

DOCUMENTO
TECNICO

**Antonio Carlomagno
Andrea Schubert
Alessandra Ferrandino**

*Dipartimento Colture Arboree,
Università di Torino,
Sede di Alba - Alba (CN)*

*Da sinistra:
A. Carlomagno
A. Ferrandino*

EVOLUZIONE DEI COMPOSTI VOLATILI PRE-FERMENTATIVI IN BACCHE DELLA CV NEBBIOLO (VITIS VINIFERA L.)

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare, durante la maturazione delle bacche, il profilo aromatico varietale di uve Nebbiolo coltivate in Piemonte. Tale indagine, è stata condotta utilizzando una tecnica estrattiva rapida dei composti volatili dalla matrice uva, nota con l'acronimo di 'SBSE'.

Introduzione

La globalizzazione del mercato vitivinicolo impone ai Paesi dalla lunga tradizione enologica la necessità di imprimere al vino la tipicità derivante dall'interazione fra vitigni autoctoni e zone di coltivazione. Parlare di enologia varietale, dunque, diventa sempre più una necessità per quelle Nazioni, come l'Italia, caratterizzate da una viticoltura estremamente variegata per condizioni pedo-climatiche e genotipi coltivati. Queste esi-

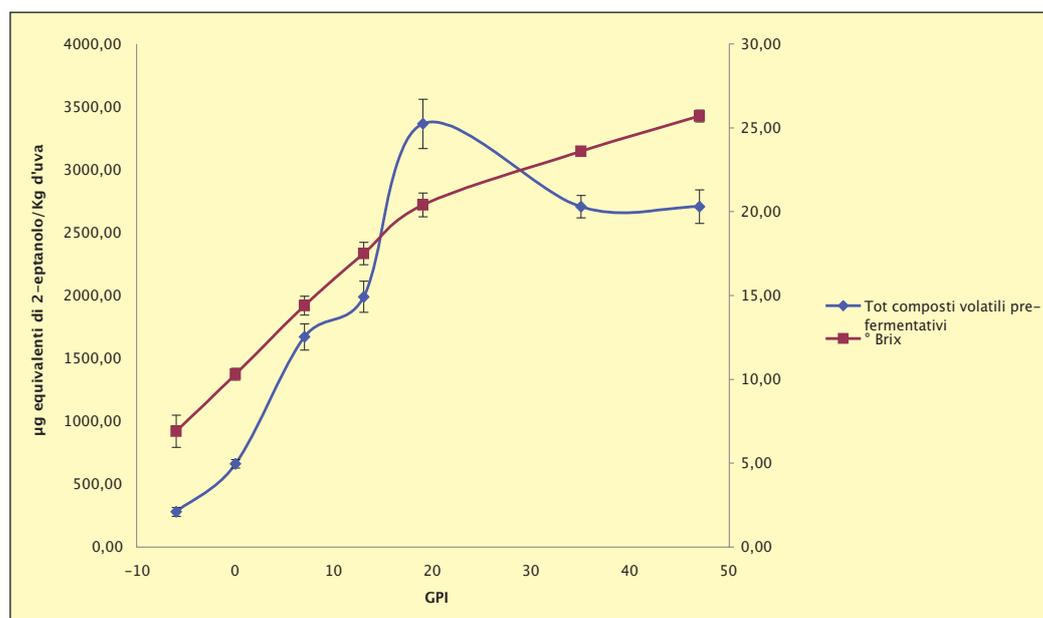
genze di mercato, richiedono una comprensione rigorosa delle caratteristiche qualitative dell'uva che, come è noto, dipendono dal vitigno coltivato, dalle caratteristiche pedo-climatiche in cui è inserito il vigneto e dalla tecnica culturale che può modificare il comportamento vegeto-produttivo della pianta, nonché il microclima della zona fruttifera. Ad oggi ampiamente studiati risultano i composti di tipo glucidico, acido e polifenolico (Hunter *et al.*, 1995; Tarara *et al.*, 2008), utilizzati anche, in

particolare quest'ultimi, come marker chimici (Ferrandino e Guidoni, 2010).

Più di recente, l'interesse è stato rivolto anche ai composti volatili varietali delle cultivar a sapore semplice (Salinas *et al.*, 2004; Coelho *et al.*, 2007; Kalua e Boss, 2010; Ferrandino *et al.*, 2012), anche grazie alla diffusione di tecniche analitiche più sensibili e dunque in grado di misurare concentrazioni anche molto basse di questi composti. Dal punto di vista tecnologico i composti volatili sono

Parole chiave: Nebbiolo, aromi varietali pre-fermentativi, aldeidi, alcoli, composti C6, terpeni, norisoprenoidi, derivati benzenici, SBSE

Fig. 1 - Evoluzione dei composti volatili pre-fermentativi totali (μg equivalenti di 2-eptanolo/Kg di uva) e dei solidi solubili ($^{\circ}$ Brix), durante la maturazione di bacche della cv Nebbiolo (*Vitis vinifera* L.)



(Le barre verticali indicano l'errore standard; GPI = giorni post invaiatura)

molto importanti per la qualità del vino, presumibilmente anche in virtù del legame con il territorio di origine, nonché della sua influenza (Sabon *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2011). Essi svolgono ruoli fisiologici importanti nella pianta: monoterpeni e sesquiterpeni, ad esempio, risultano fondamentali nelle interazioni biologiche pianta-pianta, pianta-insetto e pianta-patogeno (Dudareva *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2008). La caratterizzazione dei monoterpeni delle uve aromatiche è ben documentata, mentre meno numerosi sono i lavori che affrontano la caratterizzazione terpenica delle uve a sapore semplice (Di Stefano *et al.*, 1998; Nasi *et al.*, 2008; Tamborra ed Esti, 2010; Cook Papini *et al.*, 2010) e, ancor meno, la loro evoluzione durante la maturazione delle uve (Salinas *et al.*, 2004; Coelho *et al.*, 2007; Kalua e Boss, 2010), o dei sesquiterpeni (Kalua e Boss, 2010).

Nelle varietà a sapore neutro hanno anche importanza, per via delle loro basse soglie di percezione (Sefton *et al.*, 1989; Kotseridis *et al.*, 1999), i norisoprenoidi C13 derivanti dai carotenoidi (Schwab *et al.*, 2008); essi assumono forme olfattivamente attive durante

la vinificazione delle uve e modificano la loro struttura chimica nel corso della maturazione del vino, con importanti ripercussioni sensoriali (Sefton *et al.*, 1989). Altri composti volatili con funzioni ecologiche (Schwab *et al.*, 2008) e importanza sensoriale nell'uva (Sefton *et al.*, 1993) sono i derivati benzenici. Infine, è noto che durante la pigiatura delle uve, a seguito dell'azione delle lipossigenasi sui lipidi (Yang *et al.*, 2009; Kalua e Boss, 2010), si formano aldeidi e alcoli a sei atomi di carbonio (C6) dai sentori erbacei (Z-3-esenale, E-2-esenale, esanale, E,Z-2,6-nonadienale, Z ed E-3-esenolo, E-2-esenolo), ai quali è stata recentemente attribuita una funzione di difesa dai patogeni nei tessuti vegetali (Matsui, 2006).

I composti volatili varietali sono stati utilizzati per discriminare chimicamente le varietà a sapore semplice (Pedroza *et al.*, 2010), per indagare le relazioni genetiche fra ibridi e loro parentali (Cook Papini *et al.*, 2010), ma anche per studiare l'influenza dell'ambiente di coltivazione (Coelho *et al.*, 2007), dello stato idrico della pianta (Koundouras *et al.*, 2006), della gestione della chioma (Vilanova *et al.*, 2011)

e del suolo (Xi *et al.*, 2011) sul profilo aromatico.

Questo lavoro ha l'obiettivo di caratterizzare il profilo aromatico varietale delle bacche di Nebbiolo nel periodo compreso tra l'invasatura e la vendemmia, per poter affiancare ai ben noti concetti di maturità tecnologica e fenolica delle uve anche parametri legati al metabolismo delle sostanze aromatiche. Presso il nostro laboratorio si sta testando una tecnica estrattiva relativamente rapida, focalizzata sulla semplificazione della fase di preparazione del campione onde rendere la valutazione del profilo aromatico più fruibile e meno costosa per le aziende vitivinicole; tale tecnica infatti, non prevede l'uso di solventi che possono risultare tossici per l'ambiente e l'operatore, nonché costosi per lo smaltimento.

Tutto questo potrebbe consentire una riduzione dei costi di analisi, con ovvie ripercussioni pratiche. La tecnica estrattiva utilizzata è nota con l'acronimo "SBSE" (*Stir Bar Sorptive Extraction Technique*) e si basa sul principio del *sorbimento*, in cui l'analita si solubilizza nel materiale con caratteristiche sorbenti; essendo la dimensione della super-

ficie sorbente ampia, la sensibilità dell'analisi è elevata (Sánchez-Rojas *et al.*, 2009).

Gli analiti sorbiti possono successivamente essere desorbiti, eventualmente crio-focalizzati e quindi iniettati in colonna cromatografica. La tecnica proposta è stata già applicata all'analisi di uve (Salinas *et al.*, 2004; Caven-Quantrill e Buglass, 2007; Pedroza *et al.*, 2010; Ferrandino *et al.*, 2012) fornendo interessanti risultati.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto in Piemonte nell'annata 2011 (i dati meteorologici relativi al sito di ubicazione del vigneto sono riportati nella Tab. 1), campionando uve della cultivar Nebbiolo/Kober 5BB (clone CVT CN 142) in un vigneto sito nel comune di Monteu Roero (CN) in località Sant'Anna (44°47'0''N 7°56'0''E) ad un'altitudine di 230 m. Il vigneto, impiantato nel 1980 su terreno calcareo sabbioso, ha giacitura declive con esposizione Sud-Ovest; le distanze d'impianto adottate sono 2,80 m tra le file e 1,00 m sulla fila, per una densità di 3570 piante/ha. Le viti sono allevate a contropalliera con sistema di potatura a Guyot, con un carico medio di gemme/ceppo pari a 10.

L'interfilare è mantenuto inerbato permanentemente con essenze spontanee contenute a mezzo di sfalci periodici con trinciaerba meccanico condizionante il trinciato nel sottofila, sul quale, nell'autunno 2010, è stato eseguito un intervento diserbante con glifosate. Nello stesso autunno, inoltre, è stato effettuato anche un apporto di circa 65 t/ha di compost (compostato di lombrico da letame bovino maturo), pratica che normalmente viene eseguita con cadenza triennale. La gestione della chioma ha previsto un intervento di scacchiatura quando i germogli misuravano circa 10-15 cm, una cimatura ad inizio allegagione e due interventi di palizzamento della vegetazione in abbinamento ad altri due interventi

Tab. 1 - Dati meteorologici mensili riferiti alla stagione vegetativa. (mTmin = media mensile delle temperature minime; mTmax = media mensile delle temperature massime; mTmed = media mensile delle temperature medie; Ptot = precipitazione mensile; GP = numero di giorni di pioggia mensili con precipitazione > 1 mm; mUR = umidità relativa mensile)

Mese	mTmin	mTmax °C	mTmed	Ptot mm	GP	mUR %
Aprile	9,4	22,7	15,6	11,8	2	61
Maggio	11,9	26,1	18,8	14,6	5	62
Giugno	15,2	26,1	20,4	122,8	11	79
Luglio	15,8	28,3	21,7	59,2	5	72
Agosto	17,3	31,5	24,0	15,6	3	65
Settembre	15,1	28,3	21,0	23,2	5	71

Dati Servizio Agrometeorologia Regione Piemonte

di cimatura. All'allegazione è stata attuata anche una blanda defogliatura manuale, seguita da un secondo intervento a fine invaiatura. Il diradamento dei grappoli è stato eseguito ad invaiatura appena terminata lasciando un grappolo per germoglio.

Il piano sperimentale ha previsto l'individuazione in campo di tre filari, costituenti ognuno una ripetizione (25 piante per ogni ripetizione), da ciascuna delle quali sono stati prelevati, mediamente ogni dieci giorni, circa 300 acini (da entrambi i lati del filare) campionando racimoli di 3-5 acini, provenienti dal tratto prossimale, mediano e distale del grappolo e dalle due facce di esposizione del medesimo, in modo da rappresentare le differenti condizioni di esposizione.

Tra le bacche così prelevate, portate in laboratorio con borsa frigo e spedicellate, ne sono state scelte e pesate 200 da frullare (a freddo e senza rompere i vinaccioli), mentre sulle restanti è stata determinata la concentrazione zuccherina con rifrattometro da banco. 10 g esatti dell'omogeneato così ottenuto sono stati diluiti 10 volte con acqua deionizzata, addizionati di 30 µL di una soluzione a concentrazione nota di 2-eptanolo e lasciati in estrazione per 30 min con frequenti agitazioni manuali. 20 mL della sospensione sono stati quindi trasferiti in provetta con tappo a vite, immettendo nell'estratto un'ancoretta di agitazione rivestita di uno strato sorbente

di polidimetilsilossano, nota con il nome di "Twister®". La sospensione è stata mantenuta in agitazione per 6 ore a temperatura ambiente (Salinas *et al.*, 2004), trascorse le quali il Twister® è stato tolto dalla sospensione, sciacquato con acqua deionizzata, asciugato e ricollocato in una provetta specifica per desorbimento termico (TDU). Gli analiti desorbiti sono stati criofocalizzati in un iniettore tipo PTV-CIS (*Cooled Injection System*). Durante la fase di termodesorbimento l'iniettore CIS è tenuto freddo (0°C) e, solo a desorbimento ultimato, è riscaldato velocemente (rampa di 12°C/s fino a 300°C per 6 min), per il trasferimento degli analiti in colonna. Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un gas-cromatografo, accoppiato con spettrometro di massa, con colonna DB-WAX, J&W 122-7032 (30 m × 0,250 mm ID × 0,25 µm). Le condizioni cromatografiche sono state: gas-carrier He al flusso di 1 mL/min; temperatura iniziale del GC di 40°C per 10 min, incremento di 2,5°C/min fino a 180°C per 2 min, seconda rampa di 1°C/min fino a 200°C per 10 min, energia di ionizzazione 70 eV, temperatura della *transfer line* di 280°C.

L'identificazione dei picchi è avvenuta mediante confronto tra gli spettri acquisiti e quelli delle librerie NIST 08 e Wiley 7, calcolando anche gli indici di ritenzione di Kovats. I picchi identificati sono stati quantificati come equivalenti di 2-eptanolo.

L'evoluzione nel tempo della concentrazione delle molecole, durante la maturazione delle bacche, è stata riferita ai giorni post invaiatura (GPI), facendo corrispondere a '0 GPI' (data di piena invaiatura, 03/08/2011), il 50% degli acini invaiati, così come indicato da Koundouras *et al.* (2010).

Risultati e discussione

La metodica analitica impiegata ha permesso l'individuazione di molecole "pre-fermentative" afferenti a cinque classi chimiche: aldeidi, alcoli (in queste due classi rientrano anche i derivati lipidici C6), benzenoidi, terpenoidi e C13-norisoprenoidi. Preferiamo parlare di composti "pre-fermentativi" e non "costitutivi" della bacca (classicamente distinti come liberi e glicosilati), perché la preparazione del campione impiegata, prevedendo la rottura dell'acino, simula la fase della pigiatura delle uve che avviene in cantina. La rottura della bacca, infatti, portando a contatto enzimi e substrati, favorisce la trasformazione in forme volatili di alcune molecole che nell'uva si trovano come precursori inodori. Questo modo di classificare i composti è stato proposto da Coelho *et al.* (2007) ed oggi è comunemente adottato in tutti i lavori che prevedono rottura dell'acino prima delle determinazioni analitiche.

La Fig. 1 mostra l'anda-

mento di accumulo dei solidi solubili e dei composti volatili totali partendo dall'inizio del processo fisiologico di invaiatura (- 6 GPI: 2 % di acini invaiati), fino alla raccolta delle uve. Si nota che l'accumulo dei composti volatili è cominciato già nelle prime fasi dell'invaiatura e, negli stadi successivi, tale accumulo procede fino a raggiungere un picco circa 20 giorni dopo l'invaiatura. A partire da questa epoca, invece, la concentrazione delle sostanze volatili totali inizia a diminuire, per stabilizzarsi intorno a 2700 µg/Kg tra i 35 GPI e la vendemmia. Dunque, mentre nelle bacche aumenta la concentrazione di solidi solubili, il quantitativo dei composti volatili totali diminuisce. Versini *et al.* (1981), avevano notato che il massimo accumulo dei composti aromatici nella cv Weisser Riesling, si realizzava prima del maggior accumulo zuccherino. Vilanova *et al.* (2012), studiando quattro cultivar spagnole, avevano concluso che maturità aromatica e tecnologica non sono contemporanee, poiché non trovavano correlazione fra evoluzione dei composti volatili e concentrazione di solidi solubili. Altri Autori (Salinas *et al.*, 2004; Coelho *et al.*, 2006), in cultivar a frutto colorato, avevano osservato che il massimo accumulo dei composti volatili coincideva con il picco massimo degli zuccheri e, rimaneva costante nelle settimane successive. Garcia *et al.* (2003), in varietà a bacca bianca, avevano rilevato un'evoluzione dei composti volatili non uniforme nel corso della maturazione, evidenziando la difficoltà di stabilire la maturità delle uve in funzione delle molecole volatili. Coelho *et al.* (2007), studiando l'accumulo di composti pre-fermentativi nella varietà Fernão-Pires a frutto bianco coltivata in due siti differenti, avevano osservato un picco massimo d'accumulo dopo 20 giorni dall'invaiatura per tutte le molecole identificate. Le uve, in entrambi i siti, avevano mostrato

cinetiche di accumulo simili, ma significativamente differenti erano i profili aromatici, cioè i quantitativi delle singole molecole. Gli andamenti di accumulo dei composti volatili sono, dunque, indipendenti dall'evoluzione della concentrazione zuccherina, e variano secondo il genotipo; tuttavia, anche l'ambiente di coltivazione può influenzare la loro cinetica di accumulo (Ferrandino *et al.*, 2012) e la loro concentrazione (Coelho *et al.*, 2007).

Evoluzione delle classi chimiche

In Nebbiolo, varietà a sapore semplice, la classe di composti volatili pre-fermentativi maggiormente presente è quella dei derivati lipidici C6 (Tab. 2), come osservato già in altri lavori (Yang *et al.*, 2009; Kalua e Boss, 2010) su altri vitigni non aromatici. Alcoli ed aldeidi C6, sono i principali responsabili dell'aroma erbaceo del mosto fresco (Hardy, 1970).

La concentrazione dei derivati lipidici C6 aumenta fino a circa 20 GPI, per diminuire verso la maturazione, in accordo con quanto osservato da Garcia *et al.* (2003). Tra quest'ultimi composti, quelli presenti in maggiore concentrazione sono esanale ed E-2-esenale, mentre bassa è la concentrazione del Z-3-esenale, in accordo con quanto constatato da altri autori (Garcia *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009; Kalua and Boss, 2010). La maggior concentrazione dell'E-2-esenale rispetto al Z-3-esenale potrebbe spiegarsi con una maggiore attività della 3Z, 2E-enal isomerasi catalizzante la reazione da Z-3-esenale a E-2-esenale, in linea con quanto proposto da Kalua e Boss (2010); inoltre, la scarsa presenza di queste due aldeidi nel periodo pre-invaiatura rilevata da questi due autori, potrebbe spiegarsi con una probabile bassa attività delle liasi idroperossidiche o, con una maggiore attività delle alcol deidrogenasi che convertono tali aldeidi

negli alcoli corrispondenti.

Durante la maturazione delle bacche di Nebbiolo le concentrazioni di esanolo ed E-2-esenolo sono basse, lasciando ipotizzare che tale sia anche l'attività delle alcol deidrogenasi specifiche per le aldeidi corrispondenti, esanale ed E-2-esenale. Non è stato rilevato l'acetato di esile e, probabilmente, ciò suggerisce una scarsa attività in Nebbiolo delle alcol-acil transferasi.

Queste ipotesi sulla biosintesi, derivanti da riscontri di tipo analitico, andrebbero confermate con uno studio approfondito sull'espressione dei geni corrispondenti di tali vie metaboliche. La concentrazione delle aldeidi aumenta nel corso della maturazione (Tab. 2), raggiungendo il picco massimo alla raccolta. Tra le aldeidi identificate, Z-2-eptenale, E-2-nonenale ed E,Z-2,6-nonadienale iniziano ad accumularsi a partire da 7, 19 e 35 GPI rispettivamente. Le restanti aldeidi, al contrario, sono presenti già all'invaiatura e, fra queste, quantitativamente più importanti sono nonanale, furfurale e decanale.

L'accumulo degli alcoli alifatici è stato inferiore rispetto a quello delle aldeidi. Dal punto di vista sensoriale ciò è interessante, poiché gli alcoli hanno soglia olfattiva sempre più alta rispetto alle aldeidi corrispondenti (Schwab *et al.*, 2008).

I derivati benzenici mostrano una cinetica di accumulo più o meno costante durante l'intera fase di maturazione della bacca (Tab. 2). Ad eccezione della 2-etilbenzaldeide, tutti gli altri derivati benzenici sono presenti già ad inizio invaiatura (- 6 GPI). Fra questi, le concentrazioni più elevate sono riconducibili a benzaldeide (soglia olfattiva pari a 350 µg/L, Ferreira *et al.* 2000) e acetofenone; essi tuttavia, possono influenzare poco l'impatto sensoriale della bacca a causa delle loro elevate soglie olfattive e delle loro basse concentrazioni. Non abbiamo osservato la presenza dell'alcol benzilico,

Tab. 2 - Evoluzione dell'accumulo dei composti volatili pre-fermentativi in *Vitis vinifera* L. cv Nebbiolo (media di 3 ripetizioni ± errore standard; dati espressi in µg equivalenti di 2-eptanolo/Kg di uva)

	GPI	6	0	7	13	19	35	47
	°Brix	6,90	10,30	14,40	17,50	20,40	23,60	25,70
	PMA (g)	1,06	1,32	1,59	1,83	1,83	1,81	1,85
Aldeidi	KI							
ottanale	1291	8,01 ± 1,48	9,10 ± 1,19	8,21 ± 1,36	5,12 ± 1,14	13,21 ± 2,05	11,24 ± 0,66	12,37 ± 1,32
Z-2-eptenale	1319	nd	nd	25,17 ± 2,09	13,66 ± 1,66	9,04 ± 0,92	8,03 ± 0,99	4,21 ± 0,60
nonanale	1375	31,21 ± 6,41	29,56 ± 5,06	26,70 ± 2,66	23,31 ± 1,52	52,80 ± 6,11	38,52 ± 4,79	56,23 ± 4,28
furfurale	1457	20,05 ± 1,49	nd	50,65 ± 15,32	24,88 ± 2,66	37,66 ± 6,36	37,53 ± 4,25	38,59 ± 2,61
decanale	1497	17,41 ± 3,68	14,19 ± 0,67	16,91 ± 3,61	12,17 ± 0,65	40,79 ± 6,87	31,48 ± 1,43	34,75 ± 4,63
E-2-nonenale	1530	nd	nd	nd	nd	15,05 ± 2,05	44,90 ± 12,73	50,16 ± 11,43
E,Z-2,6-nonadienale	1580	nd	nd	nd	nd	nd	28,07 ± 5,25	20,51 ± 2,19
Subtotale		76,68 ± 13,06	52,85 ± 6,92	127,63 ± 25,04	79,14 ± 7,62	168,55 ± 24,36	199,77 ± 30,10	216,82 ± 27,06
Alcoli								
1-butanolo	1159	11,08 ± 3,37	8,83 ± 1,25	nd	nd	nd	nd	28,20 ± 10,35
2-etil-1-esanolo	1501	8,44 ± 0,85	6,47 ± 2,31	5,79 ± 0,73	3,29 ± 0,08	nd	nd	nd
Subtotale		19,52 ± 4,10	15,30 ± 1,13	5,79 ± 0,73	3,29 ± 1,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	28,20 ± 10,35
Derivati Benzenici								
benzaldeide	1510	16,45 ± 4,83	10,65 ± 1,07	11,77 ± 1,00	10,15 ± 0,77	14,46 ± 0,68	14,18 ± 1,43	28,12 ± 5,07
acetofenone	1640	24,96 ± 3,43	27,05 ± 3,71	25,62 ± 0,65	12,33 ± 0,24	10,06 ± 0,90	14,19 ± 0,99	17,22 ± 0,09
2-etil-benzaldeide	1647	nd	nd	nd	4,80 ± 0,91	7,50 ± 0,82	15,13 ± 2,80	nd
fenolo	1831	8,59 ± 1,75	11,56 ± 1,55	12,33 ± 1,62	7,42 ± 0,63	10,44 ± 0,87	9,55 ± 0,55	nd
para-butiril-cresolo	2053	5,42 ± 1,31	5,63 ± 0,48	31,63 ± 8,74	16,66 ± 2,13	5,75 ± 0,62	6,32 ± 2,81	5,52 ± 0,38
trimetil-tetraidro benzofuranone	2124	3,17 ± 0,90	5,70 ± 0,57	6,71 ± 0,36	3,24 ± 0,23	nd	nd	nd
Subtotale		58,60 ± 6,95	60,59 ± 6,43	88,05 ± 9,22	54,60 ± 2,33	48,20 ± 3,81	59,36 ± 1,17	50,86 ± 2,22
Composti C6								
esanale	1064	24,07 ± 3,95	114,18 ± 16,58	446,96 ± 51,19	665,80 ± 57,06	1340,06 ± 122,08	1102,38 ± 58,23	1104,75 ± 80,90
Z-3-esenale	1117	6,85 ± 1,16	14,22 ± 7,89	25,34 ± 1,68	37,41 ± 3,40	100,92 ± 1,95	68,01 ± 3,17	65,00 ± 4,13
E-2-esenale	1213	45,85 ± 4,57	257,35 ± 19,76	794,51 ± 39,26	1003,22 ± 67,53	1480,53 ± 53,89	1142,33 ± 18,97	1082,04 ± 48,92
1-esanolo	1363	10,54 ± 1,39	48,65 ± 3,73	68,39 ± 4,33	62,66 ± 1,97	77,96 ± 10,10	69,33 ± 4,64	76,42 ± 12,18
E-2-esenolo	1410	4,54 ± 1,36	17,42 ± 2,10	23,39 ± 2,01	44,81 ± 5,28	43,59 ± 2,82	28,97 ± 6,89	15,84 ± 1,58
Subtotale		91,85 ± 16,25	451,82 ± 26,66	1358,59 ± 89,53	1813,91 ± 125,98	3043,06 ± 163,56	2411,01 ± 66,21	2344,05 ± 135,21
Terpeni								
β-ciclocitrone	1608	nd 4,13 ±	0,33 3,43 ±	0,54	nd	nd	nd	nd
E-geranilacetone	1662	29,15 ± 4,87	60,33 ± 5,18	48,29 ± 7,03	17,59 ± 1,26	58,82 ± 13,09	17,50 ± 3,22	57,29 ± 4,34
geraniolo	1669	nd	nd	26,10 ± 3,26	9,71 ± 0,63	33,93 ± 5,41	12,94 ± 0,11	nd
Subtotale		29,15 ± 4,87	64,46 ± 5,49	77,81 ± 5,21	27,30 ± 4,13	92,74 ± 18,50	30,44 ± 3,32	57,29 ± 4,34
C13-Norisoprenoidi								
β-ionone	1740	3,82 ± 0,41	16,55 ± 1,93	12,62 ± 1,55	11,63 ± 2,44	12,13 ± 2,39	6,71 ± 1,59	9,06 ± 1,81
Totale composti volatili		279,62 ± 34,77	661,57 ± 33,79	1670,50 ± 103,11	1989,86 ± 124,52	3364,68 ± 196,72	2707,29 ± 89,38	2706,27 ± 134,30

(GPI = giorni post invaiatura; PMA = peso medio acino; nd = non determinato; KI = Indici di ritenzione di Kovats)

per cui questo ci fa supporre un'inibizione dell'attività deidrogenasica a carico della benzaldeide. De Rosso *et al.* (2010), al contrario, avevano rilevato una maggiore concentrazione dell'alcol benzilico a scapito dell'aldeide benzilica in uve della cultivar Raboso (*V. vinifera* L.), mentre Cook Papini *et al.* (2010), analizzando il profilo aromatico di Albarossa Barbera e

Nebbiolo di Dronero, avevano riscontrato la presenza del solo alcol benzilico. Garcia *et al.* (2003) e Kalua e Boss (2010), infine, avevano concluso che la presenza dell'alcol benzilico è in relazione alla cultivar indagata.

Nelle prime fasi dell'invaiaura (- 6 GPI) l'unico composto terpenico quantificato presente in Nebbiolo è l'E-geranilacetone (Tab. 2), men-

tre il geraniolo compare 7 giorni dopo l'invaiaura con un massimo a 19 GPI, per diminuire nelle ultime fasi della maturazione. Di poca importanza risulta la presenza del β-ciclocitrone. Kalua e Boss (2010), lavorando sulla cultivar Cabernet Sauvignon, avevano quantificato il geraniolo solo in pre-invaiaura, mentre nel Riesling esso era stato rilevato sia prima del-

l'invaiaatura che alla raccolta, ma non nelle date intermedie. In Nebbiolo la biosintesi dell'E-geranilacetone nell'annata 2011, probabilmente, è iniziata poco prima dell'invaiaatura, mentre l'attivazione delle vie biosintetiche che portano al geraniolo sembra divenire importante dopo l'invaiaatura (7 GPI: 98% acini invaiati), in accordo con quanto riportato da altri autori (Garcia *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2006). Il diverso comportamento di E-geranilacetone e geraniolo potrebbe derivare da una loro differente origine biosintetica, poiché il primo deriva probabilmente dai carotenoidi, mentre il precursore del secondo è il geranilpicrofosfato (Schwab *et al.*, 2008).

Durante la maturazione della cultivar Nebbiolo, l'unico C13-norisoprenoide identificato è il β -ionone, il quale mostra una cinetica con picco massimo in piena invaiatura (0 GPI) ed una successiva diminuzione. La cinetica di accumulo osservata per il β -ionone in Nebbiolo è in accordo con quanto riscontrato nelle uve della cultivar Monastrell (Salinas *et al.*, 2004); un andamento simile è stato riportato anche per uve della cultivar Fernão-Pires da Coelho *et al.* (2007), mentre Kalua e Boss (2010) concludono che, per Cabernet Sauvignon e Riesling, il β -ionone è caratteristico della fase pre-invaiaatura, poiché non identificato da post-invaiaatura a maturazione. Tuttavia l'accumulo nelle bacche di tale composto potrebbe essere influenzato da condizioni ambientali (Razungles *et al.*, 1998) e stato idrico delle piante, sia in relazione alla tipologia di suolo (Oliveira *et al.*, 2003) che in relazione agli effetti che lo stress idrico sortisce nei confronti della vegetazione (Bindon *et al.*, 2007).

Per le uve di cultivar a sapore semplice, il β -ionone è molto importante per via della sua bassa soglia olfattiva (0,09 $\mu\text{g/L}$; Ferreira *et al.*, 2000), e quindi possiamo supporre che tale molecola possa influenzare positivamente il gusto della bacca.

Considerazioni conclusive

Da questa indagine è emerso che la massima espressione dei composti volatili pre-fermentativi si manifesta prima del picco di massimo accumulo dei solidi solubili. Ciò potrebbe rivelarsi molto importante dal punto di vista pratico, soprattutto nell'ottica di produrre vini a basso grado alcolico. Tali vini, oltre che per dealcolazione in cantina, possono essere ottenuti anche in vigna, sia vendemmiano con leggero anticipo le uve, che impiegando antitraspiranti volti a ridurre la fotosintesi. Qualora si dovesse optare per la vendemmia anticipata, compatibilmente con i tenori di acidità titolabile e composti fenolici, questa potrebbe, probabilmente, permettere di portare in cantina uve con un potenziale aromatico maggiore.

Indagini su altri vitigni tipici piemontesi, su più annate e su uve provenienti da diversi ambienti pedo-climatici, sono in corso nel nostro laboratorio, al fine di comprendere meglio i numerosi eventi che possono influenzare la dotazione in sostanze volatili dell'uva.

Nelle bacche a sapore neutro, come il Nebbiolo, è risultata importante la presenza del β -ionone in virtù della sua bassa soglia olfattiva. Sarebbe interessante chiarire, anche in altre uve a sapore neutro, il ruolo sensoriale sinergico che molecole ad elevata soglia olfattiva, tra cui aldeidi e alcoli a corta catena non C6, benzenoidi e terpenoidi, potrebbero esercitare sull'uva e, come queste molecole possano *in toto* o solo parzialmente passare nel mosto e nel vino.

Ancora una volta viene confermato il ruolo fondamentale dei derivati lipidici durante la rottura dell'acino, che può avvenire per masticazione, nel caso di uve da destinare al consumo fresco e per pigiatura, nel caso di uve da destinare a vinificazione. La formazione di tali molecole sembra seguire vie biosintetiche precise le quali potrebbero risentire di un controllo ambientale o genetico.

La tecnica SBSE-GC-MS ha confermato sensibilità e praticità attese. La semplificazione nella preparazione del campione ed il mancato utilizzo di solventi durante la preparazione del campione, rendono questa tecnica più economica e più veloce rispetto a quelle tradizionali. Ulteriori indagini, anche riguardanti la determinazione della frazione aromatica glicosidica delle uve, sono in corso per valutare l'applicabilità di questa metodica nella determinazione del potenziale aromatico globale delle uve. ■

Summary

Wine olfactory complexity depends not only on winemaking techniques, but also on the grapevine varietal aroma. The aim of this work was to characterize the aroma profile of *Vitis vinifera* L. cv Nebbiolo, cultivated in Piedmont, during berry development. Berries were sampled in 2011 in three field replicates of 25 vines each. Aroma compounds were analyzed by Stir Bar Sorptive Extraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry technique (SBSE-GC/MS). Several alcohols, aldehydes, C6 compounds, benzene derivatives, monoterpenes and one norisoprenoid were identified and quantified. Data showed that the maximum accumulation of volatiles occurs before the peak of total soluble solids. C6 compounds appeared quantitatively more important among the pre-fermentative volatiles in Nebbiolo, while β -ionone is present above its olfactory threshold. The SBSE confirm its sensitivity and efficacy.

Ringraziamenti. Gli Autori ringraziano la Fondazione "Cassa di Risparmio di Cuneo" per il supporto finanziario (Progetto "Tracciabilità dei vitigni piemontesi attraverso analisi delle componenti aromatiche") e il "Consorzio di Tutela Barolo, Barbaresco, Alba Langhe e Roero", l'azienda vitivinicola "Fratelli Negro" e l'Agrotecnico Diego Scavino, per la preziosa collaborazione apportata.

Bibliografia

- Bindon K.A., Dry P.R., Loeveys B.R. (2007) – Influence of plant water status on the production of C13-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4493-4500.
- Caven-Quantrill D.J., Buglass A.J. (2007) – Determination of volatile organic compounds in English vineyard grape juices by immersion stir bar sorptive extraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 206-213.
- Coelho E., Rocha S.M., Delgadillo I., Coimbra M.A. (2006) – Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv “Baga” ripening. *Analytica Chimica Acta*, 563, 204-214.
- Coelho E., Rocha S.M., Barros A.S., Delgadillo I., Coimbra M.A. (2007) – Screening of variety-and pre-fermentation-related volatile compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile. *Analytica Chimica Acta*, 597, 257-264.
- Cook Papini P., Mazza G., Gatti M., Bavaresco L. (2010) – Anthocyanin and aroma profiling of the ‘Albarossa’ grapevine crossbreed (*Vitis vinifera* L.) and its parent varieties ‘Barbera’ and ‘Nebbiolo di Dronero’. *Vitis*, 49, 121-127.
- De Rosso M., Panighel A., Carraro R., Padoan E., Favaro A., Dalla Vedova A., Flamini R. (2010) – Chemical characterization and enological potential of Raboso varieties by study of secondary grape metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11364-11371.
- Di Stefano R., Bottero S., Piggella R., Borsa D., Bezzo G., Corino L. (1998) – Precursori d’aroma glicosilati presenti nelle uve di alcune cultivar a frutto colorato. *L’Enotecnico*, marzo, 63-74.
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. (2004) – Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 1893-1902.
- Ferrandino A., Guidoni S. (2010) – Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv “Barbera” clones. *European Food Research and Technology*, 230, 417-427.
- Ferrandino A., Carlomagno A., Baldassarre S., Schubert A. (2012) – Varietal and prefermentative volatiles during ripening of *Vitis vinifera* cv Nebbiolo berries from three growing areas. *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.061, in stampa.
- Ferreira V., López R., Cacho J. (2000) – Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659-1667.
- García E., Chacon J.L., Martínez J., Izquierdo P.M. (2003) – Changes in volatile compounds during ripening in grapes of Airen, Macabeo and Chardonnay white varieties grown in La Mancha region (Spain). *Food Science and Technology International*, 9, 33-41.
- Green J.A., Parr W.V., Breitmeyer J., Valentin D., Sherlock R. (2011) – Sensory and chemical characterization of Sauvignon blanc wine: Influence of source of origin. *Food Research International*, 44, 2768-2797.
- Hardy, P.S. (1970) – Changes in volatiles of Muscat grapes during ripening. *Phytochemistry*, 9, 709-715.
- Hunter J.J., Ruffner H.P., Volschenk C.G., Le Roux D.J. (1995) – Partial defoliation of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon/99 Richter: effect on rot growth, canopy efficiency, grape composition and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 306-314.
- Kalua C.M., Boss P.K. (2010) – Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 337-348.
- Kotseridis Yorgos (1999). – Etude de l’arome des vins de Merlot et de Cabernet Sauvignon de la region Bordelaise. PhD thesis. Université II Bordeaux, Faculté d’Enologie.
- Koundouras S., Marinos V., Gkoulioti A., Kotseridis Y., van Leeuwen C. (2006) – Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5077-5086.
- Matsui K. (2006) – Green leaves volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 274-280.
- Nasi A., Ferranti P., Amato S., Chianese L. (2008) – Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques. *Food Chemistry*, 110, 762-768.
- Oliveira C., Silva Ferreira A.C., Mendes Pinto M., Hogg T., Alves F., Guedes de Pinho P. (2003) – Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5967-5971.
- Pedroza M.A., Zalacain A., Lara J.F., Salinas M.R. (2010) – Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE-GC-MS. *Food Research International*, 43, 1003-1008.
- Razungles A.J., Baumes R.L., Dufour C., Sznaper C.N., Bayonove C.L. (1998) – Effect of sun exposure on carotenoids and C13-norisoprenoid glycosides in Syrah berries (*Vitis vinifera* L.). *Sciences des Aliments*, 18, 361-373.
- Sabon I., De Revel G., Kotseridis Y., Bertrand A. (2002) – Determination of volatile compounds in Grenche wines in relation with different terroirs in the Rhone Valley. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6341-6345.
- Salinas M.R., Zalacain A., Pardo F., Alonso G.L. (2004) – Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during *Vitis vinifera* ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4821-4827.
- Sánchez-Rojas F., Bosch-Ojeda C., Cano-Pavón J.M. (2009) – A review of stir bar sorptive extraction. *Chromatographia*, Supplement Vol. 69, 79-94.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E. (2008) – Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54, 712-732.
- Sefton M.A., Skouroumounis G.K., Massy-Westropp R.A., Williams P.J. (1989) – Norisoprenoids in *Vitis vinifera* white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits. *Australian Journal of Chemistry*, 42, 20171-2084.
- Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J. (1993) – The volatile composition of Chardonnay juices – a study by flavor precursor analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 359-370.
- Tamborra P., Esti M (2010) – Authenticity markers in Aglianico, Uva di Troia, Negroamaro and Primitivo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 660, 221-226.
- Tarara J.M., Lee J., Spayd S.E., Scagel C.F. (2008) – Berry Temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 235-247.
- Versini G., Inama S., Sartori G. (1981) – A capillary column gaschromatographic research into the terpene constituents of Riesling Reanano wine from Trentino Alto Adige: Their distribution within berry, their passage into must and their presence in the wine according to different wine-making procedures. *Organoleptic considerations. Vini d’Italia*, XXIII, 189-211.
- Vilanova M., Diago M.P., Genisheva Z., Oliveira J.M., Tardaguilla J. (2011) – Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 935-942.
- Vilanova M., Genisheva Z., Bescansa L., Masa A., Oliveira J.M. (2012) – Changes in free and bound fractions of aroma compounds of four *Vitis vinifera* cultivars at the last ripening stages. *Phytochemistry*, 74, 196-205.
- Xi Z., Tao Y., Zhang L., Li H. (2011) – Impact of cover crops in vineyard on the aroma compounds of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon wine. *Food Chemistry*, 127, 516-522.
- Yang C.X., Wang Y.J., Liang Z.C., Fan P.G., Wu B.H., Yang L., Wang Y.N., Li S.H. (2009) – Volatiles of grape berries evaluated at the germoplasm level by headspace-SPME with GC-MS. *Food Chemistry*, 114, 1106-1114.