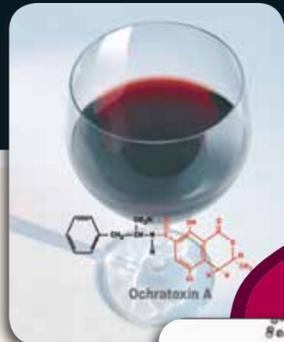


IN PRINCIPIO FU PASTEUR

L'interesse verso gli inquinamenti di tipo microbiologico del vino è antico. Anche in questo caso il merito della identificazione della causa microbiologica di alcune delle cosiddette malattie del vino va attribuito a Luis Pasteur che identificò, nella seconda metà del XIX secolo, la causa eziologica dell'amarore, del girato e dello spunto acetico. Questi studi, inoltre, assunsero ben maggiore importanza se si osserva quanto scrisse il grande studioso: "Quando si osserva la birra e il vino messi alla prova da profonde alterazioni, perché questi liquidi hanno dato asilo a degli organismi microscopici che si sono introdotti in maniera invisibile e fortuita al loro interno, dove si sono diffusi, come non essere assillati dal pensiero che fenomeni dello stesso tipo possano e debbano verificarsi talvolta anche per l'uomo e gli animali?". Gli studi sulle malattie del vino portarono, quindi, all'intuizione dell'origine microbiologica delle malattie epidemiche che avevano da sempre flagellato l'umanità rappresentandone la principale causa di morte.



Bibliografia

Garcia Moruno E., Sanlorenzo C., Boccaccino B., Di Stefano, R. (2005) Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56 (1): 73-76.

di ENRICO VAUDANO,
ANTONELLA COSTANTINI,
EMILIA GARCIA MORUNO

Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Centro di Ricerca per l'Enologia, Asti

TAB. 1 - PRINCIPALI ALTERAZIONI DI ORIGINE MICROBIOLOGICA

Alterazione	Microorganismo	Degradazione e/o molecole prodotte
Spunto acetico	Batteri acetici: <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i>	Produzione di etil acetato, acido acetico, acetaldeide
Agridolce	Batteri lattici eterofermentanti	Produzione di mannitolo
Filante	<i>Pediococcus</i> spp	Produzione di esopolisaccaridi
Sentore di burro	Batteri lattici	Produzione di diacetile
Girato	Batteri lattici genere <i>Lactobacillus</i>	Degradazione acido tartarico
Nota di geranio	Batteri lattici: <i>O.oeni</i>	Degradazione del sorbitolo a 3,5-esadiene-2-olo
Amarore	Batteri lattici	Degradazione del glicerolo ad acroleina
Gusto di topo	Batteri lattici e <i>Brettanomyces</i>	Produzione di acetil-tetraidropiridine
Fioretta	<i>Candida</i> , <i>Hansenula</i> e <i>Pichia</i> spp	Formazione di pellicola superficiale
Brett	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Produzione di etil-fenoli
Ridotto	Ceppi di <i>S.cerevisiae</i>	Produzione di idrogeno solforato mercaptani ed altri composti solforati
Sapore di tappo	Muffe: <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> batteri: <i>Cladosporium</i> batteri: <i>Streptomyces</i>	Sintesi di tri e tetracloroanisoli, geosmina, metilisoborneolo
Etil carbammato	Lieviti e batteri	Produzione di urea e etilcarbammato
Ammine biogene	Batteri lattici	Produzione di istamina, putrescina, tiramina
micotossina	<i>Aspergillus</i> spp	Sintesi di ocratossina A

Durante la trasformazione del mosto d'uva in vino, molti fattori concorrono a determinare la qualità del prodotto ottenuto. Insieme alle caratteristiche compositive dell'uva di partenza definite da clima, terreno e interventi viticoli e alle tecniche enologiche applicate, la corretta gestione microbiologica dell'intero processo risulta fondamentale. Anche durante una fermentazione in condizioni ottimali e un corretto affinamento, nei vari punti del processo, varie insidie microbiologiche sono presenti, pericoli che aumentano in modo preoccupante man mano che ci si discosta dalle condizioni ideali.

Dal vigneto all'imbottigliamento, la contaminazione microbiologica è in agguato da parte di microrganismi di svariate specie. In alcuni casi si tratta di specie sempre dannose, mentre per altre, la pericolosità dipende dal momento dell'inquinamento e dal tipo di vino che si vuole ottenere.

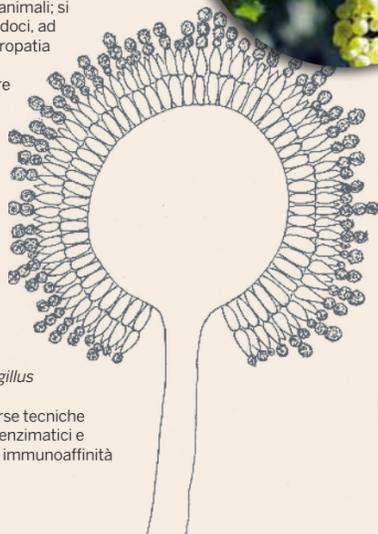
Diverse specie di microrganismi appartenenti a muffe, lieviti e batteri possono causare danni qualitativi al vino durante la sua produzione, determinando alterazioni di tipo sensoriale o tecnologico, mentre più rare sono le specie in grado di contaminare il vino con molecole dannose per la salute umana causando cioè intossicazioni. Fortunatamente il vino non è causa di infezioni alimentari da parte di patogeni grazie alle condizioni restrittive di etanolo e acidità. In Tabella 1 sono riassunti i principali microrganismi contaminanti e le alterazioni che essi provocano.

Tratteremo in modo più esteso tre alterazioni di origine microbica che recentemente hanno catturato l'attenzione di enologi e studiosi per la pericolosità, dal punto di vista salustico e qualitativo, delle molecole prodotte.

Contaminazioni microbiche nel vino ORIGINE, PREVENZIONE E RIMEDI

1. *Aspergillus* spp: Ocratossina A

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da un certo numero di specie appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* che possono svilupparsi su svariate matrici alimentari. Inizialmente rilevata su derrate immagazzinate quali grano, mais e caffè e su mangimi insilati, nel 1996 è stata identificata per la prima volta nei vini e nei succhi di frutta, presupponendo quindi una contaminazione dell'uva e della frutta d'origine. Sull'uva la specie responsabile della produzione di OTA è principalmente *Aspergillus carbonarius*. La molecola ha un'azione potenzialmente nefrotossica, teratogena, epatotossica e cancerogena negli animali; si sospetta possa avere effetti anche negli esseri umani, essendoci, ad esempio, prove a sostegno del suo coinvolgimento nella Nefropatia endemica balcanica. Inoltre la sostanza è stata rilevata nel sangue umano dopo il consumo di alimenti contaminati. Oltre all'aspetto tossicologico, l'esposizione all'OTA ha anche un impatto sull'economia, in particolare sull'allevamento, dove la diminuzione della produttività (latte, uova, e la perdita di peso) e l'aumento del tasso di mortalità, possono essere preoccupanti. Oggi il vino è considerato la seconda causa di assunzione di ocratossina A in Europa; il limite massimo nei mosti e nei vini è stato fissato in 2 µg/kg. Numerosi studi su campioni di vino commerciali hanno evidenziato la presenza di questa tossina soprattutto in vini rossi e passiti provenienti da uve coltivate nelle regioni meridionali d'Europa. In Italia il problema sembra concentrarsi nelle regioni del sud a causa delle particolari condizioni climatiche che favoriscono lo sviluppo dei ceppi ocratossinogeni in particolare appartenenti al genere *Aspergillus* sezione *nigr*. Dal punto di vista analitico varie metodologie basate su diverse tecniche analitiche sono state proposte, saggi Elisa, metodi immuno-enzimatici e biosensori. Il metodo ufficiale prevede l'utilizzo di colonne di immunoaffinità per isolare la molecola e successiva analisi HPLC.



Prevenzione e cura

La prevenzione della contaminazione viene effettuata a livello viticolo, in quanto non vi è infezione da funghi ocratossinogeni una volta pigiata l'uva. Essa si attua con adeguate pratiche agronomiche che possono essere assimilate a quelle adottate contro la *Botrytis*, favorendo l'areggiamento del grappolo, evitando ristagni d'umidità e lesioni degli acini. Nei casi in cui trattamenti antifungini risultino indispensabili, i sistemi di lotta contro la *Botrytis* hanno un buon effetto anche su aspergilli potenziali produttori di ocratossina. È fondamentale pigiare immediatamente l'uva una volta raccolta e non ammassarla in contenitori di grande volume per evitare aumenti di OTA post raccolta. In

questo senso, particolare attenzione deve essere posta nell'appassimento delle uve in zone in cui sono presenti funghi ocratossinogeni, controllando adeguatamente l'umidità in camere climatiche. In caso di contaminazione, sono stati commercializzati numerosi composti contenenti carbone attivo, considerando anche che durante il processo tecnologico di produzione del vino, attraverso chiarifiche, filtrazione e travasi, il contenuto in OTA tende a calare drasticamente. Inoltre, lieviti e batteri assorbono anche OTA durante il processo di vinificazione. Presso il nostro centro è stata dimostrata l'efficacia del trattamento con chips nel ridurre il contenuto di OTA nei vini e anche la possibilità di utiliz-



zare il deposito di lieviti alla fine della fermentazione di un vino "pulito" per trattare un vino contaminato da OTA, utilizzando la capacità di assorbimento dei lieviti. Inoltre è stato anche brevettato l'utilizzo di ceppi di *Brevibacterium* in grado di eliminare completamente l'ocratossina A, degradandola a ocratossina α e fenilalanina in terreno sintetico. La ricerca sta proseguendo con lo scopo di trasferire sul "campo" questa capacità degradativa sia in vino che in altre matrici contaminate.

Savino M., Limosani P., Garcia-Moruno E. (2007). Reduction of Ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58 (1): 97-101.

Del Prete V., Rodríguez H., Carrascosa A.V., De las Rivas B., Garcia-Moruno E., Muñoz R. (2007). In vitro removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria. *Journal of food protection*, 70: 2155-2160.

Costantini A., Cersosimo M., Del Prete V., Garcia-Moruno E. (2006). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, TLC and HPLC of strains isolated from wine and must. *Journal of food protection*, 69: 391-396.

Costantini A., Vaudano E., Del Prete V., Dani M., Garcia-Moruno E. (2009). Biogenic amines production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 10664-10669.

Costantini A., Doria, F., Vaudano, E., Garcia-Moruno, E. (2011). Chemical and molecular methods for the control of biogenic amine production by microorganisms. *Annals of Microbiology*, 61: 173-178.

Rodríguez H., Reverón I., Doria F., Costantini A., de las Rivas B., Rosario Muñoz R., Garcia-Moruno E. (2011). Degradation of Ochratoxin A by *Brevibacterium* Species. *J. Agric. Food Chem.*, 59(19):10755-60.

Garcia-Moruno E., Muñoz R. (2012). Does *Oenococcus oeni* produce histamine? A review. *Int. J. of Food Microbiology*, 157: 121-129.

Cersosimo M., Del Prete V., Pagliara A., Garcia Moruno E. (2005). Efecto del tratamiento con ozono sulla contaminazione di *Brettanomyces* in barrique. *L'Enologo*, 5: 105-108.
Henick-Kling T., Egli C., Licher J., Mitrakul C., Acree T.E. (2000). *Brettanomyces* in Wine. In: *Atti Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Oenology*, 16-20 January 2000, Melbourne, Australia

2. *Brettanomyces* spp: Etilfenoli

Il genere *Brettanomyces/Dekkera* è considerato, probabilmente, il microrganismo più dannoso per la qualità del vino rosso. I numerosi studi riguardanti il problema della contaminazione da *Brettanomyces* in vini e mosti prodotti in tutto il mondo, testimoniano quanto la presenza di questo microrganismo in ambito enologico sia una problematica di attualità. Dal punto di vista organolettico, lo sviluppo di *Brettanomyces*, in determinate condizioni, causa la comparsa nel vino di sgradevoli odori, descritti come sudore di cavallo, odore di cerotto o di plastica bruciata, capaci comunque, anche a bassa concentrazione, di coprire gli aromi fruttati e floreali del vino. Queste note animali sono correlate alla degradazione degli acidi idrossicinnamici dell'uva in composti maleodoranti, come il 4-etil fenolo e il 4-etil guaiacolo. Inoltre *Brettanomyces* concorre, insieme ad alcuni batteri lattici, alla sintesi di derivati aminoacidici che generano il cosiddetto difetto di "gusto di topo" oltre ad acidi organici a corta catena e relativi esteri etilici.

Nell'attuale classificazione, il genere *Brettanomyces*, forma anamorfica del genere *Dekkera*, include 5 specie e tra queste *Brettanomyces bruxellensis* è quella maggiormente riscontrata nel vino. In cantina i *Brettanomyces* sono stati isolati nelle attrezzature, sulle pareti, sui pavimenti e nelle botti di rovere. La contaminazione da parte di questi lieviti si manifesta solitamente a fermentazioni alcolica e malolattica ultime, per lo più durante l'invecchiamento in barrique. La loro pericolosità è dovuta alla capacità di svilupparsi in condizioni estremamente restrittive di temperatura, acidità, livello di solforosa ed etanolo anche rimanendo in stato dormiente (VBNC Viable But Non Culturable: vitale ma che non cresce nei terreni di coltura) quindi non rilevabile con metodi indiretti, pronto a svilupparsi quando le condizioni lo consentono anche raggiungendo concentrazioni di 10^4 - 10^5 cell/ml.



Prevenzione e cura

La prevenzione si basa essenzialmente su 4 concetti chiave: 1) igiene delle superfici a contatto con il vino, 2) monitoraggio del microrganismo, 3) utilizzo adeguato della SO_2 , e 4) riduzione della vulnerabilità del vino durante il processo di produzione. L'igiene di cantina, dei serbatoi di vinificazione in acciaio viene ottenuta facilmente anche con l'ausilio di detergenti specifici, mentre per i contenitori in legno per l'affinamento, dove avviene la massima parte delle contaminazioni, l'eliminazione totale è molto più difficile se non impossibile. Per le botti inquinate oltre ai lavaggi con soluzioni disinfettanti a base di SO_2 , sono allo studio tecniche di sanificazione innovative basate sull'uso di ultrasuoni, microonde (brevetto Thales, Francia), o l'uso dell'ozono. È in fase di studio, presso il CRA-ENO l'ap-

plicazione alle superfici delle barriques di una tecnica di criosabbatura con CO_2 solida, messa a punto dall'azienda MEC di Caltignaga (NO). La sabbatura con ghiaccio secco è in grado di sanificare e rinnovare le superfici in legno senza danneggiarle.

Il monitoraggio di *Brettanomyces* si attua attraverso analisi microbiologica e l'analisi chimica degli etilfenoli prodotti. Recentemente, sono state introdotte tecniche di biologia molecolare in grado di rilevare fino a sole 10 cell/ml di *Brettanomyces*, ben prima quindi che i microrganismi raggiungano concentrazioni tali da causare danni qualitativi, permettendo così di intervenire precocemente. Per quanto riguarda l'utilizzo corretto della solforosa, si deve considerare che dosi di SO_2 libera di 25-30 mg/l bloccano la crescita del microrganismo. Particolare cura richiede il

trattamento preventivo delle barrique ed è utile, prima di affrontare la stagione calda con innalzamento delle temperature in cantina che agevolano lo sviluppo microbico, una operazione di travaso e di "méchage" cioè la bruciatura di dischetti di zolfo delle barrique.

Infine (e soprattutto), la prevenzione si basa sul concetto di riduzione della vulnerabilità del vino durante le fasi critiche; queste sono soprattutto la fine fermentazione alcolica, la fermentazione malolattica e il successivo affinamento soprattutto se questo avviene in legno. Come il corpo umano è difficilmente attaccabile da microrganismi opportunisti se si trova in condizioni di buona salute, anche il vino è meno vulnerabile se il processo di vinificazione avviene nel modo corretto, in particolare se è ben colonizzato dai microrganismi responsabili delle fermentazioni alcoliche e malolattiche che devono terminare velocemente, privando i microrganismi opportunisti come *Brettanomyces* della possibilità di svilupparsi. Prima di affrontare l'affinamento in legno il vino deve presentarsi "idoneo": fermentazioni terminate con zuccheri esauriti, buon quadro acido con pH non eccessivamente alto, buona copertura con solforosa.

3. Batteri lattici: Ammine biogene

Le ammine biogene sono basi organiche a basso peso molecolare, derivanti dalla decarbossilazione degli aminoacidi precursori, presenti in diversi tipi di alimenti e bevande, come il formaggio, il pesce, la birra e il vino. Nel vino, la presenza eccessiva di queste sostanze non influenza la qualità organolettica del prodotto finito ma può costituire un rischio per la salute del consumatore. Infatti, benché alcune di esse siano presenti nel nostro organismo dove assolvono importanti funzioni regolatorie, se presenti in alte concentrazioni possono causare emicrania, ipertensione e allergie, problemi respiratori e cardiaci. Inoltre, la pericolosità di questi composti deriva, oltre che alla loro azione diretta, anche dal fatto di essere precursori di altre sostanze ben più tossiche come il carbammato di etile. Le ammine biogene più importanti nei vini sono istamina, putrescina, tiramina che derivano dagli aminoacidi più diffusi nel vino e cioè rispettivamente istidina, arginina e tirosina. Alcuni Paesi europei hanno fissato limiti nel vino più o meno restrittivi: si va dai 2 mg/l della Germania ai 10 mg/l di Austria e Svizzera. L'origine di queste molecole è ancora incerta in quanto numerosi microrganismi coinvolti nel processo di vinificazione, sia lieviti che batteri,

sono stati indicati come responsabili. In effetti la capacità decarbossilasica degli aminoacidi è diffusa, e sembra essere ceppo-dipendente nell'ambito della specie.

La fermentazione malolattica sembra essere il momento critico in cui avviene la massima produzione di queste sostanze. Fino a oggi le indagini sui vini svolte presso il nostro centro portano a escludere *O.oeni*, principale responsabile della fermentazione malolattica, come produttore di ammine biogene. Molto probabilmente, i veri responsabili sono alcuni ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* con capacità decarbossilasica, presenti solo raramente e da considerare quindi come inquinanti. È interessante osservare che ceppi di *Lactobacilli* produttori sono stati rilevati come contaminati nelle preparazioni di lievito secco attivo. La rilevazione delle ammine biogene e dei ceppi potenziali produttori avviene con approccio multianalitico che prevede analisi chimiche quali - quantitative come TLC e HPLC e analisi molecolari che consentono, per ogni ceppo studiato, di individuare la presenza dei geni che codificano gli enzimi decarbossilasici.

Prevenzione e cura

La prevenzione di questa contaminazione si attua essenzialmente attraverso un processo di vinificazione corretto che favorisca le fermentazioni alcolica e malolattica, impedendo la proliferazione di microrganismi contaminanti. Inoltre l'utilizzo di ceppi selezionati di *O.oeni* in malolattica contrasta la contaminazione di altri batteri selvaggi, presenti naturalmente nell'ambiente vigneto-cantina.



Ucrete, dal 1967: il resto è poliuretano cemento

- La pavimentazione in resina più affidabile e conosciuta al mondo
- Stesso grado di sanificabilità dell'acciaio inox
- Senza giunti e ad assorbimento nullo: non consente la proliferazione batterica
- Antiscivolo anche su superfici costantemente bagnate
- Posato solo da Applicatori Fiduciari BASF

BASF Construction Chemicals Italia Spa - Via Vicinale delle Corti, 21 - 31100 Treviso • Italia - T +39 0422 304 251 - F +39 0422 429 485
infomac@basf.com - www.master-builders-solutions.basf.it

MASTER®
BUILDERS
SOLUTIONS

BASF
The Chemical Company