

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO
FACOLTA' DI AGRARIA

CORSO DI LAUREA
IN VITICOLTURA ED ENOLOGIA

Relazione finale

INDAGINE SULLA PRESENZA DI 4-
ETILFENOLO COME INDICATORE
DELLA CONTAMINAZIONE DA
BRETTANOMYCES IN VINI BARBERA

Relatore: Prof. Vincenzo Gerbi

Candidata: Daniela Serra

Correlatore: Prof. Annibale Gandini

Anno Accademico 2002/2003

INTRODUZIONE	5
L'AFFINAMENTO DEI VINI ROSSI IN FUSTI.....	6
IL RUOLO DELL'AFFINAMENTO IN FUSTI.....	7
L'EVOLUZIONE DEI VINI ROSSI DURANTE L'AFFINAMENTO IN LEGNO	7
PRINCIPI FONDAMENTALI DELL'AFFINAMENTO DEI VINI ROSSI.....	9
Il ruolo dell'ossigeno.....	10
La dissoluzione dei costituenti non volatili del legno	10
La dissoluzione dei costituenti volatili del legno	11
Influenza del legno	12
I LIMITI DELL'AFFINAMENTO IN FUSTI	14
Rapporto <i>barrique</i> /vino: ricerca dell'equilibrio nella gestione dell'affinamento.....	14
Lo sviluppo di microrganismi	14
GLI ACIDI FENOLICI E I LORO DERIVATI.....	16
I FENOLI VOLATILI E LA LORO ORIGINE.....	18
I VINIL FENOLI NEI VINI BIANCHI.....	19
ORIGINE MICROBIOLOGICA DEGLI ETILFENOLI NEI VINI ROSSI	20
STUDIO DELLA MICROFLORA DEI VINI FENOLICI.....	22
IL LIEVITO <i>BRETTANOMYCES</i> E LA SUA IMPORTANZA ENOLOGICA	23
<i>BRETTANOMYCES</i> : LIEVITO DI CONTAMINAZIONE O DI ALTERAZIONE?	26
CONTAMINAZIONE DEI VINI NEL CORSO DELLA LORO ELABORAZIONE DA PARTE DI <i>BRETTANOMYCES</i>	27
CONTENUTO DI ETILFENOLI E IMPATTO ORGANOLETTICO.....	29
L'UTILIZZO DEGLI ENZIMI PECTOLITICI.....	30
LA PURIFICAZIONE DEI PREPARATI ENZIMATICI PER L'ENOLOGIA	30
Purificazione e caratterizzazione dell'attività cinnamil-esterasi	32
La formazione dei fenoli volatili	33
Chimismo della formazione dei vinil-fenoli.....	33
Chimismo della formazione degli etil-fenoli.....	36
Il controllo dell'attività di cinnamato esterasi.....	37
SCOPO DEL LAVORO.....	39
PARTE SPERIMENTALE	40
MATERIALI E METODI	40
METODO ANALITICO UTILIZZATO PER LA DETERMINAZIONE DEL 4-ETIL FENOLO	40
Principio del Metodo	40
Reattivi	40
Apparecchiatura ed accessori	41
Taratura dello strumento.....	41
Preparazione del campione.....	41
Procedimento	42
Espressione del risultato	42
CONTROLLO MICROBIOLOGICO	43
Principio del Metodo	43
RISULTATI	45
CONTENUTO DI 4-ETILFENOLO IN VINI BARBERA	45
LE CONDIZIONI DI COMPARSA DEL CARATTERE FENOLICO	49
Influenza della fermentazione malolattica.....	49
Influenza dell'ossigeno	51

Incidenza dell'affinamento in <i>barrique</i>	53
Incidenza dell'anidride solforosa sui tenori di etilfenoli nei vini	57
L'igiene dei fusti	58
CONCLUSIONI	61
RINGRAZIAMENTI	Errore. Il segnalibro non è definito.
BIBLIOGRAFIA	62

INTRODUZIONE

Gli etilfenoli, e più in generale i fenoli volatili, sono dei composti fortemente odoranti, la cui presenza nei vini comporta la comparsa di difetti sensoriali, gustativi e olfattivi.

Questi composti vengono prodotti dal metabolismo di lieviti appartenenti ai generi *Brettanomyces/ Dekkera* in presenza di acidi idrossicinnamici.

I fenoli volatili sono responsabili di alcuni odori sgradevoli tra cui: sudore di cavallo, stalla, animale, cuoio e plastica bruciata.

Il *Brettanomyces* è un lievito di contaminazione, il suo intervento comporta l'azione di due enzimi in sequenza; il primo è la cinnamato decarbossilasi che trasforma gli acidi cinnamici in vinilfenoli e il secondo è la vinilfenolo reductasi che rende possibile la formazione del 4-etilfenolo e del 4-etilguaiacolo.

La presenza di 4-etilfenolo nei vini è influenzata, oltre che dal metabolismo dei *Brettanomyces*, anche dalle differenti modalità di vinificazione e d'invecchiamento adottati.

L'AFFINAMENTO DEI VINI ROSSI IN FUSTI

L'affinamento è il periodo che intercorre fra il termine della fermentazione e l'imbottigliamento.

La sua durata è estremamente variabile in funzione della tipologia, della composizione e della qualità del vino considerato.

Durante questo periodo occorre stabilizzare il vino e prepararlo per un eventuale, più o meno lungo, periodo di invecchiamento in bottiglia; nel vino avvengono quindi grandi trasformazioni della sua composizione, l'evoluzione del colore, del sapore e del profumo.

Le operazioni di cantina e la natura del contenitore hanno un ruolo fondamentale sulle modificazioni che avvengono, in quanto sono legate ai fenomeni di ossidoriduzione di cui il vino è sede.

Durante l'affinamento si disciolgono nel vino quantità variabili di ossigeno in funzione della tecnica enologica impiegata e della temperatura a cui si opera: la saturazione avviene a concentrazioni di ossigeno è pari a 10 mg/l a 5° C e 7 mg/l a 25° C.

L'ossigeno molecolare si fissa direttamente su alcune sostanze (Fe^{3+} e Cu^{2+}) che sono autoossidanti, queste producono dei perossidi instabili in grado di ossidare altre sostanze accettrici di ossigeno, le quali non possono essere ossidate direttamente dall'ossigeno molecolare, che è un ossidante molto debole.

Queste sostanze intermedie quindi acquisiscono un maggiore potere ossidante rispetto all'ossigeno molecolare.

Le operazioni che vengono condotte sul vino sono quindi all'origine di fenomeni ossidativi più o meno intensi, a seconda della composizione del mezzo.

In vasche chiuse ermeticamente oppure in bottiglia, il vino viene privato dell'ossigeno presente nell'aria e subisce dei processi di riduzione che lo modificano.

Affinare il vino significa gestire un processo che ha come scopo quello di sviluppare pienamente le potenzialità del vino per soddisfare le esigenze dei consumatori.

Occorre seguire dei principi fondamentali e non permettere che il vino semplicemente si conservi, lasciando che si generino, ad esempio, dei difetti organolettici dovuti allo sviluppo di microrganismi di alterazione.

IL RUOLO DELL'AFFINAMENTO IN FUSTI

Tradizionalmente l'affinamento dei grandi vini rossi, dalla fine della fermentazione alcolica fino all'imbottigliamento, avviene in fusti di rovere.

L'impiego di questo tipo di recipienti fu mosso dapprima dall'esigenza di trasportare a braccia d'uomo tali contenitori, che venivano usati nelle spedizioni del vino; solo in un secondo momento si osservarono i benefici che aveva questa pratica nei confronti dell'evoluzione del vino e delle sue caratteristiche organolettiche.

Negli anni 50-60 del secolo scorso si abbandonò questa pratica per quella dell'affinamento in vasche inerti, questa decisione fu imposta dagli evidenti limiti economici legati all'utilizzo dei fusti, così come anche dai rischi di contaminazione microbica e di trasmissione al vino di difetti; in quegli anni infatti, l'eliminazione del legno, ha sicuramente apportato un miglioramento dei vini che non presentavano più il gusto di muffa, ma risultavano essere più puliti e fruttati.

Negli ultimi anni, considerata anche la situazione economica più favorevole, abbiamo assistito ad una nuova diffusione di questa pratica mossa dalla consapevolezza del ruolo svolto dal legno sull'evoluzione del prodotto e dall'esigenza di adattare l'affinamento nei fusti alla qualità di ciascun vino.

L'EVOLUZIONE DEI VINI ROSSI DURANTE L'AFFINAMENTO IN LEGNO

Nel vino, durante l'affinamento in legno, avvengono:

- reazioni di stabilizzazione del colore, della limpidezza e delle sostanze colloidali;
- modificazioni delle strutture fenoliche: ammorbidimento dei tannini;
- sviluppo di aromi.

Questo perché rispetto alla vasca chiusa ermeticamente, il legno non è un contenitore inerte nei confronti del vino.

Il vino conservato in legno piuttosto che in vasca ha una limpidezza maggiore, in recipienti di volume minore, soprattutto grazie all'intervento di fenomeni di adsorbimento ad opera del legno.

Il fusto, per le sue ridotte capacità, è più sensibile alla temperatura ambiente e per questo, nel caso in cui il locale dove sono tenuti sia messo nelle condizioni di sentire il freddo invernale, risulteranno più abbondanti le precipitazioni dei sali e delle sostanze colloidali.

La composizione fenolica del vino viene modificata in quanto intervengono delle reazioni di ossidazione controllata: il colore diventa più intenso grazie alla reazione tra tannini ed antociani in presenza di etanale, la quantità di antociani liberi diminuisce progressivamente e la struttura dei tannini si evolve (Fig.1). I tannini del legno si comportano da trasportatori di ossigeno che portano alla formazione di acetaldeide. Sarà l'acetaldeide a generare una serie di reazioni fra i tannini e gli antociani che danno origine ad un gruppo cromoforo, di colore più scuro e di maggiore intensità cromatica, quindi più resistente nel tempo.

Dopo un giusto periodo di affinamento in fusti, i vini hanno un'intensità cromatica con una materia colorante più stabile nel tempo, un sapore più gradevole dovuto ad un ammorbidimento/polimerizzazione dei tannini.

Il vino acquista anche una maggiore complessità aromatica dovuta alle sostanze volatili che vengono estratte dal legno.

Il controllo dell'intensità dell'aroma *boisé* è essenziale per l'ottenimento di un prodotto equilibrato. Infatti, anche se uno degli obiettivi che si perseguono con l'impiego dei fusti di legno nell'affinamento dei vini, è quello di ottenere un carattere *boisé*, questo non deve essere esagerato e non deve mai dominare le caratteristiche proprie del vino.

Per ottenere questo equilibrio occorre:

- effettuare una accurata scelta del legno e del suo grado di tostatura (se trattasi di *barrique*)
- intervenire opportunamente sulla durata dell'affinamento
- equilibrare la percentuale di vino proveniente da *barrique* nuove negli assemblaggi.

Il ruolo dell'ossigeno

L'apporto di ossigeno ai vini rossi proviene, per il 50% della sua entità globale, dai trasferimenti del vino stesso e dai trattamenti che il vino subisce.

La restante parte dell'ossigeno, si discioglie nel vino grazie al fusto nel quale è contenuto e dipende dall'origine del legno, dalla sua composizione, dal tipo di chiusura e dalla posizione del fusto medesimo.

L'ossigeno penetra attraverso il legno (16%), attraverso gli interstizi fra una doga e l'altra (63%) e attraverso il foro di cocchiere (21%) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Inoltre il tappo in legno in posizione *bonde de côté* e il tappo di silicone battuto provocano una depressione che aumenta la quantità di ossigeno disciolto nel vino.

L'ossigeno disciolto viene continuamente consumato dal vino in quanto ossida i suoi componenti.

Gli ellagitannini del legno si disciolgono nel vino in quantità che possono arrivare fino a 200 mg/l, la loro concentrazione diminuisce regolarmente a causa dei fenomeni ossidativi che queste sostanze catalizzano.

I tannini ellagici riescono comunque, anche in assenza di ossigeno, a modificare la struttura dei tannini del vino, favoriscono infatti le reazioni di combinazione degli antociani e di conseguenza partecipano alla stabilizzazione del colore.

La dissoluzione dei costituenti non volatili del legno

Il legno è responsabile della liberazione di diversi componenti oltre agli ellagitannini, come per esempio le lignine e le cumarine.

Un altro gruppo di molecole che provengono dal legno, originate dalla trasformazione degli ellagitannini e dalla lignina, contribuiscono ad aumentare il contenuto di acidi fenolici del vino, in particolare dell'acido gallico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

I vini conservati in legno presentano ovviamente caratteristiche sensoriali diverse rispetto a quelli affinati solo in vasca.

Il legno svolge contemporaneamente due effetti:

- Accentua la durezza attraverso la dissoluzione dei composti fenolici

- Ammorbidisce i tannini condensati tramite la formazione di polimeri eterogenei.

Il risultato finale ovviamente dipende dall'intensità dei due fenomeni.

I rischi di ottenere un vino meno morbido sono reali, dipendono infatti dalla struttura tannica del vino e dalle caratteristiche del legno usato per l'affinamento (origine, composizione, preparazione).

Per i vini rossi si può affermare che l'affinamento in legno non comporti un arricchimento in tannini.

La dissoluzione dei costituenti volatili del legno

Quando i composti aromatici del legno si dissolvono nel vino, contribuiscono alla ricchezza e alla complessità del suo *bouquet*.

Il vino deve possedere una ricchezza aromatica ed una struttura tale da consentirgli un'adeguata ed equilibrata fusione con le caratteristiche che invece provengono dal legno.

Il legno non può apportare una qualità che non sia già presente nel vino.

Il legno di rovere grezzo contiene elevate quantità di sostanze volatili che presentano un odore particolare, si tratta di:

- Lattoni: il più importante è il β -metil gamma octalattone, che possiede un profumo di noce di cocco, la forma CIS è molto più profumata e possiede anche un aroma intensamente speziato (Chatonnet, 1995). Nel legno americano predomina la forma CIS e quindi il legno è molto più aromatico, nel legno europeo invece le due forme, CIS e TRANS, sono in maggiore equilibrio. Il contenuto del legno in lattoni dipende dalla sua origine geografica, dalle condizioni di stagionatura e dal tipo di tostatura. I lattoni quando sono presenti in quantità eccessiva apportano delle note sgradevoli intesamente legnose, quasi resinose.
- Fenoli volatili: derivano dalla demolizione pirolitica della lignina; il più importante è l'eugenolo che possiede un odore caratteristico di chiodi di garofano.
- Aldeidi fenoliche: la vanillina interviene attivamente nella percezione dell'aroma di legno e vaniglia trasmessi dal legno di rovere al vino.

- Aldeidi furaniche: derivano dalla degradazione termica della cellulosa e della emicellulosa e sono: furfurale e 5-metilfurfurale (odore di mandorla tostata), 5-idrossimetilfurfurale (inodore).

E' già stato detto dell'importanza dell'origine e della lavorazione che viene fatta alla *barrigue*: il riscaldamento che si realizza produce appunto i derivati furanici, i fenoli volatili e i fenilchetoni ed aumenta il contenuto in aldeidi fenoliche e in lattoni.

Influenza del legno

Le scelte in merito alla tipologia di *barrigue* da usare, devono tenere conto della composizione del fusto, del vino e delle sue caratteristiche.

1. Essiccamento: quello naturale è di più elevata qualità rispetto a quello artificiale.
2. La tostatura: il riscaldamento permette di eliminare le note difettose di legno verde e di apportare aromi vanigliati e speziati gradevoli. Se la tostatura è troppo forte, aumentano le note di tostato e di bruciato.
3. Un legno poco denso (Limousin) accentua il carattere astringente, anche se questa caratteristica può venire attenuata da una forte tostatura; solitamente si impiegano queste *barrigue* per vini che possiedono una buona struttura tannica che mancano di rotondità e di corpo.
Un legno denso (Allier) invece libera meno composti fenolici; dal punto di vista aromatico, tostature medie e forti (Fig. 2) conferiscono caratteristiche che mascherano le note vegetali e provocano una riduzione dell'amaro.
4. Se il vino è fine ed equilibrato, nello stesso tempo ha un buon corpo e un intenso aroma fruttato, il legno svolge un effetto limitato e i composti fenolici ceduti da questo vengono sopportati dal vino. Occorre evitare che il vino assuma caratteri amari e odori intensi di affumicato e tostato, che conferiscono allo stesso un carattere di grossolanità. E' ragionevole quindi impiegare un legno a grana fine ed una tostatura da media a debole.
5. Se il vino presenta una debole struttura tannica o un aroma vegetale, il legno può contribuire a migliorare la struttura senza accentuarne

l'aggressività. In questi casi è bene preferire un legno denso con tostatura forte, in funzione delle caratteristiche del vino da affinare.



Fig. 2. Immagine del processo di tostatura della *barrique*.

Non è mai consigliabile effettuare l'affinamento del vino con il 100 % di *barrique* nuove, è quindi più ragionevole affinare lo stesso vino in recipienti di diverso stato ed assemblarli solo prima dell'imbottigliamento.

Una buona soluzione sembra essere quella di impiegare, in percentuali variabili, tre tipi di *barrique*:

- *Barrique* nuove che trasmettono maggiormente la note *boisé*.
- *Barrique* al secondo passaggio, che dovrebbero conferire al vino la nota *boisé* ma con maggiore discrezione.
- *Barrique* al terzo passaggio, che danno una nota più mascherata di *boisé*.

L'affinamento in fusti non crea un vino di qualità, semmai esalta quelle naturalmente presenti nel vino stesso.

I LIMITI DELL'AFFINAMENTO IN FUSTI

Rapporto *barrique*/vino: ricerca dell'equilibrio nella gestione dell'affinamento.

Il rischio di un cattivo adattamento legno-vino consiste nella comparsa di un carattere *boisé* dominante, che sovrasta la struttura del vino e determina una sensazione di asciutto in bocca.

Oltre alle caratteristiche proprie della *barrique* (origine, essiccamento, tostatura), anche l'età di questa e le modalità di abbonimento possono influenzare l'affinamento.

I fenomeni ossidativi e la dissoluzione dei composti sono inversamente proporzionali all'età del fusto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Un abbonimento prolungato con acqua calda determina un aumento dei fenomeni ossidativi e una minore estrazione dei composti fenolici del legno; inoltre il vino presenterà una maggiore intensità colorante e la presenza di tannini meno aggressivi.

L'adattamento del vino al legno comunque non segue delle regole precise, è superfluo affermare che solo in seguito a delle prove sia possibile determinare, per ciascun vino, i tipi di *barrique* più adatti e la proporzione di impiego fra ciascuno di quelli scelti.

Lo sviluppo di microrganismi

Durante l'affinamento in legno è sempre osservabile un aumento di acidità volatile, da 0.15 a 0.30 g/l di acido acetico, ma che può anche essere di maggiore entità.

Questo fenomeno è legato all'azione dei:

- batteri lattici quando concludono la degradazione dell'acido malico residuo e metabolizzano l'acido citrico.

- batteri acetici i quali avendo metabolismo aerobio, si sviluppano intorno al foro di cocchiere o durante l'esecuzione di un travaso all'aria, aumentando quindi l'acidità volatile.
- lieviti a metabolismo ossidativo ed acidificanti: come *Candida valida* e *Pichia vini* (Chatonnet *et al.*, 1993).

La *barrique* è un contenitore potenzialmente favorevole a queste alterazioni: il vino infatti si trova a contatto continuo con l'ossigeno ed è suscettibile alle variazioni di temperatura.

Per quanto riguarda la temperatura, è proprio nel periodo fra la primavera e l'inizio dell'autunno che in cantina si hanno maggiori rischi di alterazioni microbiche in quanto la temperatura e il grado di evaporazione in cantina aumentano.

Occorre pertanto tenere sotto stretto controllo la temperatura dell'ambiente, che va mantenuta sotto i 20° C, e mantenere un tenore di SO₂ libera superiore ai 15 mg/l.

La temperatura relativamente bassa, l'impiego della SO₂ e la limitazione degli arieggiamenti, limitano lo sviluppo dei microrganismi.

Oltre ai microrganismi citati prima, anche i lieviti *Brettanomyces* / *Dekkera*, presenti nelle cantine e comunemente considerati lieviti di contaminazione, possono svilupparsi quando le condizioni sono favorevoli, in recipienti nuovi o usati, in presenza o in assenza di aria; il loro metabolismo dà origine agli etilfenoli, il cui odore è particolarmente sgradevole. Il loro sviluppo può continuare in bottiglia.

Importante è anche impiegare il diossido di zolfo sotto forma gassosa, prodotto dalla combustione dei dischi, che permette di solfitare il vino e di disinfettare la parte interna della *barrique* dove si trovano i microrganismi.

L'affinamento del vino in fusti è una pratica molto delicata, basata sull'igiene del contenitore, del locale e del vino.

I rischi dovuti all'affinamento in legno si conoscono, occorre controllarli con tecniche appropriate.

GLI ACIDI FENOLICI E I LORO DERIVATI

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 non 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 a 10-20 mg/l nei vini bianchi.

Gli acidi cinnamici derivano dall'acido cinnamico (Fig. 3), presentano una struttura chimica C6-C3 e sono: acido p-cumarico, caffeico, ferulico (Tab. 1).

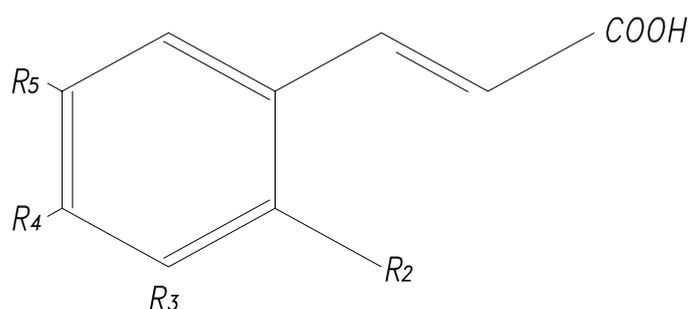


Fig. 3. Struttura chimica dell'acido cinnamico e dei suoi derivati.

Tab.1. I radicali dell'acido cinnamico.

ACIDI CINNAMICI	R₂	R₃	R₄	R₅
Acido p-cumarico	H	H	OH	H
Acido caffeico	H	OH	OH	H
Acido ferulico	H	OCH ₃	OH	H

Nell'acino sono contenuti nel succo vacuolare delle cellule della polpa e della buccia, si trovano sotto forma esterificata essenzialmente con l'acido tartarico (Ribéreau Gayon, 1965) o come eterosidi del glucosio.

Nei mosti gli acidi cinnamici esterificati con l'acido tartarico sono attaccati dagli enzimi ossidasici che provocano l'imbrunimento dei mosti.

Questi composti intervengono anche nella formazione degli antociani acilati attraverso l'esterificazione del glucosio eterosidico degli antociani monomeri da parte dell'acido caffeico e dell'acido p-cumarico.

Gli acidi fenolici danno soluzioni idroalcoliche incolori che tendono però ad ossidarsi e quindi ad ingiallire (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998).

Sotto il profilo sensoriale gli acidi cinnamici, in soluzione, non presentano sapori oppure odori particolari, ma per azione dei lieviti appartenenti al gen. *Brettanomyces* possono dare origine ai fenoli volatili.

I FENOLI VOLATILI E LA LORO ORIGINE

I fenoli volatili più largamente rappresentati nei vini sono il 4-vinilfenolo e 4-vinilguaiacolo, il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo.

I vinilfenoli sono generalmente presenti in deboli quantità nei vini rossi mentre nei vini bianchi la loro concentrazione media risulta essere pari a circa 500 µg/l.

Gli etilfenoli invece sono mediamente assenti nei vini bianchi mentre nei vini rossi sono presenti in concentrazioni variabili. (Tab. 2)

Tab.2. Tenori dei vini in etil- e in vinilfenoli in µg/l (da Chatonnet *et al.*, 1992)

Fenoli Volatili	Vini bianchi	Vini rossi
4-vinilfenolo		
<i>Mini</i>	73	0
<i>Maxi</i>	1150	111
<i>Media</i>	301	35
4-vinilguaiacolo		
<i>Mini</i>	15	0
<i>Maxi</i>	496	57
<i>Media</i>	212	12
4-etilfenolo		
<i>Mini</i>	0	1
<i>Maxi</i>	28	6047
<i>Media</i>	3	440
4-etilguaiacolo		
<i>Mini</i>	0	0
<i>Maxi</i>	7	1561
<i>Media</i>	0.8	82

I VINIL FENOLI NEI VINI BIANCHI

I vinil fenoli provengono dalla decarbossilazione enzimatica da parte dei lieviti del gen. *Saccharomyces* a carico dell'acido p-cumarico e dell'acido ferulico, con formazione rispettivamente di 4-vinil fenolo e 4-vinil guaiacolo. L'acido caffeico e l'acido sinapico non sono interessati dalla decarbossilasi del *S. cerevisiae*. La cinnamato decarbossilasi di *S. cerevisiae* decarbossila solo gli isomeri trans della serie cinnamica.

Questo enzima, la CD, è endocellulare ed esercita la propria attività solamente durante la fermentazione alcolica.

Le minime quantità di vinil-fenoli presenti nei vini rossi si spiegano con l'inibizione totale dell'enzima CD da parte delle procianidine oligomere (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Il tenore dei vinil-fenoli in un vino bianco dipende:

- dal contenuto del mosto in acidi fenolici precursori;
- dall'attività CD;
- dal ceppo di lievito (ceppi Pof, *phenolic off flavor*).

I tenori in acidi idrossicinnamici dipendono a loro volta dal vitigno e dalle condizioni di maturazione: più le uve sono mature maggiore è la quantità di precursori.

Inoltre anche le condizioni di estrazione del mosto influiscono sui tenori degli acidi fenolici: sfecciature insufficienti, macerazione pellicolare e macerazione prefermentativa a freddo, sono tutte operazioni che favoriscono l'estrazione degli acidi fenolici dalle parti solide e quindi la formazione dei vinil-fenoli durante la fermentazione alcolica.

Per contro l'assenza di solfitazione e più ancora l'iperossigenazione, comportano una netta diminuzione dell'acido paracumarico nei vini.

In seguito verrà anche trattato delle attività degli enzimi pectolitici e del loro ruolo nella liberazione di maggiori quantità di acidi cinnamici e della conseguente suscettibilità di questi ad essere trasformati nei vinil-fenoli corrispondenti.

Nel corso dell'affinamento si constata una diminuzione del tenore in vinil-fenoli e del loro impatto olfattivo, dovuto alla loro polimerizzazione e alla loro

trasformazione in etossietilfenoli, composti poco odorosi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

ORIGINE MICROBIOLOGICA DEGLI ETILFENOLI NEI VINI ROSSI

Numerosi microrganismi isolati da bevande fermentate hanno la capacità di decarbossilare l'acido trans-p-cumarico presente nel substrato in 4-vinilfenolo, in diverse quantità (Tab. 3 e 4). Solo alcuni di questi producono tracce di 4-etilfenolo.

Tab. 3 . Sintesi dei fenoli volatili dall'acido p-cumarico da parte di differenti batteri. (Chatonnet *et al.*, 1992)

<i>Microrganismi</i>	<i>Trasformazione dell'acido p-cumarico</i> ^a	
	<i>4-Vinilfenolo</i>	<i>4-Etilfenolo</i>
<i>Leuconostoc enos</i> ICB 8403	+	-
<i>Leuconostoc enos</i> ICB 8417	+++	-
<i>Leuconostoc enos</i> ICB 8413	+	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ICB 8510	+++	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ICB 720	++++	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ICB 8290	+	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ICB R771	+	+/-
<i>Lactobacillus brevis</i> ICB 8407	-	+/-
<i>Lactobacillus brevis</i> ICB 8404	+++	-
<i>Lactobacillus brevis</i> ICB 8511	+	-
<i>Pediococcus sp</i> ICB Ja2	+	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ICB 33316	+++	+/-
<i>Pediococcus damnosus</i> ATCC	+	+
<i>Acetobacter aceti</i> ICB 15973	+	-
<i>Acetobacter sp</i> LMG 1662	++	-
<i>Acetobacter quasi aceti</i> LMG 1657	++	-
<i>Acetobacter sp</i> NCIB 8619	+++	-
quasi <i>Acetobacter aceti</i> NCIB 8956	++	-
quasi <i>Acetobacter aceti</i> NCIB 8967	++	-

^a - = Negativo; +/- = molto basso (\leq dell'1% del substrato); + = 1-20%; ++ = 20-40%; +++ = 40-60%; ++++ = > 60%.

Solo certi lieviti sono in grado di produrre elevate quantità di 4-etilfenolo a parità di concentrazione di acidi idrossicinnamici del substrato.

Tab. 4 . Sintesi dei fenoli volatili dall'acido p-cumarico da parte di differenti lieviti. (Chatonnet *et al.*, 1992)

<i>Microrganismi</i>	<i>Trasformazione dell'acido p-cumarico</i>	
	<i>4-Vinilfenolo</i>	<i>4-Etilfenolo</i>
<i>Candida vini</i> MCUL 27720	-	-
<i>Candida freychussi</i> MUCL 27714	++++	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i> MUCL 27770	+	-
<i>Metchnikovia pulcherina</i> MUCL 277876	-	-
<i>Pichia menbranifaciens</i> MUCL 27734	-	-
<i>Hansenula anomala</i> MUCL 27753	++++	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (italicus)</i> ICB	+++	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (chevalieri)</i> ICB	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (uvarum)</i> ICB	++	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (carlsbergensis)</i> ICB	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (capensis)</i> ICB	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (cerevisiae)</i> ICB	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (cerevisiae)</i> UTAD23	++++	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (cerevisiae)</i> EG8C	+++	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (cerevisiae)</i> ICB VL1	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae (bayanus)</i> ICB	++	-
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> MUCL 28822	+	-
<i>Torulasporea delbruekii</i> MUCL 27816	-	-
<i>Pichia carsenis</i> ICB	+	-
<i>Pichia canadensis</i> MUCL 277222	+	-
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> MUCL 11443	+	-
<i>Zigosaccharomyces bailii</i> ICB	+	-
<i>Brettanomyces intermedius</i> CBS	+	+++
<i>Dekkera intermedia</i> MUCL 11989	+	+++
<i>Brettanomyces lambicus</i> ICB SA	+	+++

^a - = Negativo; +/- = molto basso (\leq dell'1% del substrato); + = 1-20%; ++ = 20-40%; +++ = 40-60%; ++++ = > 60%.

Gli etilfenoli vengono prodotti a seguito della decarbossilazione e della riduzione degli acidi idrossicinnamici provenienti dalle uve e dal legno del contenitore dove il vino viene affinato (Chatonnet *et al.*, 1995).

Gli enzimi che determinano queste reazioni sono:

- la cinnamato decarbossilasi
- la vinil-fenolo reduttasi

Di questi enzimi sono dotati:

- *Brettanomyces / Dekkera*
- *Saccharomyces*
- *Batteri lattici*

Per fortuna l'attività dell'enzima vinil - fenolo reduttasi dei lieviti *Saccharomyces* è bloccata dalla componente fenolica delle uve (Chatonnet *et al.*, 1995).

Quindi solo *Brettanomyces* è in grado di formare quantità importanti di etilfenoli nei vini rossi, i batteri lattici sono incapaci di formarne livelli in grado di far comparire un odore percepibile (Chatonnet, 2002).

STUDIO DELLA MICROFLORA DEI VINI FENOLICI

Diversi vini di una stessa annata che presentavano quantità importanti di etilfenoli, sono stati inoculati in diverse circostanze su terreni selettivi per lo sviluppo delle diverse tipologie di microrganismi.

Sono stati quindi isolati da questi vini “fenolici” dei batteri acetici, dei lieviti e in rari casi anche batteri lattici.

Nessuna delle colture isolate di batteri acetici (*Acetobacter sp.*) e lattici (*Leuconostoc oenos*) è stata in grado di formare 4-etilfenolo.

Il solo lievito che è risultato essere in grado di sintetizzare rilevanti quantità di 4-etilfenolo a partire dall'acido p-cumarico è stato *Brettanomyces* forma anamorfica di *Dekkera* (Chatonnet *et al.*, 1992).

IL LIEVITO *BRETTANOMYCES* E LA SUA IMPORTANZA ENOLOGICA

Il lievito *Brettanomyces* era stato individuato nei mosti di birra già nel 1904 da Claussen che ne segnalò la presenza, nel 1912 vengono isolati gli stessi lieviti nel sidro da parte di Osterwalder (Larue *et al.*, 1991).

I lieviti dei generi *Brettanomyces* e *Dekkera* normalmente sfuggono alle indagini microbiologiche convenzionali, tuttavia dagli studi eseguiti da diversi autori in Italia (Verona e Florenzano, 1947 e 1950) e dopo da altri in Francia (Peynaud e Domerq, 1956; Barret, 1955) e in Sud Africa (Van der Walt e van Kerken, 1959-1961) possiamo affermare che la loro presenza non sia affatto cosa rara nei mosti e nei vini (Zambonelli, 1998); nel 1956 gli studi eseguiti da Peynaud e Domerq, attribuirono al metabolismo di questi lieviti la produzione di elevate concentrazioni di acido acetico.

Bisogna attendere tempi più recenti per avere la conferma che esista un rapporto diretto fra la presenza di *Brettanomyces* e la comparsa di odori sgradevoli.

Questo genere di lieviti non ha un impiego a livello industriale, gli studi che si stanno conducendo sono finalizzati ad evitare la loro presenza nei vini in quanto purtroppo costituiscono per tutte le bevande fermentate (vino, birra o sidro) un problema da evitare.

Il termine *Brettanomyces* deriva dall'industria britannica della birra (British Brewing Industry).

La forma sporificante e quindi telomorfica dei lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces*, è *Dekkera* (Fig.4). Sebbene possibile la sporificazione è di difficile induzione, è infatti normalmente inferiore all' 1 %.

<i>DEKKERA</i>	<i>BRETTANOMYCES</i>
ASCO SPORIGENO	A- SPORIGENO
ASCO CON 1-4 SPORE	non esiste l'asco
Formazione di PSEUDOMICELIO	Formazione di PSEUDOMICELIO
Gemmazione APICALE	Gemmazione APICALE
Attività FERMENTATIVA	Attività FERMENTATIVA

Fig. 4. Caratteristiche morfologiche e fisiologiche dei generi *Dekkera* e *Brettanomyces*.

E' a causa di questa difficoltà che si incontra 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, a losanga (Fig. 5), possono presentare gemmazione multipolare e possono formare pseudomiceli (Zambonelli, 1998).

Le dimensioni delle cellule sono inferiori a quelle dei *Saccharomyces cerevisiae*, circa 2 - 4 µm di diametro per 7 - 18 µm di lunghezza.

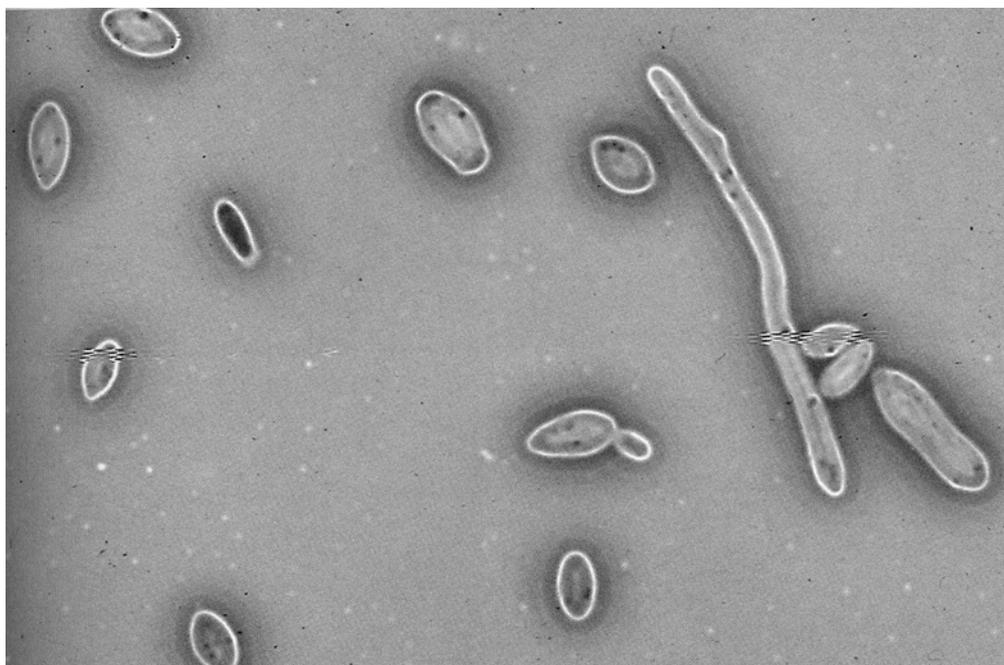


Fig. 5. Immagine al microscopio ottico della cellula di *Brettanomyces* spp. (da Delfini, 1982).

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 riscontrata 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.

Le esigenze nutrizionali di *Brettanomyces* sono:

- Carbonio: glucosio, etanolo, acidi cinnamici e composti carbonilici del legno dei recipienti;
- Ossigeno: non è particolarmente esigente, sono sufficienti quantità piccolissime;
- Azoto assimilabile: scarse esigenze;
- Temperature: l'intervallo delle temperature di sviluppo di questi lieviti è di 13-30° C.
- Resistenze: buona all'alcol, alla solforosa e all'acidità.

L'attività fermentativa di *Brettanomyces* è stimolata dalla presenza dell'ossigeno, in condizioni aerobiche è inoltre osservabile una forte produzione di acido acetico.

Alcuni studiosi hanno proposto una caratteristica tipica del *Brettanomyces* come criterio tassonomico del genere e cioè l'effetto *Custer*.

Quando si verifica il passaggio dall'aerobiosi all'anaerobiosi si verifica un arresto brutale dell'attività fermentativa e della crescita di *Brettanomyces*.

Le relazioni di questo lievito con l'ossigeno sono complesse: l'ossigeno stimola la crescita e la fermentazione alcolica di *Brettanomyces* 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).

Tutti i composti in grado di essere ridotti da *Brettanomyces* favoriscono la fermentazione in anaerobiosi stretta.

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.

BRETTANOMYCES: LIEVITO DI CONTAMINAZIONE O DI ALTERAZIONE?

Brettanomyces / *Dekkera* può essere considerato un lievito di contaminazione in quanto solitamente non è presente nel vino.

Può anche però essere definito come lievito di alterazione perché dal suo metabolismo oltre agli etilfenoli, vengono prodotti anche notevoli quantità di acido acetico, in associazione ad una ridotta sintesi di glicerolo, acido succinico, acido piruvico ed acetaldeide (Larue *et al.*, 1991).

Fra i prodotti del metabolismo di *Brettanomyces* possiamo anche annoverare l'acido isovalerianico che sviluppa un odore di rancido, di calzino (Ninino e al., 2003).

Il *Brettanomyces bruxellensis* è la specie più presente nel vino.

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; il *Brettanomyces* viene quindi classificato come un inquinante classico dei vini (Chatonnet, 1999).

In cantina si trovano principalmente nei rubinetti mal puliti, nei canaletti di scolo, nelle *barrique* e nelle fecce.

Purtroppo non esiste un sito oggetto di contaminazione e uno indenne, tutti i luoghi della cantina possono essere interessati da questo genere di lieviti.

In cantina i *Brettanomyces* colonizzano i punti in cui la pulizia risulta essere più difficile, come per esempio le pompe, i tubi, le valvole e soprattutto le superfici interne dei contenitori, di legno ma anche di cemento.

E' necessario quindi prestare particolare attenzione alla pulizia: quando infatti questa viene a mancare, si depositano delle particelle di materiale organico, fonte di nutrimento per tutti i microrganismi ed in particolare per i *Brettanomyces*, che peraltro non sono molto esigenti dal punto di vista nutrizionale.

Una via di ingresso di questi lieviti può essere considerata quella di partite di vino o di contenitori in legno di incerto stato sanitario e che possono di conseguenza comportarsi da focolai d'infezione (Larue *et al.*, 1991).

La contaminazione più frequente avviene infatti sul prodotto finito, quando sono terminate la fermentazione alcolica e quella malolattica; è questo il momento infatti in cui il *Brettanomyces* ed il suo sviluppo non sono ostacolati da fenomeni di competizione e di antagonismo.

In assenza quindi di altri microrganismi, i *Brettanomyces* iniziano a svilupparsi utilizzando le tracce di zuccheri che sono presenti in tutti i vini come glucosio e fruttosio.

La fermentazione di una quantità pari a 300 mg/l di zuccheri residui è sufficiente per formare una quantità di etilfenoli uguale al valore della loro soglia di percezione quindi equivalente a 425 µg/l (Chatonnet, 2002).

Il problema serio è che alla fine della fermentazione malolattica i vini considerati secchi contengono ancora 400 mg/l di zuccheri che possono essere fermentati da

Brettanomyces originando in teoria 600 µg/l di 4-etilfenolo. Questo significa che tutti i vini potrebbero essere soggetti alla contaminazione di *Brettanomyces* e quindi presentare spiacevoli difetti organolettici.

E' ovvio che la tipologia di vino è molto importante nel giudicare la suscettibilità dello stesso ad una contaminazione da *Brettanomyces* o microbica in genere.

I vini di maggiore complessità, originati quindi da uve più mature possono comportarsi da terreni più ricchi in substrati assimilabili e potenzialmente più favorevoli allo sviluppo di *Brettanomyces*; solitamente infatti, i vini di questa particolare tipologia hanno un maggiore titolo alcolometrico, più estratto, acidità totale bassa e soprattutto valori di pH molto alti, ottenuti solitamente con macerazioni piuttosto lunghe, eseguite proprio con l'intento di migliorare l'estrazione.

Quella della produzione di etilfenoli può essere una deviazione aromatica anche frequente fino raggiungere numerosi mg/l. Il vino presenta allora un forte odore di stalla, di cuoio.

Anche quando i tenori in etil-fenoli non sono elevati, da 600 a 700 µ/l, hanno la proprietà di deprezzare l'aroma; pur non presentando odore sgradevole nascondono il fruttato e in generale il *bouquet* del vino.

La comparsa degli etilfenoli nel corso dell'affinamento in *barrique* è molto più frequente, in particolare se le *barrique* sono usate, tuttavia non sono rari i casi di vini fenolici con *barrique* nuove o addirittura in vasca.

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* usate mal conservate, in cantine di affinamento poco adatte perché soggette ad elevati sbalzi di temperatura, oppure soggette a travasi o rabbocchi insufficienti, sono tutte circostanze che favoriscono la contaminazione e lo sviluppo dei microrganismi in generale e in particolare dei *Brettanomyces* (Chatonnet, 2002).

Il fenomeno è quindi favorito dall'innalzamento delle temperature nelle cantine durante i mesi estivi e dall'abbassamento del livello di anidride solforosa nei vini durante queste delicato periodo.

La comparsa del carattere fenolico insorge quindi nella maggior parte dei casi nel corso della maturazione dei vini, ma non è da escludere la comparsa di questo fenomeno anche durante l'affinamento in bottiglia.

Secondo Chatonnet (1993) è possibile che grazie alle loro dimensioni minute i lieviti *Brettanomyces* siano trattenuti in misura inferiore dai filtri classicamente usati prima dell'imbottigliamento, non sterilizzanti.

Talvolta la contaminazione può verificarsi in occasione dell'assemblaggio, da parte di qualche *barrique* inquinata.

CONTENUTO DI ETILFENOLI E IMPATTO ORGANOLETTICO

Alcuni vini rossi presentano dei sentori riconducibili all'animale, alla stalla e più in generale, al fenolico.

E' stato dimostrato che le sostanze volatili responsabili di questi difetti organolettici sono il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo; i due composti sono presenti solitamente in rapporto 10:1, è il 4-etilfenolo che possiede un intenso odore di stalla (Chatonnet *et al.*, 1992).

La soglia di percezione di una sostanza è la concentrazione alla quale è percepibile uno stimolo sensoriale necessario a suscitare una sensazione.

Per gli etilfenoli le soglie di percezione sono definite (Chatonnet, *et al.*, 2003) in:

- 425 µg/l per il 4-etilfenolo + il 4-etilguaiacolo
- 600 µg/l per il 4-etilfenolo
- 140 µg/l per il 4-etilguaiacolo.

Non appena il livello degli etilfenoli presenti in un vino rosso supera la soglia di percezione (della somma dei due derivati metossilati), il vino presenta uno sgradevole carattere fenolico.

Difetti aromatici evidenti dovuti a concentrazioni elevate di etilfenoli svalutano fortemente il vino.

Quando invece gli etilfenoli, presenti in concentrazioni minori alla soglia di percezione, reagiscono con altri composti presenti nel vino, arrivano a privare il vino stesso dell'espressione del suo carattere fruttato: questo fenomeno è riconosciuto con il nome di effetto soppressore.

L'UTILIZZO DEGLI ENZIMI PECTOLITICI

Spesso in enologia viene fatto ricorso all'utilizzo di preparazioni enzimatiche industriali allo scopo di migliorare l'estrazione del colore nella vinificazione in rosso oppure, nella vinificazione in bianco, la qualità dei mosti (sfecciatura, fermentazione e intensità aromatica).

Sappiamo che l'estrazione dei composti fenolici nella vinificazione in rosso dipende da numerosi fattori quali la varietà e lo stato di maturazione dell'uva, durata della macerazione, numero di rimontaggi e temperatura.

In questo contesto l'aggiunta di enzimi pectolitici, all'inizio della macerazione, può facilitare questa estrazione: il vino che ne risulta sarà più ricco di tannini e di antociani (Tab.5) con una maggiore intensità colorante ed una tinta più rossa (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998).

Tab. 5. Influenza degli enzimi pectolitici sull'estrazione del colore nella vinificazione in rosso(da Ribéreau-Gayon, 1998).

Vino alla svinatura (20 gg di macerazione)	Vasca testimone	Vasca trattata con enzimi
Assorbanza a 280 nm	64	66
Tannini (g/l)	3.5	3.8
Antociani (mg/l)	768	895
Intensità colorante	1.58	1.68
% assorbanza a 420 nm	27.8	26.2
% assorbanza a 520 nm	63.0	65.3
% assorbanza a 620 nm	9.20	8.50

LA PURIFICAZIONE DEI PREPARATI ENZIMATICI PER L'ENOLOGIA

L'impiego di enzimi esogeni, è in grado di agevolare la riuscita degli interventi tecnologici e migliorare le caratteristiche compositive del vino.

Le diverse azioni sono ottenute grazie all'attitudine ad agire specificamente su substrati differenti.

Proprio per questo motivo, esistono anche dei fattori di rischio: collegati alle attività enzimatiche principali, si attivano dei fenomeni biochimici che in modo diretto o indiretto, portano alla formazione di composti che possono modificare le caratteristiche dei vini.

Ad esempio, l'azione delle pectil-metil-esterasi può portare alla formazione di metanolo; la β -glucosidasi attuando l'idrolisi del legame fra antociano e zucchero genera un composto instabile che si degrada con conseguente perdita del colore (Marenghi, 2003).

I ceppi dei funghi comunemente utilizzati nell'industria delle biotecnologie per la produzione di enzimi in enologia appartengono agli Ascomiceti (così come i *Saccharomyces* spp.).

Aspergillus niger è un fungo microscopico filamentoso.

Trichoderma harzianum è isolato dal suolo, dove costituisce parte dell'ambiente naturale. Alcuni ceppi sono conosciuti per agire come fungicidi, potendo proteggere le colture da *Botrytis* o dalla peronospora.

Aspergillus e *Trichoderma* sono i due microrganismi utilizzati per la produzione dei preparati enzimatici destinati all'enologia (pectinasi, glucanasi).

Altri preparati sono estratti dal bianco d'uovo (lisozima) o da colture di *Lactobacillus fermentum* (ureasi).

I preparati enzimatici sono generalmente prodotti per fermentazione. Industrialmente, i ceppi selezionati sono coltivati su dei substrati vegetali come la farina di soia o l'amido di patata.

Il metodo normalmente più impiegato è la coltura in mezzo sommerso.

I ceppi utilizzati per l'estrazione di preparati enzimatici per l'enologia possiedono, oltre alle attività per le quali sono propagati (pectinasi per *A. niger*, β -1, 3-1, 6 glucanasi per *T. harzianum*), altri tipi d'attività enzimatiche, quali le cellulasi, β -glucosidasi, xylanasi, galattanasi e proteasi (cinnamil esterasi), prodotte da *A. niger*.

Le condizioni industriali di fermentazione sono scelte per favorire la produzione di attività che si potrebbero definire come «attività principali»: si tratta delle attività che caratterizzano la preparazione enzimatica.

Purtroppo, i preparati enzimatici del commercio possono portare delle attività biochimiche secondarie che ingenerano nei mosti e nei vini effetti collaterali indesiderati e peggiorativi della qualità. Per difendersi da tale rischio occorre ricorrere a prodotti appositamente studiati e collaudati per il settore enologico, ovvero epurati dalle attività che possono svalutare il risultato finale. L'esito della purificazione non è impalpabile, ma si riscontra dal punto di vista sensoriale ed è evidenziabile anche all'analisi analitica (Marenghi, 2003). Il processo di purificazione degli enzimi è tuttavia un processo costoso per le aziende produttrici: la fabbricazione richiede il costo aggiuntivo relativo all'introduzione del processo di purificazione che complica il processo produttivo, inoltre conduce ad una perdita di efficacia anche dell'attività principale dell'enzima, obbliga a partire da preparati base più concentrati, per avere all'atto della vendita, preparati commerciali con attività corretta.

Purificazione e caratterizzazione dell'attività cinnamil-esterasi

Dall'introduzione delle pectinasi in enologia per la chiarificazione dei mosti, a metà degli anni 70, Burkhardt (1976) nota che il loro impiego conduce alla rapida perdita del *bouquet* dei vini bianchi tedeschi. Egli attribuisce questi difetti organolettici alla presenza di un'attività enzimatica «depsidasi» prodotta da *Aspergillus niger* e contenuta nel preparato enzimatico utilizzato. Questa attività sarebbe in grado di idrolizzare i composti idrossi-cinnamil tartarici dei mosti bianchi. Maurer (1987) chiama questa attività «clorogenasi», ma la definisce in maniera identica. Numerosi autori si sono impegnati su questo problema, senza mai portare delle risposte sull'identificazione delle sostanze volatili responsabili della perdita della tipicità di questi vini (Canal-Llaubères, 2003).

I lavori di Chatonnet *et al.* (1992) hanno permesso di mettere in evidenza il ruolo dei preparati di pectinasi sul tenore in fenoli volatili dei vini. Prima ancora, Chatonnet *et al.* (1989) avevano dimostrato il ruolo del lievito *Saccharomyces cerevisiae* nella formazione di questi composti.

Barbe (1995) purifica e caratterizza l'attività cinnamil-esterasica.

L'attività cinnamil-esterasi, presente nei preparati delle pectinasi prodotti a partire da ceppi di *Aspergillus niger*, può causare delle deviazioni organolettiche, come perdita di freschezza nei vini bianchi e comparsa di un carattere fenolico nei vini rossi.

I preparati enzimatici prodotti da *Trichoderma harzianum* sono naturalmente esenti dall'attività CE.

Il livello d'attività dipende dal ceppo del microrganismo, ma anche dalle condizioni di fermentazione (Canal-Llaubères, 2003).

La formazione dei fenoli volatili

I fenoli volatili, vinil- ed etil-, contribuiscono all'aroma dei vini bianchi e rossi.

A partire da una certa soglia, questi composti possono apportare della pesantezza mascherando il carattere fruttato, o perfino deprezzare i vini sviluppando delle note medicinali, d'inchiostro, di tempera o di chiodo di garofano (vinil-4-fenolo, vinil-4-guaiacolo) e note di stalla o di sudore (etil-4-fenolo, etil-4-guaiacolo).

Questi composti derivano dal metabolismo degli acidi fenolici.

Chimismo della formazione dei vinil-fenoli

Barbe (1995) ha dimostrato l'evoluzione del tenore in vinil-4-fenolo e in vinil-4-guaiacolo nel corso della fermentazione alcolica, con e senza utilizzo di preparati pectolitici.

La presenza dei vinil-fenoli è osservata unicamente nei vini bianchi. La loro formazione dipende da reazioni enzimatiche che fanno intervenire la **cinnamato-decarbossilasi** (CD) del lievito (Albagnac, 1975). Il gene POF1 (*phenolic off-flavour*), che codifica la sintesi di questa proteina, è stato clonato da Meaden e Taylor (1991). L'attività CD è comunemente presente in *Saccharomyces* e nella maggior parte dei ceppi di lieviti secchi attivi per l'enologia (Grando *et al.*, 1993). Così, dei ceppi privati dell'attività cinnamato-decarbossilasi (cosiddetti POF) sono stati selezionati per evitare la formazione dei vinil-fenoli. Nei vini rossi, questa attività è inibita dai composti fenolici delle uve rosse (Chatonnet *et al.*, 1989). Il tenore in vinil-fenoli è più importante nei vini bianchi ottenuti con un trattamento enzimatico a partire da pectinasi che possiedono una attività CE; il tasso di aumento rispetto a un vino testimone può essere del 50%.

I preparati enzimatici non contengono attività cinnamato-decarbossilasi. La figura 6 mostra l'idrolisi degli esteri tartarici degli acidi cinnamici del mosto, sotto l'azione di un'attività secondaria di tipo **esterasi**, presente nei preparati enzimatici.

In uve mature, la concentrazione in precursori è da 2 a 5 volte più elevata che quella degli acidi fenolici liberi.

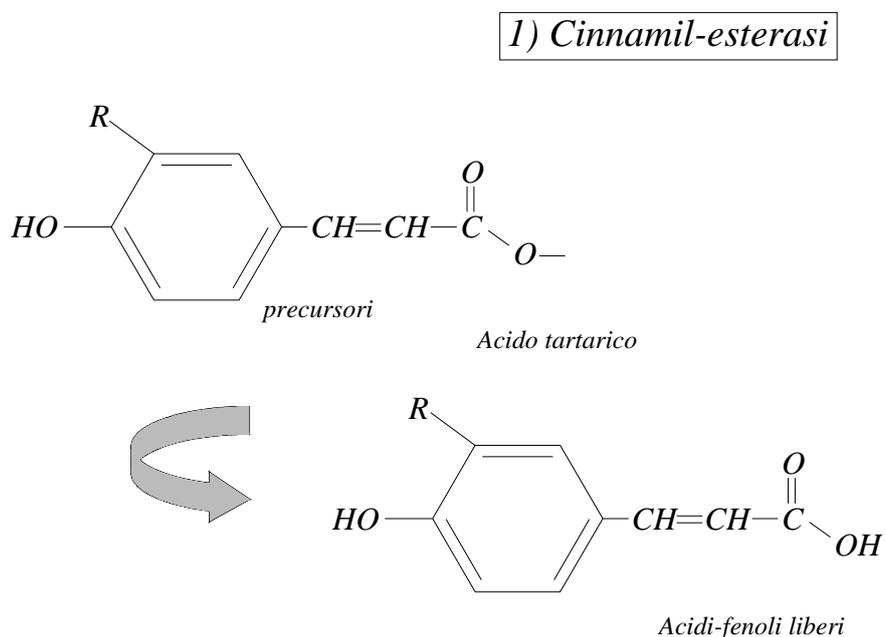


Fig. 6. Formazione dei vinil-fenoli nel vino bianco. Tappa 1: idrolisi dei derivati idrossi-cinnamil-tartarici da parte dell'attività CE (pectinasi estratte a partire da *Botrytis cinerea*)

I composti fenolici sono formati a partire dalla decarbossilazione degli acidi cinnamici liberi del mosto e da quella degli acidi cinnamici derivati dall'idrolisi degli esteri tartarici per mezzo di una esterasi presente nei preparati pectolitici, sotto l'azione della cinnamato-decarbossilasi di *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 7).

2) Cinnamato-decarbossilasi

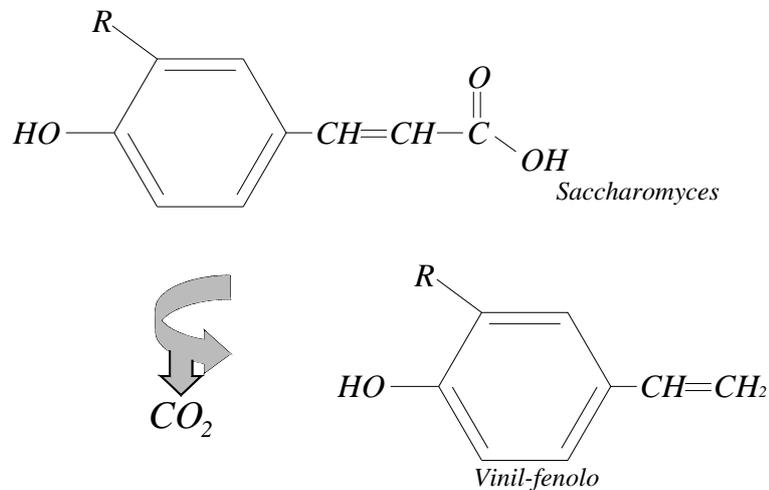
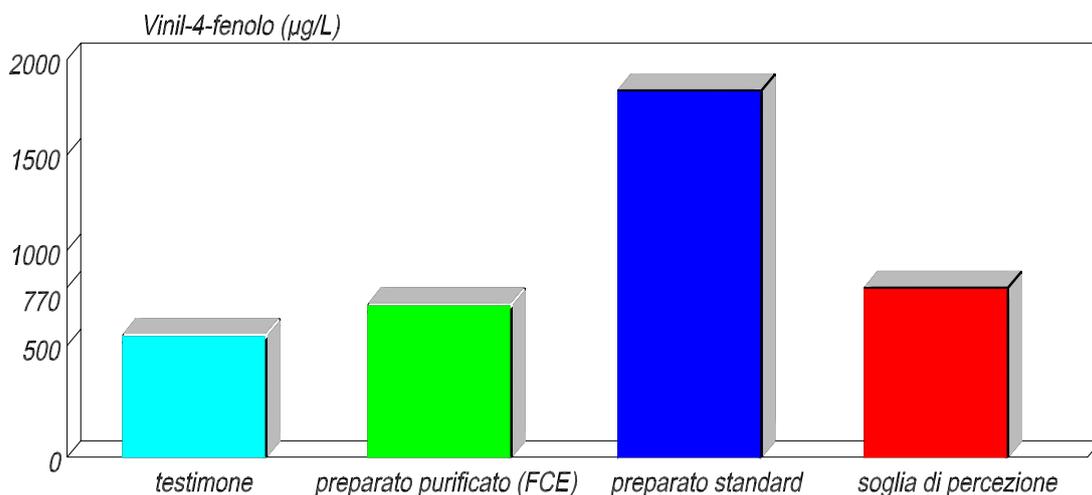


Fig. 7. Formazione dei vinil-fenoli nel vino bianco. Tappa 2: decarbossilazione degli acidi cinnamici da parte dell'attività CD (*Saccharomyces cerevisiae*)

La messa a punto di preparati pectolitici con ridotta attività CE ha permesso di limitare la formazione dei vinil-fenoli nei vini bianchi. I risultati ottenuti sui vini bianchi sono presentati nella Tab. 6 (Canal-Llaubères, 2003).

L'utilizzo di preparati pectolitici classici (non purificati dall'attività CE) per chiarificare i mosti comporta nei vini dei tenori da 2 a 4 volte più elevati in vinil-4-fenolo, rispetto a quelli dei vini testimoni. L'utilizzo di preparati a bassa attività CE limita, al di sotto della soglia di percezione (770 $\mu\text{g/L}$), il tenore in vinil-4-fenolo del vino.

Tab. 6. Effetto dei preparati enzimatici sul tenore in vinil-fenoli nei vini bianchi.



Chimismo della formazione degli etil-fenoli

Abbiamo già detto che il lievito *Saccharomyces* non è responsabile nei vini rossi della formazione dei fenoli volatili, dal momento che l'attività CD è inibita dai composti fenolici (Chatonnet *et al.*, 1997).

Nella vinificazione in rosso una contaminazione da *Brettanomyces* provoca la trasformazione dei vinil-fenoli in etil-fenoli per azione della vinilfenolo reduttasi (Fig.8). Capita quindi di poter trovare dei vini che presentino un carattere fenolico.

Contrariamente a *Saccharomyces*, la cinnamato-decarbossilasi di *Brettanomyces* non è inibita dai polifenoli.

Alcuni autori (Gerbaux *et al.* 2002) mostrano che l'aggiunta di pectinasi può aumentare i rischi di formazione di questi composti in presenza di lieviti di contaminazione fino ad oltrepassare la soglia di percezione.

L'utilizzo di pectinasi non purificate dalla CE aumentano il valore del 4-etilfenolo.

Pertanto l'uso di preparati pectolitici a bassa attività CE viene anche giustificata nella vinificazione in rosso.

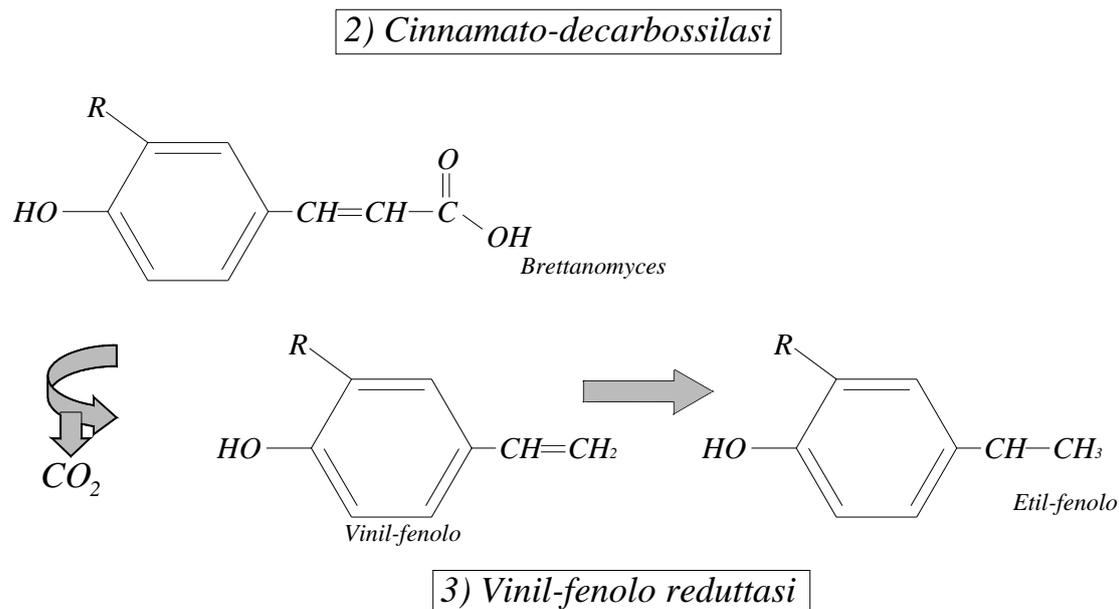


Fig. 8. Formazione degli etil-fenoli nei vini rossi. Tappa 2: decarbossilazione degli acidi cinnamici da parte dell'attività CD (*Brettanomyces*) e formazione dei vinil-fenoli.

Tappa 3: riduzione dei vinil in etil-fenoli da parte dell'attività VPR (*Brettanomyces*).

Il controllo dell'attività di cinnamato esterasi

Esiste una grande confusione nella denominazione stessa delle attività esterasiche fungine e sono riportate valutazioni diverse sulla loro incidenza qualitativa.

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 ultrafiltrazione su membrane con cut-off di 100000 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 impiegato per la 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 di molto. Da studi

effettuati (Barbe, 1995) 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.

In conclusione i fabbricanti di prodotti per l'enologia sono stati spinti negli ultimi anni a purificare i loro preparati da questa attività e a proporre dei preparati a bassa attività cinnamil-esterasica (FCE).

L'impiego di questi prodotti permette di limitare l'idrolisi degli esteri tartarici degli acidi fenolici: comportandosi in questo modo non si dovrebbero avere composizioni dei mosti rossi, ma anche bianchi, diverse da quelle iniziali.

SCOPO DEL LAVORO

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 è stata legata allo sviluppo di lieviti *Brettanomyces*, e in alcune realtà si è iniziato a monitorare questa diffusione al fine di conoscere meglio l'origine del problema ed eventualmente capire quali sono i fattori che aumentano la suscettibilità di un vino alla comparsa del problema.

Purtroppo si sa ancora poco di questo argomento e ancora meno se ne parla, ma il problema è realmente presente in cantina: con questo lavoro si è cercato di valutare l'incidenza di questi difetti organolettici mediante l'analisi per GC del 4-etilfenolo in vini barbera.

Inoltre si sono anche osservati alcune interventi tecnologici che possono influire sulla quantità di etilfenoli come prodotti finali del metabolismo dei lieviti *Brettanomyces*.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

Il dosaggio del 4-etilfenolo è stato effettuato su campioni di vini Barbera in diverse fasi del loro processo di affinamento.

METODO ANALITICO UTILIZZATO PER LA DETERMINAZIONE DEL 4-ETIL FENOLO

Principio del Metodo

Il 4-etil fenolo viene trattenuto su di una cartuccia di C18, in seguito viene eluito con diclorometano e determinato quantitativamente per gascromatografia.

Reattivi

- Etanolo 96%
- Soluzione tampone a pH 3,2. In un matraccio classe A da 1 litro sciogliere, in circa 100 ml di acqua ultrapura , 5 g di acido tartarico; aggiungere 22 ml di sodio idrossido 1N, 120 ml di etanolo 96% e portare a volume con acqua ultrapura.-
- Alcol metilico per GC
- Diclorometano per GC
- Sodio carbonato anidro
- Soluzione di standard interno (1-eptanolo) a 30 mg/l. Preparare una soluzione madre (SM) pesando 300 mg di 1-eptanolo in un matraccio classe A da 50 ml contenente già 10 ml di alcol metilico e poi portare a volume con alcol metilico. In un matraccio di classe A da 100 ml, contenente già 10 ml di metanolo, aggiungere i 0,5 ml prelevati dalla soluzione SM e portare a volume con metanolo. In questa soluzione la concentrazione di 1-eptanolo è di 30 mg/l; aggiungendo 0,25 ml di quest'ultima soluzione preparata a 25 ml di campione la concentrazione finale in 1-eptanolo sarà di 300 µg/l
- Soluzione di 4-etil fenolo a 25 mg/l. Pesare direttamente in un matraccio classe A da 100 ml, 25 mg di 4-etil fenolo puro (CAS 000123-07-9) e portare a volume con la soluzione tampone a pH 3,2. In un matraccio da 100 ml, prelevare 10 ml della soluzione precedente e portare a volume con la

soluzione tampone a pH 3,2; questa soluzione avrà una concentrazione di 4-Etil fenolo di 25 mg/l.

Apparecchiatura ed accessori

- Cartuccia C₁₈ Sep Pack da 1 g, provvista di un adattatore per siringa
- Bilancia analitica con divisioni da 0,1 mg
- Gascromatografo HP corredato da
 - Iniettore Splitt-Splitless (temperatura 250°C)
 - Forno
 - Rivelatore a Ionizzazione di fiamma (FID: temperatura a 230°C)
 - Interfaccia bicanale HP 25900
 - ChemStation
- Colonna capillare INNOWAX (lunghezza 30 m.; diametro interno 0,32 mm e spessore della pellicola 0,5 µm)
- Normale attrezzatura di laboratorio.

Taratura dello strumento

In 4 matracci classe A da 50 ml portare le seguenti quantità della soluzione di 4-etil fenolo a 25 mg/l (SM):

- Std 1 = 0,5 ml di SM (concentrazione finale pari a 250 µg/l)
- Std 2 = 1 ml di SM (concentrazione finale pari a 500 µg/l)
- Std 3 = 2 ml di SM (concentrazione finale pari a 1000 µg/l)
- Std 4 = 5 ml di SM (concentrazione finale pari a 2500 µg/l)

Portare a volume con la soluzione tampone a pH 3,2. Prelevare in una beuta 25 ml di queste soluzioni, aggiungere 0,25 ml di Standard Interno (1-Eptanolo a concentrazione di 30 mg/l) e aggiungere acqua ultrapura fino ad arrivare a circa 100 ml di soluzione finale. Chiudere la beuta con un pezzo di parafilm e trattare come se fosse un campione.

Preparazione del campione

Il campione viene utilizzato tal quale.

Procedimento

Attivare una cartuccia di C₁₈ con 10-12 ml di metanolo seguiti da 20 ml di acqua distillata.

In una beuta prelevare 25 ml del campione, aggiungere 0,25 ml di standard interno (1-Eptanolo a concentrazione di 30 mg/l). Aggiungere acqua ultrapura fino ad arrivare a una soluzione con contenuto inferiore al 4% di etanolo e chiudere con parafilm.

Far passare lentamente il campione attraverso la cartuccia (1ml/min), lavare con 20 ml di acqua distillata e asciugare la cartuccia facendole passare dell'aria attraverso.

Eluire il 4-etil fenolo con 10 ml di diclorometano raccogliendo l'eluato in un becker dove previamente si è depositata una punta di spatola di sodio carbonato anidro. Trasferire il contenuto del becker in un pallone a distillazione. Evaporare a piccolo volume a temperatura ambiente (0,2 ml circa) e iniettarlo nel gascromatografo (l'autocampionatore inietta 0,2 µl).

La programmazione della temperatura delle analisi è la seguente:

- Temperatura iniziale del forno: 40°C temperatura a cui rimane per due minuti;
- A 30°C/min aumenta fino a 60°C dove si ferma per due minuti. Poi a 2°C/min fino a 160°C e subito a 5°C/min fino a 230°C dove si ferma per dieci minuti. Il tempo di analisi è di 88 minuti;
- Temperatura massima in colonna: 300°C;
- Iniezione in Splitless dopo 2 minuti;
- I flussi dei gas di alimentazione sono: He 3Kg/cm² (Column Head Pressure di 70-80 KPa), H₂ 1,7 Kg/cm², aria 2,6 Kg/cm² (il gas di trasporto ha un flusso tale da percorrere 1 ml in 1 minuto);
- Prima di iniettare il campione accertarsi delle corrette prestazioni dello strumento iniettando una delle soluzioni di concentrazione nota di 4-etil fenolo.

Espressione del risultato

Il contenuto in 4-Etil fenolo nel campione è espresso in µg/l e viene fornito direttamente dallo strumento (Sinergo S.c.a r.l.).

CONTROLLO MICROBIOLOGICO

Principio del Metodo

Ha un'applicazione particolarmente interessante nel controllo della stabilizzazione microbiologica dei vini, poiché è in grado di rivelare la presenza di pochissime cellule vive in un grande volume di vino.

Permette di controllare ed eventualmente determinare la carica batterica e lievitifforme per sviluppo su membrana filtrante.

Mezzi di coltura

Si utilizza un terreno di coltura sintetico un terreno di coltura sintetico di facile preparazione in quanto deve essere sciolto in acqua calda e autoclavato per 15'. Il terreno di coltura viene denominato WL NUTRIENT ed è un terreno utilizzato per la determinazione della microflora nei processi di fermentazione industriale.

La composizione di WL NUTRIENT è la seguente: estratto di lievito 4.0 g/l, triptone 5.0 g/l, destrosio 50.0 g/l, potassio fosfato biacido 0.55 g/l, potassio cloruro 0.425 g/l, calcio cloruro 0.125 g/l, magnesio solfato 0.125 g/l, ferrico cloruro 0.0025 g/l, manganese solfato 0.0025 g/l, verde di bromocresolo 0.022 g/l.

Per quanto riguarda l'individuazione di lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* occorre sostituire il terreno di coltura liquido normalmente utilizzato con il terreno di coltura selettivo per questi lieviti che è il BSM della ditta Millipore. BSM è un brodo selettivo per *Brettanomyces* che ha pH 3.5 a 25° C, deve essere conservato a temperature basse (2-10 °C) e in ambiente fresco, è liquido ed ha colorazione arancio-gialla. Essendo un preparato commerciale non se ne conosce la composizione chimica ma possiamo azzardare ed affermare che sia presente l'actidione o cicloesimide, antibiotico che inibisce fortemente la crescita di tutti gli altri lieviti, il terreno di coltura BSM ha infatti un unico controllo positivo nei confronti dei lieviti *Brettanomyces*.

Apparecchiature ed accessori

- 1)Apparecchiatura filtrante sotto vuoto,
- 2)membrane filtranti sterili con pori di 0,45 nm aventi diametro di 47 mm,

- 3) scatole Petri sterili
- 4) termostato,
- 5) cappa a flusso laminare,
- 6) bunsen

Procedimento

La cappa a flusso laminare deve essere accesa qualche minuto prima di cominciare le operazioni in modo da creare un ambiente sterile.

E' fondamentale che tutta l'attrezzatura sia stata autoclavata, oppure sottoposta a flambatura.

Flambare con alcool gli imbuti e i supporti di vetro su cui verranno poi appoggiate le membrane.

Scartare le membrane e, con le pinzette flambate, facendo attenzione a non forarle, appoggiarle sui vari supporti, accendere la pompa di aspirazione in modo da farle aderire bene. Fissare gli imbuti con le pinze.

Stappare le bottiglie e prima di versare il campione negli imbuti passarne le imboccature sulla fiamma, lentamente versare tutto il contenuto agitando in modo da recuperare eventuali cellule. Sciacquare con qualche ml di acqua sterile le bottiglie e versare anche questo negli imbuti. Sciacquare anche bene gli imbuti con l'acqua microfiltrata all'istante con filtro 0,2 micron.

Intanto che tutto il liquido filtra preparare le scatole Petri mettendo all'interno con l'aiuto di una siringa il terreno colturale.

Con le pinzette flambate, dopo aver tolto gli imbuti, prelevare la membrana ed adagiarla sul substrato nella scatola Petri cercando di farla aderire perfettamente.

Ora si mettono le scatole col coperchio in basso nel termostato a 25°C in modo da consentire lo sviluppo di eventuali colonie.

La membrana è quadrettata, è quindi facile il conteggio di eventuali colonie: ogni colonia corrisponde a una cellula presente in bottiglia. Si fa una prima lettura a 24 ore dall'analisi, una seconda dopo 48 ore e un'altra, definitiva, dopo 5 giorni. Se non si ritiene sufficiente il risultato visivo, si procede con la preparazione di un vetrino e ad un'osservazione microscopica (obiettivi 40 x e 100 x) per confermare la natura delle colonie sulla membrana.

RISULTATI

CONTENUTO DI 4-ETILFENOLO IN VINI BARBERA

Tab. 7. 4-etilfenolo presente in vini Barbera.

<i>CAMPIONE</i>	<i>ANNATA</i>	<i>4-ETIL FENOLO µg/l</i>	<i>CAMPIONE</i>	<i>ANNATA</i>	<i>4-ETIL FENOLO µg/l</i>
TINO 7	2002	12	A 4	2002	651
1701/03	2002	14,4	H12/01	2002	797
B	2002	39	A 3	2002	886
B47/03 V. 72	2003	44	A 6	2002	902
B 13/02	2002	44	F03/02 22 BARR	2002	920
B13/02 PROVA B	2002	44	B21/02 24 BARR	2002	921
B44/02 V57	2002	46	7398/2	2002	932
B17/02 21BQ T	2002	51	A 5	2002	998
B28/03 V. 11	2003	53	V31+28	2002	1050
OVALE 2	2002	56	A 5	2002	1058
B28/02 11BQ	2002	63	B46/02 6 BARR	2002	1172
B46/02	2002	64	B MONF. 02 HL 100	2002	1200
B13/03 T	2002	70	B01/02 12BQ	2002	1275
09/01/2003	2002	78,9	H10/01	2001	1276
MC R	2002	85	B28/02 11 BARR	2002	1306
N1	2002	89	CHR	2002	1341
B43/02 V12	2002	93	V 18	2002	1342
V 66 B21/02	2002	93	V 34 F01/01	2001	1362
CDR/02 T	2002	94	B53/01 17T+17B	2001	1389
V 45	2002	99	B01/02	2002	1424
CB04/02 23BQ	2002	112	B17/02 T 21 BARR	2002	1434
V 11	2002	113	B08/02 BARR	2002	1443
V 43	2002	114	H12/01	2001	1464
V45 01	2001	121	B38/02 48 BARR	2002	1480
V45 01	2001	121	B10/02 T 12 BARR	2002	1485
G	2002	130	BOTTE 15	2002	1497
F03/02 22BQ	2002	130	B55/01 V. 15	2001	1498
B44/02 A 80BQ	2002	132	V 2	2002	1534
B38/02 48BQ	2002	136	31/2	2002	1535
B44/02 41BQ	2002	137	UI	2002	1550
F03/02 V67	2002	142	BOTTE 14	2002	1562
CDR/02 P	2002	145	B13/02 TEST 21 BARR	2002	1637
DF 1	2002	148	B.53/01 V.71	2001	1693
BOTTE 6	2002	166	B53/01V9-10	2001	1715
BOTTE 13	2002	168	31	2002	1742
B08/02 22BQ	2002	168	B01/02 12 BARR	2002	1752
V35+36 BQS 02	2002	182	CBS01/02 12 BARR	2002	1755
V35+36 BQS 02	2002	182	B23/02 21 BARR	2002	1827
BOTTE 12	2002	183	H08/01 B V13	2001	1848
GIMAR 2	2002	185	MON.217/3	2002	1856
B14/02 22BG	2002	192	BOTTE 11	2002	1910
B02/T75444	2002	201	B 53/01 V.62	2001	1944
B21/02 24BQ	2002	207	BOTTE 10	2002	1946

BOTTE 5	2002	216	CBS04/02 43 BARR	2002	1962
V.D. BARB AT 02 VS207	2002	218	30	2002	1980
V.D. BARB AT 02 VS207	2002	218	V11	2002	1980
B40/02 PUV	2002	235	M V 6	2002	1991
B10/02 V68	2002	251	A 2	2002	2080
B10/02 12BQ T	2002	304	M 01	2001	2112
B39/02 35BQ	2002	306	V 15 AE/01	2001	2187
B40/02 13BQ	2002	316	H09/01	2001	2202
B23/02 21BQ	2002	316	BOTTE 4	2002	2296
X	2002	321	7310/1	2002	2340
B19/02 16BQ	2002	388	B19/02 16 BARR	2002	2496
B14/02 V66	2002	415	B40/02 T	2002	2501
BMONF.TO 02	2002	426	H08/01 A V51	2001	2574
DF 2	2002	464	B40/02 PUVC	2002	2576
B44/02 A 80 BARR	2002	491	BOTTE 4	2002	2612
H11/01	2001	521	B14/02 22 BARR	2002	2846
B44/02 C 41 BARR	2002	580	B39/02 35 BARR	2002	2915

Dalla Tab. 7 è possibile osservare la variabilità della presenza del 4-etilfenolo nei campioni analizzati.

Questi campioni, come già detto prima, provengono da diverse cantine e la variabilità dei dati è funzione dei diversi processi tecnologici di produzione e della maggiore o minore presenza di precursori degli etilfenoli (gli acidi cinnamici).

La contaminazione da parte di *Brettanomyces* che si può essere verificata durante il processo di affinamento è riscontrabile nei campioni che presentano valori elevati di 4-etilfenolo, superiori a 425 µg/l, considerata la soglia di percezione degli etilfenoli (Chatonnet, 2003).

Sono stati analizzati 120 campioni di Barbera e il contenuto medio di 4-etilfenolo riscontrato è pari a circa 900 µg/l.

La distribuzione dei vini Barbera analizzati (Fig. 10) in base ai tenori in 4-etilfenolo indica che circa il 53 % dei vini presenti una concentrazione maggiore di 425 µg/l, superiore quindi alla soglia di percezione. Il 44 % (Fig. 9) dei vini analizzati presenta tenori di 4-etilfenoli particolarmente elevati (> 1000 µg/l).

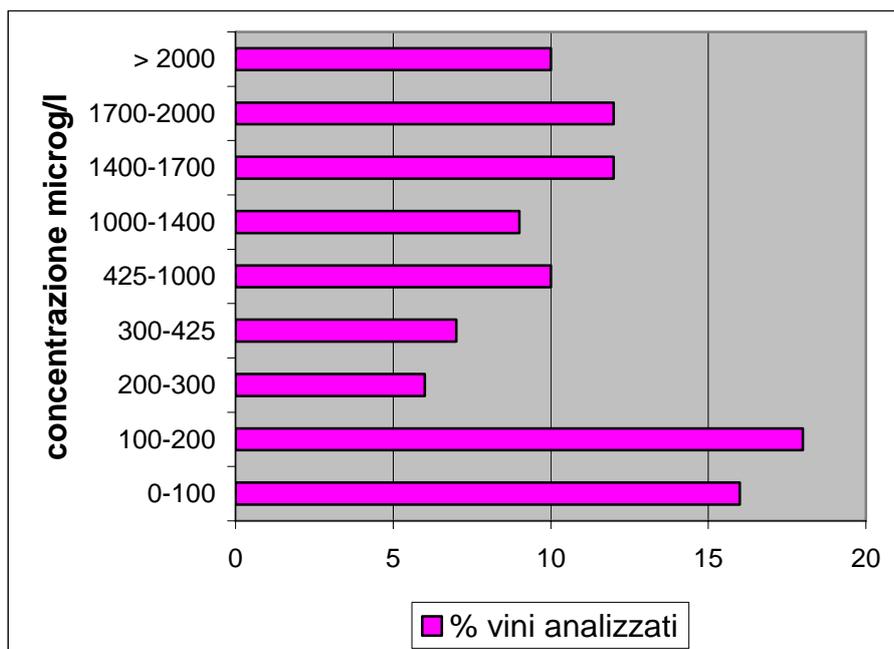


Fig. 9. Tenore in vini Barbera di 4-etilfenolo.

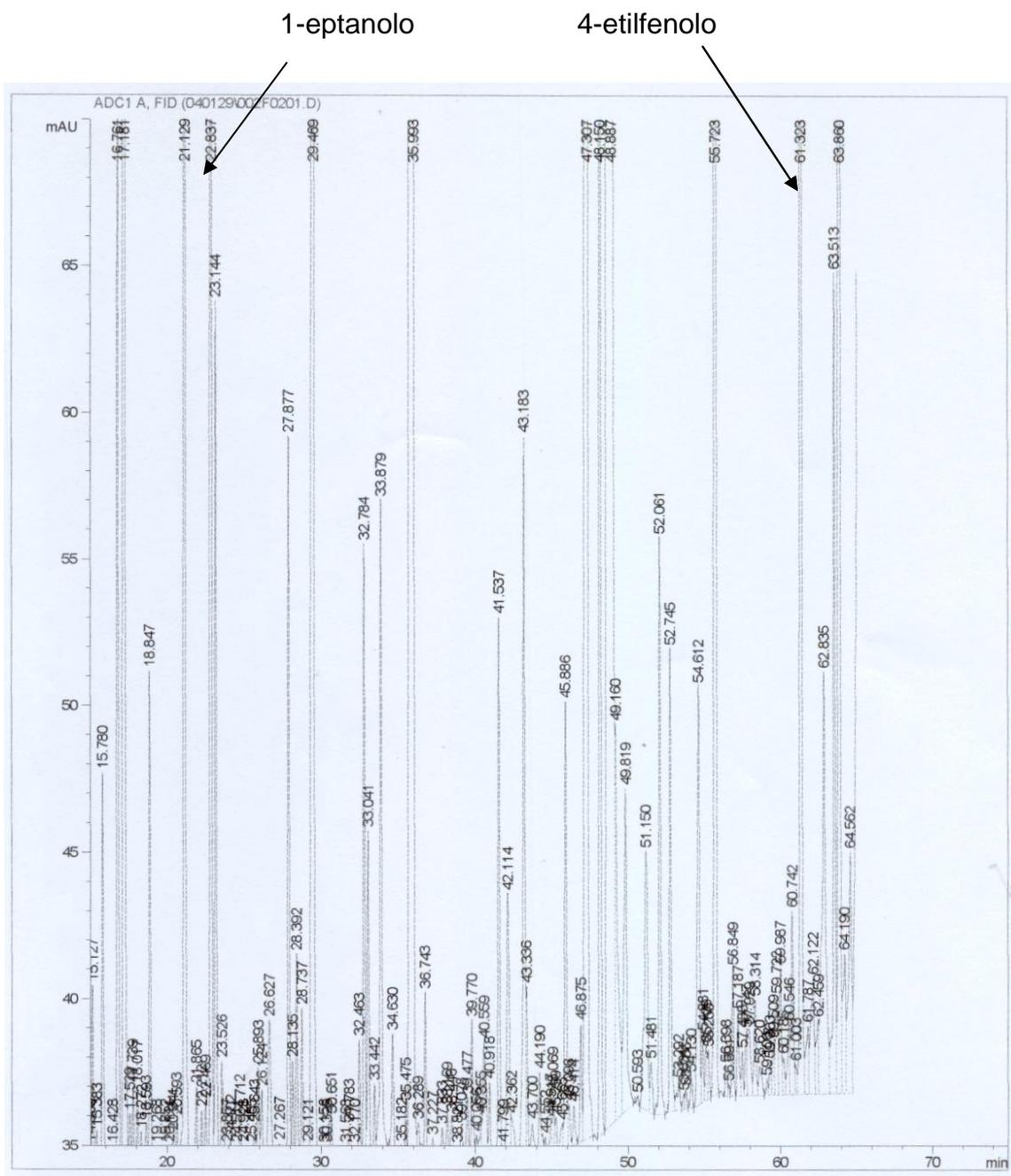


Fig. 10. Cromatogramma dell'analisi di determinazione del 4-etilfenolo con indicato il tempo di ritenzione.

LE CONDIZIONI DI COMPARSA DEL CARATTERE FENOLICO

Le analisi di cui alla Tab. 7 mostrano che i vini possono presentare problemi legati alla presenza in elevate concentrazioni di 4-etilfenolo indipendentemente dall'annata.

Allo stesso modo, all'interno di una medesima cantina si possono trovare partite contaminate e partite indenni, nelle cantine dove si verifica una contaminazione è probabile che si abbiano elevate percentuali di vini "fenolati".

Influenza della fermentazione malolattica

Si è potuto verificare che la fermentazione malolattica, quando segue la fermentazione alcolica, non comporta un aumento del contenuto in etilfenoli.

Tab. 8. Presenza di 4-etilfenolo in vino Barbera della vendemmia 2002 al termine delle fermentazioni alcolica e malolattica.

Campione	Annata	4-etilfenolo µg/l	Ac. Volatile g/l	Ac. Malico g/l	Ac. Lattico g/l	Zuccheri g/l	Alcol % Vol.
B12/02	2002	93	0,4	0,00	1,5	0,00	13,11
B44/02	2002	46	0,5	0,00	1,47	0,00	13,55
B13/02	2002	44	0,5	0,00	1,3	0,00	13,67
B13T/02	2002	70	0,53	0,00	1,42	0,00	14,4

Tab. 9. Presenza di 4-etilfenolo in vino Barbera della vendemmia 2003 e loro correlazione con le fermentazioni alcolica e malolattica.

Campione	Annata	4-etilfenolo µg/l	Ac. Volatile g/l	Ac. Malico g/l	Ac. Lattico g/l	Zuccheri g/l	Alcol % Vol.
T1	2003	49	0,51	0,00	0,85	0,81	13,80
T2	2003	368	0,55	0,00	0,78	0,74	13,57
T3	2003	557	0,55	0,00	0,89	0,57	13,49
A	2003	0,00	0,45	0,00	0,67	0,27	14,46
B	2003	0,00	0,29	1,31	tracce	0,92	14,13
C	2003	193	0,45	0,00	0,87	0,00	14,38
D	2003	0,00	0,48	0,00	0,43	1,14	15,19
B28/03	2003	53	0,3	0,84	tracce	0,00	15,88
B47/03	2003	44	0,34	0,89	tracce	0,00	14,88

Il quadro analitico generale dei vini delle due annate è rappresentativo di alcuni dei parametri chimici che hanno caratterizzato le vendemmie 2002 e 2003 (Tab. 8-9).

Per quanto riguarda la presenza di 4-etilfenolo possiamo confermare che la fermentazione malolattica non abbia nessuna influenza sul contenuto di questi composti.

Per la vendemmia 2002 il 4-etilfenolo, in questa fase del processo produttivo, era presente in quantità molto limitate.

Per i vini della vendemmia 2003 analizzati durante il mese di ottobre 2003, si può osservare per tutti i campioni in cui è stato anche analizzato il 4-etilfenolo, una gradazione alcolica molto elevata; al termine del processo fermentativo spesso si sono ancora avuti dei residui di zuccheri seppure modesti; contemporaneamente questi vini, alla stessa data, avevano già concluso la fermentazione malolattica.

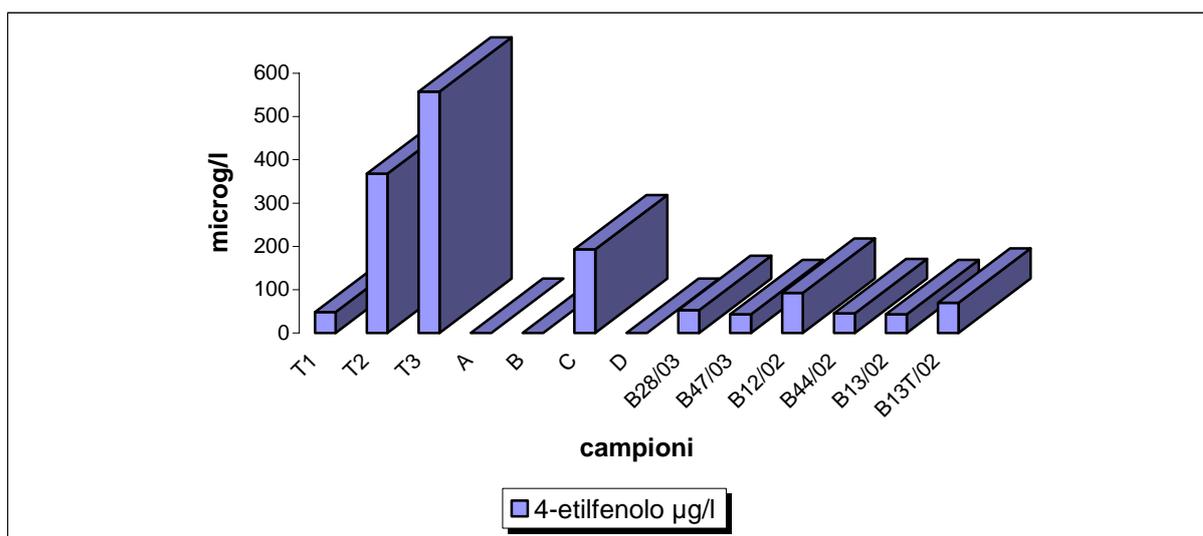


Fig. 11. Presenza di 4-etilfenolo in campioni analizzati al termine della FML.

Solo nei campioni delle serie T si osserva (Fig. 11) una presenza di 4-etilfenolo superiore alla media e non si hanno elementi per poter capire la motivazione di questa presenza; è possibile però osservare che questi campioni provengono da una cantina che aveva avuto problemi di contaminazione già con altri lotti, anche di annate precedenti.

Per quanto riguarda invece le altre due serie di campioni il contenuto di 4-etilfenolo è da ritenersi nella norma.

Anche diverse fonti bibliografiche riportano che non esistono delle correlazioni fra il contenuto di etilfenoli e l'attività metabolica dei batteri lattici (Chatonnet *et al.*, 2002).

Influenza dell'ossigeno

Come già si è detto, il passaggio dall'aerobiosi all'anaerobiosi porta ad un arresto dell'attività fermentativa e anche della crescita di *Brettanomyces*.

Emerge l'importanza fondamentale dell'ossigeno per le contaminazioni da *Brettanomyces* osservando i dati analitici di vini che non sono stati affinati in legno, ma sui quali è stata svolta una microossigenazione in vasche di acciaio.

Tab. 10. Contenuto in 4-etilfenolo in vini prima di essere sottoposti a trattamenti di microossigenazione.

Campione	4-etilfenolo µg/l
V 11	113
V 43	114
V 45	99
BAT V 207	218
V45/01	121
MEDIA	133

La tab. 10 indica i contenuti di 4-etilfenolo di alcuni lotti di vino sottoposti in seguito a microossigenazione. Si può notare che la concentrazione media è ben al di sotto della soglia di percezione degli etilfenoli definita in 425 µg/l (Chatonnet, 2002).

Questa cantina aveva già avuto problemi di comparsa di odori sgradevoli con i vini dall'annata 2001 e per prevenire eventuali sviluppi di microrganismi indesiderati, prima di sottoporre il vino a microossigenazione ha eseguito i seguenti interventi:

- Filtrazione su membrana a 0.45 µm del vino;
- Sterilizzazione mediante vapore della vasca in acciaio inox dove è poi avvenuta la microossigenazione.

Al termine del processo di microossigenazione i vini avevano un contenuto in 4-etilfenolo maggiore come evidenziato dalla Tab. 11.

Tab.11. Contenuto in 4-etilfenolo in vini dopo essere stati sottoposti a trattamenti di microossigenazione.

I valori sono molti variabili ma come si può osservare i trattamenti preventivi di cui sopra non sono serviti a limitare il contenuto di 4-etilfenolo che è sempre maggiore della sua soglia di percezione di 425 µg/l (Chatonnet, 2002) come meglio identificato nel grafico di cui alla Figura n. 12.

Campione	4-etilfenolo µg/l
30	1980
31	1742
31/2	1535
B2	2080
B4	651
B5	1058
B6	902
B3	886
V11	1980
V31+28	1050
m V6	1991
MEDIA	1441

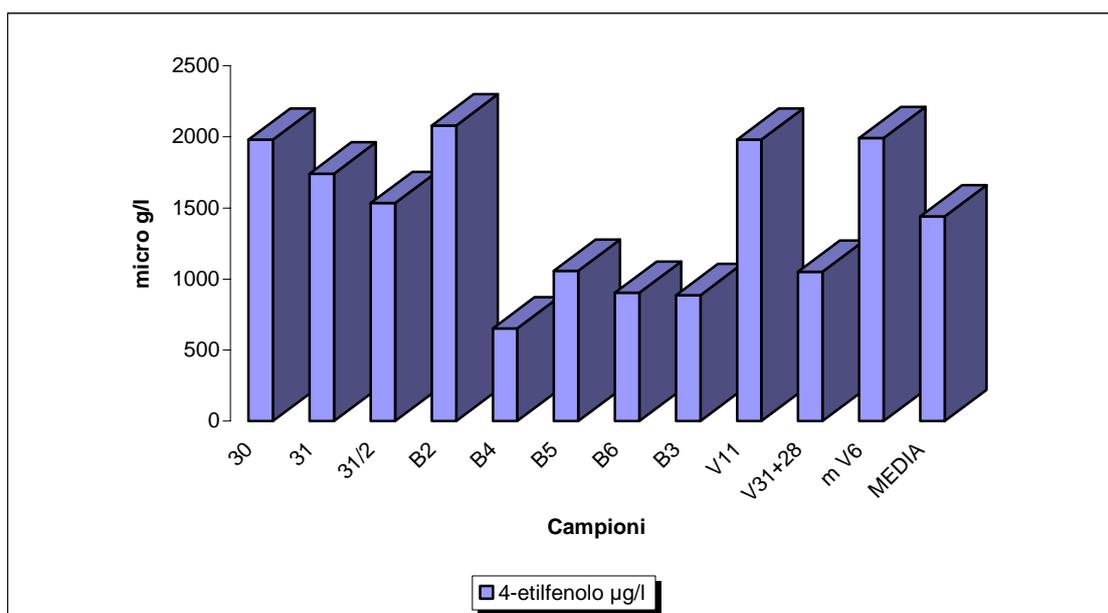


Fig. 12 4-etilfenolo nei vini che hanno subito la microossigenazione.

Anche la ricerca bibliografica aveva segnalato una correlazione positiva fra la microossigenazione e la quantità di etilfenoli. L'ossigeno stimola molto la crescita di *Brettanomyces* e anche la sua sintesi di acido acetico. In anaerobiosi invece, la concentrazione in acido acetico prodotto è molto bassa o addirittura nulla (Larue *et al.*, 1991), ma purtroppo mancano dati sull'acidità volatile di tutti i campioni analizzati.

Incidenza dell'affinamento in *barrique*

Come già affermato in precedenza l'affinamento in *barrique* non è indice sistematico di contaminazione dei vini e di comparsa del carattere "fenolico".

Durante l'affinamento in *barrique* possono verificarsi delle circostanze che favoriscono la contaminazione e lo sviluppo eccessivi di etilfenoli come:

- Utilizzo di *barrique* usate e mal gestite
- Cantine di affinamento non ben termocondizionate
- Travasi e quindi pulizia dei fusti non frequenti.

Ecco un riepilogo dei tenori in 4-etilfenolo in funzione della tipologia di legno nei quali è avvenuto l'invecchiamento.

Tab. 12. Contenuto in 4-etilfenolo dopo 3 mesi di affinamento in botte.

Nella tab. 12 sono riportati i tenori in 4-etilfenolo di vini Barbera d'Asti della vendemmia 2002 analizzati all'inizio del 2003 quando avevano passato in botte appena 3 mesi del loro processo di affinamento. Gli enologi della cantina hanno cercato sempre di mantenere il livello di SO₂ totale a 50 mg/l.

Già con i primi mesi di affinamento in legno, si è potuto osservare come in 5 botti su 9 analizzate, il contenuto di

Campione	4-etilfenolo µg/l
BOTTE 4	2296
BOTTE 5	216
BOTTE 6	166
BOTTE 10	1946
BOTTE 11	1910
BOTTE 12	183
BOTTE 13	168
BOTTE 14	1562
BOTTE 15	1497
media	1105

4-etilfenolo fosse importante e come invece, nelle rimanenti 4 botti non si potesse osservare un aumento preoccupante di etilfenoli: le quantità analizzate sono rimaste sempre al di sotto della metà della loro soglia di percezione.

Dopo un anno di affinamento in botti, è stata fatta un'unica massa del vino che come si può vedere nella Tab.13 ha un contenuto in 4-etilfenolo di 1850 µg/l circa, senz'altro la percentuale di botti contaminate e quindi di vino con elevati tenori di etilfenoli era superiore quantitativamente nei rapporti finali ottenuti facendo le masse per preparare il vino per l'imbottigliamento.

Tab. 13. Analisi della massa del vino contenuto nelle botti di cui alla Tab.12 dopo un anno di affinamento.

Analisi Massa Botti	
4-etilfenolo $\mu\text{g/l}$	1856
Ac. Tot. g/l	6,09
Ac. Volatile g/l	0,67
Alcol % Vol.	13,86
Zuccheri g/l	0,00
Ac. Tartarico g/l	1,89
SO ₂ totale mg/l	36
Estratto totale g/l	29,4

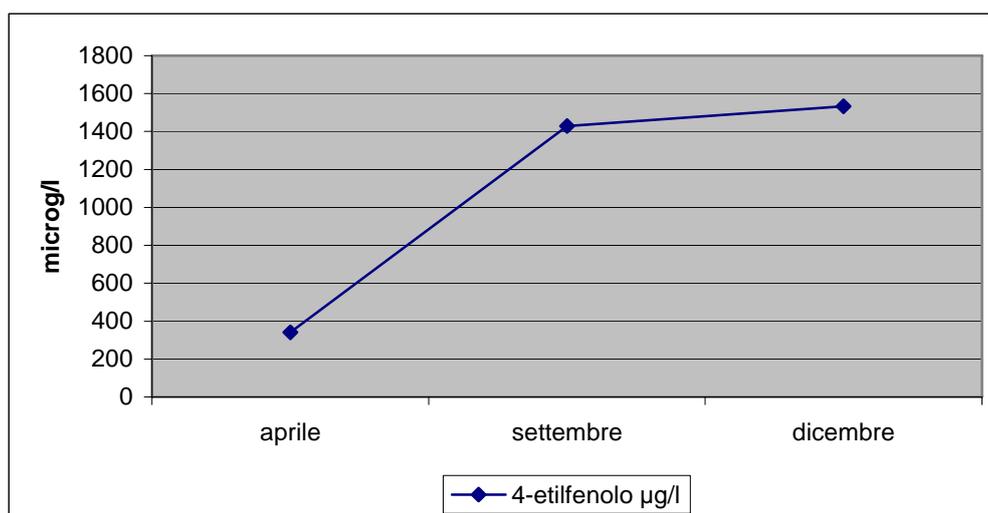


Fig.13 Evoluzione del contenuto di 4-etilfenolo durante l'invecchiamento in legno.

Per seguire l'evoluzione dell'aumento del contenuto di 4-etilfenolo si sono fatte le analisi dei vini:

- appena messi in *barrique* (aprile 2003)
- dopo il primo travaso (settembre 2003)
- un mese prima di togliere il vino delle *barrique* (dicembre 2003).

Il grafico (Fig. 13) è stato ricavato usando i valori medi dei tenori di etilfenoli: dalla sua osservazione possiamo comprendere come, al momento del riempimento della *barrique* i vini presentassero mediamente delle concentrazioni di 4-etilfenolo al di sotto della loro soglia di percezione. Le analisi eseguite in dicembre 2003

esprimono una situazione totalmente cambiata, con tenori di 4-etilfenolo aumentati di molto. L'aggiunta di SO₂ di circa 10-20 mg/l in occasione del travaso, fatta al fine di raggiungere concentrazioni di 60-70 mg di SO₂ totale non è bastata a contenere l'aumento degli etilfenoli.

L'aumento del tenore in 4-etilfenolo fra un controllo e l'altro è indice certo di un aumento anormale della popolazione di *Brettanomyces*, e potrebbe essere messo in relazione con la soglia di alterazione limite al fine di adottare la miglior strategia di azione adatta alla particolare situazione.

Per contro l'aumento dell'acidità volatile non è stato così importante come si può notare nel grafico di cui alla Fig. 14.

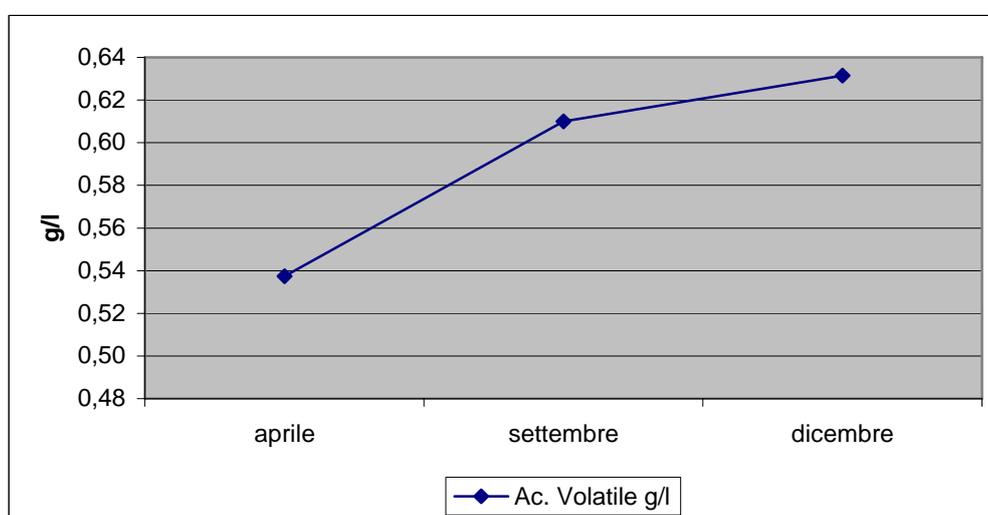


Fig.14 Evoluzione del tenore di acidità volatile durante l'invecchiamento in legno.

E' bene comunque mantenere un buon livello di controllo di queste partite che presentano problemi legati alla presenza notevole di 4-etilfenolo al fine di poter mettere in atto delle strategie preventive, per quanto possibile, come per esempio:

- solfitaggio di correzione senza travaso
- travaso
- travaso e disinfezione dei contenitori
- isolamento dei lotti "fenolici".

L'affinamento del vino in *barrique* può avvenire mediante l'utilizzo di *barrique* usate oppure di *barrique* nuove.

Facendo un confronto fra queste due tipologie di fustame utilizzato in una cantina già contaminata e il tenore di 4-etilfenolo presente è emerso quanto rappresentato nel seguente grafico (Fig. 15).

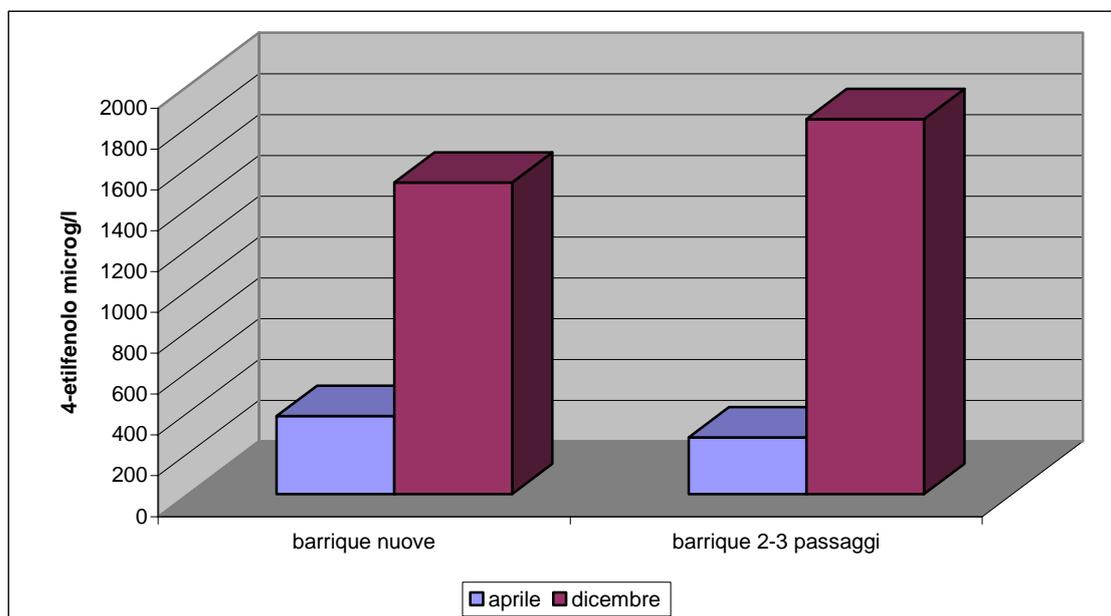


Fig.15 Influenza delle condizioni delle *barrique* sul tenore di 4-etilfenolo durante l'affinamento.

Dalla bibliografia (Chatonnet *et al.*, 1992) sono stati citati con maggiore frequenza livelli superiori di etilfenoli in vini affinati in *barrique* già usate precedentemente.

Esaminando i nostri risultati possiamo però affermare che la differenza fra il contenuto in 4-etilfenolo fra il vino affinato in *barrique* usate oppure *barrique* nuove non sia tanto elevata da essere considerata rilevante.

L'utilizzo di *barrique* usate dovrebbe facilitare la contaminazione dei vini oppure consentire l'apporto diretto al vino degli etilfenoli eventualmente "intrappolati" nella massa del legno. Il legno è infatti molto poroso e può fungere da rifugio, più o meno in profondità, per i lieviti che quindi diventano anche difficili da eliminare.

Nello stesso tempo anche l'impiego di *barrique* nuove è ugualmente favorevole allo sviluppo di questi lieviti.

Riscontrare, come nel nostro caso, elevate concentrazioni di etilfenoli in vini affinati in *barrique* nuove può avere la seguente spiegazione: in situazioni di contaminazione, solo il tenore di SO₂ libera e attiva permette di controllare le

popolazioni di *Brettanomyces* e tenendo conto del potenziale ossidante molto più elevato nelle *barrique* nuove a motivo di quantità più elevate di tannini ellagici, soprattutto nel periodo estivo, si avrà una maggiore tendenza alla diminuzione della SO₂ libera rispetto alle *barrique* usate.

Incidenza dell'anidride solforosa sui tenori di etilfenoli nei vini

L'anidride solforosa o meglio, il diossido di zolfo, ha un'azione antisettica ben precisa sui microrganismi in genere e quindi anche sui lieviti *Brettanomyces*. Al di sotto infatti di determinate concentrazioni di SO₂ libera, lo sviluppo di *Brettanomyces* e quindi il tenore di 4-etilfenolo può aumentare.

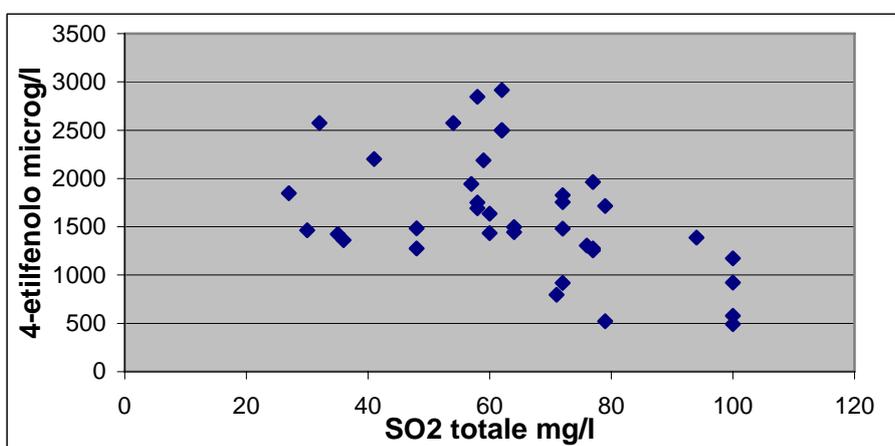


Fig.16. Tenore di SO₂ totale e in etilfenoli di diverse *barrique* di una stessa cantina dopo 12 mesi di affinamento.

La rappresentazione grafica permette di osservare che i campioni con concentrazioni di SO₂ totale maggiore, intorno ai 100 mg/l, presentano quasi sempre tenori inferiori di 4-etilfenolo (Fig. 16).

Sarebbe stato meglio monitorare la frazione libera al fine di poter andare a stabilire le concentrazioni adatte ad andare a limitare lo sviluppo di *Brettanomyces*.

Un vino dovrebbe infatti ritenersi correttamente protetto con concentrazioni di 25 mg/l di SO₂ libera a pH 3.65; con valori di pH superiori occorre anche andare ad aumentare il quantitativo di SO₂ libera.

In microbiologia si preferisce comunque parlare di solforosa attiva e Chatonnet (2003) indica che i *Brettanomyces* sono inibiti per valori di SO₂ attiva superiore a 0.30 mg/l e rapidamente distrutti a 0.50 mg/l.

Ribadiamo quindi che, anche se le modalità di affinamento non hanno sempre un effetto rilevante sul contenuto in etilfenoli, la periodicità dei travasi è in realtà un fattore importante per il controllo degli stessi anche in funzione della sanitizzazione dei contenitori e dell'aggiunta di SO₂ che viene fatta in quel momento.

L'igiene dei fusti

L'utilizzo del legno, facilita la contaminazione dei vini, potendo ospitare e proteggere i microrganismi.

In caso di affinamento di lunga durata in *barrique*, proprio la manutenzione del fustame e l'igiene di cantina sono gli unici sistemi a disposizione dell'enologo per effettuare una corretta profilassi (Chatonnet, 2002).

Da lavori seguiti è risultato che per ridurre significativamente le popolazioni microbiche occorre lavare le *barriques* raggiungendo nella profondità del legno la temperatura minima di 65° C.

Per raggiungere questo scopo occorre quindi in alternativa:

- lavare con acqua calda, riscaldata intorno agli 80° C, unita a una buona pressione dell'acqua al fine di ridurre i tempi di lavaggio intorno ai 5 minuti/*barrique* ed un impiego di acqua di circa 45-75 litri di acqua/*barrique*;
- impiegare il vapore; il trattamento deve comunque essere abbastanza lungo sì da eliminare la totalità dei microrganismi (Chatonnet, 2002).

Alcune aziende hanno sperimentato diversi metodi di sanitizzazione delle *barrique*

Più nello specifico sono state fatte delle prove di risciacquo dei contenitori in legno con:

1. acqua arricchita di ozono;
2. risciacquo con acqua unita a perossido di idrogeno al 20-60%.

1) Il risciacquo delle *barrique* con acqua arricchita di ozono (O₃), gas dotato di importanti proprietà disinfettanti legate al suo elevato potere ossidante, è stato presentato come una tecnica rivoluzionaria.

L'ozono ha una reazione molto veloce a contatto della superficie porosa del legno e questo compromette la sua diffusione e soprattutto la sua azione in profondità.

Per testare questo metodo di sanitizzazione si sono fatte delle prove di controllo microbiologico andando ad analizzare:

- acqua di risciacquo;
- tampone dell'interno del contenitore di legno.

Tab. 14. - Valutazione dell'efficacia del trattamento sanitizzante con acqua ozonizzata.

tipologia contenitore	<i>Brettanomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
barrique TTC acqua risciacquo	presenti	assenti
barrique TTC Tampone	presenti	assenti
barrique TC Tampone prima	Inquinata	presenti
barrique TC Tampone dopo	Inquinata	presenti
Vasca acciaio acqua di risciacquo	presenti	Inquinata
Vasca acciaio tampone	presenti	inquinata

Possiamo quindi affermare che tale tecnica non abbia dato dei risultati soddisfacenti in vista di un suo normale impiego in cantina (Tab. 14).

2) I controlli delle prove di sanitizzazione effettuati campionando un tampone di una botte lavata usando un prodotto a base di perossido di idrogeno a concentrazioni molto elevate: hanno portato a dei risultati interessanti. L'inconveniente riscontrato è nell'elevato quantitativo di acqua necessario per il risciacquo dopo il trattamento. Basti infatti pensare che per una botte da 50 hl di capacità occorrono circa 15 hl di acqua per il risciacquo al fine di essere sicuri di

non contaminare il vino con residui del trattamento sanitizzante, provocandone una veloce ossidazione. Proprio per questo motivo questo prodotto viene impiegato solo per la sanitizzazione delle vasche di acciaio.

La valutazione dell'efficacia del trattamento sanitizzante con acqua ossigenata al 20-60 % è stata fatta controllando 9 campioni presi in 9 botti diverse; dal controllo microbiologico è risultato che in 8 botti su 9 non si sia riscontrata presenza di *Brettanomyces* dopo al trattamento sanitizzante.

CONCLUSIONI

La presenza di *Brettanomyces* nei vini Barbera e del prodotto del loro metabolismo, il 4-etilfenolo, 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 4-etilfenolo, in particolare la temperatura, l'ossigeno, l'etanolo e il pH.

Al termine di questo lavoro possiamo affermare che taluni interventi tecnologici hanno un'influenza positiva sulla formazione dei fenoli volatili, come per esempio l'affinamento in *barrique*, la cattiva sanitizzazione dei contenitori di legno, l'impiego di enzimi pectolitici, la microossigenazione e la mancanza di prudenza nell'utilizzo del diossido di zolfo.

E' innegabile che i vini barbera possano presentare una maggiore suscettibilità rispetto alla formazione di elevate quantità di 4-etilfenolo a motivo della loro maggiore concentrazione in acidi idrossicinnamici, precursori degli etilfenoli.

Inoltre molte delle scelte effettuate con l'obbiettivo 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 la messa a punto di sistemi di disinfezione efficaci e rispettosi dei materiali, permetteranno di gestire lo sviluppo dei lieviti *Brettanomyces* per limitarne gli innegabili effetti indesiderati che compromettono la purezza e la tipicità dell'aroma dei vini.

BIBLIOGRAFIA

- **Albagnac G. (1975).** La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures. Ann. Technol. Agric. 24, 133-141.
- **Canal-Llaubères R.M., (2003).** La Purificazione dei prodotti enzimatici per l'enologia. Vinideanet, 7, 1-7.
- **Carrascosa J. M., Viguera M.D., Nuñez de Castro I. et Scheffers W. A., (1981).** Metabolism of acetaldehyde and Custer effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*. Antonie van Leeuwenhoek, 47, 209-215.
- **Castino M., Di Stefano R. (1976).** Frazionamento degli acidi fenolici dei vini per gel filtrazione. Riv. Vitic. Enol. 29, 290-305.
- **Chatonnet P. (2002).** “La contaminazione dei vini da parte di *Brettanomyces* durante la vinificazione e l'affinamento. Parte I: incidenza ed analisi del problema”. OICCE Times – anno III n.1, 28-24.
- **Chatonnet P., (1993).** Fenoli volatili: influenze organolettiche e metodi di prevenzione. Vigne e Vini 7-8, 26-34.
- **Chatonnet P., (2002).** La contaminazione dei vini da parte di *Brettanomyces* durante la vinificazione e l'affinamento. Parte II: Sistemi di lotta. OICCE Times – anno III n. 2, 18-21.
- **Chatonnet P., Boidron J.N. et Pons Monique, (1990).** Elevage des vins rouges en fûts de chêne: Evolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. Sci. Alim., 10, 565-587.
- **Chatonnet P., Boidron J.N., Dubourdieu D., (1993).** Influence des conditions d'élevages et de sulfitage des vins rouges en barriques sur

leur teneur en acide acétique et en éthyl-phénols. J. Int. Sci. Vigne et vin, 27, 4, 277-298.

- **Chatonnet P., Dubordieu D. et Boidron J.N., (1995).** The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. Am. J. Enol. Vitic., 46, 463-468.
- **Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N. (1992).** “Le caractère phénolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lutte”. Revue Française d’œnologie. 138, 21-24.
- **Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N. (1995).** “The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines”. Am. J. Enol. Vitic. 46, 4, 463-468.
- **Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N. et Pons M., (1992).** The origin of ethylphenols in wines. J. Sci. Food Agric., 60, 165-178.
- **Chatonnet P., Masneuf I., Gobbiotti M.C., Dubourdieu D. (1999).** “Prevention et detection des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l’élevage des vins”. Revue Française d’œnologie, 179, 20-24.
- **Chatonnet P., Viala C., Dubordieu D. (1997).** “Influence of polyphenolic components of red wines on microbial synthesis of volatile phenol”. Am. J. Enol. Vitic. 48, 4, 443-448.
- **Ciani M. et Ferraro L., (1997).** Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. J. Sci. Food Agric., 75, 489-495.
- **Delfini C., Di Stefano R. (1984).** L’attività malolattica nei vini. Vini d’Italia 26, 11-22.

- **Di Stefano R., (1985).** Gli etil-fenoli nei vini. *Vigne e Vini* 5, 35-38.
- **Domizio P., Rosi I., (2003).** Controllo della presenza di lieviti *Brettanomyces/Dekkera* durante il processo di vinificazione e affinamento del vino. *Vigne e Vini* 7-8, 69-72.
- **Dubois P. (1984).** Quelques résultats récents concernant les constituants volatils des vins. *L'Enotecnico* 20, 15-22.
- **Dubois P., Brulè G., Ilic M. (1971).** Etude des phenols volatils de deux vins rouges. *Ann. Technol. Agric.* 20, 131-139.
- **Etievant P.X. (1981).** Volatile phenol determination in wine *J. Agric, Food Chem.* 29, 65-67.
- **Feuillat M., Radix A., Dubois P., Dekimpe J. (1981).** Contribution à l'étude des composés phénoliques et des composés volatils au cours de l'élevage des vins de Bourgogne et fûts de chêne. *Vignes et vins* 299, 5-10.
- **Froudiere I. et Larue F., (1998).** Condition de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. *Conn. Vigne Vin.*, 2, 296-303.
- **Fugelsang K., (1998).** *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins? *Biofutur*, Octobre, 182, 22-23.
- **Galzy P. et Rioux J.A., (1995).** Observations sur quelques vins atteints par la maladie de "la fleur" dans le midi. *Progrès Agric. et Vitic.*, 144, 365-370.
- **Gillis J-F., (1999).** Etude de contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. Thèse I.N.P. Toulouse. France.

- **Guilloy – Benatier N., D. Chassagne, H. Alexandre, Charpentier C., Feuillant M.** Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces / Dekkera* in wine. J. Int. Sci. Vigne Vin, 2001, 35, n°3, 157-164.
- **Heresztyn T., (1986) (a).** Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. Am. J. Enol. Vitic., 37, 127-132.
- **Heresztyn T., (1986) (b).** Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. Arch Microbiol., 146, 96-98.
- **Larue F., Rozes N., Froudiere I., Couty C., Ferreira G.P. (1991).** "Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins". J. Int. Scien. Vigne Vin, 25, 3, 149-165.
- **Licker J.L., Acree T.E., Henick-Kling T. (1999).** "Influence des levures *Brettanomyces* à l'arome du vin. Description sensorielle des vins avec d'arome Brett différents". 12^{ème} Symposium International d'Oenologie. Association Internationale d'œnologie et Gestion d'Entreprise. Montreal 31 Mai-2 Juin 1999.
- **Lonvaud-Funel A., (1999).** Les aspects microbiologiques de l'élevage des vins rouges en barriques. Vème Colloque des Sciences et Techniques de la Tonnellerie. Connaissances actuelles et avenir de l'élevage en barriques. 47-51.
- **Marenghi M., (2003).** L'impiego ragionato degli enzimi. Vigne Vini, 6, 53-55.

- **Ninimo N.E., Fontanot S., Caugnati G., (2003).** Quattro piccoli odori possono uccidere la qualità di un vino. *ERSA* 4, 13-16.
- **Peynaud E. et Domercq S., (1956).** Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv. Für Mikrob.*, 24, 8, 266-280.
- **Pretorius I. S., (2000).** Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- **Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., B. Doneche, A. Lonuvald (1998).** L'utilizzo delle preparazioni enzimatiche industriali in vinificazione, *Trattato di Enologia I*, 326-327.
- **Scheffers W. A. et Wikèn T. O., (1969).** The Custers effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek. Supplement: Yeast Symposium.*, 35, 31-32.
- **Wijsman M.R., Van Dijken J.P., Van Kleef B.H., Sheffers W.A. (1984).** "Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custer effects) ". *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 183-192.