

INQUINAMENTO DA *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*



(cellule di lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces*)

LORIS FLORIAN
CLASSE VI VB
A.S. 2009/2010
G. B. CERLETTI

INDICE

PARTE TEORICA

- Introduzione	pag. 2
- Cenni storici	pag. 2
- Come e quando si sviluppa ?	pag. 3
- Ossigeno	pag. 3
- Anidride solforosa e pH	pag. 4
- Zuccheri	pag. 4
- Etanolo	pag. 4
- Acido acetico	pag. 5
- Temperatura	pag. 5
- Competizione con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pag. 5
- Fattori di sopravvivenza	pag. 5
- Quali composti produce?	pag. 6
- Fenoli volatili	pag. 6
- I motivi della diffusione	pag. 7
- Prevenzione e cura	pag. 7

PARTE SPERIMENTALE

- Premessa	pag. 8
- Fasi della sperimentazione	pag. 8
- Dati e conclusioni	pag. 17

INTRODUZIONE

Il vino è il prodotto di un complesso sistema microbiologico che evolve durante le diverse fasi tecnologiche della sua preparazione. La composizione microbiologica cambia partendo dalle fasi di raccolta, fermentazione e affinamento.

In ogni fase possono essere presenti diversi microrganismi che ne modificano la composizione con conseguenze che in alcuni casi possono essere disastrose sotto l'aspetto qualitativo. Il microrganismo che più di ogni altro deve preoccupare gli enologi è il lievito *Brettanomyces bruxellensis*.

L'intervento dei *Brettanomyces* non deve preoccupare durante la normale fermentazione alcolica, in quanto la popolazione di tali lieviti è superata e resa insignificante dall'attività frenetica dei lieviti *Saccharomyces*; i pericoli emergono dopo 5-8 mesi dalla fermentazione, dato che i *Brettanomyces* sono in grado di fermentare gli zuccheri residui non utilizzati dal *Saccharomyces*.

Dal punto di vista sensoriale *Brettanomyces* è in grado di produrre, oltre ai sentori di cuoio, cavallo ecc., una grande quantità di esteri, che i *Saccharomyces* non sono in grado di produrre. Le deviazioni olfattive sono comunemente chiamate "Brett character".

Tutto ciò comporta cambiamenti nelle caratteristiche sensoriali ed organolettiche dei vini, ciò non è voluto in quanto gli standard di qualità verrebbero inevitabilmente a mancare.

CENNI STORICI

Il termine *Brettanomyces* venne introdotto nel 1904 da Claussen, per identificare un lievito responsabile dell'aroma di alcune birre inglesi. Claussen osservò un ceppo di lievito differente da *Saccharomyces*, che subentrava dopo la normale fermentazione alcolica, per dar vita ad una fermentazione secondaria.

I primi veri studi sui *Brettanomyces* furono eseguiti, nel 1940, da Custers, lo studioso identificò 17 ceppi legati principalmente al mondo della birra; il primo ceppo proveniente dall'ambiente enologico fu isolato da Krumbholz nel 1930.

Le specie attualmente riconosciute sono: *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus* e *Brettanomyces nardensis*.

Il *Brettanomyces* possiede una parete cellulare resistente all'azione della beta-glucanasi ed è caratterizzato da un breve ciclo vitale e da una lenta crescita, dalla quale si produce un basso quantitativo di anidride carbonica.

Il *Brettanomyces* è resistente alla cicloesimide (actidione).

Il *Brettanomyces* è caratterizzato dalla produzione di fenoli volatili, tra i quali troviamo il 4-vinilfenolo (da cui si originerà il 4-etilfenolo) ed il 4-vinilguaiacolo (da cui si originerà il 4-etilguaiacolo), essi sono originati da due acidi cinnamici ossia l'acido p-cumarico e l'acido ferulico.

Brettanomyces può produrre altri cataboliti, tra cui acido isovalerico e tetraidropiridine.

Il *Brettanomyces* può essere considerato tra i maggiori produttori di ammine biogene. Il tenore medio di ammine biogene totali, rilevato in presenza di *Brettanomyces bruxellensis*, è di circa 15 mg/l.

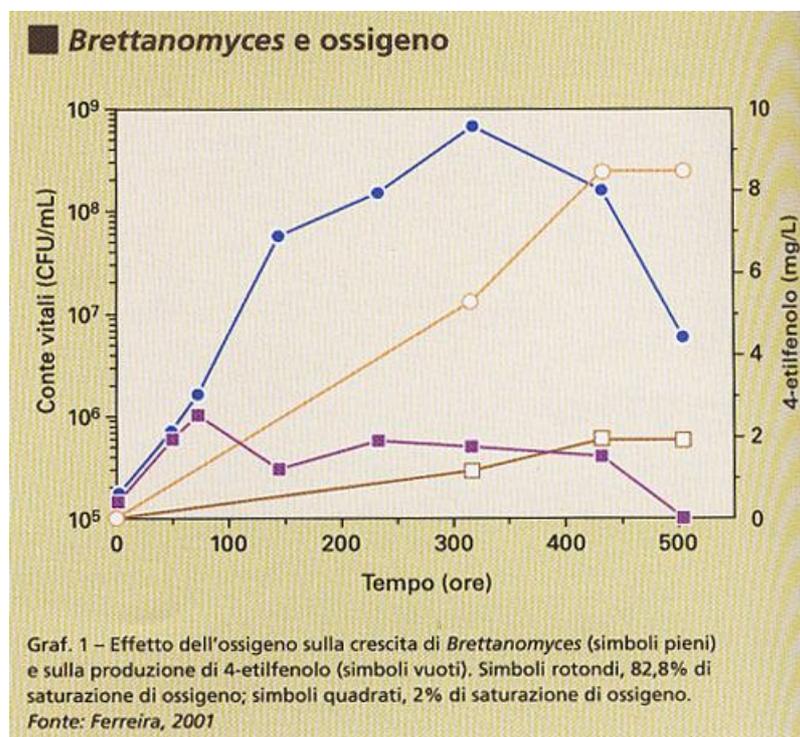
COME E QUANDO SI SVILUPPA?

I fattori che possono condizionare lo sviluppo di *Brettanomyces* sono: ossigeno, anidride solforosa, pH, zuccheri, etanolo, acido acetico, temperatura, competizione con il *Saccharomyces*, fattori di sopravvivenza.

OSSIGENO

Questo elemento favorisce la produzione di etilfenoli, in particolar modo di 4-etilfenolo (sentore di topo o stalla).

Livelli di O₂ superiori a 7 mg/l (corrispondenti a una saturazione di circa l' 80%) stimolano la crescita di *B. bruxellensis*.



Nei vini con livelli di ossigeno minori del 2% di saturazione è stata osservata una riduzione sia della crescita sia della produzione di etilfenolo nel tempo. La crescita del lievito segue l'andamento di una curva a campana con una fase lag iniziale.

Nei vini con livelli di ossigeno dell'82% di saturazione è stata osservata una crescita esponenziale della popolazione di *Brettanomyces*, seguita da una forte produzione di 4-etilfenolo.

La presenza di ossigeno stimola la produzione di acido acetico con conseguente aumento dell'acidità volatile del vino.

ANIDRIDE SOLFOROSA E pH

La crescita di *Brettanomyces* risulta inibita a pH 3,5 se la concentrazione di anidride solforosa libera è superiore ad almeno 20 mg/l, corrispondenti a 0,4 mg/l di anidride solforosa molecolare.

L'anidride solforosa dev'essere considerata come una sostanza inibitrice dello sviluppo del lievito, ma essa non è in grado di impedirne la presenza nel mezzo.

Da sottolineare il fatto che valori di pH inferiori a 3.19 inibiscono la crescita, quindi il metabolismo di *Brettanomyces bruxellensis*. Il *Brettanomyces* inquina maggiormente i vini rossi rispetto ai bianchi, probabilmente a causa che questi ultimi presentano un pH più basso e quantitativi di anidride solforosa maggiori.

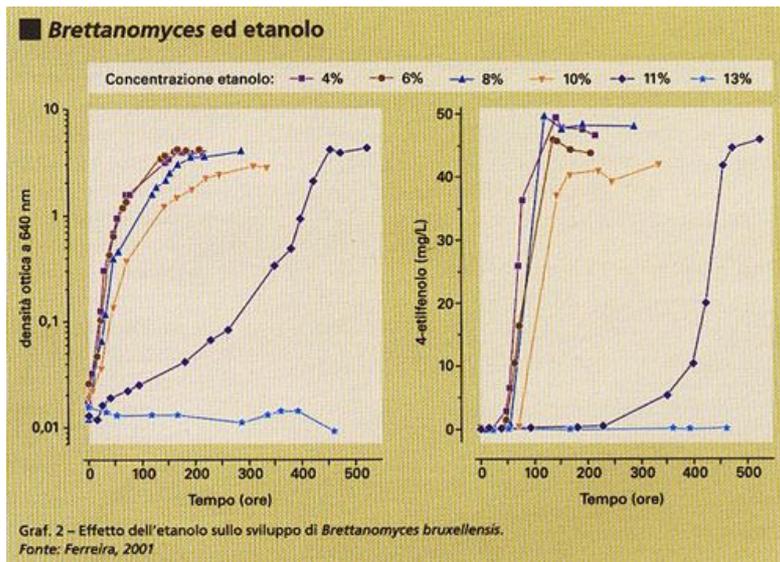
ZUCCHERI

Il *Brettanomyces*, oltre a glucosio e fruttosio, è in grado di metabolizzare anche i pentosi, non utilizzati dai *Saccharomyces* durante la fermentazione alcolica, il cellobiosio, uno zucchero prodotto durante le fasi di tostatura delle barrique, il trealosio, disaccaride presente nella cellula dei lieviti. Inoltre è in grado di utilizzare come fonte carboniosa anche il glicerolo.

Questo microrganismo riesce a moltiplicarsi fermentando anche piccole quantità di zuccheri residui nel vino: anche la fermentazione di soli 300 ng/l di zuccheri è sufficiente per produrre una popolazione di oltre 3000 cellule/ml, popolazione sufficiente per formare etilfenoli oltre la soglia di percezione olfattiva. La fermentazione ad opera di *Brettanomyces bruxellensis* può avvenire solo in presenza di ossigeno, ciò comporta la produzione di elevate quantità di acido acetico da glucosio.

ETANOLO

La crescita di *Brettanomyces* risulta inibita dalla presenza di etanolo oltre l'11%, tuttavia sono stati riscontrati con buona frequenza la presenza di *Brettanomyces* ed etilfenoli in quantità elevata anche in vini a elevato tenore alcolico, come l'Amarone.



ACIDO ACETICO

Il *Brettanomyces* risente della presenza nel mezzo colturale di concentrazioni superiori ai 2 g/l di acido acetico. Questa inibizione è maggiore in condizioni aerobiche che anaerobiche; il *Brettanomyces* risulta meno sensibile del *Saccharomyces*.

TEMPERATURA

I *Brettanomyces* si sviluppano in maniera ottimale alla temperatura di 25-30 °C, ma crescono tranquillamente anche a temperature minori quali 12-15 °C, infatti possono causare gravi problemi negli ambienti da bottaia.

COMPETIZIONE CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE

La presenza di *Saccharomyces cerevisiae* inibisce lo sviluppo di *Brettanomyces*, anche se l'inoculo avviene in concentrazioni elevate di quest'ultimo.

FATTORI DI SOPRAVVIVENZA

La vitamina pirridossina è l'unica che ha un reale effetto positivo nei confronti dei lieviti del genere *Brettanomyces*.

Gli ioni magnesio e fosfato non si sono dimostrati essenziali per la sua crescita.

L'estratto di lievito è il componente più importante per la crescita del microrganismo; inoltre la sua morfologia risulta sensibile ai cambiamenti nutrizionali.

Le cellule di *Brettanomyces* sono resistenti a restrizioni nutrizionali, abilità che può incrementare le sue possibilità di sviluppo anche nel corso di lunghi periodi di stoccaggio qualora, le condizioni ambientali diventino favorevoli.

QUALI COMPOSTI PRODUCE?

FENOLI VOLATILI

Lo sviluppo di *Brettanomyces* nei vini è associato alla comparsa di sentori fenolici (Brett character), alla perdita di aromi fruttati e allo sviluppo di sentori diversamente descritti come sentori di fattoria, sudore di cavallo, medicinale, pelle animale, cuoio, plastica, cerotto, vegetale, terroso.

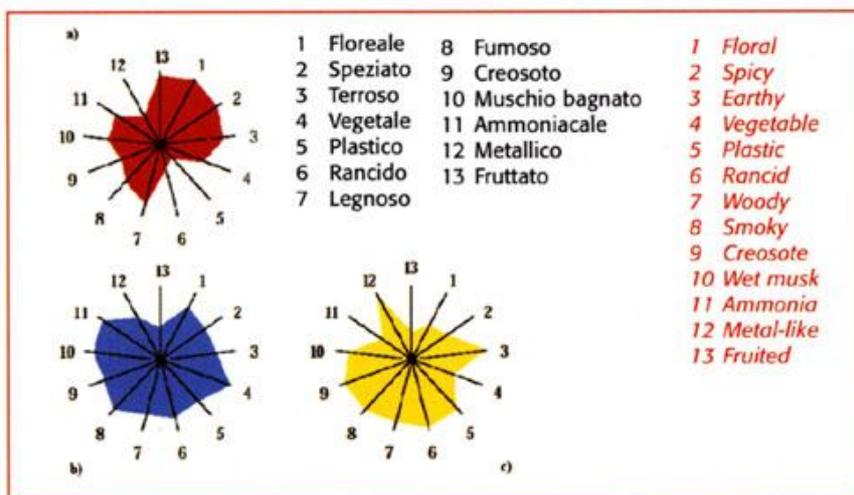
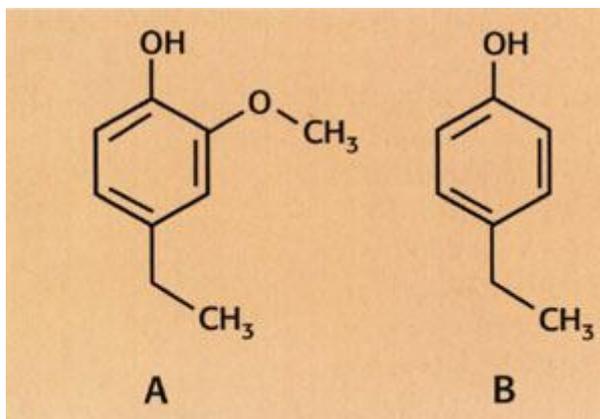


Figura 3. Percezioni sensoriali di vini:
a) "non Brett", b) "mediamente Brett",
c) "altamente Brett"
(Licker *et al.*, 1997)

Sensorial perceptions of wines:
a) "non Brett", b) "averagely Brett",
c) "highly Brett" (Licker *et al.*, 1997)

A tal proposito molta importanza viene data alla presenza dei due fenoli volatili prodotti dal *Brettanomyces*, il 4-etilguaiacolo ed il 4-etilfenolo.



Formule chimiche del 4-etilguaiacolo (A) e del 4-etilfenolo (B)
Chemical formulas of 4-ethylguaiacol (A) and of 4-ethylphenol (B)

I MOTIVI DELLA DIFFUSIONE

Negli ultimi dieci anni si è visto un incremento importante dell'inquinamento da *Brettanomyces*, ciò è causato da fattori diversi:

- Aumento del pH dei vini: le maturazioni delle uve, più accentuate per le condizioni climatiche più favorevoli e il diffondersi della tendenza di elaborare vini con maggior struttura e concentrazione, hanno causato un consistente aumento del pH dei vini e in particolare di quelli rossi.
- Diminuzione delle operazioni di filtrazioni e di chiarifica.

PREVENZIONE E CURA

Se l'effetto dell'azione dei *Brettanomyces bruxellensis* è poco evidente è possibile mascherarla con tagli o con operazioni di chiarifica; invece se l'azione è significativa non ci sono cure efficaci contro il difetto provocato dall'intervento del lievito. I carboni assorbenti rimuovono dosi limitate di 4-etilfenolo, mentre alcuni polimeri di sintesi rimuovono molto bene gli etilfenoli, ma impoveriscono il prodotto di altre sostanze.

Evidente l'importanza dell'azione preventiva nei confronti di questo inquinante microbico. In tal senso è strategica un'accurata igiene di cantina e in particolare dei vasi vinari in legno, spesso causa del diffondersi dell'inquinamento da *Brettanomyces*, in quanto questi lieviti possono insinuarsi nel legno delle botti sino ad alcuni millimetri dalla superficie interna del contenitore.

La sanitizzazione di barrique e botti non è certo un intervento agevole: bisogna prevedere un accurato lavaggio del recipiente. Efficace in tal senso, anche per la sua discreta azione sanitizzante, l'impiego del permanganato di potassio, nonché l'uso di potenti antisettici (combustione dello zolfo, acido peracetico).. Per quanto concerne il controllo dello sviluppo di *Brettanomyces* sul vino, l'anidride solforosa risulta efficace se il suo livello di molecolare risulta di almeno 0,4 mg/l (20 mg/l di libera a pH 3,5); nei casi di vini inquinati, meglio arrivare a 0,8 mg/l. Sono stati inoltre valutati altri antisettici: l'acido sorbico è risultato inefficace alle dosi usuali di impiego. Il dimetildicarbonato (oggi consentito solo in fase di imbottigliamento) si è dimostrato efficace in dosaggi inferiori a 50 mg/l.

La filtrazione risulta senza dubbio un mezzo efficace nell'abbattimento della carica microbica. Senza dubbio assai efficace come misura preventiva risulta il monitoraggio dell'eventuale presenza dell'inquinante microbico con l'utilizzo di terreni altamente specifici e selettivi. Se la presenza di *Brettanomyces* viene segnalata durante la sua fase moltiplicativa è possibile, visto il suo lento sviluppo e dato che la produzione dei fenoli volati avviene successivamente alla moltiplicazione del lievito, evitare l'alterazione sensoriale.

Il lievito *Brettanomyces* può pervenire dalle uve, specialmente se il loro stato sanitario risulta compromesso, è quindi buona pratica vendemmiare uve sane.

In conclusione, il successo della prevenzione dagli effetti nefasti del *Brettanomyces* non si basa su qualche specifica procedura, bensì su una serie di precisi e puntuali interventi e attenzioni, salvaguardando in tal modo la qualità del vino.

PARTE SPERIMENTALE

PREMESSA

La parte sperimentale dello studio del *Brettanomyces bruxellensis* si è sviluppata in varie fasi, si è partiti dalla preparazione del terreno di coltura denominato YPD sino all'inoculo dei lieviti inquinanti, forniti dall'Università di Padova, su varie tipologie di vino. I primi inoculi sono serviti a determinare il comportamento dei *Brettanomyces*, per comprenderne lo sviluppo e capire quali fossero i fattori determinanti per poter affermare che l'inoculo fosse andato a buon fine.

Lavorando con lieviti inquinanti tutte le operazioni sono state eseguite "sotto cappa" sterile e seguendo le basilari norme per evitare la contaminazione, come l'uso di guanti, materiale sterile, ecc.

Alla fine dell'esperienza tutti i liquidi inquinati sono stati fatti bollire per eliminare qualsiasi cellula vivente, i materiali sono stati sterilizzati in autoclave.

FASI DELLA SPERIMENTAZIONE

- PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO NUTRITIVO YPD:

ingredienti:

- 1000 g H₂O distillata
- 20 g di glucosio
- 20 g di peptone
- 10 g di estratto di lievito
- 20 g di agar

La preparazione del terreno di coltura consiste nel far disciogliere l'agar in un litro di acqua portata ad alta temperatura, in seguito verranno aggiunti e miscelati gli altri ingredienti sino ad ottenere un composto liquido omogeneo; successivamente il composto verrà lasciato raffreddare, giunto a temperatura ambiente sarà pronto per l'uso.

- **Primo inoculo 23 febbraio 2010**

Materiale:

- terreno di coltura YPD contenuto in becchi di clarino;
- vino marzemino 12.5% alcol;
- vino pinot nero 12% alcol;
- 2 beute da 200 ml;
- lieviti del genere *Brettanomyces bruxellensis*.

Nei becchi di clarino contenenti agar sono stati effettuati, mediante l'uso di anse sterili, degli inoculi di lieviti *Brettanomyces*, poi gli stessi sono stati messi in stufa alla temperatura di 26 °C, questo per far proliferare delle colonie e mantenere in tal modo dei ceppi utili per inoculi successivi.



(becchi di clarino inoculati con *Brettanomyces bruxellensis*)

In seguito, sono stati messi 200 ml di vino marzemino in una beuta, lo stesso è stato fatto col pinot nero, a questi campioni è stato aggiunto un inoculo di *Brettanomyces* preso direttamente dall'agar senza diluirlo od omogeneizzarlo in acqua, in quanto lo scopo era capire quali sarebbero state le conseguenze dello sviluppo dei lieviti (odori sgradevoli, pellicole superficiali ecc.).

Le beute sono state messe in stufa alla temperatura di 26 °C.

RISULTATI al 2 marzo 2010

I campioni inoculati non presentano modificazioni né a livello sensoriale né a livello visivo. Si nota però che la massa di agar inocolata è rimasta integra, quindi si presuppone sia necessario una omogeneizzazione della coltura in acqua prima dell'inoculo stesso.

- Secondo inoculo 9 marzo 2010

Per il secondo inoculo i vini utilizzati sono stati sempre il marzemino ed il pinot nero, solo che questa volta la modalità di preparazione del substrato e la pratica d'inoculo è stata diversa.

Per prima cosa sono stati preparati quattro campioni da inoculare:

- campione 1: 100 ml di acqua distillata + 100 ml di vino marzemino;
- campione 2: 100 ml di acqua distillata + 100 ml di vino pinot nero;
- campione 3: 100 ml di acqua distillata + 100 ml di vino marzemino + 10 g di glucosio;
- campione 4: 100 ml di acqua distillata + 100 ml di vino pinot nero + 10 g di glucosio.

I preparati sono stati messi in beute da 200 ml.

Preparazione della massa da inoculare

Si è preso un becker contenente 10 ml di acqua distillata, poi è stato preso un becco di clarino (di quelli preparati per il mantenimento della coltura), con una spatola sterile è stato prelevato dal becco il terreno agarizzato con la coltura che nel periodo di incubazione in stufa si è ingrandita, il tutto è stato messo nel becker ed è stato mescolato.

L'inoculo è avvenuto immettendo in ogni beuta 2,5 ml di massa d'acqua con lieviti, in seguito l'incubazione si è compiuta in stufa, alla temperatura di 26 °C.

RISULTATI al 17 marzo 2010

Tutte e quattro le beute presentano odori sgradevoli dovuti all'attività dei *Brettanomyces*, il sentore di topo è molto presente.

- Terzo inoculo 30 marzo 2010

Il terzo inoculo è stato effettuato su un lambrusco con un grado alcolico del 7.5%, in quanto molti testi affermano che il maggior rischio, di inquinamento da lieviti del genere *Brettanomyces*, riguarda vini con gradazione alcolica bassa e con un certo livello di amabilità; per questo si è voluto analizzare il comportamento di tali lieviti nel vino lambrusco.

Sono state eseguite le analisi del vino, dalle quali sono emersi i seguenti valori:

- anidride solforosa libera: 12 mg/l
- anidride solforosa totale: 60 mg/l
- acidità volatile: 0.41 mg/l
- acidità totale: 7.5 mg/l
- zuccheri: 36.8 g/l
- pH: 3.23
- alcol: 7.5% vol.

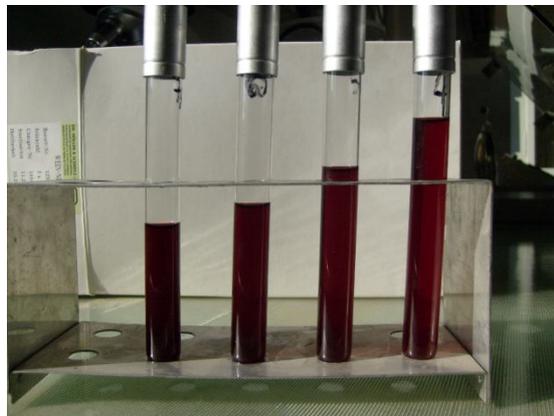
Con il vino lambrusco ho effettuato una tipologia di inoculo diversa. Innanzitutto ho preso otto provette e le ho divise in due gruppi da quattro provette ciascuno.

Gruppo 1: lo scopo era quello di effettuare delle diluizioni per ottenere quattro provette con un substrato di 7%,6%,5%,4% vol di alcol.

Procedimento:

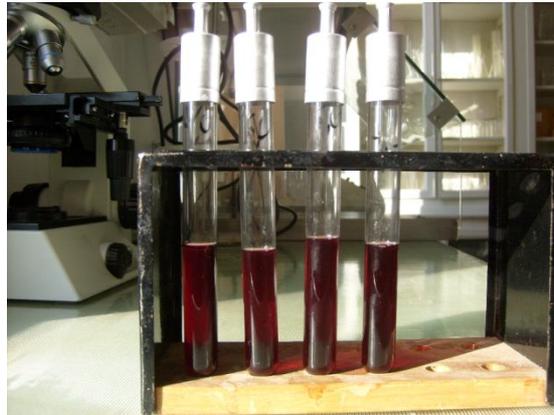
- 1) Si è utilizzato un inoculo da 0.5 ml per provetta, 10 ml di vino lambrusco a 7.5% vol.
- 2) Per ottenere la prima diluizione a 7% è stato usato solo l'inoculo
- 3) Seconda diluizione a 6%, si è trovato il valore della proporzione $6:10=7,5:x$ risultato $x=12,5$ (aggiunto 2 ml di H₂O pura + 0,5 ml di inoculo)
- 4) Terza diluizione a 5%, si è trovato il valore della proporzione $5:10=7,5:x$ risultato $x=15$ (aggiunto 4,5 ml di H₂O pura + 0,5 ml di inoculo)
- 5) Quarta diluizione a 4%, si è trovato il valore della proporzione $4:10=7,5:x$ risultato $x=18,75$ (aggiunto 8,25 ml di H₂O pura + 0,5 ml di inoculo)

Il risultato sono state quattro provette con volumi e gradazioni diversi.



(quattro provette con volumi e gradazioni diversi)

Gruppo 2: nelle provette a volume uguale si è portato il volume a 9,5 ml per provetta e solo dopo è stato effettuato l' inoculato allo scopo di avere un inoculo omogeneo per concentrazione in tutti i campioni.



(provette con stesso livello e gradazioni diverse)

RISULTATI all' 8 aprile 2010

Conta dei lieviti, mediante l'uso di un vetrino Thoma, nelle quattro provette con il medesimo livello.

Camera contaglobuli Thoma (o vetrino Thoma):

è un particolare vetrino con un piano centrale (sul quale sono incisi dei quadrati di $0,0025 \text{ mm}^2$ di lato) che giace ad un livello inferiore rispetto al resto del vetrino con un dislivello di $0,1 \text{ mm}$.

Si considerano 3 quadrati presi a caso per ciascuno dei quali si contano le cellule presenti, la media dei valori contati va moltiplicata per 4000 (il volume della camera osservata è data da un prisma che ha per base il quadratino da $0,0025 \text{ mm}^2$ di superficie e per altezza $0,1 \text{ mm}$ ed è pari a $1/4000 \text{ mm}^3$) per ottenere il numero delle cellule per mm^3 .

$\text{N}^\circ \text{ cellule per } \text{mm}^3 = \text{media delle cellule per quadrato} \times 4000.$

N.B. per ottenere il numero di cellule/ml presenti nel campione il risultato deve essere moltiplicato per 10^3 e, se necessario, per il fattore di diluizione.

- 7%: 51,55,67 cellule, quindi **230.666.666 cell/ml**, forma bastoncellare;
- 6%: 40,32,63 cellule quindi **180.000.000cell/ml**, forma bastoncellare;
- 5%: 72,81,65 cellule quindi **290.666.666 cell/ml**, forma prevalentemente bastoncellare, ma con forma anche sferica;
- 4%: 105,93,116 cellule quindi **418.666.666 cell/ml**, forma sferica prevalente.

Tutte le provette presentano a livello sensoriale modificazioni negli aromi e la forma dominante, man mano che si va dai campioni meno diluiti a quelli più diluiti, è quella sferica.

RISULTATI al 10 aprile

Conta dei lieviti, mediante l'uso di un vetrino Thoma, nelle quattro provette con il medesimo livello.

- 7%: 65,59,79 cellule quindi **270.666.666 cell/ml**, forma bastoncellare e cellule piccole, poco sviluppate;
- 6%: 131,123,183 cellule quindi **582.666.666 cell/ml**, forma ellittica prevalente;
- 5%: 163,215,201 cellule quindi **772.000.000 cell/ml**, forma ellittica prevalente;
- 4%: 105,163,156 cellule quindi **565.333.333 cell/ml**, forma sferica prevalente.

Tutte le provette presentano a livello sensoriale modificazioni marcate negli aromi, ma non altri fenomeni di tipo visivo.

RISULTATI al 14 aprile 2010

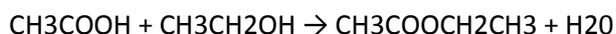
- 7%: 113,125,118 cellule quindi **474.666.666 cell/ml**;
- 6%: 176,233,249 cellule quindi **877.333.333 cell/ml**;
- 5%: 170,193,240 cellule quindi **804.000.000 cell/ml**;
- 4%: 233,191,334 cellule quindi **1.010.666.667 cell/ml**.

Tutte le provette presentano a livello sensoriale modificazioni marcate negli aromi, si distingue l'odore di aceto e di topo, a livello del menisco è presente una leggera patina (fioretta), tipica dell'attività dei *Brettanomyces bruxellensis*.

La forma cellulare è per tutte le provette ellittica.

Il sentore di aceto è provocato dalla presenza di acetato di etile, infatti i *Brettanomyces* sono in grado di produrre acido acetico in presenza di ossigeno, questo poi, tramite un' esterificazione con etanolo formerà l'acetato.

FORMAZIONE DI ACETATO DI ETILE PER ESTERIFICAZIONE DELL' ACIDO ACETICO CON L' ETANOLO:

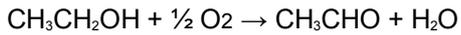


MECCANISMO DELLA FERMENTAZIONE ACETICA:

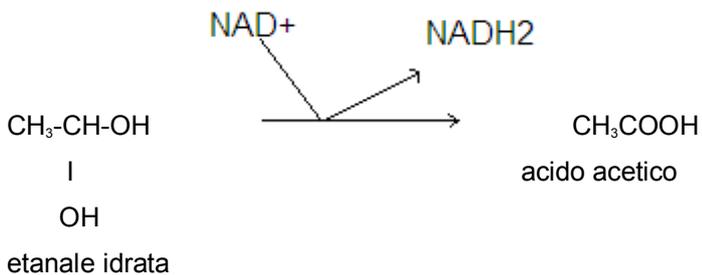
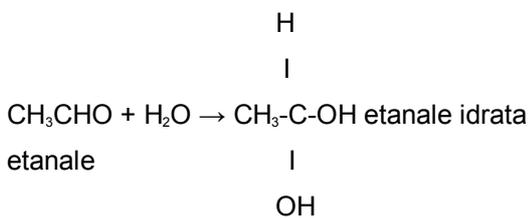
I meccanismi della fermentazione acetica sono due, uno si sviluppa in ambiente aerobio l'altro invece in ambiente anaerobio.

Considerando il fatto che i *Brettanomyces* sviluppano acido acetico solo in presenza di ossigeno, sarà riportato solamente il processo che si attua quando questi lieviti hanno a disposizione questo elemento.

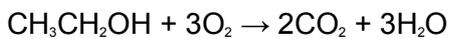
Entrambi i meccanismi hanno in comune la formazione dell'etanale a partire dall'etanolo:



- AEROBIOSI



FIORETTA: è una malattia del vino causata da un'ossidazione dell'alcol etilico ad anidride carbonica.



RISULTATI al 4 maggio 2010

- 7%: 192,213,245 cellule quindi 866.666.666 cell/ml;
- 6%: 229,222,216 cellule quindi 889.333.333 cell/ml;
- 5%: 268,252,223 cellule quindi 990.666.666 cell/ml;
- 4%: 104,170,186 cellule quindi 613.333.333 cell/ml.

Tutte le provette presentano a livello sensoriale modificazioni marcate negli aromi, si distingue l'odore di aceto e di topo, a livello del menisco è presente una patina considerevole di consistenza mucillaginosa (fioretta), tipica dell'attività dei *Brettanomyces bruxellensis*.

La forma cellulare è per tutte le provette ellittica.

Durante le attività di laboratorio, largo spazio è stato dato all'osservazione ed alla fotografia delle cellule, grazie a delle operazioni di microfotografia effettuate nel laboratorio di scienze della scuola enologica.

Si è notato un cambiamento nella forma dei lieviti studiati a seconda del substrato e delle condizioni in cui si trovavano gli stessi.



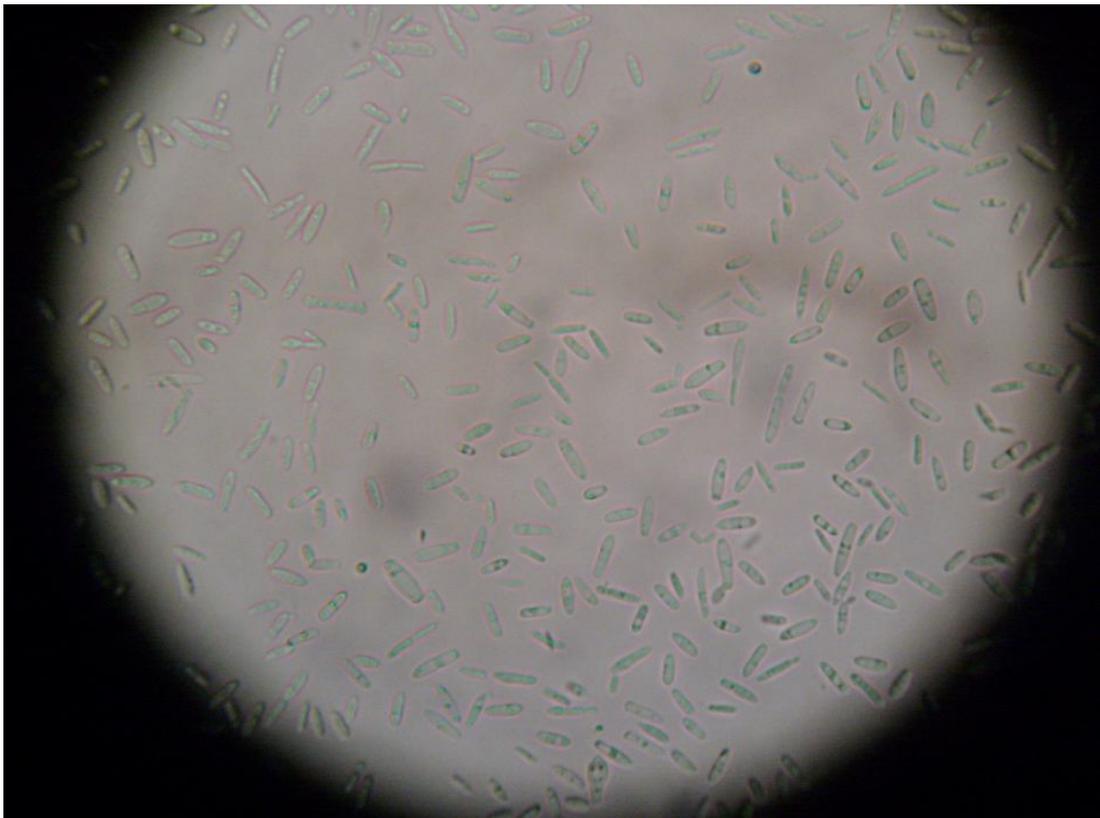
(cellule globose prelevate dal campione fornito dall'Università)



(cellule ellittiche ed in divisione prelevate dal primo inoculo su marzemino)



(cellule globose presenti su vetrino Thoma)



(cellule di *Brettanomyces bruxellensis*; si notano cellule in gemmazione)

DATI E CONCLUSIONI

DATI RACCOLTI SULLO SVILUPPO

- Su agar: lo sviluppo su agar alla temperatura di 26°C è notevole in un tempo relativamente breve, in due giorni l'inoculo si presenta già di dimensioni considerevoli. Questo dimostra che il substrato è idoneo per essere usato se si intende mantenere la coltura nel tempo.
- Su vino: lo sviluppo dei *Brettanomyces bruxellensis* nel vino è lento. Nelle beute usate per la sperimentazione i primi sintomi di inquinamento si sono avuti dopo dieci giorni circa, alla temperatura ideale di 26°C.

E' necessario considerare il fatto che in cantina il vino è conservato a temperature molto più basse, quindi si può presumere che la crescita sia ancora più lenta; questo pone vari problemi, ad esempio anche con un continuo controllo non è detto che si trovi la presenza di cellule inquinanti, specialmente se si tratta di grandi masse.

La conta dei lieviti dimostra come lo sviluppo di questi microrganismi sia influenzato dalla concentrazione di alcol, in quanto man mano che il grado aumenta, in genere, il numero di cellule/ml diminuisce.

Poi a livello olfattivo la lenta crescita non permetterà di individuare attraverso i sensi l'inizio di un attacco già in vasca. Questo potrebbe portare l'enologo a pensare che tutto sia in ordine nel prodotto, avviandolo così all'imbottigliamento, in tal caso gli effetti dell'inquinamento non individuato in cantina, saranno presenti in bottiglia.

Dall'esperienza si evince che i vini con un residuo zuccherino come il lambrusco sono substrati ideali per l'attacco dei *Brettanomyces bruxellensis*, in quanto lo zucchero verrà attaccato per l'ottimale svolgersi del metabolismo del microrganismo.

DATI RACCOLTI SUI DANNI

- Danni a livello sensoriale: la produzione di 4-etilfenolo e 4-etilguaicolo provocano profonde modificazioni negli aromi, sviluppando sentori di topo, stalla, pelo bagnato di animale. Anche la produzione di acido acetico è un fattore da considerare, in quanto in condizioni di aerobiosi la sua produzione è tale da sviluppare un sentore di aceto, che non può essere trascurato.
- Danni a livello visivo: l'attività dei lieviti considerati provoca modificazioni a livello visivo, in quanto il loro sviluppo crea la cosiddetta "fioretta", ossia una patina mucillaginosa sulla superficie del vino, poi se esso viene agitato il velo si rompe andando ad intorbidire tutta la massa.

Durante il periodo di sperimentazione che ha coperto un arco di tempo di circa due mesi e mezzo i risultati sono stati considerevoli per quanto riguarda la comprensione dello sviluppo dei *Brettanomyces bruxellensis* e dei danni che essi possono provocare al vino inquinato.

Si può affermare che i lieviti *Brettanomyces bruxellensis* possono rivelarsi una vera insidia per gli operatori di cantina. Essi non sono di facile individuazione e possono sopravvivere su qualsiasi oggetto e macchinario usato in enologia.

La loro attività metabolica pregiudica irrimediabilmente, se non fermata in tempo, il prodotto, deprezzandolo e destinandolo alla distillazione.

In conclusione, dopo l'esperienza non posso che concordare con molti Autori nel dire che la vera lotta nei confronti di questo lievito è la prevenzione, prestando particolare attenzione alle operazioni in cantina, alla sanitizzazione ed alla sterilizzazione dei macchinari della stessa.

E' indubbio poi che la sanità delle uve debba essere eccellente, fuori da ogni fenomeno di marciume od attacco microbico. Tutto ciò deve portare il tecnico a controllare tutto l'iter che porterà al futuro vino, in modo da evitare pericolosi inconvenienti che lederebbero l'immagine aziendale, oltre che una parte dei profitti.

BIBLIOGRAFIA

- VigneVini n.11 novembre 2009. Autori: Raffaele Guzzon. Luca Settanni.
- ScienceDirect "The production of ethilphenols in wine by yeasts of genera *Brettanomyces* and *Dekkera*".
Autori: R. Suàrez, J.A. Suàrez-Lepe, A. Morata, F. Calderòn.
- *Brettanomyces*: conoscerlo per evitarlo. Autori: Roberto Ferrarini, Riccardo Rossini, Enrico Bocca, Sandra Torriani.
- Strategie di analisi e di controllo dello sviluppo di *Brettanomyces/Dekkera* nell'industria enologica. Autore: Università degli Studi di Milano.
- Dispensa di chimica a. s. 2009/2010. Autori: prof. Carla Mariotto e studenti classi 6° VB del corso Cerere Viticolo Enologico.

RINGRAZIAMENTI

- Prof. Nicola Zanetti per l'aiuto ed il sostegno fornitomi, oltre al ruolo guida che ha ricoperto durante tutto il periodo di preparazione della tesina.
- Prof. Carla Mariotto.
- Prof. Ornella Santantonio.