

Comprendere e contenere il *Brettanomyces bruxellensis* nei vini: approcci in corso

RICCARDO MASETTO (enologo), FABRIZIO MINUTE (R&S), FEDERICO GIOTTO (Ceo, enologo) - Giotto Consulting



Nei primi anni del ventesimo secolo, all'alba di nuovi approcci enologici proiettati verso la valorizzazione qualitativa dei prodotti agroalimentari, si iniziò a parlare sempre più frequentemente di uno dei lieviti ad oggi più diffusi e discussi nella filiera vitivinicola: il *Brettanomyces*. Com'è noto e scientificamente documentato, il *Brettanomyces* (sin. *Dekkera* nella sua forma sporigena) è un genere fungino responsabile di alterazione e deprezzamento dei vini riscontrato in ogni parte del mondo dove la vite trovi coltura. *Brettanomyces bruxellensis* è la specie più diffusa, seguita da *B. anomalous*. Le alterazioni qualitative dovute al suo metabolismo sono molteplici e molto spesso irreversibili.

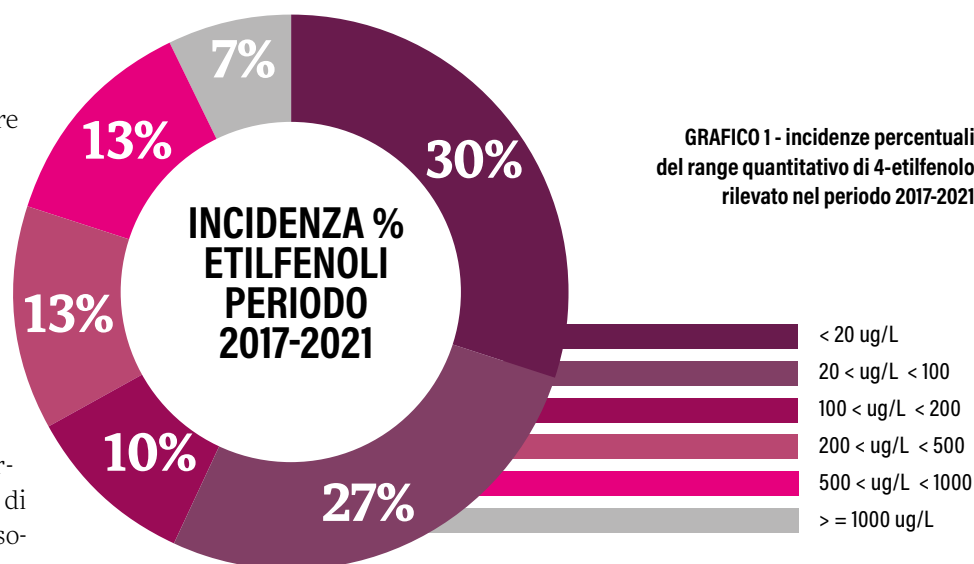
Lievito ed eziologia

L'eziologia del *Brettanomyces spp.* è ancora oggi oggetto di studio. Analogamente a tanti altri lieviti e batteri di interesse enologico, anche questo microrganismo è presente in vigna (Taillandier, 2007; Guerzoni and Marchetti, 1987), dove la sanità delle uve e la qualità dell'intervento fitosanitario sono fattori determinanti sulla sua concentrazione. A tal proposito, è in corso una sperimentazione condotta dal reparto R&D della Giottoconsulting srl con

lo scopo di isolare e caratterizzare il *Brettanomyces* dall'insieme del microbiota presente nelle uve in fase pre-vendemmiale, mediante l'applicazione di specifiche analisi genomiche. L'elevata alcool-tolleranza (> 15 % vol), la resistenza ai solfiti, l'adattamento alle condizioni di aerobiosi e anaerobiosi e le limitate esigenze nutrizionali gli permettono di perseverare nel corso di tutta la filiera vitivinicola. I fabbisogni fisico-chimici del *Brettanomyces* aiutano a comprendere le sue dinamiche di sviluppo. I valori termici ideali (> 15 °C), per esempio, giustificano il motivo per cui nel corso dei mesi estivi si assiste ad un forte incremento di attività da parte di questo microorganismo, con una lieve flessione nel periodo invernale. Il lievito *Brettanomyces* si moltiplica per gemmazione. La forma cellulare è polimorfa: ellissoidale, ogivale oppure cilindrica e le sue dimensioni variano dai 2 ai 7 µm. In condizioni di stress, quali ad esempio una recente solfitazione, la cellula può diminuire le sue dimensioni (anche inferiore al micron) rendendo parzialmente inefficace la filtrazione come metodo di allontanamento cellulare (Millet e Lonvaud-Funel 2000).

Metabolismo della specie *B. bruxellensis*

Nel settore enologico il genere *Brettanomyces* è noto per il deterioramento organolettico che provoca nei vini nei quali si sviluppa. La sua attività metabolica porta al rilascio di molecole alteranti nei confronti della qualità del vino e influenti sulla sua salubrità. La notorietà di questo lievito è dovuta in particolar modo agli "etilfenoli", fenoli volatili a bassa soglia di percezione capaci di alterare completamente il profilo aromatico dei vini generando



NEL SETTORE ENOLOGICO IL GENERE *BRETTANOMYCES* È NOTO PER IL DETERIORAMENTO ORGANOLETTICO CHE PROVOCA NEI VINI NEI QUALI SI SVILUPPA

sentori quali: sudore di cavallo, medicinale, stalla, cerotto, spezia e cuoio. Le molecole definite come tali sono il 4-etilfenolo, 4-etilguaiacolo, 4-etilcatecolo, e derivano da un doppio processo enzimatico a carico di acidi fenolici presenti nelle uve, nei mosti e nei vini. L'insieme delle reazioni enzimatiche e fermentative a carico di diversi substrati contenuti nei mosti e nei vini è maggiore in condizioni di aerobiosi; l'anaerobiosi riduce notevolmente la sintesi di acido acetico (Ciani e Ferrero, 1997, Aguillar Uscanga, 1998). Il fatto che l'ossigeno ne favorisca la proliferazione e che l'anaerobiosi dapprima ne rallenti l'attività (Sheffers e Wikén, 1969) giustifica il motivo per cui nel corso dell'affinamento in barrique la continua micro-ossigenazione da parte del legno svolge un effetto induttivo.

Brettanomyces e pratiche enologiche

La presenza del lievito *Brettanomyces* è stata riscontrata nelle uve, nei mosti e nei vini e la sua at-

tività è fattore-dipendente. Tutte le fasi della vinificazione, dal ricevimento delle uve alla preparazione del vino all'imbottigliamento, possono risultare punti critici per una possibile contaminazione, indipendentemente dal tipo di contenitore utilizzato.

- La macerazione pre-fermentativa a freddo delle uve è una delle prime fasi critiche. Processare uve sane e sottoposte a corrette pratiche enologiche preventive può ridurre notevolmente il rischio di proliferazioni indesiderate.
- Fermentazioni alcoliche stentate con lunghe fasi di latenza aerobica possono favorire lo sviluppo del *Brettanomyces*. Analogamente, fermentazioni malolattiche protratte troppo nel tempo espongono il vino ad un maggior rischio di alterazione.
- Una non accurata igienizzazione dei vasi vinari e delle attrezzature di cantina specialmente in presenza di scabrosità e irregolarità superficiali, può favorire la conservazione delle cellule e l'innesco di molteplici focolai in tutto lo stabilimento produttivo.
- I vini nel corso dell'affinamento in legno sono sottoposti a rischi di contaminazione notevoli. Le cellule di *Brettanomyces*, infatti, sono state

riscontrate fino ad una profondità di 7-8 mm nella porosità di vasi vinari in legno apparentemente sanificati (Laureano et al., 2005).

Incidenza e diffusione del *Brettanomyces*

Ancora oggi in tante realtà vitivinicole vi è la tendenza a considerare la contaminazione da *Brettanomyces* una variabile poco frequente e di scarsa rilevanza. In veste di centro di consulenza, ricerca e formazione, la Giottoconsulting srl da anni investe nella comprensione delle dinamiche di sviluppo del *Brettanomyces*. I risultati dei test e delle evidenze scientifiche riscontrate sono di seguito riportati. Al fine di dimostrare l'incidenza del *Brettanomyces* nella quotidianità vitivinicola in contesti internazionali, nel corso del quinquennio 2017-2021 sono state effettuate delle analisi a campionamento randomizzato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione presso il laboratorio GiottoLab. Nel grafico 1 sono esposte le diverse incidenze percentuali del range quantitativo di 4-etilfenolo rilevato nel corso degli anni. Il limite di quantificazione strumentale applicato alla metodica è pari a 20 ug/L. I campioni sono stati analizzati mensilmente, con una media annua di duemila campioni per anno. L'interpretazione grafica evidenzia che il 70% dei campioni analizzati nel quinquennio presentano una concentrazione di 4-etilfenolo sopra limite di quantificazione strumentale, ciò significa che il 70% dei campioni analizzati era (o era stato) inquinato da cellule di *Brettanomyces* attive.

Etilfenoli e mascheramento olfattivo

Nel corso dei diversi anni a sostegno delle aziende vitivinicole ci è risultato sempre più evidente il fatto che vini con quantitativi di etilfenoli inferiori alla loro soglia di perce-

zione (stabilita a 425 ug/L secondo Chatonnet, 1993), apparissero notevolmente diversi sotto profilo sensoriale rispetto a vini dello stesso batch ma privi di inquinamento. L'ipotesi di un'influenza olfattiva già in principio di sviluppo ci ha spinto a condurre presso la nostra sede numerosi blind test discriminanti, dei quali si riporta sotto un esempio di test duo-trio (ISO/WD 10399, 1998). Nel mese di novembre 2021 è stato condotto presso Giottoconsulting srl un duo-trio test al fine di cercare evidenza statistica in merito all'influenza degli etilfenoli sul profilo aromatico dei vini, in linea a quanto già definito da precedenti studi scientifici.

Il test ha coinvolto un panel di tecnici professionisti, riuniti una volta a settimana per 4 settimane e in doppia sessione. La discriminante tra i campioni nel test duo-trio è stata il dosaggio in un vino a base Merlot (alcol svolto: 14.44 %vol; acidità totale: 5,91 g/L; pH: 3,53; acidità volatile: 0,43 g/L; solforosa libera: 26 mg/L; solforosa totale: 89 mg/L.) di 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo, rispettivamente a dosaggi di 100 ug/L - 10 ug/L nella prima sessione e 300 ug/L - 30 ug/L nella seconda sessione; dosaggi quindi inferiori rispetto alla soglia di percezione letterale.

I FABBISOGNI
FISICO-CHIMICI DEL
BRETTANOMYCES
AIUTANO A
COMPNDERE LE
SUE DINAMICHE DI
SVILUPPO

In seguito all'elaborazione dei dati è emerso quanto segue:

- *Sessione n°1*, dosi di inquinanti pari a 100 ug/L 4-etilfenolo + 10 ug/L 4-etilguaiacolo

Nel 73% delle esaminazioni è stata individuata la differenza tra i due vini. Nell'86% è stato indicato con preferenza maggiore il campione privo di etilfenoli. La ragione della preferenza è stata descritta con l'attenuazione del carattere "fruttato" e l'alterazione del carattere varietale. A questo dosaggio di inquinanti non sono stati rilevati i sentori tipici del "Brett character".

- *Sessione n°2*, dosi di inquinanti pari a 300 ug/L 4-etilfenolo + 30 ug/L 4-etilguaiacolo

Nell'89% delle esaminazioni è stata individuata la differenza tra i due vini. Nel 92% è stato indicato con preferenza maggiore il campione privo di etilfenoli. La preferenza è stata giustificata dalla percezione, nel campione inquinato, di note fenoliche, ossidative, animale e cuoio. Questa prova ha dato ulteriore conferma dell'influenza che gli etilfenoli hanno sul profilo aromatico dei vini già a dosi minime, quindi ai primordi dell'attività metabolica del *Brettanomyces*. La perdita irreversibile dei caratteri di qualità e identità del vino sono ovviamente fattore-dipendente. I responsi tecnici ottenuti dai nostri test sono in linea con quanto riportato da Tempere et al., 2016, in merito all'effetto mascheramento indotto dagli etilfenoli.

Tecniche di rilevamento e approccio preventivo

Si possono distinguere due tipologie di approccio interventistico: preventivo e curativo. Nel primo caso si fa riferimento all'insieme delle tecniche atte a prevenire la proliferazione del *Brettanomyces* e/o a rilevarlo in principio evitando ulteriori perdite qualitative. Nel

caso curativo, come suggerisce il termine, si intende l'applicazione di tecniche atte ad attenuare il problema. Ad oggi però non esistono approcci curativi capaci di ripristinare le caratteristiche organolettiche originali dei vini, ma solamente di attenuarne il problema. Per questa ragione si rende necessaria l'attuazione di un protocollo di prevenzione dedicato.

Tecniche di rilevamento cellulare

- *Coltura su piastra*: la tecnica della coltura su piastra consiste nel sottoporre le cellule microbiche (in questo caso del *Brettanomyces bruxellensis*) a condizioni ambientali e nutritive di sviluppo, inducendolo a moltiplicarsi, qualora presente nel campione analizzato. L'indicazione che ne deriva è di tipo quantitativo, esprime infatti la presenza o meno del lievito e la quantità di UFC/ml. Anche questa tecnica presenta alcuni limiti. La presenza di *Brettanomyces* sottoforma di spora o VBNC (forma vitale ma non coltivabile) non è rilevabile mediante coltura microbica. Inoltre, le lunghe tempistiche di incubazione richieste possono costituire un problema nel caso di un rilevamento puntuale.

- *Tecniche avanzate di rilevamento (PCR)*: la PCR (reazione a catena della polimerasi) è una tecnica di biologia molecolare che consiste nell'amplificazione di regioni specifiche di DNA contenute nel campione analizzato e alla loro successiva caratterizzazione. Questa tecnica molto accurata ed oggi nota in tutto il mondo per le applicazioni che riscontra, presenta però alcuni punti di debolezza nel caso della matrice vino: il suo contenuto in polifenoli (nel caso di vini rossi) e l'esistenza di cellule di *Brettanomyces* morte ma con DNA conservato al loro interno possono condurre rispettivamente



a falsi negativi e falsi positivi. Anche questa tecnica, dunque, può essere opinabile.

Tecniche di rilevamento dei metaboliti

- *Assaggio*: la problematica insita in questa tecnica di monitoraggio è la soggettività. La soglia di percezione olfattiva degli etilfenoli è stabilita a 425 ug/L, (Chatonnet 1993),

ma come messo in evidenza dai numerosi studi scientifici presenti in letteratura e dai test effettuati internamente presso la nostra sede, gli etilfenoli possono influire negativamente sul vino già a dosi inferiori alla loro soglia di percezione.

- *Analisi strumentale*: tra le varie tecniche strumentali impiegate nel rilevamento dei fenoli volatili, la cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography) riscontra notevole interesse. In merito alle problematiche dei Brett Off-Flavors questo strumento offre il vantaggio di poter quantificare con precisione il contenuto di molecole inquinanti, quali ad esempio 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo. La loro quantificazione avviene già a dosi minime

e impercettibili e ciò consente di intervenire tempestivamente prevenendo il deperimento qualitativo dei vini. Diversamente dalla coltura su piastra e dalla PCR, questa tecnica rileva puntualmente la problematica senza alcun rischio di falsi positivi, negativi e/o soggettività.

La velocità metabolica con il quale il *Brettanomyces* origina fenoli volatili risulta fortemente correlata all'inoculo e alla temperatura. Nei periodi primaverili ed estivi un incremento mensile di 4-etilfenoli nell'ordine dei 1500 ug/L è comune, in assenza di interventi. Considerando questa sua caratteristica è confermata l'importanza della puntualità nel rilevamento del problema.

Sulla base delle precedenti considerazioni relative alla prevenzione e alla velocità metabolica di questo lievito, la Giottoconsulting srl ha deciso di istituire un protocollo tecnico denominato "Brettscreening" atto ad agevolare il produttore nel contenimento del *Brettanomyces*.

Conclusioni

Le ricerche tecniche che da anni il nostro reparto di R&D porta avanti mirano allo sviluppo e all'applicazione di approcci sempre meno invasivi e orientati nell'ottica conservativa della qualità dei vini. Parallelamente, dal punto di vista tecnico, il supporto puntuale al cliente e la gestione comune del *Brettscreening* offre un valido aiuto nella persecuzione dei vini di qualità. Molti studi sono tutt'oggi in atto presso i nostri laboratori, contestualmente sostenuti anche da blind test aperti al pubblico (nel limite delle recenti restrizioni per Covid-19). L'esigenza di prevenire la proliferazione del *Brettanomyces* in cantina è una realtà oggi imprescindibile, dinnanzi alla quale noi tecnici necessitiamo attenzione e approccio scientifico.

SI POSSONO
DISTINGUERE
DUE TIPOLOGIE
DI APPROCCIO
INTERVENTISTICO:
PREVENTIVO E
CURATIVO