

**ISTITUTO D'ISTRUZIONE SUPERIORE "P. D'Aquileia"**  
**ISTITUTO TECNICO AGRARIO STATALE "PAOLINO D'AQUILEIA"**  
**Con orientamento speciale per la Viticoltura e l'Enologia**  
**Cividale del Friuli (UD)**

**ESAME DI STATO**  
**2013/2014**

**INQUINAMENTO DA DEKKERA/BRETTANOMYCES**  
**E SVILUPPO DI FENOLI VOLATILI**  
**CAUSE - EFFETTI - PRECAUZIONI - SOLUZIONI**

Discipline coinvolte: Enologia - Chimica Enologica - Microbiologia

Studente: Fazio Gaetano

Corso: Viticoltura ed Enologia

Classe: VI E

Anno Scolastico: 2013/2014

## INDICE

Introduzione.....	3
<b>1. Cenni storici.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Brettanomyces in cantina.....</b>	<b>5</b>
2.1 Importanza enologica.....	5
<b>3. Origine del lievito Brettanomyces.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Biologia Brettanomyces.....</b>	<b>7</b>
4.1 Classificazione scientifica.....	7
4.2 Caratteristiche biologiche.....	7
<b>5. Condizioni di sviluppo del lievito.....</b>	<b>9</b>
5.1 Momenti in cui è più facile avere sviluppo di Brettanomyces.....	9
5.2 <b>Fattori che possono condizionare lo sviluppo di Brettanomyces.....</b>	<b>9</b>
5.2.1 Ossigeno.....	9
5.2.2 Temperatura.....	10
5.2.3 Zuccheri.....	10
5.2.4 Anidride solforosa e pH.....	10
5.2.5 Etanolo.....	11
5.2.6 Acido acetico.....	11
5.2.7 Fattori di sopravvivenza.....	12
5.2.8 Competizione con Saccharomyces.....	12
5.2.9 Interazioni con Oenococcus oeni.....	12
<b>6. Brettanomyces lievito da alterazione o da contaminazione?.....</b>	<b>13</b>
<b>7. Contaminazione dei vini nel corso della loro elaborazione da parte di Brettanomyces.....</b>	<b>14</b>
<b>8. Origine microbiologica e proprietà dei fenoli volatili.....</b>	<b>15</b>
8.1 Deviazione olfattiva di tipo "fenolico".....	15
8.2 Meccanismi enzimatici della produzione di vinil-fenoli da Saccharomyces cerevisiae.....	17
8.3 Influenza di alcuni parametri della vinificazione sul tenore in vinil-fenoli dei vini bianchi.....	18
8.4 Circostanze e frequenza dell'apparizione degli etil-fenoli.....	18
8.5 Origine microbiologica degli etil-fenoli nei vini rossi.....	18
8.6 Gli acidi fenolici e i loro derivati.....	19
8.7 Chimismo enzimatico della produzione degli etil-fenoli da Brettanomyces.....	19
8.8 Controllo dell'attività cinnamato esterasi.....	20
<b>9. Brettanomyces in affinamento.....</b>	<b>21</b>
9.1 Il recupero tradizionale della barrique.....	21
9.2 Controllo dei fattori fisico-chimici durante l'affinamento in legno.....	22
<b>10. Controllo microbiologico del Brettanomyces.....</b>	<b>23</b>
10.1 Terreni utilizzabili in laboratorio per verificare la presenza di Brettanomyces.....	24
10.2 Prelievo in barrique.....	23
<b>11. Prevenire è meglio che curare.....</b>	<b>25</b>
11.1 Controllo della contaminazione della cantina da parte di fonti esterne.....	25
11.2 Valutazione dell'efficienza delle procedure di sanitizzazione.....	25
11.3 Monitoraggio della contaminazione nelle fasi-chiave del processo.....	26
<b>12. Come curare Brettanomyces in cantina.....</b>	<b>27</b>
12.1 Mezzi diretti.....	27
12.2 Mezzi indiretti.....	28
<b>13. Metodi di rilevamento di Brettanomyces.....</b>	<b>29</b>
13.1 Analisi gas-cromatografica.....	29
12.2 Estrazione di DNA e ricorso a PCR.....	29
Conclusioni.....	30
Bibliografia.....	31

## DEKKERA/BRETTANOMYCES

### *Introduzione*

*In questi ultimi anni diverse cantine hanno iniziato a riscontrare, in alcuni vini, dei difetti organolettici definiti come sentori fenolici e meglio identificati come sentori “di animale”.*

*La comparsa di questi odori anomali e nauseabondi è legata allo sviluppo di lieviti *Brettanomyces*, e in alcune realtà si è iniziato a monitorare questa diffusione al fine di comprenderne le cause e i fattori che predispongono un vino più di un altro alla contaminazione. Purtroppo le conoscenze sono ancora limitate e le cantine tendono a sottovalutare il problema.*



## 1. CENNI STORICI

Il termine *Brettanomyces* venne introdotto nel 1904 da Claussen per identificare un lievito responsabile del caratteristico aroma di alcune birre inglesi del tempo (da cui il prefisso Brettano). Claussen, infatti, identificò un ceppo di lievito non appartenente al genere *Saccharomyces*, agente di una fermentazione secondaria della birra. I primi studi sistematici furono condotti da Custers (1940); il genere è stato studiato e definito su 17 ceppi isolati prevalentemente dall'industria della birra britannica - il termine *Brettanomyces* deriva dal greco per "fungo britannico". L'unico ceppo studiato proveniente dall'ambiente enologico fu isolato da Krumbholz nel 1930 in un vino francese. Le specie attualmente riconosciute sono: *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus* e *Brettanomyces naardeensis*. Altri studi nel 1956 furono eseguiti da Peynaud e Domercq, che associarono questi lieviti alla produzione di elevate concentrazioni di acido acetico. Successive diverse indagini hanno messo in evidenza una situazione più complessa: molti infatti risultano i microrganismi coinvolti in questo processo; tra questi ricordiamo:

-*Saccharomyces cerevisiae*: maggiormente sospettato inizialmente, poi riconosciuto meno responsabile in quanto fortemente inibito dai tannini poco polimerizzati o dalle catechine;

-*batteri malolattici*: alcuni autori imputavano alla loro attività la formazione di etil-fenoli; oggi si tende a ridurne l'importanza poiché la quantità prodotta non incide in modo significativo sulla qualità aromatica del vino;

-*lieviti non-Saccharomyces*, in particolare *Dekkera/Brettanomyces* protagonista della sintesi di etil-fenoli.

Origine della nomenclatura dei lieviti (Licker <i>et al.</i> , 1997) <i>Origin of the names of yeasts (Licker et al., 1997)</i>		
Genere <i>Genus</i>	Etimologia <i>Etymology</i>	Note <i>Notes</i>
<i>Saccharomyces</i> "sugar fungus"	<i>Saccharo</i> = zucchero <i>myces</i> = micete	dal greco <i>saccharon</i> dal greco <i>mycetes</i>
<i>Saccharomyces</i> "sugar fungus"	<i>Saccharo</i> = sugar <i>myces</i> = fungus	from Greek <i>saccharon</i> from Greek <i>mycetes</i>
<i>Brettanomyces</i> "micete dell'industria inglese della birra"	<i>Brettano</i> = industria britannica della birra <i>myces</i> = micete	Claussen, 1903 dal greco <i>mycetes</i>
<i>Brettanomyces</i> "fungus of the English beer industry"	<i>Brettano</i> = British beer industry <i>myces</i> = fungus	Claussen, 1903 from Greek <i>mycetes</i>

## 2. BRETTANOMYCES IN CANTINA

### 2.1 *Importanza enologica*

La cantina non è che il punto di arrivo di *Brettanomyces*: come avviene quasi per tutti i lieviti presenti nel vino, e per lo stesso *Saccharomyces cerevisiae*, esso proviene dall'esterno in particolare dalla vigna, dove gli organi vegetali ed il terreno lo possono ospitare; tuttavia alcuni lieviti molto resistenti possono conservarsi in cantina per molto tempo. Una volta giunto in cantina, questo microrganismo può colonizzare tutti i materiali porosi presenti, e non solo, soprattutto il legno delle botti e delle barrique, ma anche le vasche in cemento non perfettamente vetrificato, le asperità delle tubature, e comunque potenzialmente tutte le superfici. Nel prodotto lo sviluppo del difetto è contemporaneo a quello del microrganismo. Poiché *Brettanomyces* è un lievito con scarsa attitudine fermentativa e soprattutto non competitivo rispetto a *Saccharomyces cerevisiae*, inizia a manifestarsi a partire dalla fine della fermentazione alcolica, quando *S. cerevisiae* comincia a morire e lisare, in corrispondenza delle fasi di vinificazione in cui l'azione della SO<sub>2</sub> molecolare si mantiene necessariamente più blanda (fermentazione malolattica, stabilizzazione del colore, microossigenazione, affinamento in barrique). *Brettanomyces* può condurre fermentazioni miste con *Saccharomyces*, tuttavia non riesce mai a prendere il sopravvento a causa della sua scarsa capacità competitiva.

Il vino è molto ostile per tutti gli altri lieviti, in quanto è un mezzo povero sia di zuccheri che di nutrienti e ricco di etanolo (che in condizioni di ossidazione spinta *Brettanomyces* utilizza per svilupparsi, come i lieviti "Flor"); tuttavia tali condizioni risultano, comunque, compatibili con il metabolismo di *Brettanomyces* che, essendo molto lento, può continuare ad operare per molti mesi o addirittura per anni le trasformazioni metaboliche di cui è capace. Numerosi centri di ricerca hanno condotto studi volti ad individuare ceppi positivi di *Brettanomyces* eventualmente capaci di esaltare la complessità aromatica dei vini senza danneggiare le loro proprietà organolettiche, ma tale caratteristica non è mai stata posta in evidenza.

*Brettanomyces* non è un problema confinato alle produzioni artigianali o alle cattive condizioni igieniche tutt'ora riscontrabili in alcune cantine; proprio per la tipologia dei vasi vinari in cui trova le condizioni ideali (recipienti in legno), diventa un problema soprattutto per i vini di pregio che vi devono maturare per tempi più o meno lunghi.

Alla luce di quanto fin qui riportato, e con l'aggiuntiva considerazione del costo di una barrique che induce ad esasperarne l'utilizzo, è immediato intuire come una sua contaminazione esponga a rischi elevatissimi il vino (o meglio i vini che essa successivamente ospiterà), anche per le oggettive difficoltà che si incontrano nella sua pulizia e disinfezione.

### **3. ORIGINE DEL LIEVITO BRETTANOMYCES**

#### **3.1 VIGNETO:**

la propagazione primaria inizia nel vigneto in quanto fiori, frutti e il suolo sono l'habitat naturale di una vasta popolazione di microrganismi che varia stagionalmente come entità e diffusione (picco massimo di propagazione in autunno).

Dal punto di vista agronomico Brettanomyces non pregiudica in alcun modo la vegetazione della vite; diventa, però, di fondamentale importanza limitare l'inquinamento già durante le operazioni di vendemmia e all'arrivo dell'uva in cantina.

#### **3.2 AMBIENTE DI CANTINA:**

sono stati indicati come fonte di diffusione di Brettanomyces:

3.1 l'uso di attrezzature contaminate come pigiatrici, tubi flessibili di trasferimento, presse, canali di scolo, valvole e macchinari per l'imbottigliamento;

3.2 Muri e pavimenti umidi della cantina (il pavimento della cantina sarebbe bene se fosse sempre bagnato per evitare "innalzamento" di polveri) ;

3.3 Insetti - è stata accertata la presenza di Brettanomyces sul corpo, sulle ali e sulle zampe di Drosophila così come nella sacca del nettare e nel suo tratto intestinale.

3.4 Botti di legno - Brettanomyces ha una preferenza per il rovere che costituisce un ambiente ottimale per il suo sviluppo.

## 4. BIOLOGIA DI BRETTANOMYCES

### 4.1 *Classificazione scientifica*

*Dominio: Eukaryota*  
*Regno: Fungi*  
*Phylum: Ascomycota*  
*Subphylum: Saccharomycotina*  
*Classe: Saccharomycetes*  
*Ordine: Saccharomycetales*  
*Famiglia: Saccharomycetaceae*

### 4.2 *Caratteristiche biologiche*

#### *Premessa*

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 ognuna di queste fasi possono essere presenti diversi microrganismi che ne modificano la composizione con conseguenze, che in alcuni casi, possono essere nefaste sotto l'aspetto qualitativo. In particolare il microrganismo in questione è sinonimo di queste alterazioni: si tratta proprio del lievito Brettanomyces. (VQ numero cinque — giugno 2007 pagg. 68-75). Brettanomyces, infatti, è la seconda causa microbiologica di difetto nel vino; è sempre compresente con Saccharomyces anche se non gradisce elevate concentrazioni zuccherine. Brettanomyces ha capacità fermentativa e si conserva anche da un anno all'altro perché ha scarse esigenze nutrizionali.

I lieviti appartenenti al genere Brettanomyces fanno parte della famiglia dei Saccharomycetaceae, e sono spesso colloquialmente definiti "Brett"; sono in grado di svilupparsi con basse quantità di zuccheri quali glucosio, fruttosio, galattosio, tralosio... Il nome Dekkera viene usato intercambiabilmente con Brettanomyces, dato che descrive la telomorfo o forma della spore del lievito. La forma sporificante, e quindi telomorfica dei lieviti appartenenti al genere Brettanomyces è Dekkera; sebbene possibile, la sporificazione è di difficile induzione, è infatti normalmente inferiore all'1%. Dekkera ha l'asco sporigeno con 1-4 spore, mentre Brettanomyces è asporigeno; entrambi presentano attività fermentativa. La morfologia cellulare del lievito può variare da una forma ovoidale a tubolare allungata. È a causa di questa difficoltà che si riscontra nel rilevamento e nell'osservazione delle spore che i lieviti appartenenti ai generi Brettanomyces e Dekkera vengono comunemente riuniti in un unico gruppo chiamato Brettanomyces. In questo genere le cellule hanno una caratteristica forma ogivale, losanga, possono formare pseudomiceli e gemmazione multipolare (Zambonelli, 1998). Le dimensioni delle cellule sono inferiori a quelle dei Saccharomyces cerevisiae, circa 2-4 micron per 7-18 micron di lunghezza.

Il lievito è acidogenico e si riproduce velocemente in soluzioni glucosate, producendo elevate quantità di acido acetico. Le spore di Dekkera sono a forma di "cappello", danno origine a colonie a cupola, color crema, di piccole dimensioni, con superficie liscia e consistenza cremosa. Si

sviluppano in terreni del tipo “WL nutrient agar”, con percezione di odore di aceto, non si sviluppano in terreno “agar-lisina” - la lisina è l'unico amminoacido presente in questo terreno – e si sviluppa in 8 giorni in terreno WL differenziale. La colonia può generare un sentore nauseabondo di “topo”.

I lieviti del genere *Dekkera/Brettanomyces* normalmente sfuggono alle indagini microbiologiche condotte in maniera convenzionale; tuttavia sulla base di studi seguiti da Verona e Florenzano (1947-1950) e successivamente da altri autori in Francia ed in Sud Africa, si può affermare che essi non sono affatto rari nei mosti e nei vini. Quale sia il ruolo che possono svolgere nel corso della vinificazione è tutt'altro che chiaro, anche se la loro attitudine a produrre elevate quantità di acido acetico e di acido solfidrico, li mette in posizione molto sospetta. Bisogna attendere tempi più recenti per avere la conferma che esista un rapporto diretto tra presenza di *Brettanomyces* e la comparsa di odori sgradevoli. L'ecologia di *Brettanomyces* è ancora confusa: il lievito è stato isolato dall'uva in rari casi (Pretorius 2000) e nelle cantine (Peynaud 1956). La sua presenza è stata rinvenuta sui depositi organici delle pompe usate per i travasi ed è comunque legata a circostanze in cui si verifica una mancanza di igiene (Fugelsang 1998). Inoltre si sviluppa maggiormente nei recipienti di legno e più in generale nei recipienti scolmi; lo sviluppo di *Brettanomyces* è inversamente proporzionale al grado di riempimento della barriques perchè l'ossigenazione stimola la fermentazione degli zuccheri da parte di questi microrganismi. Le esigenze nutrizionali, seppur scarse, di *Brettanomyces* sono: glucosio, acidi cinnamici e composti carbonilici del legno dei recipienti.



## 5. CONDIZIONI DI SVILUPPO DEL LIEVITO BRETTANOMYCES

### 5.1 Momenti in cui è più facile avere sviluppo di *Brettanomyces*

**5.1.1** Si moltiplica soprattutto nel caso di arresti fermentativi; è anche nota la sua capacità di causare tali arresti o rallentamenti fermentativi a causa della sintesi di acidi grassi che provocano la morte di *Saccharomyces* perché si accumulano nel suo citoplasma o si legano alla sua membrana plasmatica;

**5.1.2** Si sviluppa una volta conclusa la fermentazione alcolica e prima che inizi la fermentazione malolattica. Questo è il momento più favorevole perché c'è poca  $SO_2$ , i nutrienti sono scarsi e anche perché *Saccharomyces* è in fase di esaurimento.

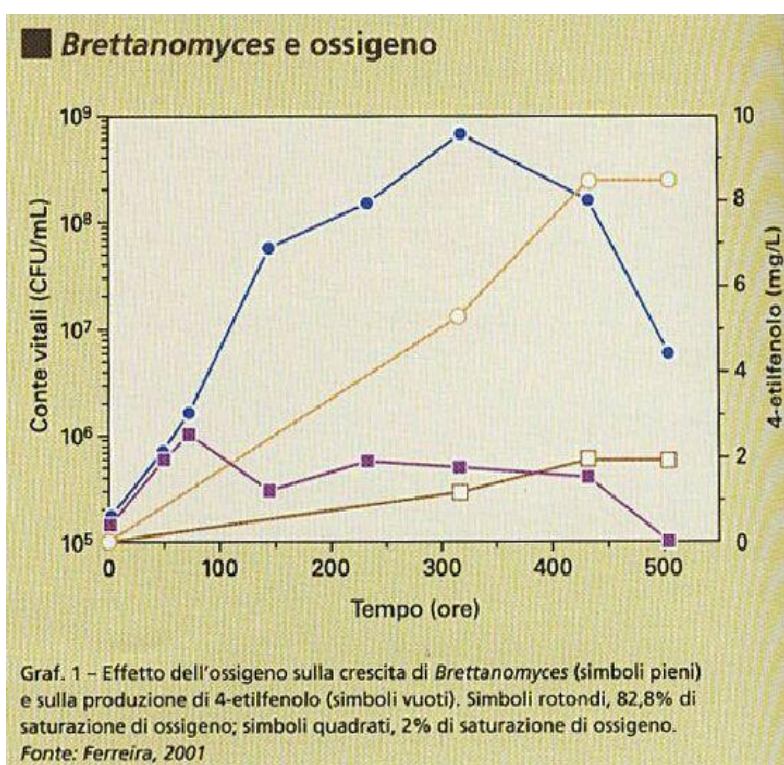
### 5.2 Fattori che possono condizionare lo sviluppo di *Brettanomyces*

#### 5.2.1 Ossigeno

*Brettanomyces* è un lievito capace di sviluppare in anaerobiosi ma la crescita e la fermentazione sono stimolate in presenza di ossigeno. L'ossigenazione influenza positivamente anche la produzione di 4-etilfenolo. Evidentemente il potenziale di ossidoriduzione ed il grado di riempimento della barrique sono strettamente collegate al suo sviluppo.

Nel vino, livelli di ossigeno superiori a 7 mg/L (corrispondenti ad una saturazione di circa l'82%), stimolano la crescita di *Brettanomyces bruxellensis* e sono responsabili della rapida produzione di fenoli volatili. Nei vini rossi con livello di ossigeno minori del 2% di saturazione si osserva una riduzione sia della crescita di *Brettanomyces* sia della produzione di etil-fenolo.

Dalla figura sottostante si nota come la formazione di 4-etilfenolo continui anche dopo la fase di morte delle cellule di *Brettanomyces*.



La presenza di ossigeno, inoltre, stimola la produzione di acido acetico con conseguente aumento di acidità volatile nel vino. Al contrario, in anaerobiosi, la concentrazione in acido acetico è bassa se non addirittura nulla.

Le condizioni di crescita di *Brettanomyces* durante l'affinamento dei vini sono molto diverse da quelle fermentative. Anche la microossigenazione può favorire la crescita di questo lievito, comunque l'assenza di ossigeno non ne impedisce la crescita, dimostrando che probabilmente nel vino sono presenti delle molecole che permettono al *Brettanomyces* di sviluppare anche in presenza di deboli quantità di ossigeno. Quando si verifica il passaggio dall'aerobiosi all'anaerobiosi si verifica un arresto brutale dell'attività fermentativa e della crescita di *Brettanomyces*.

Riassumendo, le relazioni di questo lievito con l'ossigeno sono complesse: l'ossigeno stimola la crescita e la fermentazione alcolica del "Brett" come anche la produzione di acido acetico; quando invece il lievito cresce in condizioni di anaerobiosi la concentrazione di acido acetico prodotto diminuisce fortemente (Gilis 1999). L'insorgenza del difetto viene associata ad un unico sentore definito "Brett-character" i cui descrittori tipici sono comunemente definiti come stalla, sudore di cavallo, lana bagnata, medicinale, cuoio, dovuti essenzialmente alla presenza di etilfenoli.

### **5.2.2 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 soprattutto durante l'affinamento (in barricaia). Appare evidente che, a causa del suo optimum di temperatura, ne è favorito lo sviluppo soprattutto durante la macerazione e la fermentazione dei vini rossi; i vini bianchi, evidentemente, ne sono meno suscettibili.

### **5.2.3 Zuccheri**

*Brettanomyces*, oltre a glucosio e fruttosio, è in grado di utilizzare anche i pentosi non utilizzati da *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentazione alcolica. Inoltre è in grado di utilizzare come fonte carboniosa il cellobiosio (zucchero prodotto durante la fase di tostatura della barrique), il trealosio (disaccaride presente nei lieviti, che garantisce la vitalità della cellula) ed il glicerolo prodotto anche dai lieviti *Saccharomyces* nel corso di fermentazioni glicero-piruviche o aldeido-gliceriche.

*Brettanomyces* riesce a moltiplicarsi fermentando piccole quantità di zuccheri residui nel vino: la fermentazione di 300 mg/L di zuccheri è sufficiente per produrre una popolazione di oltre 3000 cellule/mL, ovvero una popolazione sufficiente per formare etil-fenoli oltre la soglia di percezione.

### **5.2.4 Anidride solforosa e pH**

*Brettanomyces* è relativamente resistente alla SO<sub>2</sub>; una volta che il vino viene introdotto in barrique, infatti, esso si localizza sulle parti interne, in corrispondenza di crepe o fessure, dove rimane attivo e protetto dai sanificanti per molto tempo. Il diossido di zolfo è un fattore essenziale e il suo tenore nel corso dell'affinamento nei vini governa i rischi di contaminazione da *Brettanomyces*, soprattutto durante il periodo estivo. Nella pratica un tenore di solforosa libera di 30 mg/L porta quasi sempre alla sparizione totale delle popolazioni vitali per 30 giorni (situazione valida per vini giovani a pH 3,4-3,5). Se il pH raggiunge 3,8, non esiste più dell'1% di SO<sub>2</sub> molecolare attiva; in tal caso è da temere che anche 30 mg/L di SO<sub>2</sub> libera siano insufficienti per eliminare le popolazioni contaminanti. Si constata, dunque, che la concentrazione di etilfenoli del vino varia considerevolmente da una barrique all'altra e che è tanto più elevata quanto più il tenore di SO<sub>2</sub> è basso. Quando i vini sono conservati in barrique nella posizione "bonde de cote" - perfettamente

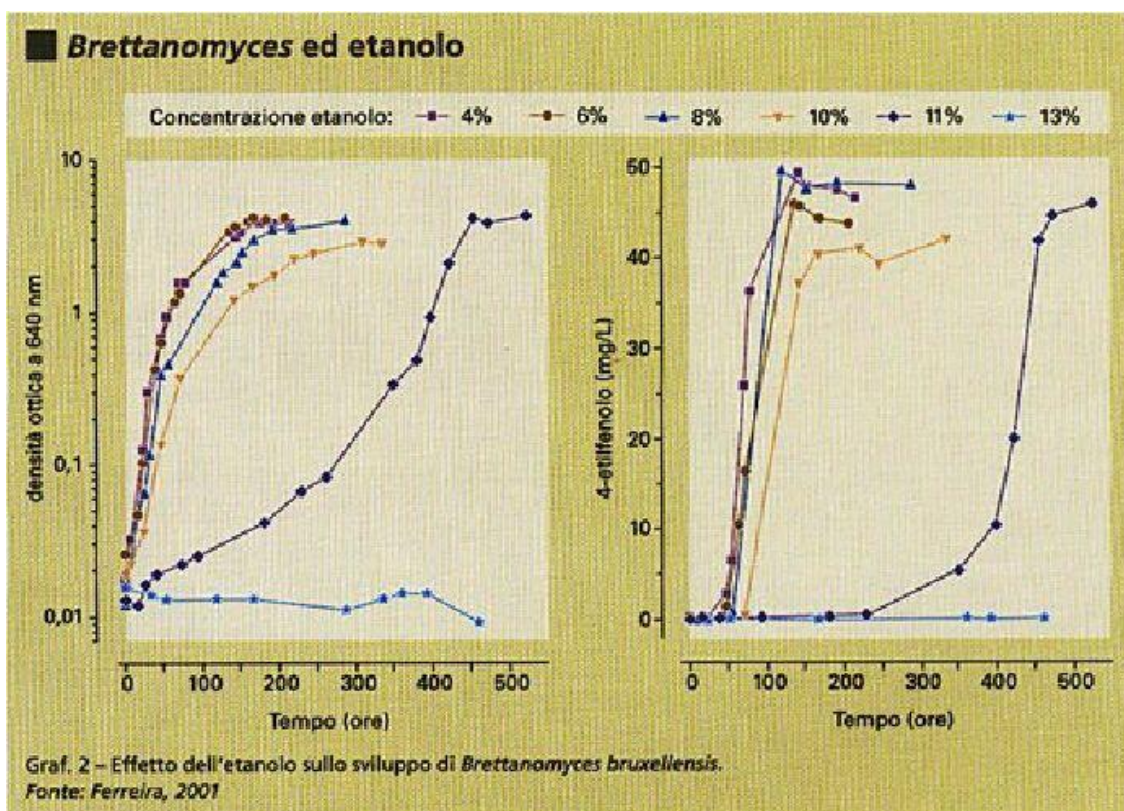
stagne – è importante porre il vino in fusto con una copertura di solforosa libera di circa 30-35 mg/L. Nel caso di affinamento in barrique, la solfitazione del vino non è sempre sufficiente per prevenire lo sviluppo di *Brettanomyces*, è indispensabile, in occasione di travasi, disinfettare i fusti con SO<sub>2</sub> gassoso o bruciando dello zolfo (mèchage - 7g). Inoltre bisogna tenere presente che *Brettanomyces* è più resistente alla SO<sub>2</sub> rispetto ai batteri lattici ed acetici.

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. Valori di pH inferiori a 3,19 inibiscono la crescita, quindi il metabolismo di *Brettanomyces bruxellensis*.

*Brettanomyces* inquina maggiormente i vini rossi rispetto ai bianchi probabilmente perché questi ultimi presentano un pH più basso e quantitativi di anidride solforosa maggiori.

### 5.2.5 Etanolo

La crescita di *Brettanomyces* risulta inibita dalla presenza di etanolo (oltre 11% vol.), tuttavia la presenza di *Brettanomyces* e di etilfenoli è stata riscontrata con buona frequenza, in quantità elevata, anche in vini ad elevato tenore alcolico come i vini liquorosi.



### 5.2.6 Acido acetico

Da ricerche effettuate sullo sviluppo di *Brettanomyces* e *Saccharomyces* in presenza di acido acetico è emerso che concentrazioni minori di 3 g/L hanno la stessa influenza sulla crescita dei due lieviti. Con livelli superiori a 3 g/L *Brettanomyces* sembra essere più sensibile di *Saccharomyces* mentre livelli di 4,5-5 g/L in anaerobiosi risultano inibitori per entrambi i lieviti. L'acido acetico è una delle principali cause che provocano gravi deprezzamenti per aumento dell'acidità volatile.

### **5.2.7 Fattori di sopravvivenza**

La vitamina piridossina è una delle poche ad avere un effetto positivo sulla crescita di *Brettanomyces*. Gli ioni magnesio e fosfato non sono essenziali per la sua crescita.

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

### **5.2.8 Competizione con *Saccharomyces***

*Brettanomyces* presenta una velocità di moltiplicazione molto ridotta rispetto a *Saccharomyces*. Alcuni studi hanno dimostrato che, inoculando allo stesso tempo un vino con i due lieviti, dopo 30 ore *Saccharomyces cerevisiae* diventa dominante (95%) e la crescita di *Brettanomyces* viene fortemente inibita. A fine fermentazione alcolica, quando lo zucchero è presente a basse concentrazioni, *Saccharomyces* trova difficoltà a svilupparsi; in presenza di *Brettanomyces*, tale difficoltà non può essere spiegata solo con l'aumento della concentrazione di acido acetico prodotto dalle cellule di *Brettanomyces*, ma si potrebbe ipotizzare l'interferenza di un altro metabolita oppure l'esistenza di competizione per un altro nutriente.

### **5.2.9 Interazioni con *Oenococcus oeni***

*Brettanomyces* si comporta come un microrganismo “opportunist” che cresce e si sviluppa quando non ci sono altri microbi che possono competere per la sua crescita.

Il miglior momento per il suo sviluppo, come già accennato, è il periodo di tempo che intercorre tra la fine della fermentazione alcolica e l'inizio della fermentazione malolattica, quando il numero di microrganismi che possono competere con *Brettanomyces* è basso.

Da prove di laboratorio e di cantina è stato dimostrato che le condizioni che favoriscono la crescita di *Oenococcus oeni* e quindi un regolare svolgimento della fermentazione malolattica sembrano inibire fortemente la crescita di *Brettanomyces* e la conseguente produzione di fenoli volatili; quindi si può affermare che *Oenococcus oeni* è competitivo nei riguardi della crescita di *Brettanomyces*.

Naturalmente, dopo la conclusione della fermentazione malolattica, è consigliabile applicare tutte le buone pratiche che possono prevenire un eventuale sviluppo di questo microrganismo durante la conservazione dei vini.

*Appare evidente che molti di questi fattori devono essere presi in considerazione insieme e non singolarmente perché l'azione dell'anidride solforosa e dell'etanolo, nei confronti di questo lievito, sono strettamente dipendenti dal pH del mezzo.*

## 6. BRETTANOMYCES LIEVITO DI CONTAMINAZIONE O DI ALTERAZIONE?

Brettanomyces può essere definito “lievito di contaminazione” in quanto solitamente non è presente nel vino, bensì deriva da una contaminazione esterna. Tuttavia può essere definito lievito di alterazione perché dal suo metabolismo, oltre agli etilfenoli, viene prodotta una notevole quantità di acido acetico, in associazione ad una ridotta sintesi di glicerolo, acido succinico, acido piruvico e acetaldeide (Larue et al.,1991). Brettanomyces bruxellensis è la specie del genere più presente nel vino. Alcuni studiosi sostengono inoltre che Brettanomyces possa essere uno dei microorganismi responsabili della produzione di alcune ammine biogene come la fenil-etil-ammina; le ammine biogene (basi organiche di basso peso molecolare) possono provocare tossicità o reazioni allergiche all'uomo, a seconda della loro concentrazione e, ovviamente, alla suscettibilità/sensibilità dell'individuo.



## **7. CONTAMINAZIONE DEI VINI NEL CORSO DELLA LORO ELABORAZIONE DA PARTE DI BRETTANOMYCES**

I lieviti del genere *Brettanomyces* sono ubiquitari dell'ambiente di cantina, nel quale trovano condizioni ideali per il loro sviluppo. *Brettanomyces* viene dunque classificato come un inquinante classico dei vini (Chatonnet, 1999). In cantina si trovano principalmente nei rubinetti mal puliti, nei canaletti di scolo, nelle fecce, nelle barrique.

Tutti i luoghi della cantina possono essere soggetti all'inquinamento da *Brettanomyces*; purtroppo non esistono dei siti indenni e dei siti oggetto di contaminazione.

In cantina *Brettanomyces* colonizza i punti in cui la pulizia risulta essere difficile, come ad esempio le pompe, i tubi, le valvole, le botti ma anche le vasche in cemento; soprattutto le superfici meno lisce. È pertanto di fondamentale importanza garantire un'ottima pulizia della cantina e di tutti gli strumenti per prevenire lo sviluppo di tali lieviti indesiderati, soprattutto nei punti in cui può depositarsi materiale organico (fonte di nutrimento per tutti i microrganismi); si ribadisce che i *Brettanomyces* non sono molto esigenti dal punto di vista nutrizionale. Una via d'ingresso di questi lieviti può essere considerata quella di partite di vino o di contenitori di incerto stato sanitario e che possono, quindi, comportarsi da focolai d'infezione (Larue et al., 1991). La contaminazione più frequente si verifica nel prodotto finito, quindi al termine della fermentazione alcolica o della fermentazione malolattica o in caso di arresti fermentativi; in momenti in cui c'è una scarsa competizione con i lieviti che conducono la fermentazione alcolica, c'è poca anidride solforosa libera (15 g/L non sono sufficienti a bloccare *Brettanomyces*, è inibito almeno con 40 g/L di SO<sub>2</sub> libera), i nutrienti sono scarsi. In assenza di altri microrganismi *Brettanomyces* è dunque in grado di svilupparsi utilizzando i pochi zuccheri presenti alla fine della fermentazione alcolica. È consigliabile indurre molto velocemente la fermentazione malolattica al termine della fermentazione alcolica o con l'inoculo di batteri lattici o naturalmente creando le condizioni ideali per il sopravvento dei batteri (pH > 3.2, 18°C < temperatura < 20°C, SO<sub>2 tot.</sub> < 150 mg/L), affinché *Brettanomyces* non abbia il sopravvento.

La fermentazione di 300 mg/L è sufficiente a formare una quantità di etilfenoli uguale al valore della loro soglia di percezione (425 microgrammi/L) (Chatonnet, 2000). Con tali concentrazioni zuccherine, riescono a svilupparsi e produrre fino a 6000 cellule per mL di vino. Il problema è che alla fine della fermentazione malolattica i vini considerati secchi possono contenere ancora 400 mg/L di zuccheri che possono essere fermentati da *Brettanomyces* originando, in teoria, 600 microgrammi/L di 4-etilfenolo. Questo vuol dire che tutti i vini potrebbero essere soggetti alla contaminazione da *Brettanomyces*. I vini di maggior complessità, ovvero soprattutto quelli prodotti con uve più mature, possono comportarsi da terreni più ricchi in substrati assimilabili e potenzialmente più favorevoli al loro sviluppo (tali vini presentano, generalmente, pH più elevati, maggior estratto, titolo alcolometrico maggiore...). Quella della produzione di etilfenoli può essere una deviazione aromatica anche frequente fino a raggiungere numerosi mg/L. Il vino presenta allora un forte odore di stalla, di cuoio. Anche quando i tenori in etilfenoli non sono elevati, da 600 a 700 microgrammi/L, hanno la proprietà di deprezzare l'aroma; pur non presentando odore sgradevole nascondono il fruttato e in generale alterano il bouquet del vino. Nell'ultimo decennio si è visto un incremento importante dell'inquinamento da *Brettanomyces*, ciò è causato da fattori diversi quali: l'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, che hanno causato un consistente aumento del pH dei vini in particolare di quelli rossi.

## 8. ORIGINE MICROBIOLOGICA E PROPRIETA' DEI FENOLI VOLATILI

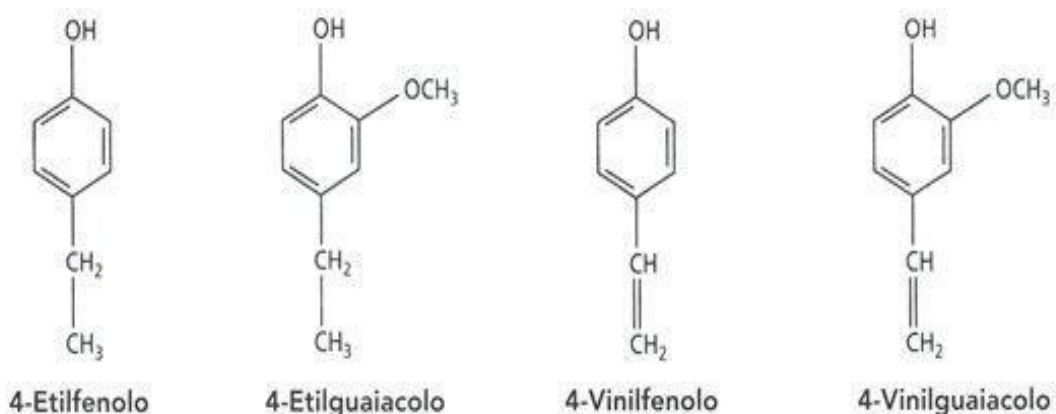
### 8.1 Deviazione olfattiva di tipo "fenolico"

Quando il lievito *Brettanomyces* si riproduce nel vino crea diversi composti che possono alterarne l'aroma. Alcuni enologi concordano sul fatto che a basse dosi la presenza di questi composti possa avere un effetto positivo sul vino, contribuendo alla sua struttura e donando un carattere di invecchiamento ad alcuni vini rossi. Molti vini si affidano al *Brettanomyces* per darsi un carattere distintivo, come i Château Musar e il Château de Beaucastel. Tuttavia quando i livelli dei composti sensoriali superano largamente una determinata soglia, la loro percezione è quasi sempre negativa. Le soglie sensoriali possono differire tra le singole persone e alcuni trovano i composti più gradevoli rispetto ad altri. Visto che il *Brettanomyces* è potenzialmente in grado di rovinare un vino, è generalmente visto come un elemento peggiorativo, e la sua presenza nel vino come un **difetto**.

I vini contaminati da *Brettanomyces* vengono spesso definiti "Bretty", "metallici", o con carattere Brett". I lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces*-*Dekkera* costituiscono oggi un grave problema a causa della produzione di odori sgradevoli nel vino, che possono causarne notevoli deprezzamenti. I difetti organolettici causati da *Brettanomyces* e riscontrati nei vini di tutto il mondo sono riconducibili a odori simili a cane bagnato, orina di topo, sudore di cavallo, stalla, vernice, plastica, etc, che vengono nell'insieme definiti come "nota Brett". *Brettanomyces* è, infatti, tra i maggiori responsabili dell'origine di odori e di aromi sgradevoli che condizionano pesantemente il profilo aromatico dei vini, fino al punto di stravolgerlo completamente.

Il motivo principale risiede nel fatto che *Brettanomyces* produce una gamma di composti nauseabondi chiamati fenoli volatili tra i quali il 4-etilfenolo, il 4-etilguaiacolo, il 4-vinilguaiacolo e il 4-vinilfenolo.

I fenoli volatili responsabili delle deviazioni olfattive di tipo «fenolico» nei vini.



Solamente allo stato di tracce nei mosti, i fenoli volatili sono presenti nei vini a tenori compresi tra qualche decina e diverse centinaia di microgrammi/L. I vini bianchi contengono quantità variabili di vinilfenoli, ma sono abitualmente privi di etilfenoli. Mentre i vini rossi non contengono che deboli quantità di vinilfenoli, e presentano quantità variabili di etilfenoli. I più maleodoranti sono il 4-vinilfenolo (odore farmaceutico, vernice), il 4-etilfenolo (odore di stalla, di sudore di cavallo), il 4-vinilguaiacolo (garofano, pepato) e il 4-etilguaiacolo (affumicato, speziato); gli ultimi due hanno senz'altro degli odori meno sgradevoli. Bisogna dunque considerare l'impatto olfattivo dei due etilfenoli e dei due vinilfenoli, in miscela alle proporzioni in cui si trovano nel vino. La maggioranza dei vini bianchi si caratterizza per un rapporto 4-vinilfenolo/4-vinilguaiacolo di 1/1; nel caso dei vini rossi la proporzione di 4-etilfenolo/4-etilguaiacolo è 8/1. Le soglie limite di preferenza (concentrazione a partire dalla quale l'aroma globale del vino risulta alterato) sono state stimate a 720 microgrammi/L per una miscela di vinilfenolo e vinilguaiacolo 1/1 nei vini bianchi e a 420 microgrammi/L per una miscela di 4-etilfenolo/4-etilguaiacolo 10/1 nei vini rossi. Ovviamente devono essere considerati in soluzione idroalcolica.

<b>Soglie di percezione e i descrittori attribuiti ad alcuni fenoli volatili</b> <i>Perception threshold and descriptors ascribed to some volatile phenols</i>		
<b>Composto</b> <i>Compound</i>	<b>Soglia di percezione</b> <i>Perception threshold</i> (g/L)	<b>Descrittore</b> <i>Descriptor</i>
<b>4-vinilfenolo</b> <i>4-vinylphenol</i>	770	<b>Farmaceutico, chiodo di garof.</b> <i>Pharmaceutical, clove</i>
<b>4-vinilguaiacolo</b> <i>4-vinylguaiacol</i>	440	<b>Speziato</b> <i>Spicy</i>
<b>4 etilfenolo</b> <i>4 ethylphenol</i>	620	<b>Sudore di cavallo</b> <i>Horse sweat</i>
<b>4-etilguaiacolo</b> <i>4-ethylguaiacol</i>	140	<b>Speziato affumicato</b> <i>Smoked spicy</i>



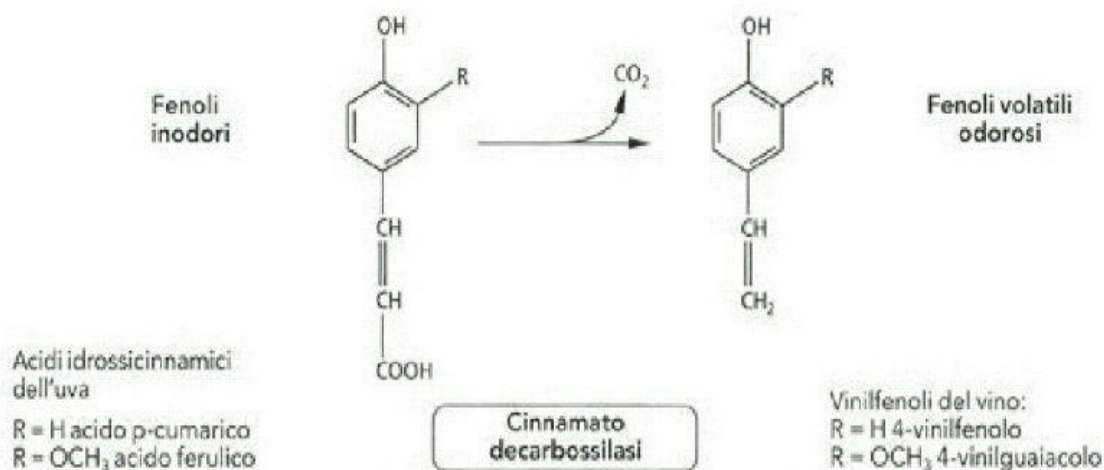
## 8.2 Meccanismi enzimatici della produzione di vinil-fenoli da *Saccharomyces cerevisiae*

### Premessa

*Brettanomyces* non è l'unico microrganismo responsabile della produzione di vinil ed etilfenoli.

Il ceppo di lievito che conduce la fermentazione alcolica (*Saccharomyces cerevisiae*), esclusivamente nel corso della fermentazione, può generare tali composti fenolici.

I vinilfenoli provengono dalla decarbossilazione enzimatica, a carico di due acidi cinnamici del mosto, l'acido p-cumarico e l'acido ferulico, con formazione rispettivamente di 4-vinilfenolo e di 4-vinilguaiacolo, come mostrato dallo schema seguente.



Reazioni di decarbossilazione degli acidi fenolici del mosto, nel corso della fermentazione alcolica, ad opera del *S. cerevisiae*.

Nel caso di *Saccharomyces cerevisiae* la specificità della cinnamato decarbossilasi è stretta, ovvero gli acidi benzoici non subiscono la trasformazione in fenoli volatili.

Possono essere decarbossilati solo alcuni acidi della serie cinnamica. Fra gli acidi cinnamici dell'uva, ad essere interessati dall'attività cinnamato decarbossilasi, vi sono l'acido ferulico e l'acido p-cumarico.

La cinnamato decarbossilasi di *S. cerevisiae* è attiva unicamente durante la fermentazione alcolica.

Il debole tenore in vinilfenoli dei vini rossi è dovuto dall'inibizione della CD di *S. cerevisiae* ad opera di certi composti fenolici dell'uva (tannini). Il difetto di "fenolico" da *Saccharomyces* appare, dunque, solo nel corso della fermentazione alcolica.

### ***8.3 Influenza di alcuni parametri della vinificazione sul tenore in vinilfenoli dei vini bianchi***

Il tenore in vinilfenoli di un vino bianco dipende da una parte dal contenuto del mosto in acidi fenolici precursori, dall'altra dall'attività della cinnamato decarbossilasi -CD- del ceppo di lievito che assicura la fermentazione alcolica. I tenori in acidi idrossicinnamici del mosto variano con il vitigno e con le condizioni di maturazione dell'uva, infatti i tenori sono più elevati nelle uve mature e nei climi caldi. I trattamenti meccanici, le sfecciature insufficienti, la macerazione pellicolare, favoriscono l'estrazione degli acidi fenolici e quindi la formazione dei vinilfenoli durante la fermentazione alcolica.

L'impiego di alcuni enzimi pectolitici usati per facilitare l'estrazione o la chiarificazione dei mosti di varietà a bacca bianca (enzimi pectolitici usati durante la pressatura o per facilitare la decantazione...), può determinare un aumento del tenore, nei vini, in vinilfenoli. In effetti alcuni preparati industriali derivanti da *Aspergillus niger* contengono un enzima con attività cinnamil-esterasi che catalizza l'idrolisi degli esteri tartarici degli acidi idrossicinnamici del mosto nel corso della fase prefermentativa. Sotto l'azione della cinnamato decarbossilasi di *Saccharomyces cerevisiae* gli acidi p-cumarico e ferulico sono successivamente trasformati in vinilfenoli, durante la fermentazione alcolica. Ad oggi vengono selezionati ceppi di lievito con bassa capacità di produzione di tali composti fenolici; sono stati chiamati Pof (phenolic off flavor); vengono commercializzati con il nome di Zymaflore.

### ***8.4 Circostanze e frequenza dell'apparizione degli etilfenoli***

L'origine degli etil-fenoli nei vini fu per lungo tempo poco conosciuta e alquanto controversa.

Gli etilfenoli si formano raramente durante la fermentazione alcolica; si tratta in questo caso di un alterazione temibile accompagnata da una produzione elevata e rapida di acido acetico. Una solfitazione insufficiente del pigiato e una scarsa igiene delle vasche favoriscono questa deviazione che comunque è molto rara.

Può capitare che nei casi di fermentazione malolattica stentata con valori piuttosto bassi di anidride solforosa vi sia produzione di etilfenoli.

La comparsa degli etilfenoli nel corso dell'affinamento è molto più frequente, in particolare nel caso d'impiego di barrique usate; tuttavia anche i vini rossi maturati in barriques nuove possono presentare tenori elevati in etilfenoli. Infatti le barriques nuove possono avere un effetto stimolante sulla crescita di *Brettanomyces* poichè queste contengono uno zucchero, il cellobiosio, facilmente assimilabile da questi lieviti.

### ***8.5 Origine microbiologica degli etilfenoli nei vini rossi***

Per lungo tempo l'origine degli etilfenoli è stata attribuita al metabolismo dei batteri lattici. Tuttavia gli isolamenti di batteri lattici, di batteri acetici e di lieviti, a partire da vini rossi che presentano il difetto di fenolico, dimostrano che i lieviti appartenenti al genere *Dekkera/Brettanomyces* sono i soli microrganismi capaci di formare numerosi milligrammi di etilfenoli per litro di vino. *Saccharomyces* non è responsabile della formazione di fenoli volatili nei vini rossi, dal momento che l'attività CD è inibita dai composti fenolici (soprattutto dai tannini) (Chatonnet et al., 1997).

## 8.6 Gli acidi fenolici e i loro derivati

Per poter capire quali sono i precursori dei composti fenolici, bisogna sapere che...

...fra i composti fenolici, le molecole sono classificate a seconda della loro diversa struttura chimica in due grandi gruppi: flavonoidi e non flavonoidi. Nei composti flavonoidi sono compresi gli acidi fenolici e gli idrossistilbeni.

Le uve e i vini contengono acidi fenolici di due tipi: benzoici e cinnamici.

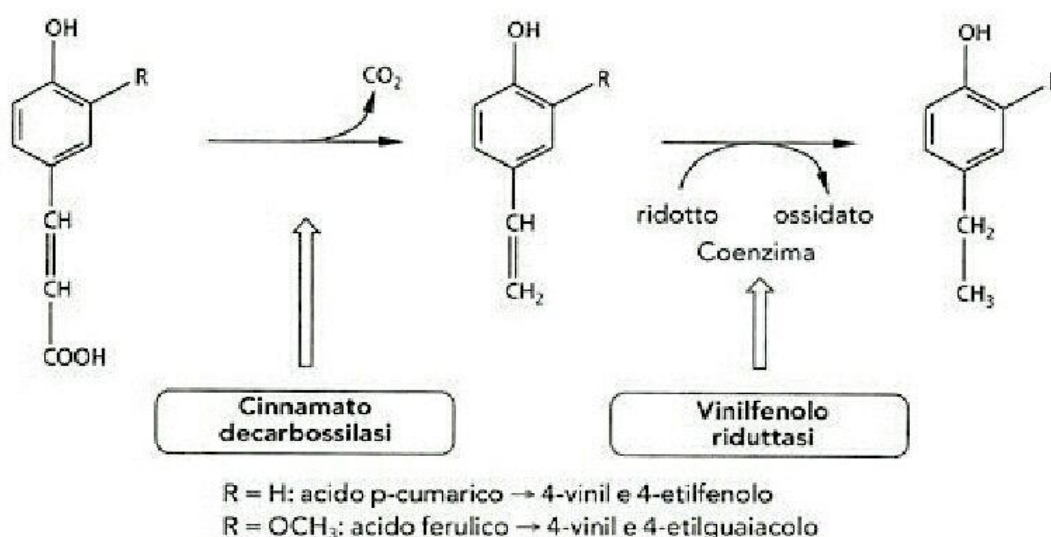
La loro concentrazione varia da 100 a 200 mg/L nei vini rossi e da 10 a 20 mg/L nei vini bianchi. Gli acidi cinnamici derivano dall'acido cinnamico (acido p-cumarico, caffeico, ferulico). Nell'acino sono contenuti nel succo vacuolare delle cellule della polpa e della buccia; si trovano sotto forma esterificata essenzialmente con l'acido tartarico (Riberèau Gayon, 1965). Sotto il profilo sensoriale gli acidi cinnamici, in soluzione, non presentano sapori oppure odori particolari, ma per azione dei lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* possono dare origine ai fenoli volatili.

## 8.7 Chimismo enzimatico della produzione degli etilfenoli da *Brettanomyces*

Alcuni autori (Gerbaux et al., 2002) sostengono che l'aggiunta di pectinasi non purificate dalla cinnamil-esterasi aumentano il valore del 4-etilfenolo. Pertanto l'uso di preparati pectolitici a bassa attività CE viene giustificata nella vinificazione in rosso. Il chimismo enzimatico è il seguente: un primo enzima: una cinnamato decarbossilasi, trasforma gli acidi cinnamici in vinilfenoli; questo enzima ha una specificità differente da quella del *S. cerevisiae*, infatti può decarbossilare anche l'acido sinapico, reazione di cui la CD del *S. cerevisiae* è incapace e soprattutto non è inibito dai composti fenolici.

Il secondo enzima è una vinilfenol-riduttasi di cui *S. cerevisiae* è privo. Da qui discende sia l'incapacità del *S. cerevisiae* di formare delle quantità importanti di fenoli volatili nei vini rossi sia l'attitudine di *Brettanomyces* a decomporre gli acidi cinnamici in vinilfenoli e poi in etilfenoli.

Inoltre l'utilizzo di preparati enzimatici ad attività pectolitica (utilizzati durante la pressatura o durante la macerazione), provoca l'aumento dei precursori con gruppo carbossilico libero (-COOH), determinando, in alcuni casi, un aumento di fenoli volatili sgradevoli.



### Meccanismo enzimatico della produzione degli etilfenoli da *Brettanomyces sp.*

### ***8.8 Controllo dell'attività cinnamato esterasi***

Sono state identificate e caratterizzate le attività responsabili dell'idrolisi degli esteri tartarici degli acidi cinnamici; alcuni studi hanno dimostrato che è possibile eliminare parzialmente l'attività cinnamil-esterasica dai preparati pectolitici per filtrazione su membrane con cut-off di 100.000 Da. Così operando la maggior parte dell'attività Cinnamil esterasica si ritrova nel retentato, mentre il permeato rimane povero di attività CE.

Durante il processo di preparazione degli enzimi pectolitici, al fine di denaturare l'attività cinnamil-esterasi, si varia il pH della preparazione prima della sua formulazione; questo procedimento ha purtroppo lo stesso effetto sulle altre attività enzimatiche e questo significa che le rese si riducono notevolmente. Da studi effettuati (Barbe, 1995) è stato dimostrato che questo processo di purificazione determina un valore minimo in CE e in conseguenza di questo la produzione di vinil-fenoli rimane al di sotto della soglia di percezione.

## 9. BRETTANOMYCES IN AFFINAMENTO

L'affinamento in barrique non induce sistematicamente una contaminazione dei vini e la conseguente comparsa del carattere fenolico. Certo è che l'utilizzo di barrique mal conservate, in cantine di affinamento poco adatte perché soggette ad elevati sbalzi di temperatura, oppure soggette a travasi, rabbocchi insufficienti, sono tutte circostanze che favoriscono la contaminazione e lo sviluppo dei microrganismi in generale e in particolare dei *Brettanomyces* (Chatonnet, 2002). *Brettanomyces*, come già detto, è in grado di utilizzare il cellobiosio che deriva dal processo di tostatura della botte. Botti di legno nuove, contenendo più cellobiosio delle botti vecchie, favoriscono, dunque, lo sviluppo di *Brettanomyces*. Alcuni autori sostengono che il maggior sviluppo di questi lieviti nelle botti di legno nuove, sia dovuto al loro potenziale di ossido-riduzione molto elevato, che favorisce la diminuzione dell'anidride solforosa libera, consentendo, dunque, un elevato sviluppo di lieviti inquinanti. Il fenomeno è inoltre favorito dall'innalzamento delle temperature nelle cantine e nelle barricaie durante i mesi estivi. La comparsa del carattere fenolico insorge quindi nella maggior parte dei casi, nel corso della maturazione dei vini, anche se non è da escludere la comparsa di questo fenomeno anche durante l'affinamento in bottiglia. È molto probabile che, grazie alle loro dimensioni minute, i lieviti *Brettanomyces* siano trattenuti in misura inferiore dai filtri classicamente usati prima dell'imbottigliamento, non sterilizzanti. (Chatonnet 1993). Talvolta la contaminazione può verificarsi in occasione dell'assemblaggio di vini provenienti da qualche barrique inquinata; tuttavia non è da escludere una possibile contaminazione in vasca. Nei vini francesi, rispetto ai vini italiani, è accettato un leggero sentore conferito da questi microrganismi; è giustificato dall'uso intensivo della barrique.

### *9.1 Il recupero tradizionale della barrique*

E' da porre in rilievo che gli studi a tutt'oggi effettuati hanno permesso di identificare *Brettanomyces* ben oltre il centimetro di profondità nelle porosità del legno, ed è difficile definire una procedura di sanitizzazione standardizzata nel rispetto del legno e dei suoi costituenti.

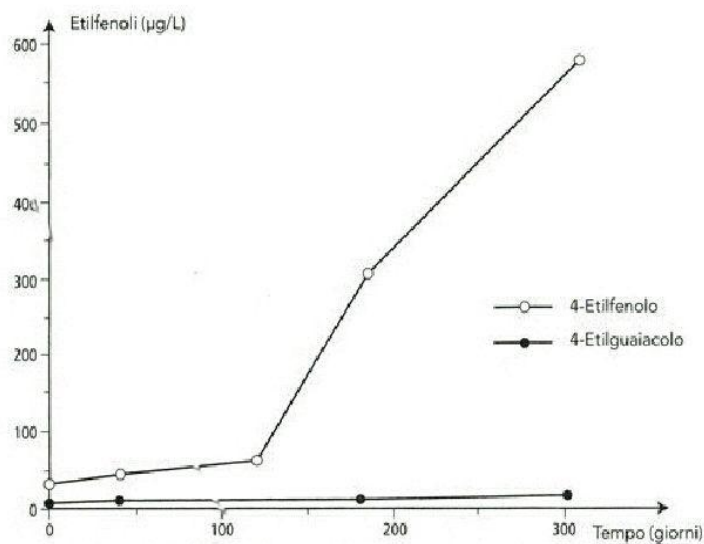
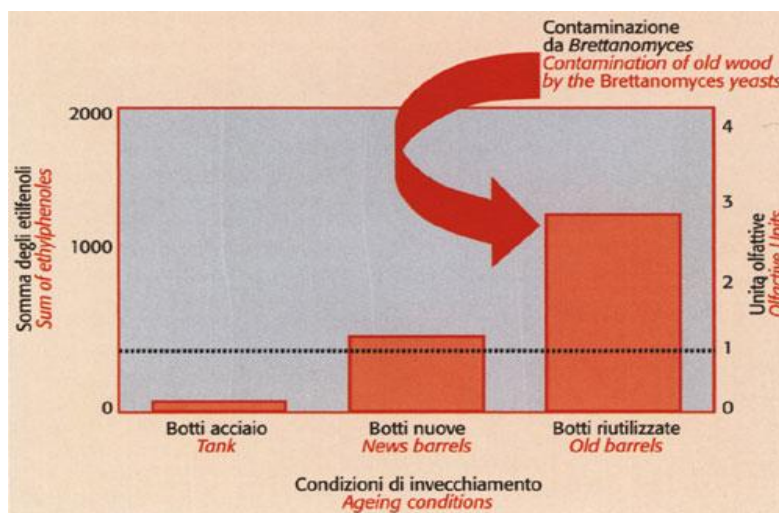
Tra le procedure saggiate alcune si basano principalmente sull'azione meccanica (non consigliata), talvolta associata alle elevate temperature (almeno 65°C): attualmente è allo studio, per questo scopo, anche l'utilizzo delle microonde. Maggiori sforzi sono stati dedicati alla predisposizione di metodi di lavaggio chimici (soluzioni caustiche, di metabisolfito, di permanganato, polifosfati, carbonati ed altri sali - eventualmente in combinazione tra loro -, insufflazione gassosa diretta di SO<sub>2</sub>, ozono, raggi UV, acido sorbico, pimaricina, ecc.). L'impiego di dimetilcarbonato o di dietilcarbonato è da sconsigliare per la possibilità di derivare residui di metanolo o di etil carbammato.

Le incertezze correlate all'uso dei suddetti mezzi derivano, a seconda dei casi, dalla dubbia efficacia dell'azione fungicida - soprattutto in considerazione della composizione organica del substrato - dagli effetti potenzialmente negativi sulle proprietà del legno, ovvero dalla possibile alterazione della composizione del vino che vi entrerà in contatto.

Con questa premessa emerge con grande evidenza l'importanza di attuare una attenta valutazione dei rischi connessi alla presenza e alla diffusione di questo microrganismo nei vini. Le barriques devono essere lavate accuratamente, sgocciolate e poi trattate con dischetti di zolfo che bruciando, in condizioni di chiusura ermetica, sterilizzano le doghe (*méchage*). Prima dell'utilizzo andranno nuovamente lavate. Sarebbe meglio, inoltre, non lasciare mai le barriques vuote; talvolta è consigliabile riempirle con una soluzione di acqua e metabisolfito.

## 9.2 Controllo dei fattori fisico-chimici durante l'affinamento in legno

L'affinamento in legno non è sinonimo di contagio ma sicuramente l'impiego di legno non nuovo, mal conservato, in cantine poco adatte, colmature e travasi non tempestivi e con cattiva disinfezione dei fusti rappresentano un insieme di fattori che favoriscono lo sviluppo di questi lieviti inquinanti. Nel caso di barrique nuove la contaminazione è meno frequente. Purtroppo alcuni fattori come il loro maggiore potenziale di ossidazione o il maggior consumo di vino fanno sì che il consumo di SO<sub>2</sub> sia più rapido e questo rende più facilmente attaccabili i vini in esse contenuti. È quindi molto importante la gestione dell'anidride solforosa che è riconosciuta come il mezzo più potente per il controllo di questo lievito. Per tutti questi motivi è importante un controllo periodico dei vini soprattutto quelli conservati nelle barrique usate per verificare l'insorgenza di possibili contaminazioni.



Esempio dell'evoluzione della concentrazione in etilfenoli di un vino rosso nel corso dell'affinamento in barrique.

Fig. Chatonnet et al., 1992

## 10. CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEL BRETTANOMYCES

Come per tutti i controlli microbiologici, il campionamento riveste un ruolo fondamentale e deve essere effettuato su masse il più omogenee possibile ed in maniera sterile, utilizzando materiale plastico, asettico o sterilizzato servendosi dell'autoclave cioè una "macchina" dotata di una serpentina interna che scalda l'acqua nella parte inferiore; il principio si basa sull'utilizzo del vapore ad alta temperatura e a pressione di circa 1,5 atm. Il riscaldamento avviene in tre fasi: la prima è una fase di riscaldamento per portare il sistema a 121°C; quando la temperatura è stata raggiunta parte il cronometro -15 minuti-, seguita da una terza fase di raffreddamento; l'autoclave può essere aperto quando raggiunge i 70°C. L'autoclave è dotato di sonde che rilevano pressione e temperatura. Attualmente il metodo di analisi più diffuso è la coltura su terreno solido selettivo agarizzato (Agar 10.1) (piastre Petri).

I terreni di coltura rappresentano i substrati artificiali nei quali è possibile far crescere, secondo modalità determinate dall'intervento umano, i microrganismi.

Il problema maggiore con *Brettanomyces* è la sua bassa velocità di crescita rispetto a tutti gli altri lieviti e muffe presenti normalmente nel campione, per cui la conferma della sua presenza comporta tempi lunghi (anche 8 giorni); lo sviluppo di lieviti già dopo pochi giorni è di per sé indice di contaminazione di altra origine. Se a tale scopo non si facesse uso di terreni selettivi, sarebbe impossibile valutare efficacemente la presenza del microrganismo specifico, poiché la microflora complessiva presente nel campione lo maschererebbe senz'altro; d'altra parte, se si imponessero condizioni troppo selettive si rischierebbe di ottenere una sottostima della reale carica di microrganismi nel campione in esame per l'eccessiva esclusione di quelli non coltivabili (*stato vitale non coltivabile* – situazione in corrispondenza della quale *Brettanomyces*, pur essendo presente, non si sviluppa-).

Da questo complesso quadro scaturisce l'esigenza di dosare antibiotici e fattori nutritivi con modalità del tutto differenti rispetto ai tradizionali terreni di coltura.

Grazie all'imponente lavoro di ricerca e sensibilizzazione compiuto in questi ultimi anni, dai terreni generici per lieviti (quali il WL-agar aggiunto di cicloesimide, ovvero il WLD-agar) si è passati all'uso di terreni più specifici e selettivi per *Brettanomyces* (come DBDM ed altri), dove oltre agli indicatori degli acidi organici (acetico in particolare), sono presenti anche rilevatori specifici dell'attività del microrganismo (precursori dei fenoli volatili).

I terreni di coltura descritti possono essere utilizzati sia con metodiche di semina diretta per inclusione o adsorbimento su piastra (Spreading) del campione o effettuando delle diluizioni scalari. La morfologia caratteristica di questo lievito permette di identificarlo con sicurezza attraverso un semplice microscopio ottico.

Le cellule appartenenti alla stessa colonia si presentano al microscopio con un elevato polimorfismo, alternando forme subglobulari (spesso ogivali o a forma di proiettile) con altre leggermente più cilindriche. La gemmazione può essere multilaterale o bipolare; raramente si è osservato uno pseudomicelio non settato.

La presenza sia di cellule vitali che quiescenti - con dimensioni ancora più piccole e strette - ed il frequente rinvenimento di una contaminazione in vini sottoposti a filtrazione sterile, hanno fatto supporre che nemmeno quest'ultima possa rappresentare uno sbarramento assoluto per *Brettanomyces*; si ritiene però che una simile affermazione non si possa suffragare con sufficiente certezza, dato che le condizioni di sterilità non sono sempre effettive in cantina.

Oggi sono disponibili prodotti commerciali già pronti in piastra o da preparare al momento dell'uso per mezzo dei quali è possibile effettuare direttamente in azienda un primo screening di autocontrollo microbiologico.

Per quanto un terreno sia specifico è comunque probabile che anche altri lieviti possano svilupparvisi.

La corretta valutazione ed il controllo dei risultati che scaturiscono dalla lettura su piastra delle colonie microbiche è un fattore determinante per il laboratorio microbiologico, e ciò vale a maggior ragione per la ricerca di un microrganismo con le peculiarità del *Brettanomyces*.

### ***10.1 Terreni utilizzabili in laboratorio per verificare la presenza di Brettanomyces***

Sono necessarie fonti di carbonio come il glucosio, fonti azotate come peptoni, sali minerali, vitamine (estratti di lievito), agar per la solidificazione (Agar - polimero di galattosio e acido galatturonico estratto da diversi generi di alghe rosse; esso fluidifica intorno ai 96-100°C e solidifica a temperature inferiori ai 45°C). Una prima tipologia di terreno può essere preparata aggiungendo carbonato di Ca al 2%; attorno alle colonie sviluppatasi in piastra si formerà dell'acido acetico che provocherà lo scioglimento del carbonato di calcio. Si effettua, dunque, un prelievo della colonia e la si osserva al microscopio per assicurarsi, attraverso la particolare forma ogivale, che il microrganismo sviluppato nel terreno sia proprio *Dekkera*.

Un'altra tipologia di terreno può essere realizzata aggiungendo al terreno base actidione (100mg/L); a tale concentrazione, nel terreno di semina, si svilupperà soltanto *Dekkera* perché gli altri microrganismi sono inibiti. Si ricorre, successivamente, all'analisi al microscopio. Come già accennato si sviluppano molto bene in terreni del tipo "WL nutrient agar", con percezione di odore di aceto, non si sviluppano in terreno "agar-lisina" - la lisina è l'unico amminoacido di questo terreno - e si sviluppa in 8 giorni in terreno WL differenziale. È sempre consigliabile ricorrere comunque all'osservazione al microscopio.

### ***10.2 Prelievo in barrique***

Si effettuano tre prelievi distinti in diverse posizioni delle barrique; nella superficie di 1 dmq mediante un tampone sterile, e vengono posti in una soluzione fisiologica allo 0,9% di NaCl.

La soluzione fisiologica diventa il liquido che si preleverà per realizzare, successivamente, l'inoculo nel terreno secondo le modalità già descritte.



## 11. PREVENIRE È MEGLIO CHE CURARE

Come per tutti i problemi di natura microbiologica, anche per la prevenzione dell'insorgenza del *Brettanomyces* occorre determinare, in primo luogo, i punti critici il cui controllo è assolutamente necessario, la cui individuazione può essere effettuata focalizzando gli aspetti riportati di seguito:

11.1 Controllo della contaminazione della cantina da parte di fonti esterne;

11.2 Valutazione dell'efficienza delle procedure di sanitizzazione degli strumenti utilizzati per la vinificazione e lo stoccaggio, nonché dei locali della cantina;

11.3 Monitoraggio della contaminazione nelle fasi-chiave del processo.

**11.1 Controllo della contaminazione della cantina da parte di fonti esterne:** questo controllo, nonostante rappresenti la tappa cruciale di prevenzione nei confronti della contaminazione primaria, è spesso sottovalutato. Oltre ad una procedura di difesa in senso lato, esso può fornire indicazioni puntuali, ad esempio, sulla conformità delle operazioni di raccolta e di conferimento delle uve.

Uno strumento di controllo piuttosto diffuso è rappresentato dall'analisi dei vini di provenienza esterna. Oltre all'esecuzione delle analisi finalizzate al conferimento dell'ordine d'acquisto (tra le quali sono sovente annoverati anche i fenoli volatili), viene frequentemente adottata la prassi di controllare i parametri di natura microbiologica per valutarne lo stato sanitario, con particolare attenzione per la ricerca di *Brettanomyces*.

In generale sarebbe opportuno valutare, su ogni prodotto in entrata in cantina, il rischio di contaminazione al fine di adottare le più opportune pratiche preventive; un esempio eloquente è rappresentato dai chips, i quali vengono spesso sottoposti a controllo microbiologico al loro ingresso.

**11.2 Valutazione dell'efficienza delle procedure di sanitizzazione:** la ricerca periodica del microrganismo all'interno degli strumenti comunemente utilizzati in cantina (presse, pompe, tubature, valvole, griglie di scolo, ecc.), permette di identificare i possibili punti critici da verificare e soprattutto la sequenza delle relative procedure di igiene al fine di evitare ulteriori contaminazioni.

Il monitoraggio all'interno delle vasche prima e dopo il trattamento permette di definire l'efficienza delle procedure attuate. Per quanto riguarda i contenitori in legno, uno screening accurato permette di stabilire il loro livello di igiene e di valutare quando cessa di rispondere agli standard di pulizia prefissati. In molti casi viene effettuata la ricerca del *Brettanomyces* e degli altri microrganismi direttamente nelle acque di lavaggio di botti e di barrique al fine di valutare l'effettiva efficacia dei processi di pulizia intrapresi.

Per quanto comporti procedure di campionamento e di preparazione del campione comprensibilmente più complesse, in casi particolari si esegue l'analisi su frammenti di legno prelevati dall'interno delle barrique.

**11.3 Monitoraggio della contaminazione nelle fasi-chiave del processo:** il primo punto in cui è indispensabile cominciare a valutare il rischio ed effettuare l'analisi è tra la fine della fermentazione alcolica e l'avvio della fermentazione malolattica; nel caso che quest'ultima stenti a partire, è bene ripetere il controllo almeno una volta ogni 2-3 settimane.

Durante questa fase sarebbe utile effettuare anche un'analisi precoce dei fenoli volatili per disporre successivamente di un riferimento analitico. Altro punto chiave importante da focalizzare è immediatamente dopo la fine della fermentazione malolattica.

Per quanto riguarda le barriques, l'analisi dovrebbe essere effettuata su ciascun fusto ad intervalli mensili; nel caso che ciò non sia ritenuto opportuno, ed in particolare per i controlli successivi al primo, è bene raggruppare le barriques in piccoli gruppi ben identificati (massimo 5 barrique a gruppo) ed effettuarne ogni mese il controllo.

*Sono del parere che il problema della contaminazione del vino da parte di questo microrganismo non debba essere sottovalutato anche in aziende medio-piccole che, necessariamente, devono sostenere costi aggiuntivi per le analisi del caso. Ribadisco che la più importante forma di prevenzione, nonché una delle poche attuabili contro *Brettanomyces* è garantire la totale igiene dell'ambiente cantina e di tutti gli strumenti adoperati durante le fasi di vinificazione, di affinamento e di stoccaggio. Intendo dunque che la pulizia dei rubinetti "assaggiavino" ogni qualvolta se ne faccia uso, degli strumenti utilizzati per effettuare i batonnage ecc... è indispensabile.*

## 12. COME CURARE BRETTANOMYCES IN CANTINA

### 12.1 Mezzi diretti

*-I mezzi diretti sono volti all'eliminazione parziale del microrganismo responsabile dell'alterazione-*

- 12.1.1 Il dimetilcarbonato è un antisettico contro lieviti e batteri. Questo composto si decompone sterilizzando il mezzo; i prodotti di degradazione sono la CO<sub>2</sub> e il metanolo. In vini finiti, 120 mg/L di dimetilcarbonato provocano l'inibizione di *Brettanomyces bruxellensis* mentre 200 mg/L possono assicurare l'eliminazione del lievito. Alcuni studi hanno dimostrato che l'efficacia del dimetilcarbonato dipende dal tenore di etanolo presente nei vini. L'uso di DMDC inibisce i microrganismi presenti nel vino ma non garantisce una protezione duratura perché l'idrolisi di questo composto è molto rapida e aumenta con la temperatura. Vista la possibilità di rilascio di metanolo, il suo utilizzo nel settore enologico è vietato in Europa.
- 12.1.2 Il chitosano è una molecola fungina estratta da *Aspergillus niger*, è un polisaccaride derivato dalla chitina che agisce sulla membrana cellulare di *Brettanomyces* bloccando gli scambi con l'ambiente esterno e provocando la morte delle cellule.  
L'utilizzo del chitosano - "NO BRETT INSIDE" - è stato approvato come nuova pratica nel codice enologico dell'*Organisation Internationale de la vigne et du vin* (Oiv) nel luglio del 2009 e dall'Unione Europea nel dicembre del 2010 (fonte: *VigneVini* n.12 dicembre 2011).  
Il chitosano uccide *Brettanomyces*, anche se al di sotto di 1 g/HL la sua efficacia risulta già ridimensionata. Il tempo di contatto della molecola con *Brettanomyces* deve essere di 20 giorni per garantire un effetto totale. Bisogna tenere presente che l'efficacia dell'antisettico dipende sempre dall'entità della popolazione di partenza in quanto la sua efficacia è pari al 99% e se sono presenti inizialmente 10.000 cellule, a trattamento ultimato la carica sarà scesa a 100 cellule vive, numero che non costituisce un pericolo per il vino. Si evidenzia che lo scopo principale è quello di ridurre il numero di cellule vive al di sotto della soglia limite di produzione di fenoli volatili; non si ottiene, dunque, la totale eliminazione del microrganismo.
- 12.1.3 L'uso della filtrazione sterile ha portato buoni risultati per ottenere la riduzione di *Brettanomyces* nel vino. Studi sulla filtrazione dimostrano che si può ottenere una rimozione efficace utilizzando membrane con pori inferiori a 0,45 micron. Il problema è rappresentato dallo stato vitale non coltivabile di *Brettanomyces* che non cresce in piastra seppur vivo; è stato constatato che le cellule non coltivabili possono passare attraverso i pori da 0,45 micron in quanto possono ridurre le proprie dimensioni quando si trovano in questo particolare stato.  
Per questo motivo si raccomanda di utilizzare pori da 0,22 micron per essere sicuri di avere la sterilità da *Brettanomyces*. Tuttavia questa filtrazione spinta può essere dannosa per la struttura

colloidale del vino e può portare ad una perdita del colore, di polisaccaridi, provocando il colmattaggio dei filtri.

## ***12.2 Mezzi indiretti***

*-I mezzi indiretti sono volti all'eliminazione dei composti prodotti dal microrganismo-*

Alcuni prodotti enologici potrebbero essere utilizzati per asportare i fenoli volatili presenti nei vini. I più efficaci sono i carboni vegetali attivati che sono gli unici a poter essere utilizzati in enologia, per legge. Anche le fecce, se gestite correttamente, possono avere un parziale potere adsorbente nei confronti di molti odori sgradevoli..

Il carbone *deodorante* determina asporti pari al 30%, sia per quanto riguarda il 4-etilfenolo che per il 4-etilguaiacolo (il carbone deodorante NON è ammesso in campo enologico). Più modesta è l'azione del carbone *decolorante* che determina riduzioni intorno al 10% di entrambi gli etilfenoli.

Tuttavia, per avere una diminuzione importante di etilfenoli si dovrebbe arrivare a dosaggi di carbone di circa 80-100 g/HL (dose massima autorizzata 100 g/HL); naturalmente tali dosaggi possono creare effetti negativi perchè oltre ad asportare parzialmente il difetto, avendo anche una parziale azione deodorante, il carbone asporterebbe gran parte degli aromi caratteristici del vino.

Il carbone enologico deve avere delle caratteristiche particolari e deve rispondere a determinati requisiti in base a degli indici (potere decolorante e indice di iodio), deve avere, inoltre, un'elevata porosità e possedere, in superficie, dei radicali che permettono di fissare i composti fenolici in modo irreversibile.

## **13. METODI DI RILEVAMENTO DI BRETTANOMYCES**

### ***13.1 Analisi gas-cromatografica***

È una determinazione indiretta perché consente di individuare i metaboliti di *Brettanomyces* (fenoli volatili), è in grado di rilevarne la presenza anche se in piastra non c'era stato sviluppo di *Brettanomyces*.

Non si tratta di un metodo molto sicuro ed attendibile perché talvolta sono stati rilevati risultati opposti.

### ***13.2 Estrazione di DNA e ricorso a PCR***

Un metodo attualmente proposto ricorre ad un test genetico di PCR (reazione di polimerizzazione a catena). L'impiego di tale tecnica e la continua ricerca di metodiche di estrazione del DNA direttamente dalla matrice vino ci permettono ormai di valutare la presenza del lievito *Brettanomyces* in tempi brevissimi. Una volta standardizzata, essa ne consente la rilevazione con una soglia di sensibilità molto bassa, pari a sole 10 cellule. Grazie all'utilizzo di sonde specifiche è possibile contemporaneamente identificare con certezza la specie di appartenenza.

La tecnica che si basa sull'identificazione di uno specifico frammento di DNA è sensibile anche alla presenza di cellule in fase di sviluppo non attiva, comprese quelle che sono vitali ma non coltivabili.

Gli elevati costi di produzione unitari di questa analisi possono ridursi significativamente in caso di una sua applicazione intensiva.

## CONCLUSIONI

Brettanomyces fa parte della microflora naturale dell'uva, è pertanto importante saper gestire la costante presenza di questa popolazione microbica durante tutto il processo di vinificazione.

La corretta gestione della fermentazione resta dunque, a questo stadio, il migliore strumento preventivo: la nicchia ecologica deve essere occupata dai microrganismi responsabili della fermentazione alcolica e malolattica.

Il rallentamento/blocco fermentativo è il peggior nemico dell'enologo e deve mettere in allerta l'enologo stesso, che deve essere pronto ad applicare, in modo tempestivo, l'adeguata misura.

Dopo la fermentazione malolattica il vino stabilizzato mantiene una debole popolazione di Brettanomyces, di più facile controllo durante l'affinamento; si deve dunque operare correttamente in fase preventiva in modo da limitare la crescita di questi microrganismi ed arrivare alla fase di affinamento con la popolazione più bassa possibile, evitando, così di dover applicare strategie curative.

Durante l'affinamento, oltre al rispetto delle norme igieniche, principale mezzo di prevenzione, e delle elementari pratiche enologiche, solo un controllo analitico a cadenza regolare permette di evitare un eccessivo sviluppo di Brettanomyces.

Quindi la presenza di Brettanomyces è tutt'altro che da sottovalutare; ai fini del controllo dell'incidenza del problema della comparsa dei fenoli volatili, riveste particolare importanza il monitoraggio di tutti i fattori che influenzano la produzione di etil fenoli.

Concludendo posso affermare che molte delle scelte effettuate in vinificazione, con l'obiettivo del miglioramento qualitativo dei vini, hanno spesso un risvolto positivo anche sulla formazione dei fenoli volatili come per esempio l'utilizzo di enzimi pectolitici per l'estrazione del colore.

Lo sviluppo di tecniche moderne di determinazione, adatte al controllo dei vini e alla messa a punto di sistemi di disinfezione efficaci e rispettosi dei materiali, permetteranno di gestire lo sviluppo dei lieviti Brettanomyces per limitare gli innegabili effetti indesiderati che compromettono la purezza e la tipicità dell'aroma dei vini.

## BIBLIOGRAFIA

- Chatonnet P. (2002). “La contaminazione dei vini da parte di *Brettanomyces* durante la vinificazione e l'affinamento”.
- Chatonnet P. (1993). Fenoli volatili: influenze organolettiche e metodi di prevenzione. *Vigne e Vini*.
- Chatonnet P. Dubordieu D. et Boidron J.N. (1995). “The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp yeast and lactic acid bacteria on the ethylpenol content of red wines”.
- Di Stefano R., (1985). Gli etilfenoli nei vini. *Vigne e Vini* 5, 35-38
- Marengi M., (2003). L'impiego ragionato degli enzimi. *Vigne e Vini* 6, 53-55.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., B. Doneche, A. Lonuvald (1998). L'utilizzo delle preparazioni enzimatiche industriali in vinificazione. *Trattato di Enologia I*, 326-327.
- Quattro piccoli odori possono uccidere la qualità di un vino. *ERSA* 4, 13-16.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Maujean A. Origine microbiologica e proprietà dei fenoli volatili. *Trattato di Enologia II*, 259-270.
- Zambonelli C. - Microbiologia e biotecnologia dei vini – i processi biologici e le tecnologie della vinificazione.
- Ferrari, Minacci - *Brettanomyces* e vino: rischi, prevenzione e rimedi, pag. 1. - studi ISVEA Poggibonsi (SI).
- Vinidea.net - Rivista Internet Tecnica del Vino 2005, N 5/2
- Donato Lanati, Dora Marchi – contaminazione da *Brettanomyces*: comparsa di fenoli volatili.
- Laffort Info. Numero 51 novembre 2006.
- L'enologo. Dicembre 2008. “Incidenza degli etilfenoli in vini affinati in legno”. Pag. 99-100.
- L'enologo. Novembre 2007. “NO Brett inside”. Pag. 70
- Appunti scolastici di microbiologia, enologia e chimica.
- VQ numero cinque — giugno 2007, pagg. 68-75.