1,2	11,8 $\pm$ 0,9	12,6 $\pm$ 0,1	13,4 $\pm$ 0,3	15,5 $\pm$ 2,1	*	ns	ns
Campferoli (%)	3,7 $\pm$ 0,5b	5,3 $\pm$ 0,0a	5,0 $\pm$ 0,4ab	3,9 $\pm$ 0,1ab	3,7 $\pm$ 0,5b	*	ns	ns
Profilo delle quercetine								
Quercetina-3-galattoside (%)	7,3 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,8	6,9 $\pm$ 6,9	ns	ns	ns
Quercetina-3-glucuronide (%)	24,5 $\pm$ 2,1	25,4 $\pm$ 2,2	23,3 $\pm$ 0,2	28,2 $\pm$ 4,1	29,2 $\pm$ 2,6	ns	ns	ns
Quercetina-3-glucoside (%)	68,3 $\pm$ 1,6	67,0 $\pm$ 1,9	69,2 $\pm$ 0,4	65,1 $\pm$ 3,3	63,8 $\pm$ 1,6	ns	ns	ns

Il peso unitario degli acini presentava variazioni statisticamente significative, dovute all'interazione tra epoca e intensità di defogliazione, con valori più bassi nel caso delle uve DF+. Al contrario, il peso unitario delle bucce dei vari campioni, così come il rapporto buccia/acino, non presentavano differenze statisticamente significative, anche se si nota una tendenza a valori più alti nelle uve DF+.

I flavonoli totali e i contenuti in derivati glicosidici della quercetina risultavano influenzati dall'epoca di defogliazione, presentando una maggior concentrazione nelle uve della tesi DF+. Al contrario, le uve delle tesi DA+ e DA- (defogliazione in allegazione) non hanno mostrato differenze significative rispetto alle uve campionate nella parcella non defogliata (CND). Sebbene dall'analisi della varianza a due vie non emerga il ruolo della variabile intensità di defogliazione sui parametri monitorati, è possibile notare come l'esecuzione della defogliazione più intensa in fioritura si traduca in una tendenza verso un maggiore accumulo di flavonoli totali e di derivati glicosidici della quercetina, effetto non riscontrato invece se la defogliazione viene effettuata in allegazione (Tab. 3). I valori di flavonoli totali nelle bucce mostrano lo stesso andamento dei valori di flavonoli totali nell'uva, correlazione già deducibile dal fatto che in tutte le tesi il rapporto buccia/polpa risulta costante, essendo la buccia l'unica parte della bacca in cui si accumulano i flavonoli (Flamini et al., 2013).

Considerando il profilo dei flavonoli, è possibile notare come le uve fossero caratterizzate da una netta prevalenza dei derivati glicosidici della quercetina che rappresentano circa l'80% del contenuto di flavonoli totali, seguiti in ordine di abbondanza da quelli della miricetina e del campferolo. Tale distribuzione è caratteristica delle uve Sangiovese, in accordo con quanto riportato da altri autori (Mattivi et al., 2006). L'abbondanza relativa dei glicosidi della quercetina non presenta differenze statisticamente significative. Al contrario, i derivati glicosidici della miricetina mostrano percentuali tendenzialmente più basse nelle tesi di defogliazione in funzione dell'epoca di defogliazione, come evidenziato dall'analisi della varianza a due vie (two-way ANOVA), mostrando percentuali inferiori nel caso dei trattamenti eseguiti in fioritura (DF+ e DF-). Anche l'accumulo dei glicosidi del campferolo risulta influenzato dall'epoca di defogliazione, presentando percentuali più elevate nei campioni defogliati in fioritura (DF+ e DF-).

In tabella 3 viene inoltre riportata la composizione dei glicosidi della quercetina riscontrati nelle bucce, principalmente rappresentati da quercetina-3-glucoside, quercetina-3-glucuronide e quercetina-3-galattoside. Dall'analisi della varianza non emergono differenze significative nella loro distribuzione percentuale nelle uve campionate nelle diverse parcelle sperimentali.

Come previsto dal piano sperimentale, il campionamento dei grappoli per l'allestimento delle microvinificazioni è stato effettuato nelle parcelle che hanno prodotto uve con il più alto contenuto in flavonoli, ovvero le uve identificate come DF+. Al fine di non alterare la composizione chimica del mosto, in particolare nei riguardi dei composti oggetto di studio, non è stato applicato un trattamento termico ai mosti. Pertanto la naturale microflora dell'uva è stata mantenuta. In particolare, in prossimità della vendemmia, sulle uve, raccolte in perfetto stato sanitario, è stata riscontrata la presenza di lieviti apiculati rappresentati dalla specie *Kloeckera apiculata*, a concentrazioni di poco inferiori a  $10^4$  UFC/mL.

In tabella 4 viene riportata la composizione chimica del mosto al momento dell'allestimento delle microvinificazioni.

*Tabella 3: Caratteristiche chimico-fisiche del mosto di uve Sangiovese*

	Mosto
Glucosio (g/L)	124,5±1.2
Fruttosio (g/L)	137,1±1.1
Acidità totale (g/L)	5,40±0.28
pH	3,37±0.11
Acido malico (g/L)	0,67±0.20
APA (mg/L )	106,4±6.3

In figura 1 vengono riportati gli andamenti fermentativi delle microvinificazioni. In entrambe le fermentazioni condotte con solo *S. cerevisiae* (in figura, ES 488 e ES454), a seguito dell'inoculo, la popolazione si è rapidamente sviluppata, raggiungendo alla fase stazionaria concentrazioni pari a  $9,70 \times 10^7$  UFC/mL nella prova ES 454 e  $7,60 \times 10^7$  UFC/mL nella prova ES 488. Inizialmente, in entrambe le prove sperimentali, è stata riscontrata la presenza di *K. apiculata*, naturalmente presente nel mosto di partenza. In particolare, nella fermentazione ES 454 è stata riscontrata una concentrazione massima di lieviti apiculati di  $1,00 \times 10^4$  UFC/mL al primo giorno di fermentazione (T=1) ma già al secondo giorno la popolazione risultava inferiore al limite di rilevabilità. Nella fermentazione ES 488, la popolazione di *K. apiculata* era numericamente maggiore, raggiungendo una densità cellulare massima pari a  $1,70 \times 10^5$  UFC/mL e poco più persistente, essendo la concentrazione dell'ordine di  $18,0 \times 10^4$  UFC/mL al secondo giorno di fermentazione (t=2).

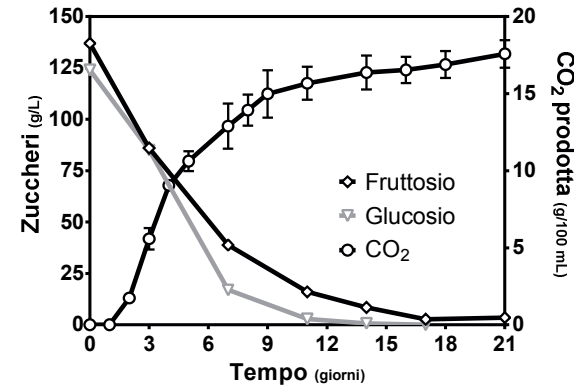
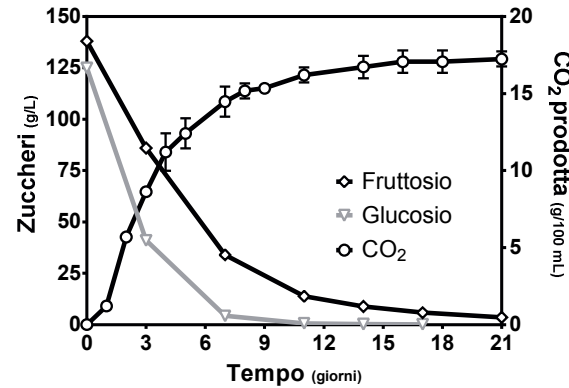
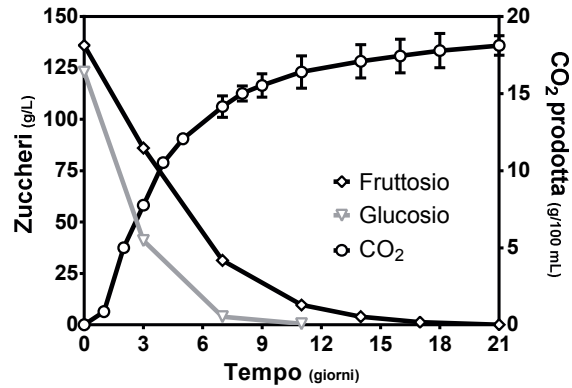
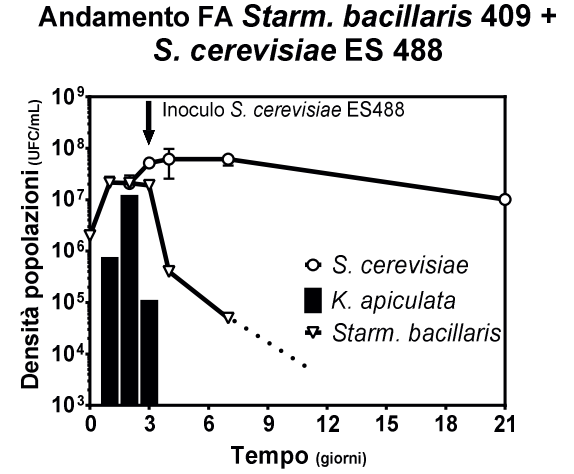
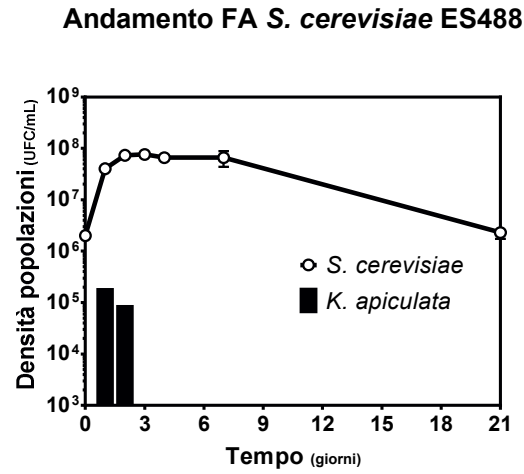
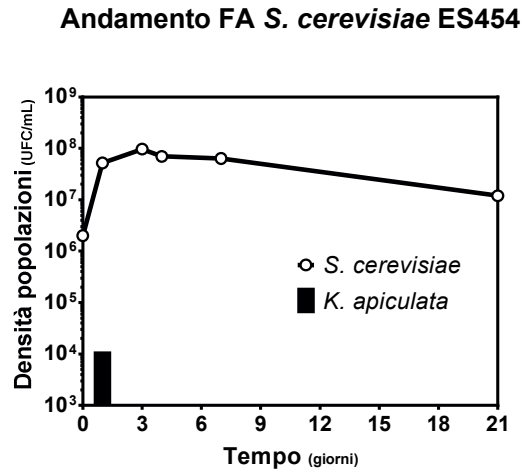


Figura 1. Andamento della fermentazione alcolica nelle microvinificazioni condotte con inoculo di *S. cerevisiae* e con inoculo misto di *Starm. bacillaris* e *S. cerevisiae*. In alto: andamento delle popolazioni di lieviti; in basso: andamento del consumo di zuccheri e della produzione di CO<sub>2</sub>

Nella vinificazione condotta con inoculo sequenziale (figura 1) invece, nella prima fase di fermentazione dopo l'inoculo di *Starm. bacillaris* ceppo 409, è stata rilevata la presenza consistente di *K. apiculata*, che ha raggiunto una concentrazione massima di  $1,10 \times 10^7$  UFC/mL al secondo giorno di fermentazione ( $t=2$ ). Nei due giorni successivi la concentrazione dei lieviti apiculati è diminuita fino a risultare inferiore a concentrazioni dell'ordine di  $10^4$  UFC/mL. Al terzo giorno di fermentazione ( $t=3$ ) la popolazione di *S. cerevisiae* ha preso il sopravvento determinando il declino della popolazione di *Starm. bacillaris* ed ha raggiunto rapidamente una concentrazione di  $6,17 \times 10^7$  UFC/mL. In realtà, la presenza di *S. cerevisiae* è stata rilevata già al secondo giorno di fermentazione ( $t=2$ ), quindi prima dell'inoculo con *S. cerevisiae* ceppo ES 488, avvenuto al terzo giorno di fermentazione ( $t=3$ ). Dunque, la popolazione di *S. cerevisiae* individuata al terzo giorno è verosimilmente rappresentata anche dal *S. cerevisiae* naturalmente presente sulle uve. In ogni caso, la fermentazione sembra sia stata inizialmente condotta da *Starm. bacillaris* e, solo in seguito, sia avvenuto il sopravvento del *S. cerevisiae*. Ciò si deduce dal consumo di fruttosio che è risultato maggiore rispetto al consumo di glucosio nelle prime fasi di fermentazione alcolica (fig. 1), così come dal più lento consumo di glucosio rispetto alle fermentazioni condotte in coltura pura di *S. cerevisiae* (fig. 1). Inoltre, anche l'elevata produzione di glicerina, presente in concentrazione pari a  $14,5 \pm 0,1$  g/L, conferma l'attività di *Starm. bacillaris* (tab. 5).

Alla svinatura, i vini presentavano le caratteristiche mostrate in tabella 5. In tabella, ES 454: fermentazione condotta da *S. cerevisiae*, ceppo commerciale Enartis FERM ES 454; ES 488: fermentazione condotta da *S. cerevisiae*, ceppo commerciale Enartis FERM ES 488; Sb 409: fermentazione svolta con inoculo sequenziale di *Starm. bacillaris* Sb 409 e *S. cerevisiae* Enartis FERM ES 488 (inoculato al 3° giorno).

Le fermentazioni condotte con inoculo di solo *S. cerevisiae* ceppo ES 454 si sono concluse con la completa degradazione degli zuccheri ( $<0,1$  g/L). Per quanto riguarda invece le prove condotte da solo *S. cerevisiae* ceppo ES 488 e quelle con inoculo sequenziale *Starm. bacillaris* ceppo 409 (Sb 409) e *S. cerevisiae* ceppo ES 488 è stato riscontrato un basso residuo zuccherino.

Tabella 5: Caratteristiche chimico-fisiche dei vini sperimentali alla svinatura. Valori espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le medie in una stessa riga seguite da differenti lettere sono significativamente diverse (Tukey test a  $p < 0,05$ ); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ns non significativo.

	ES 454	ES 488	Sb 409	One-way ANOVA
Glucosio (g/L)	<0,1	<0,1	<0,1	-
Fruttosio (g/L)	<0,1	$6,0 \pm 3,5$	$3,5 \pm 2,9$	-
Acidità totale (g/L)	$7,90 \pm 0,14$	$7,45 \pm 0,21$	$7,80 \pm 0,14$	ns
pH	$3,33 \pm 0,01$	$3,36 \pm 0,03$	$3,34 \pm 0,02$	ns
Glicerina (g/L)	$11,4 \pm 0,4b$	$11,6 \pm 0,9b$	$14,5 \pm 0,1a$	*
Etanolo (%v/v)	$15,0 \pm 0,1$	$14,5 \pm 0,2$	$14,4 \pm 0,4$	ns
Acido acetico (g/L)	$0,40 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,02$	ns
Indice Polifenoli Totali (DO <sub>280</sub> )	$93,1 \pm 0,4a$	$89,6 \pm 0,1b$	$91,0 \pm 1,1ab$	*
Intensità Colore (DO <sub>420+520+620</sub> )	$24,9 \pm 0,7$	$24,0 \pm 0,5$	$23,8 \pm 0,9$	ns
Tonalità (DO <sub>420</sub> /DO <sub>520</sub> )	$0,50 \pm 0,00b$	$0,52 \pm 0,01a$	$0,51 \pm 0,00ab$	*

In tutti i casi in cui è stato riscontrato un residuo zuccherino, era costituito da solo fruttosio. Questo è riconducibile al comportamento glucosofilo di *S. cerevisiae* (Ciani et al., 1998) che quindi, una volta consumato tutto il glucosio, ha incontrato maggiore difficoltà nel consumare il fruttosio. Inoltre, il lievito a fine fermentazione si trova in condizioni di stress da etanolo (Ribéreau-Gayon et al., 2000a), particolarmente elevato nel caso delle fermentazioni condotte in questo studio. Non risultano statisticamente differenti i valori di acidità totale, pH e acido acetico.

Nelle fermentazioni inoculate con *Starm. bacillaris* è stata rilevata una più elevata concentrazione di glicerina, che non era però associata ad un minor contenuto di etanolo, contrariamente a quanto riportato da alcuni autori in vinificazioni condotte con *Starm. bacillaris* (Tofalo et al., 2012).

Come mostrato in tabella 6, i vini contenevano sia le forme glicosidiche, sia le forme libere dei flavonoli, in conformità con quanto riportato in letteratura (Makris et al., 2006)

Tabella 6: Contenuto in flavonoli dei vini. Valori espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le medie in una stessa riga seguite da differenti lettere sono significativamente diverse (Tukey test a  $p < 0.05$ ); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ns non significativo.

	ES 454	ES 488	Sb 409	One-way ANOVA
Flavonoli tot (mg/L)	150,4 $\pm$ 2,7	136,0 $\pm$ 3,8	141,6 $\pm$ 6,5	ns
Profilo dei flavonoli				
Quercetine (%)	79,0 $\pm$ 3,0	79,3 $\pm$ 2,6	79,7 $\pm$ 3,1	ns
Miricetine (%)	18,4 $\pm$ 2,9	17,3 $\pm$ 2,1	17,6 $\pm$ 2,9	ns
Campferoli (%)	2,6 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,3	ns
Quercetine (mg/L)	118,8 $\pm$ 2,4a	107,7 $\pm$ 0,5b	112,8 $\pm$ 0,7ab	*
Profilo delle quercetine				
Quercetina-3-galattoside (%)	3,6 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 1,1	3,3 $\pm$ 0,2	ns
Quercetina-3-glucuronide (%)	21,0 $\pm$ 1,7	20,4 $\pm$ 0,0	18,9 $\pm$ 0,4	ns
Quercetina-3-glucoside (%)	49,6 $\pm$ 1,9	48,4 $\pm$ 0,8	51,5 $\pm$ 4,6	ns
Quercetina aglicone (%)	25,9 $\pm$ 0,7	27,4 $\pm$ 0,3	26,3 $\pm$ 4,0	ns

Così come riportato in altri lavori (Romboli et al., 2015), la distribuzione delle diverse forme di quercetina, miricetina e campferolo, non risulta influenzata dalle specie di lievito coinvolte nella fermentazione alcolica. Inoltre, non risultano differenze statisticamente significative nel contenuto in flavonoli totali dei vini fermentati con le diverse specie e ceppi di lievito, anche se si notano valori tendenzialmente maggiori nel vino ES 454. Questa tendenza è confermata dalle differenze statisticamente significative nel quantitativo di quercetina totale dei vini, che seguono esattamente l'andamento delle quantità di flavonoli totali. Nonostante ciò, non si evidenziano differenze tra le abbondanze relative della forma aglicone e delle varie forme glicosidiche di quercetina.

## Conclusioni

In questo lavoro è stato indagato l'effetto di una pratica di gestione della chioma, la defogliazione precoce, e dell'ecologia microbica delle fermentazioni alcoliche sulla composizione dei flavonoli in uve Sangiovese e nei vini da esse prodotti.

Dai dati disponibili in letteratura emerge che l'esposizione degli acini alla radiazione solare incide sul tasso di biosintesi e di accumulo dei flavonoli (Price et al., 1995). Sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che l'epoca della defogliazione è risultata determinante per l'accumulo di flavonoli nell'uva, presenti in maggior quantità alla vendemmia nelle uve da piante sottoposte a defogliazione precoce in fioritura. Al contrario, nessun effetto è stato ottenuto in seguito alla stessa pratica eseguita all'allegagione. Per quanto riguarda l'intensità della defogliazione, è stata osservata la tendenza verso un maggiore accumulo di questi composti sempre in funzione della fase fenologica alla quale è stata condotta: in allegagione le differenze nell'accumulo di flavonoli non sono significative, mentre in fioritura si nota un maggiore accumulo nel caso di un trattamento più intenso.

Molti lavori in letteratura attestano che la fermentazione condotta da diverse specie e ceppi di lievito, *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*, può determinare una diversa composizione finale del vino. In particolare, l'attività  $\beta$ -glucosidasica del lievito può essere responsabile dell'idrolisi delle forme



glicosidiche dei flavonoli, con conseguente rilascio degli agliconi (Terrier et al. 2009). Dalle analisi dei vini ottenuti con le fermentazioni sperimentali è emerso che il contenuto in flavonoli di vini prodotti con fermentazioni svolte da diverse specie e ceppi di lievito non è significativamente differente. In conclusione quindi l'attività dei lieviti impiegati in questo studio non ha influenzato la composizione dei flavonoli nel vino.

## Bibliografia

- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 992-1002.
- Ciani, M., & Ferraro, L. (1998). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of applied microbiology*, 85(2), 247-254.
- Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M. D., Arapitsas, P., & Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 19651-19669.
- Granchi L., Ganucci D., Messini A., Rosellini D. and Vincenzini M. 1998. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello di Montalcino wines. *Food Technol. and Biotech.* 36: 313-318.
- Hernández T., Estrella I., Carlavilla D., Martín-Álvarez P.J. and Moreno-Arribas M.V. 2005. Phenolic compounds in red wines subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Anal. Chim. Acta* 563: 116-125.
- Keller, M. (2010) *The science of grapevines: anatomy and physiology*, 1st ed (Elsevier Academic Press: Burlington, MA, USA).
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 396-404.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7692-7702.
- Montealegre, R. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. C., Gascueña, J. M., & Romero, E. G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 687-693.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2009) *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Volume 2 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin:Paris, France).
- Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M., & Watson, B. T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 187-194.
- <sup>a</sup>Ribéreau, G. P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2000). *Handbook of enology. The microbiology of wine and vinification*, vol 1.
- <sup>b</sup>Ribéreau, G. P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2000). *Handbook of enology. The handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments*, vol 2.
- Romboli, Y., Mangani, S., Buscioni, G., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2015). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(7), 1137-1145.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical pharmacology*, 83(1), 6-15.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue française d'oenologie*, (173), 22-25.
- Somers, T.C. and Ziemelis, G. (1985) Flavonol haze in white wines. *Vitis* 24, 43-50.
- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., & Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food microbiology*, 29(1), 18-26.
- Terrier, N., Poncet-Légrand, C. and Chenynier, V. (2009) Flavonols, flavonols and dihydroflavonols. In: *Wine chemistry and biochemistry*. Ed. M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (Springer, New York, NY, USA) pp. 463–507.

## **Riassunto**

*I flavonoli sono composti fenolici riscontrati nelle uve che vengono sintetizzati ed accumulati nelle bucce principalmente in risposta alla radiazione UV.*

*In questo lavoro, è stato valutato l'effetto della pratica di defogliazione precoce sulle caratteristiche compositive di uve Sangiovese, con particolare riferimento ai contenuti dei derivati glicosidici della quercetina, flavonoli più abbondanti in questa varietà.*

*La sperimentazione è stata condotta su due filari adiacenti di un vigneto localizzato nell'areale di produzione del Chianti DOCG nell'annata 2016. Per ogni filare, sono state individuate 5 parcelle (12 piante ciascuna). In 4 di esse la defogliazione basale è stata eseguita in due diversi momenti, fioritura ed allegagione, a due diversi gradi di intensità, fino al terzo e fino al quinto nodo. La quinta parcella è stata lasciata come controllo non defogliato.*

*Le uve da piante sottoposte a defogliazione più intensa in fioritura si sono distinte per valori più elevati di antociani potenziali ed estraibili, ricchezza fenolica totale e per un più basso peso degli acini. Inoltre, tali uve, seguite da quelle da piante sottoposte defogliazione meno intensa in fioritura, risultavano più concentrate in flavonoli totali e derivati glicosidici della quercetina, mentre le uve da piante defogliate in allegagione non risultavano significativamente diverse da quelle del controllo non defogliato. I derivati glicosidici della quercetina, quali la quercetina-3-glucoside, la quercetina-3-glucuronide e la quercetina-3-galattoside rappresentavano circa l'80% dei flavonoli totali delle uve delle diverse tesi, non mostrando variazioni significative nella loro distribuzione percentuale in funzione della diversa tipologia di defogliazione condotta.*

## **Abstract**

*Flavonols are a class of phenols found in grapes synthesized and accumulated in berry skins principally as UV protectants.*

*The aim of this work was to evaluate the effect of early leaf removal on compositional features of Sangiovese grapes, with particular attention to the concentration of quercetin glycosides, the most abundant flavonols found in this grape variety. The experiment was conducted in two adjacent rows of a Sangiovese vineyard located in the production area of Chianti DOCG during the vintage 2016. In each row, 5 blocks of 12 plants were individuated: 4 blocks were subjected to different conditions of early leaf removal while the last was not defoliated. Leaf removal was performed in two distinct phenological stages (bloom and fruit set) at two level of intensity (3rd node and 5th node).*

*Grapes from vine subjected to a more intense defoliation carried out at bloom were characterized by higher concentration of total and extractable anthocyanins, high value of total phenol richness and lower berry mass. These grapes followed by those from less intense defoliated vine at bloom presented higher concentration of total flavonols and quercetin glycosides, whereas no difference was found between grapes from vine defoliated at fruit-set and non-defoliated control grapes. The quercetin glycosides found in all the grapes were quercetin-3-glucoside, quercetin-3-glucuronide, and quercetin-3-galactoside, which represent about the 80% of total flavonols. Finally, no significant difference emerged on quercetin glycosides relative abundance related to different defoliation managements.*