

BIBLIOGRAFIA



Aguilar-Uscanga, M. G., Delia, M. L., & Strehaiano, P. 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology Biotechnology*, 61, 157-162

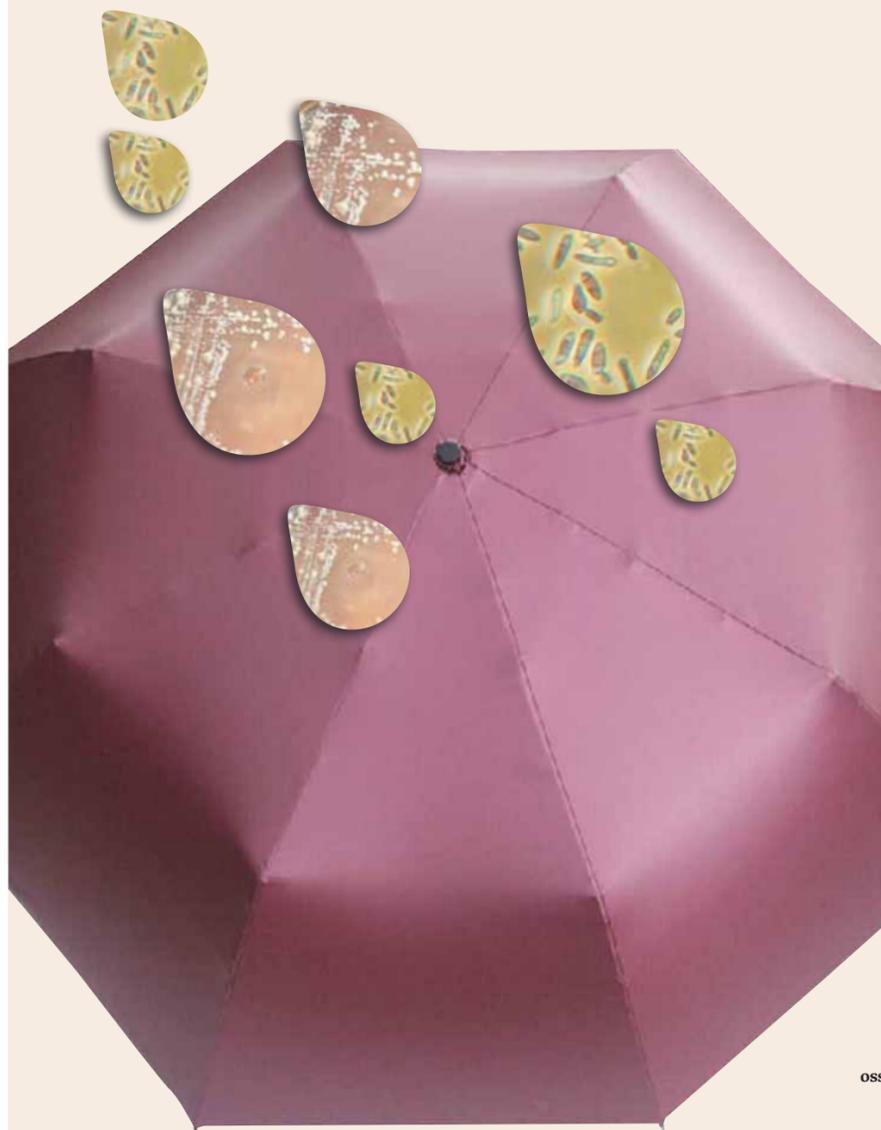
Blateyron-Pic, L., A. Bornet, C. Brandam, J. B. Jentzer, D. Granes, J. M. Heras, C. Joannis-Cassan, O. Pillet, N. Siczkowski, and P. Taillandier. 2012. *Le chitosane d'origine fongique: un nouvel outil de choix pour lutter contre Brettanomyces dans les vins*. *Revue des œnologues*, 143:27-28

Chatonnet, P. 2012. *Brettanomyces, mythes et réalités*. *evue des œnologues*, 144:42-48.

Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2003. *Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast Dekkera bruxellensis in enological conditions*. *Food Microbiology*, 20, 377-384.

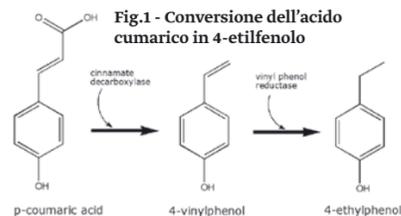
Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., Ledford, R. A. 2000. *Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects*. *Journal of Food Protection*, 63, 976-981.

Le **deviazioni organolettiche** prodotte dai lieviti del genere *Brettanomyces/Dekkera* non sono più accettabili nei vini. I fenoli volatili prodotti da questi lieviti, come il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiaacolo, **conferiscono ai vini dei sentori d'inchiostro, di stalla o di sudore di cavallo**, a volte considerati come indice di "tipicità" o "terroir", ma in realtà assai poco graditi da degustatori e consumatori. Dal punto di vista commerciale, queste deviazioni sono molto penalizzanti, perché riducono sensibilmente l'autenticità dei prodotti, apportando uno **sgradevole carattere "Brett" che tende a uniformare i vini colpiti**, indipendentemente dalla loro origine o annata. La **conoscenza dei punti critici** della vinificazione e le **misure di prevenzione** sono i mezzi di cui attualmente l'enologo dispone per garantire una buona gestione del problema *Brett*. Osservando le norme di igiene in cantina, effettuando dei controlli periodici del vino soprattutto durante l'invecchiamento e un corretto utilizzo delle attuali tecnologie è possibile evitare gli effetti dannosi causati dal *Brettanomyces*.



### Brettanomyces bruxellensis

Il lievito *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) è un microorganismo che si trova nel microbioma di diversi prodotti fermentati quali vino, sidro, birra, kombucha, ecc (Greenwalt et al., 2000; Martens et al., 1997; Morrissey et al., 2004; Silva et al., 2004). Questo lievito può causare gravi perdite economiche nel settore enologico a causa della sua capacità di produrre fenoli volatili. Tali molecole influenzano fortemente il profilo organolettico



del vino, in particolare il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiaacolo. Elevate concentrazioni di 4-etilfenolo soprattutto nei vini rossi, sono associate ad aromi sgradevoli descritti come fenolico, cuoio, sudore di cavallo, stalla, solvente (Chatonnet et al., 1992)

L'origine dei fenoli volatili coinvolge due enzimi una cinnamato decarbossilasi e una vinilfenolo reductasi (Fig 1). La cinnamato decarbossilasi è presente anche in altre specie di lievito quali *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* spp e *Torulaspota*, ma solo *Brettanomyces* può convertire il 4-vinilfenolo in 4 etilfenolo (Dias et al., 2003). Fra gli acidi cinnamici dell'uva, a essere interessati dall'attività cinnamato decarbossilasi vi sono l'acido ferulico, l'acido caffeico e l'acido p-cumarico, rispettivamente precursori del 4- etilguaiaacolo, 4 etilcatecolo e 4-etilfenolo. Oltre ai noti etilfenoli, i *Brettanomyces* sono in grado di produrre acido acetico; elevate produzioni di questo composto si verificano in presenza di ossigeno mentre in condizioni di anaerobiosi la produzione di acido acetico è bassa se non nulla (Aguilar Uscanga et al., 2003). Questi microorganismi, inoltre, possono originare molecole che conferiscono "l'aroma di topo" (Heresztyn, 1986) e produrre acido isovaleriano che viene descritto come aroma di formaggio e rancido. Durante l'ultimo decennio questi lieviti sono stati sempre più studiati da molti gruppi di ricerca per capire meglio le loro capacità di produrre sostanze indesiderate e per stabilire misure per controllarli in modo adeguato (Suárez et al., 2007).



*Brettanomyces bruxellensis* osservato al microscopio elettronico

*Brett* è un lievito naturale, che si trova praticamente in tutte le regioni vinicole e è stato isolato sull'uva, sulle attrezzature di cantina e sulle botti. Le azioni attuabili verso i *Brettanomyces* possono essere di tipo preventivo - la strategia migliore - o curativo.



# BRETTANOMYCES Prevenzione (e rimedi)

di ANTONELLA COSTANTINI, ENRICO VAUDANO, EMILIA GARCIA MORUNO

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

## 1. Prevenzione Igiene



L'igiene in cantina è estremamente importante nel controllare i problemi di alterazioni microbiche. Bisogna per prima cosa assicurarsi che tutte le attrezzature vengano pulite e disinfettate con regolarità, in modo da evitare l'accumulo di materiale organico in grado di fornire una fonte di nutrimento per lo sviluppo dei microorganismi. Tutte le vasche e soprattutto le botti devono essere accuratamente sanificate, e anche il vino che viene utilizzato per il rabbocco delle botti deve essere privo di contaminazioni. La sanificazione delle botti e barrique è di fondamentale importanza



insieme alla gestione dei travasi. In particolare è consigliato un travaso con mechàge (bruciatura di dischetti di zolfo) delle botti, prima di affrontare i mesi caldi estivi. Sono necessari circa 5-7 g di zolfo per produrre per bruciatura la quantità necessaria per sanificare una barrique

considerando che si avrà un arricchimento in SO<sub>2</sub> totale nel vino successivamente immesso nel contenitore di 10- 20 mg/l. L'azione antisettica del trattamento è molto più efficace su legni asciutti.

## Controllo di alcuni fattori che influiscono sullo sviluppo del Brett

La crescita di *Brettanomyces* è fortemente favorita dalla presenza di zuccheri residui nel vino. La gestione delle fermentazioni del vino rappresenta la prima misura importante di prevenzione. Per ottimizzare le fermentazioni è necessario utilizzare starter, soprattutto per la fermentazione alcolica (FA), capaci di utilizzare completamente gli zuccheri, in particolare in presenza di mosti molto zuccherini.

Bisogna aerare la fermentazione mediante travasi per favorire l'attività degli starter e controllare la temperatura. È necessario controllare il residuo zuccherino prima di assumere che la fermentazione alcolica sia davvero terminata.

Henick-Kling, T., Egli, C., Licker, J., Mitrakul, C. & Acree, T. E. (2000). In Proceedings of the 5th international symposium on cool climate viticulture and oenology, Melbourne, Australia, 16-20 January.

Heresztyn, T. (1986). Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 127-132

Jentzer, J. B. 2011. Effet anti-*Brettanomyces* du chitosane en vinification. Dissertation. Toulouse, France

Martens, H., Iserentant, D., Verachtert, H. 1997. Microbiological aspects of a mixed yeast-bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 85-91.

Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A. D. W. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 647-655.

Murat, M. L., & Dumeau, F. 2003. Impact of fining on population levels of certain spoilage microorganisms in red wines. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 478, 92-94.

Silva, P., Cardoso, H., Geros, H. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 65-72.

Suarez R., Suarez-Lepe J.A., Morata A., Calderon F 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Food Chem* 102: 10-21.



Una delle fasi critiche della vinificazione è quella che intercorre tra fine FA e inizio malolattica (FML), perché il vino non è ancora stabilizzato ed è molto vulnerabile allo sviluppo di contaminanti. Se la FML non si avvia spontaneamente in tempi veloci è utile l'impiego di starter malolattici.

## La solfitazione

La solfitazione rappresenta l'azione preventiva più efficace. Nella fase di pre-fermentazione è utile a limitare lo sviluppo della popolazione di *Brettanomyces*, tuttavia, si raccomanda di evitare una solfitazione eccessiva (> 8 g/hl) che potrebbe portare a un ritardo della fermentazione malolattica.

La solforosa permette di stabilizzare i vini dal punto di vista microbiologico oltre ad avere un potere antiossidante. È difficile mantenere la concentrazione di SO<sub>2</sub> stabile per periodi prolungati soprattutto nella fase di affinamento in botte in cui l'ambiente è mediamente ossidante. Pertanto è necessario effettuare dosaggi periodici della solforosa; Henick-Kling et al (2000) raccomandano una dose di SO<sub>2</sub> molecolare di 0.5 mg/l per prevenire e bloccare *Brettanomyces*, ma altri autori hanno rilevato dosi più elevate, intorno a 1-1,2. Va ricordato che il tenore di SO<sub>2</sub> molecolare dipende dal pH del vino: 30 mg/l di SO<sub>2</sub> rilasciano 0.4 mg/l di SO<sub>2</sub> molecolare a pH 3,7, e 0.8 mg/l a pH 3,4.

## Monitoraggio

È necessario effettuare dei controlli della popolazione di *Brettanomyces* almeno nelle fasi critiche di vinificazione. Attualmente i metodi biomolecolari, che utilizzano la tecnica di PCR quantitativa (qPCR), consentono di avere risultati in tempi molto rapidi; inoltre l'analisi viene fatta direttamente su matrice vino e ciò permette di quantificare i lieviti anche nel caso in cui si trovino nello stato vitale ma non coltivabile (VBNC) e vari laboratori in Italia e all'estero si stanno attrezzando in questo senso o già utilizzano la tecnica. Anche presso il Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti è stato messo a punto un metodo qPCR che permette di quantificare poche cellule/ml di *Brettanomyces* nel vino. Siccome gli etilfenoli non sono prodotti fino a quando la popolazione di lievito non raggiunge 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> cell/ml, la possibilità di conoscere la popolazione di *Brettanomyces* permette all'enologo di attuare misure preventive per bloccare lo sviluppo di questi lieviti, prima che gli etilfenoli superino le soglie di percezione. Anche i metodi chimici volti a quantificare gli etilfenoli in vino sono utili; oggi le tecniche di gascromatografia si sono affinate molto e si riescono a quantificare piccolissime quantità di etilfenoli. Il controllo di queste molecole associato alla quantificazione delle cellule è utile per avere un quadro chiaro della situazione del vino e può indirizzare l'enologo nella scelta delle misure più appropriate.

## Misure per ridurre la popolazione di Brett

Il chitosano è un polisaccaride naturale estratto da *Aspergillus niger*. Jentzer (2011) ha osservato l'azione del chitosano sulle cellule e si è visto che ha un'azione fisica e una biologica. L'azione fisica si basa sulla formazione di interazioni elettrostatiche tra il chitosano e le pareti cellulari dei microrganismi che portano alla formazione di agglomerati e possono poi essere rimossi mediante un travaso. Inoltre questi autori hanno anche verificato l'azione biologica di questo composto e hanno quantificato l'adenosina trifosfato (ATP) in una prova con mosto sintetico contaminato con 10<sup>6</sup> cell/ml di *Brettanomyces*. Tale mezzo è stato poi trattato con chitosano (10 g/hl) e l'ATP è stato di nuovo misurato; è emerso che il chitosano genera un rilascio di ATP nel mezzo. Questo fenomeno rivela un forte disturbo nella permeabilità della membrana delle cellule e ne provoca la morte. Blateyron-Pic et al., (2012) hanno mostrato che dosi tra 2 e 6 g/hl di chitosano sono sufficienti e distruggere completamente la popolazione di *Brettanomyces*, la quantificazione è stata condotta con qPCR.

Murat e Dumeau (2003) hanno riportato che la popolazione di *Brett* può essere ridotta da 40 a 2.000 volte mediante trattamento con proteine chiarificanti. È stato inoltre anche osservato che la gelatina liquida, in una sperimentazione su vino rosso a Bordeaux,

ha ridotto la popolazione di Brett da 10<sup>4</sup> CFU/ml a 270 e 170 CFU/ml con dosi di 0.3 e 0.6 ml/l rispettivamente. Tuttavia, lo svantaggio di questa procedura è la riduzione del colore e dell'aroma dei vini. La filtrazione può essere un trattamento volto a ridurre la quantità di lieviti contaminanti utilizzando membrane con porosità inferiore agli 0.45 µm; gli svantaggi sono simili a quelli che si hanno con gli agenti chiarificanti.

Anche il dimetildicarbonato (DMDC) è un antisettico di batteri e lieviti. Il suo potere antisettico è dato dalla reattività del dimetildicarbonato nei confronti delle proteine, interverrebbe quindi sui microrganismi per inattivazione enzimatica. L'Unione Europea, nel 2006, ha autorizzato il DMDC per il vino con l'obiettivo di ottenere la stabilità microbiologica e di prevenire lo sviluppo dei lieviti indesiderabili e dei batteri lattici. Il trattamento può essere effettuato con dosi non superiori a 200 mg/l. Il prodotto non trova ancora larghi consensi per le limitazioni delle dosi e per l'uso attento che se ne deve fare (possibile aumento di alcol metilico).

## 2. Misure curative per ridurre il contenuto di etilfenoli

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 essere autorizzati in enologia. 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 in quanto oltre ad asportare parzialmente il difetto, avendo anche una parziale azione deodorante, il carbone asporterebbe gran parte degli aromi caratteristici del vino.







**GARZANTI**  
SPECIALTIES

Le migliori tecnologie  
per le migliori tradizioni

**Garzanti Specialties S.p.A.**  
Via Enrico Tazzoli 6 20154 Milano (Italy)  
Tel. +39-02-625421  
Fax +39-02-6551905  
Email info@garzantispecialties.it  
www.garzantienologia.it

