



## Considerazioni su alcuni aspetti microbiologici dei vini nella fase di post-fermentazione

L'origine microbiologica degli etil fenoli è stata chiaramente dimostrata da oltre un decennio: i lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces bruxellensis* sono dotati di un patrimonio enzimatico che gli permette di produrre grandi quantità di etil-4-fenolo (E4P) ed etil-4-guaiacolo (E4G) a partire da acidi fenolici naturalmente presenti nelle uve (Chatonnet 1992).

Tuttavia ancora oggi un gran numero di vini presenta questo tipo di difetto. Da un punto di vista organolettico, il carattere fenolico si traduce, nei casi meno gravi, in una perdita di tipicità e di finezza dei vini, mentre nei casi più gravi si avverte la presenza di un forte odore animale, che richiama i sentori di "stalla" e "sudore di cavallo".

La soglia di percezione delle due molecole implicate (concentrazione alla quale l'aroma del vino è alterato) è stimato a 425 µg/l per una miscela 10/1 E4P/E4G.

Per avere questa alterazione in un vino, bisogna avere un numero minimo di cellule di *Brettanomyces* attive, dei nutrienti e degli acidi fenolici che fungano da precursori dell'etil-fenolo.

Cerchiamo di capire quando si hanno queste condizioni nei vini e cosa si può fare per evitarle.

microrganismi di interesse enologico (*Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*) ma anche specie negative come *Zygosaccharomyces bailii* e *Brettanomyces bruxellensis*, che compaiono solitamente dopo invaiatura.

Si deve dunque considerare l'uva quale responsabile della contaminazione della cantina. L'individuazione di questi lieviti di contaminazione in vigneto è resa delicata dal fatto che in questo momento sono presenti in quantità minoritaria. Il processo di vinificazione con il passaggio repentino da uva a mosto (pigiaturo) seguita dalla fermentazione degli zuccheri in alcool da parte di *Saccharomyces cerevisiae* provoca uno stress cellulare che mette in atto una severa selezione tra i microrganismi. Per tanto la maggior parte delle specie isolate sull'acino d'uva non si ritrovano poi nel mosto e nel vino.

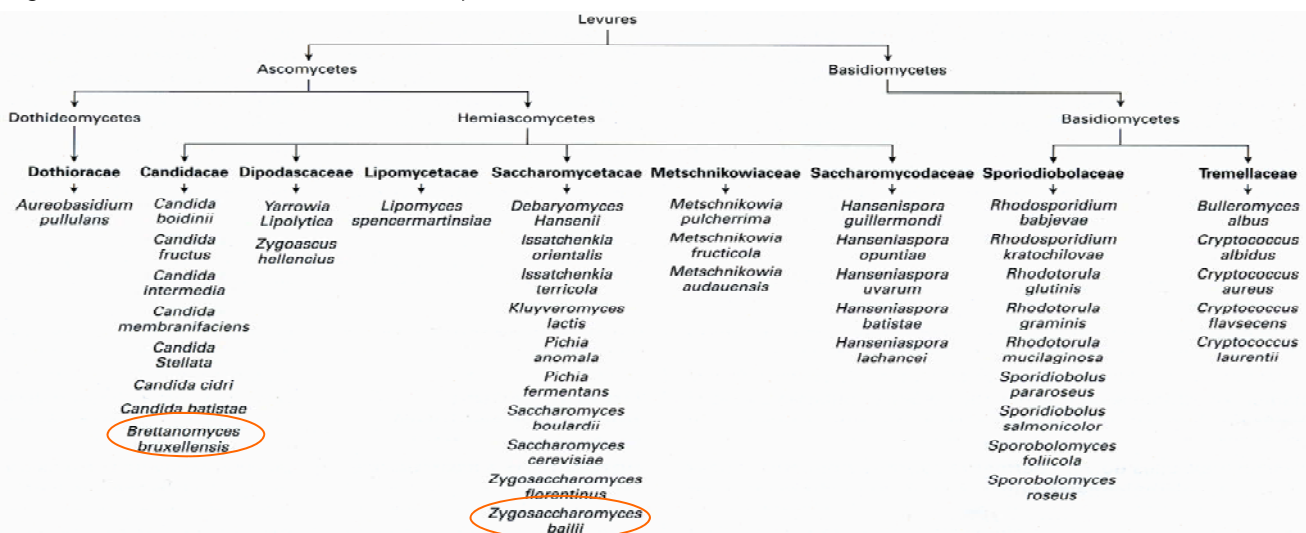
I lieviti del genere *Brettanomyces* sono particolarmente resistenti all'etanolo, all'assenza di ossigeno, ad una gamma abbastanza ampia di pH ed alla SO<sub>2</sub> e sono in grado di resistere nel vino malgrado l'impoverimento in zuccheri.

Recenti studi ecologici condotti in differenti cantine bordolesi (Renouf et al., 2006a) hanno mostrato che dal momento dell'introduzione del pigiato in vasca alla fine della fermentazione alcolica, i *Brettanomyces* sono in minoranza tra i lieviti *non-Saccharomyces*. Per contro da fine macerazione in avanti essi diventano maggioritari tra i *non-Saccharomyces*, soprattutto nelle vinacce e nelle fecce. Da questo momento in poi, si può assistere

### Stato dell'arte sulla conoscenza del *Brettanomyces*

La microflora presente sulla superficie dell'acino d'uva raggruppa numerosi microrganismi (fig. 1). Essi si diversificano in due grandi gruppi: i lieviti Basidiomiceti e i lieviti Ascomiceti. Si constata tra questi la presenza di

Figura 1: inventario e classificazione delle specie di lieviti isolate sull'uva (Rev. Oen. n.120)



allo sviluppo della popolazione di *Brettanomyces* che, utilizzando gli acidi fenolici e gli zuccheri residui naturalmente presenti, può produrre grandi quantità di etil fenoli.

L'importanza della presenza di *Brettanomyces* sulle uve come fonte di inquinamento della cantina e del vino è confermata dall'identificazione degli stessi ceppi sulle uve prima e sul vino dopo. I lavori di isolamento ed identificazione dei ceppi di *Brettanomyces* sono molto importanti per poterne capire l'origine e seguirne lo sviluppo, ma anche in considerazione del fatto che non tutti i ceppi producono la stessa quantità di fenoli volatili.

*Brettanomyces* è presente sulla superficie delle vassche, sulla superficie delle barrique, negli effluenti delle cantine, nell'aria e sulla maggior parte delle superfici a contatto con il vino. Ciò a sottolineare l'importanza di una rigorosa manutenzione e igiene delle attrezzature.

Inoltre esistono forme quiescenti del *Brettanomyces*, che non crescono in piastra, che hanno una capacità di sopravvivenza quasi illimitata, basti pensare che sono state ritrovate cellule vive in vini imbottigliati da oltre 100 anni.

## Fattori di rischio.

▶ Le macerazioni prefermentative permettono un adattamento dei microrganismi al mezzo, pertanto lunghi dall'inibire il *Brettanomyces*, ne stimolano la capacità di colonizzazione dell'ambiente. Quando la temperatura si alza la loro crescita è facilitata. Se l'inoculo dei lieviti si fa dopo MPF, il rischio di insuccesso dell'inoculo è maggiore, e questo può portare ad un arresto della fermentazione ed eventualmente ad una contaminazione.

▶ Particolarmente pericolose sono le chiusure di fermentazione stentate, in quanto il *Brettanomyces* è più resistente rispetto ai *Saccharomyces* a condizioni di bassa concentrazione di zuccheri, scarsa presenza di nutrienti e tasso elevato di alcool.

▶ Dopo svinatura, la fase di latenza prima della fermentazione malolattica (FML), corrisponde ad un periodo molto propizio al loro sviluppo (fig. 2). Durante la FML, il rischio è minore grazie al fatto che la nicchia ecologica viene occupata dai batteri lattici.

In seguito, durante l'affinamento lo sviluppo del *Brettanomyces* è generalmente più lento, e può essere più facilmente controllato. In questo stadio, il rischio di moltiplicazione dipende essenzialmente dalle condizioni ambientali. Non si deve tuttavia dimenticare che la presenza di popolazioni seppur numericamente modeste, che rimangono in vita nei vini per lunghi periodi può essere più pericolosa che picchi di popolazione presenti per periodi brevi.

▶ Il metodo di pulizia dei contenitori, specialmente nel caso di un affinamento in fusti di legno, rappresenta un altro importante elemento. Una pulizia efficace dei fusti, seguita da una buona colatura, asciugatura e dall'abbruciamento di zolfo sono operazioni essenziali dopo il travaso.

▶ La presenza di zuccheri residui, indifferentemente se glucosio e/o fruttosio, costituisce un elemento favorevole allo sviluppo di questi lieviti d'alterazione. Recentemente la legislazione ha autorizzato in certe denominazioni la produzione di vini con tenori in zuccheri relativamente

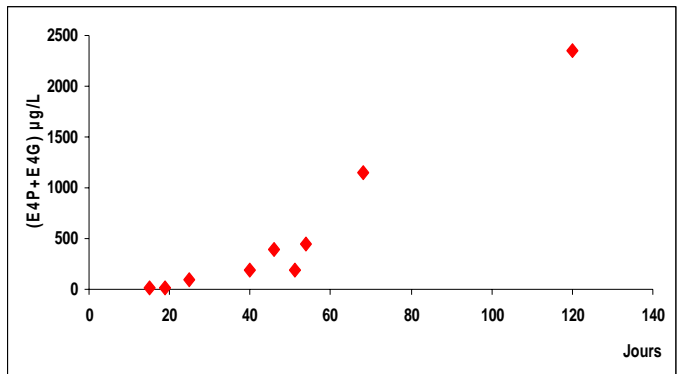


Figura 2. Relazione tra tempo di latenza fine FA / inizio FML e tenore in fenoli volatili dei vini dopo FML (2005, n = 9)

elevati; la tendenza attuale è comunque di avere qualche grammo di zuccheri residui che conferiscono un po' più di morbidezza ai prodotti. Solo 0,3 g/l di glucosio e/o fruttosio sono sufficienti ad una popolazione di *Brettanomyces* per produrre 425 µg/l di fenoli volatili (Chatonnet, 1999). In assenza di glucosio-fruttosio, la crescita di *Brettanomyces* è ancora possibile a partire da altri zuccheri non utilizzati dai *Saccharomyces*.

▶ Durante l'affinamento la presenza di ossigeno può essere favorevole direttamente o indirettamente alla crescita di *Brettanomyces* (Renouf et al, 2006b). Non si deve dimenticare che tutte le tappe dell'elaborazione del vino inducono inevitabilmente un'importante dissoluzione di ossigeno (travasi, colature, filtrazioni, collaggi, imbottigliamento, ...) e che alcune pratiche sono appositamente attuate per favorirne la dissoluzione nei vini (microossigenazione, affinamento in legno, ...).

▶ L'affinamento sulle fecce consente di mantenere nel vino una biomassa contaminante importante. E' dunque una pratica a rischio, da fare solo in caso di estrema sicurezza.

▶ Molta attenzione si deve anche fare negli assemblaggi tra lotti, che possono portare ad inquinare lotti sani e deboli con lotti inquinati ma più resistenti.

Normalmente vini con pH elevati e gradazioni alcoliche basse sono più vulnerabili al *Brettanomyces* che vini a pH < 3,4 ed alcool > 14,5 % vol.

## Mezzi di controllo e prevenzione

Al fine di prevenire contaminazioni, che possono indurre aumento di fenoli volatili, un controllo analitico attento è vivamente raccomandato. Le contaminazioni come abbiamo visto possono aver luogo a differenti stadi della vinificazione. Conviene dunque essere estremamente vigili ad ogni tappa del processo.

Per controllare il rischio *Brettanomyces* abbiamo attualmente a disposizione tre strumenti analitici mirati:

- la conta dei lieviti *Brettanomyces* dopo coltura su terreno selettivo;

- il dosaggio dei fenoli volatili con SBSE/GC/MS
- la microscopia a epifluorescenza.

Tuttavia questi strumenti analitici sono utili solo se impiegati in modo razionale e correttamente interpretati. Per cominciare si deve sapere che non esiste nessuna correlazione tra il tenore in fenoli volatili di un vino e la sua popolazione di *Brettanomyces* (fig. 3); questo significa che un controllo pertinente dovrà misurare l'evoluzione di entrambi i parametri. Inoltre la popolazione di *Brettanomyces* è distribuita in modo eterogeneo all'interno dei vasi vinari.

La tabella 1 riporta i risultati di prelevamenti realizzati in tre barrique in superficie ed in profondità. In tutti i casi si rileva assenza o scarsa presenza di cellule in superficie, mentre la popolazione è sistematicamente più elevata al fondo della barrique. Esiste dunque un gradiente di concentrazione tra la superficie ed il fondo del contenitore. Su vasche di maggiori dimensioni il gradiente è ancora più marcato. Si comprende dunque l'interesse di operare i travasi regolarmente al fine di eliminare questa biomassa in grado di contaminare l'intero contenuto della vasca. Infatti il tenore in fenoli volatili è pressoché identico in ogni punto di prelievo all'interno del contenitore. Per un controllo analitico mirato, il dosaggio di questi composti è dunque indispensabile.

Per assicurare un buon controllo il campionamento deve essere fatto in modo corretto, evitando inquinamenti.

Tab 1	Livello di prelevamento	Popolazione <i>Brettanomyces</i> (UFC/mL)	Fenoli volatili (in µg/L) (E4P + E4G)
Barrique 1	Superficie	8	218
	fondo	$2 \cdot 10^2$	219
Barrique 2	Superficie	< 1	100
	fondo	$7 \cdot 10^1$	130
Barrique 3	Superficie	10	171
	fondo	$2 \cdot 10^2$	208

Durante la lavorazione del vino possono essere individuati alcuni momenti chiave per controllarne la salute microbiologica :

- prima della fermentazione alcolica a fine macerazione prefermentativa se questa viene fatta
- nel periodo di latenza tra FA e FML
- durante la FML se questa è molto lenta e stentata
- fine fermentazione malolattica

Per conoscere lo stato microbiologico del vino, la microscopia in epifluorescenza rappresenta un ottimo strumento. Essa permette in effetti di misurare molto rapidamente la carica microbica del vino: in meno di un'ora, la popolazione batterica può essere determinata e la presenza di *Brettanomyces* può essere sospettata. In caso di dubbio la conferma si può avere con la conta su piastra impiegando il terreno specifico.

Nella fase prefermentativa il controllo della carica microbica per epifluorescenza permette di verificare la consistenza della popolazione indigena.

In caso di rallentamento della FA un'analisi per epifluorescenza, accompagnata da una verifica del tenore in fenoli volatili diviene obbligatoria. Il dosaggio dei fenoli volatili in SBSE/GC/MS permette una diagnosi estremamente rapida ed affidabile. Può essere realizzata nell'ar-

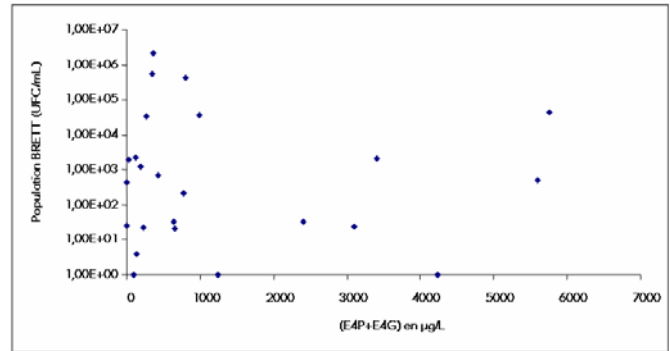


Figura 3. Relazione tra tenore in fenoli volatili di un vino e sua popolazione di *Brettanomyces* (analisi fatta su 24 vini di differenti denominazioni ed annate).

co della giornata a partire da un volume di soli 10 ml di vino. La presenza di fenoli volatili conferma l'avvenuto sviluppo di *Brettanomyces*.

Durante la fase di latenza tra FA e FML così come in caso di FML estremamente lenta è vivamente raccomandato fare un controllo analitico incrociato utilizzando i tre strumenti analitici a disposizione. Questo controllo ci deve permettere di anticipare una importante moltiplicazione del *Brettanomyces*.

In affinamento il controllo mensile o bimestrale del tenore in fenoli volatili è indispensabile se si vuole prevenire la comparsa del difetto: ogni aumento che si registra tra una misurazione e la precedente attesta l'avvenuta contaminazione.

Infine al momento della preparazione alla messa in bottiglia, la conoscenza del livello di popolazione è indispensabile per ragionare sul tipo di trattamento di preparazione del vino all'imbottigliamento. Ovviamente, dopo imbottigliamento, si dovrà verificare l'efficacia del trattamento.

Si deve tener presente che il *Brettanomyces* può nell'arco di 7 giorni avere uno sviluppo repentino che porta ad un livello di popolazione capace di alterare il vino. Per i batteri lattici questo potrebbe accadere in 15 giorni, per i batteri acetici qualche ora può essere sufficiente.

I risultati di una conta microbica vanno letti in funzione delle caratteristiche del vino. Se il numero di microrganismi non è molto elevato, ma il vino presenta condizioni favorevoli al loro sviluppo (scarsa  $SO_2$ , pH elevati, presenza di zuccheri, temperature favorevoli, ...) allora la situazione è a rischio.

## Pratiche di cantina atte ad evitare o limitare la contaminazione

Tra i mezzi di controllo della flora microbica l'uso razionale della solforosa resta il più efficace.

Per fare ciò deve essere preso in conto il valore del pH. Da esso dipende la frazione di  $SO_2$  molecolare, ossia della forma attiva nei confronti dei microrganismi. La percentuale di  $SO_2$  libera presente in forma molecolare può essere facilmente calcolata applicando la formula messa a punto da Sudraud e Chauvet (1985):

$$SO_2_{mol} = SO_2_{lib} \times 100 / (10^{pH-pK1} + 1)$$

La  $pK_1$ , è la prima costante di dissociazione ionica dell'acido solforoso, aumenta all'aumentare del grado alcolico e della temperatura, all'aumento dei quali aumenta pertanto l'attività della  $SO_2$

Per uno stesso tenore di  $SO_2$  libera, la frazione di  $SO_2$  molecolare attiva, è per esempio due volte meno importante a pH 3,9 che a pH 3,6. Per valori di pH elevati, diviene difficile, se non impossibile, mantenere la  $SO_2$  a dosi sufficienti. In questo caso conviene aumentare il livello di solfitaggio durante il periodo estivo, quando le temperature elevate favoriscono la crescita dei lieviti di alterazione.

Il tenore di  $SO_2$  molecolare necessaria dipende dall'obiettivo che ci si pone. Se si vuole inibire i microrganismi sono sufficienti 0,4 mg/l per i batteri e 0,6 mg/l per i lieviti. Per la loro distruzione le dosi aumentano e passano a 0,8 mg/l per i batteri lattici, 1,2 per i lieviti dei vini liquorosi e 0,6 per i *Brettanomyces*.

La figura 4 presenta l'evoluzione del tenore in fenoli volatili nel corso di sette mesi di affinamento. Ad ogni misura del tenore in fenoli volatili viene anche determinata la quantità di  $SO_2$  molecolare: dal momento in cui il tenore in  $SO_2$  molecolare scende sotto a 0,4 mg/l, il tenore in fenoli volatili aumenta.

I travasi e la correzione del livello di  $SO_2$  libera a dosi adeguate (25 – 35 mg/l) sono sempre raccomandati.

I travasi contribuiscono ovviamente a stabilizzare i vini. Travasi frequenti e regolari permettono di separare il vino dalle fecce, la cui carica microbologica è sempre molto elevata.

I trattamenti di collaggio proteico inducono anch'essi una drastica diminuzione della popolazione microbica, anche di un fattore quattro, proprio grazie all'effetto di coagulazione e di precipitazione che trattiene nel torbido i microrganismi.

La filtrazione abbassa notevolmente il numero di cellule, ma non le elimina mai completamente, per cui una solfitazione dopo filtrazione resta sempre utile per evitare che le poche cellule rimaste, prive di competizione, possano avere un rapido sviluppo.

Le stesse considerazioni valgono per il trattamento termico, che soprattutto partendo da bassi livelli di

carica microbica, può eliminarla completamente. Successivamente si deve però operare in modo da non avere nuovi inquinamenti, i quali, in ambiente libero da ogni competizione, possono dare ancora maggiori problemi.

## Conclusioni

Il *Brettanomyces* fa parte della microflora naturale dell'uva, i tecnici dovranno quindi imparare a gestire la costante presenza di questa popolazione microbica durante tutto il processo di vinificazione.

Le alterazioni allo stadio prefermentativo e nel corso della fermentazione sono generalmente rare. Nel caso di fermentazioni difficili, alcolica e/o malolattica, il rischio di moltiplicazione dei *Brettanomyces* aumenta. 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. Ogni tipo di rallentamento deve mettere in allerta il tecnico pronto ad applicare in modo tempestivo l'adeguata contromisura. In questo senso gli strumenti analitici attualmente disponibili permettono di operare la scelta enologica e di anticipare il verificarsi di condizioni irreversibili.

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

Figura 4: Controllo del tenore in fenoli volatili e quantità di  $SO_2$  molecolare attiva nel corso dell'affinamento (2004)

