

IL CARATTERE “Brett” NEL VINO

Indice

1. Cosa è e chi lo produce?

- Composti responsabili del carattere “Brett”: soglia di percezione e descrittori
- *Dekkera/Brettanomyces*: morfologia e metabolismo
- Schema biochimico della produzione degli etilfenoli.

2. Da dove vengono?

- Ecologia
- Fattori fisico-chimici che hanno effetto sullo sviluppo di *Brettanomyces*

3. Come determinarlo?

- Analisi microbiologico
- Analisi strumentale: gascromatografia
- Analisi sensoriale

4. Come prevenirlo?

- Controllo della contaminazione di cantina da parte di fonti esterne
- Valutazione dell’efficienza delle procedure di sanitizzazione
- Valutazione e controllo dei fattori fisico-chimici durante la fermentazione alcolica
- Valutazione e controllo dei fattori fisico-chimici durante la fermentazione malolattica
- Valutazione e controllo dei fattori fisico-chimici durante l’affinamento in legno

A cura di:

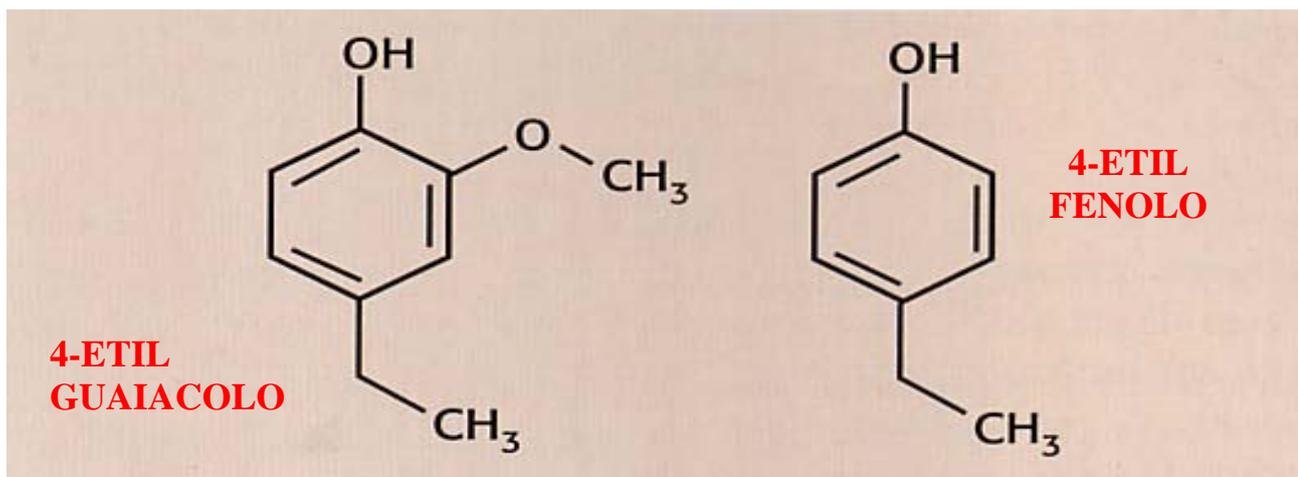
- **Ana María Moar Grobas**
Responsabile di laboratorio

1. Cosa è e chi lo produce?

Il carattere “Brett” è un descrittore introdotto nell’analisi sensoriale nell’anno 1997 (Licker et al) per definire gli aromi dovuti alla presenza di etilfenoli nel vino e riconducibili a pollina, scuderia, sudore di cavallo, pelle animale e cuoio. In particolare, il descrittore “plastico” include i caratteri tipici di “Brett”: sudore di cavallo, medicinale, plastica.

Il carattere “Brett” è dovuto alla presenza nel vino di una quantità superiore al valore della soglia di percezione del 4-Etilfenolo e il 4-Etilguaiacolo. I due composti sono presenti solitamente in rapporto 10:1

Recentemente è stato anche identificato il 1-etilcatecolo, dotato di una spiccata nota animale. Tutti questi composti sono maggiormente avvertibili alla degustazione quando il vino è meno strutturato e concentrato.



Nella seguente tabella sono indicati le soglie di percezione e i descrittori attribuiti:

COMPOSTO	Soglia di percezione µg/l	Descrittore
4-vinilfenolo	770	Chiodi di garofano (+) Medicina (-)
4-vinilguaiacolo	440	Speziato (+)
4-Etilfenolo	620	Stalla(-) Sudore di cavallo(-)
4-Etilguaicolo	140	Speziato (-) Affumicato (+)/Fumoso (-)
4-Etilcatecolo	//	Plastica bruciata (-) Canforato(-) Affumicato (+)/Fumoso (-)

Come si può osservare dei descrittori, alcuni di questi possono essere considerati come positivi da alcuni degustatori (simbolo +), soprattutto a basse concentrazioni; altri composti conferiscono al vino caratteri molto negativi (simbolo -). La modesta entità di queste concentrazioni non deve essere sottovalutata, perché sebbene molto bassa, è raggiungibile con facilità.

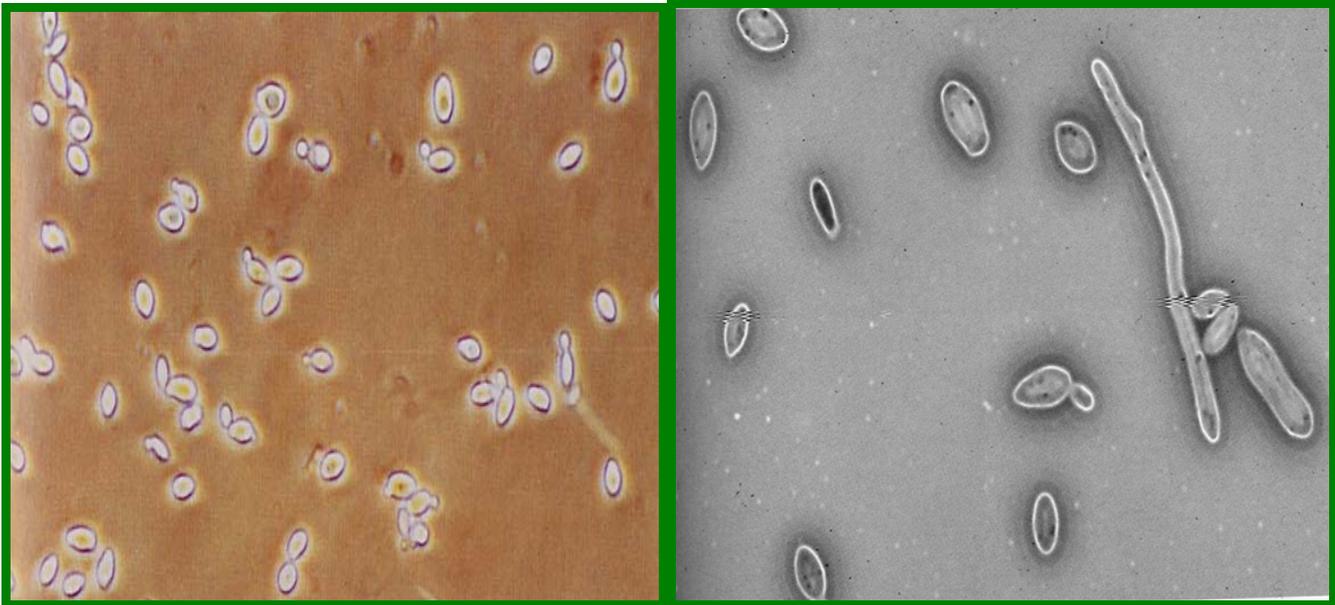
La comparsa del carattere “Brett” è dovuta allo sviluppo nel vino di lieviti appartenenti al genere *Dekkera*, denominati comunemente con il nome della forma asporigena *Brettanomyces*.

La nomenclatura del genere *Brettanomyces/Dekkera* ha subito nel corso degli anni una serie dei cambiamenti, conseguenti all'applicazione di metodiche tassonomiche sempre più avanzate e precise. Attualmente sono considerate valide 5 specie di *Brettanomyces/Dekkera*:

- *Brettanomyces nanus*
- *Dekkera aomala*
- *Dekkera bruxellensis*.- Denominata anche *D. intermedius* e *B. lambicus*
- *Dekkera custersianus*
- *Dekkera naardenensis*

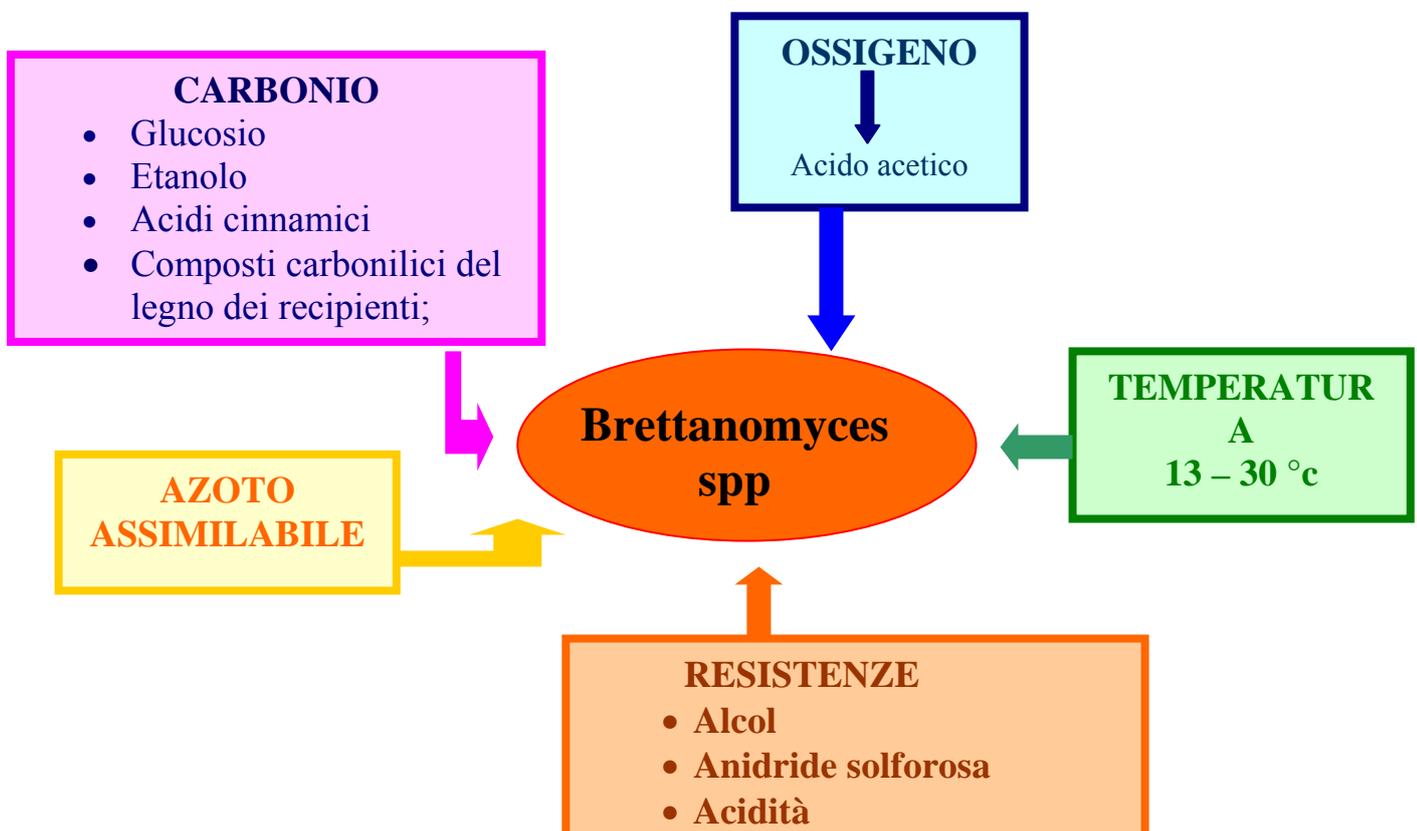
Tuttavia il lievito contaminante del vino conosciuto come *Brettanomyces* appartiene solamente alla specie *Dekkera bruxellensis*.

Nelle seguenti immagini al microscopio ottico sono mostrate delle cellule di *Brettanomyces spp*



Come si può osservare dalle immagini precedenti, le cellule di *Brettanomyces* presentano spesso forma ovoidale, possono presentare gemmazione multipolare e spesso forma un pseudomicelio unicellulare non settato.

Le esigenze nutrizionali di *Brettanomyces* sono indicate nel seguente schema:

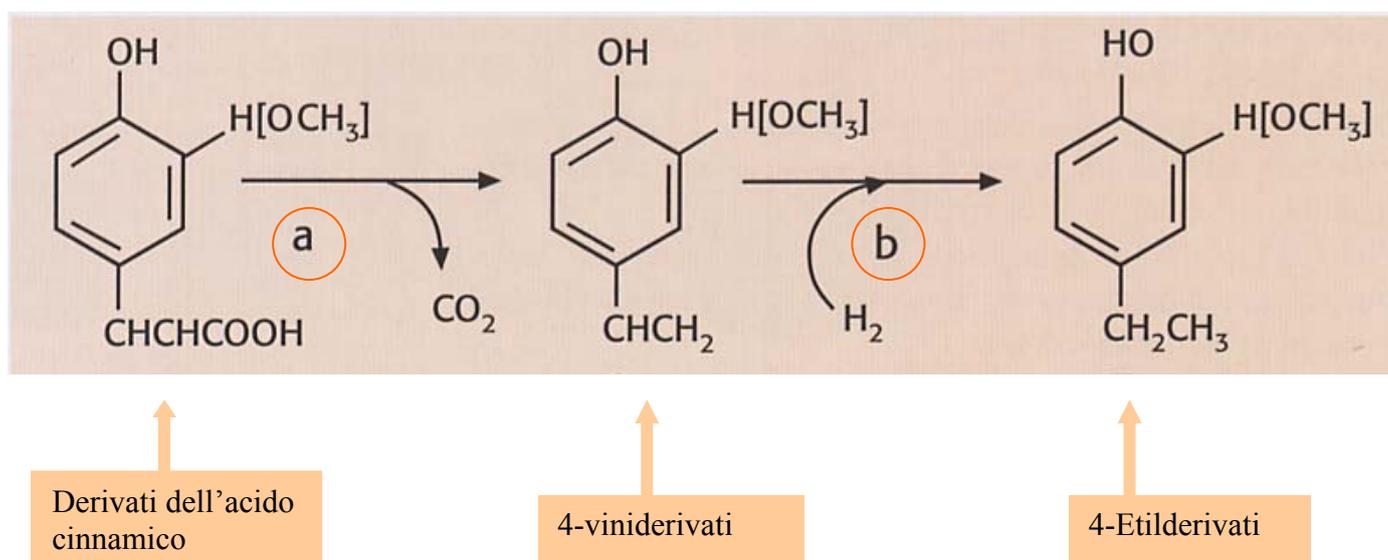


Le esigenze nutrizionali di *Brettanomyces* sono:

- **Carbonio:** glucosio, etanolo, acidi cinnamici e composti carbonilici del legno dei recipienti;
- **Ossigeno:** non è particolarmente esigente, sono sufficienti quantità piccolissime. L'attività fermentativa di *Brettanomyces* è stimolata dalla presenza dell'ossigeno, in condizioni aerobiche è inoltre osservabile una forte produzione di acido acetico.
- **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.

La via biosintetica che porta alla formazione dei fenoli volatili prevede come substrati gli acidi idrossicinnamici presenti già nell'uva ma l'enzima incaricato della reazione ha una provenienza diversa se si tratta di vini bianchi o rossi:

- **VINI BIANCHI.**- Si osserva soltanto la presenza dei vinilfenoli. La loro formazione dipende da reazioni enzimatiche che fanno intervenire la **CINNAMATO DECARBOSSILASI (a)** di *Saccaromyces*.
- **VINI ROSSI.**- La attività enzimatica della cinnamato decarbossilasi di *Saccaromyces* è inibitata dai polifenoli presenti nelle uve rosse. La stessa attività di *Brettanomyces* non è inibita dai polifenoli. Inoltre è specifica di *Brettanomyces* la attività **VINILFENOLI REDUTTASI (b)** che trasforma i vinilfenoli nei suoi etilderivati. Secondo le ultime ricerche attraverso l'attività di quest'ultimo enzima produrrebbe ATP (molecola in grado di conservare energia cellulare) in maniera analoga a quanto fanno i batteri lattici durante la fermentazione malolattica. Il 4-etilcatecolo è anche prodotto da *Brettanomyces* utilizzando però come precursore l'acido cafeico.

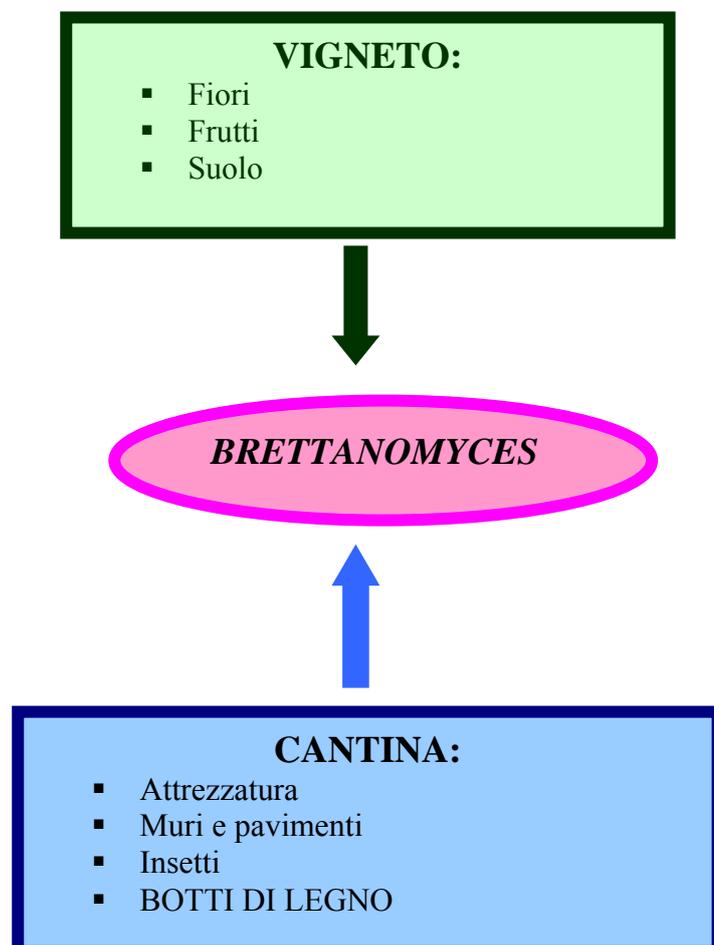


Oltre ai fenoli volatili, *Brettanomyces* produce quantitativi considerevoli di acido acetico (soprattutto in condizioni di aerobiosi => apporto di ossigeno) e acidi grassi di 8 e 10 atomi di carbonio così come i suoi rispettivi esteri etilici; tutti questi composti sono in grado di interferire con una regolare fermentazione alcolica.

2. Da dove vengono?

La cantina non è che il punto di arrivo di *Brettanomyces*. L'inquinamento può avere diverse origini:

1. **VIGNETO**.- La propagazione primaria inizia nel vigneto: fiori, frutti e lo stesso suolo sono l'habitat naturale di una vasta popolazione di microrganismi che varia stagionalmente come entità e diffusione (picco massimo di propagazione in autunno). Dal punto di vista agronomico, *Brettanomyces* non pregiudica in alcun modo la vegetazione della vite. Diventa però di primordiale importanza limitare l'inquinamento durante le operazioni di vendemmia e arrivo dell'uva in cantina.
2. **AMBIENTE DI CANTINA**.- Sono stati indicati come fonte di diffusione di *Brettanomyces*:
 - l'uso **d'attrezzatura contaminante**: pigiatrici, scarichi, tubi flessibili di trasferimento, presse, pompe di travaso, canali di scolo, valvole e macchinari per l'imbottigliamento.
 - **Muri e pavimenti** umidi della cantina
 - **Insetti**.- E' stata accertata la presenza di *Brettanomyces* sul corpo, sulle ali e sulle zampe di *Drosophila* così come nella sacca del nettare e nel tratto intestinale.
 - **Botti di legno**.- *Brettanomyces* ha una preferenza per il rovere che costituisce un ambiente ottimale per il suo sviluppo



I principali fattori chimico fisici che influenzano la crescita di *Brettanomyces* sono i seguenti:

1. **INTERAZIONE CON *Saccaromyces cerevisiae***.- *Brettanomyces* presenta una velocità di moltiplicazione molto ridotta rispetto a *Saccaromyces*. Alcune prove di sperimentazione hanno dimostrato che inoculando allo stesso tempo un vino con i due lieviti, dopo 30 ore *Saccaromyces* diventa maggioritario (95%) e la crescita di *Brettanomyces* viene fortemente inibita. Alla fine della fermentazione alcolica, con basse concentrazioni di zuccheri, *Saccaromyces* trova delle difficoltà per svilupparsi in presenza di *Brettanomyces*; fino a questo momento questo fenomeno veniva spiegato in funzione solo della concentrazione di acido acetico prodotto ma attualmente si ipotizza una competizione per una sostanza nutriente.
2. **NUTRIENTI**.- Se confrontato con *Saccaromyces*, *Brettanomyces* è molto meno esigente dal punto di vista nutrizionale; questo aumenta considerevolmente le sue capacità di sopravvivere fino a quando le condizioni ambientali diventino favorevoli.
3. **OSSIGENO**.- *Brettanomyces* è un lievito capace di svilupparsi in anaerobiosi ma la crescita e la fermentazione sono maggiori in presenza di ossigeno..

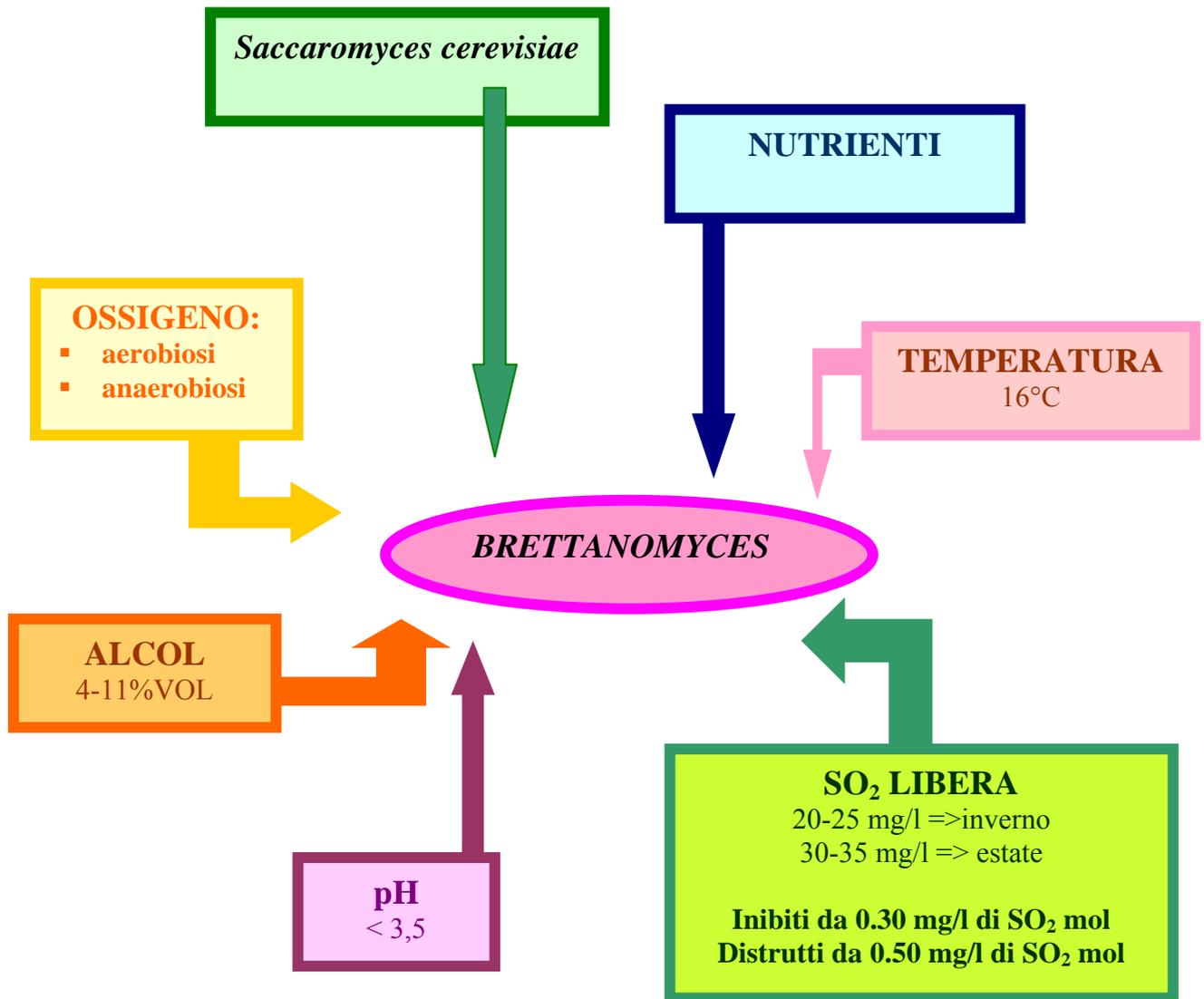
L'ossigenazione influenza positivamente sia la crescita e la fermentazione alcolica del lievito sia la produzione di 4-Etilfenolo. Livelli di O₂ superiore a 7 mg/l (saturazione del 82%) stimolano la crescita di *Brettanomyces* e sono responsabili della rapida produzione di fenoli volatili. Inoltre la presenza di O₂ stimola la produzione di acido acetico con il conseguente aumento della acidità volatile. In condizioni di anaerobiosi non avviene la produzione di acido acetico.

4. **TEMPERATURA**.- Studi sperimentali condotti a 16 e 30°C hanno dimostrato che una temperatura di crescita di 16°C riduce di molto la velocità di produzione di fenoli volatili rispetto a 30°C.
5. **ALCOL**.- Le colture di *Brettanomyces* non sono inibite da concentrazioni di alcol fino a 11% vol; tenori superiori d'alcol inibiscono la crescita anche se in minore proporzione rispetto a *Saccaromyces cerevisiae*.
6. **pH**.- Valori di pH superiori a 3,5 non influenzano la sua vitalità cellulare che viene drasticamente diminuita da pH inferiori.

Inoltre ad alti valori di pH bisogna aumentare la concentrazione di SO₂ per mantenere lo stesso potere antisettico (la solforosa molecolare è l'unica forma attiva e dipende del pH)

7. **ANIDRIDE SOLFOROSA LIBERA**.- L'unico intervento per limitare la crescita di *Brettanomyces* nei vini rossi affinati in botti è quella di mantenere una concentrazione sufficiente di SO₂ libera durante tutto il processo di affinamento: da 20 a 25 mg/l nelle stagioni fredde e 30-35 mg/l nella stagione estiva. **I *Brettanomyces* sono inibiti da tenori di SO₂ molecolare intorno a 30 mg/l e distrutti da tenori intorno a 0.5 mg/l**

Questo lievito può resistere ai trattamenti delle botti con SO₂ (fino a 500 mg/l contro 100 mg/l che inibiscono la maggior parte di lieviti e batteri); è in grado di penetrare dentro della struttura cellulare delle doghe di legno formando un biofilm in grado di sopravvivere al trattamento di sanitizzazione.



Da tutti questi fattori si può dedurre che sono spesso i vini più ricchi e più ricercati qualitativamente ad essere maggiormente dotati di substrato per lo sviluppo dei *Brettanomyces*: elevato grado alcolico, generati quindi di uva più mature dal punto di vista tecnologico e polifenolico, a bassa acidità totale, frutto di lunghe macerazioni e con un tenore basso in anidride solforosa solforosa

3. Come determinarlo?

Ci sono tre metodi per determinare la presenza di carattere "Brett" e di *Brettanomyces*:

- 1. ANALISI MICROBIOLOGICO.**- Come in tutti i controlli microbiologici, il campionamento riveste un ruolo fondamentale e deve essere effettuato su masse le più omogenee possibile ed in maniera sterile, utilizzando materiale plastico asettico o sterilizzato con vapore.

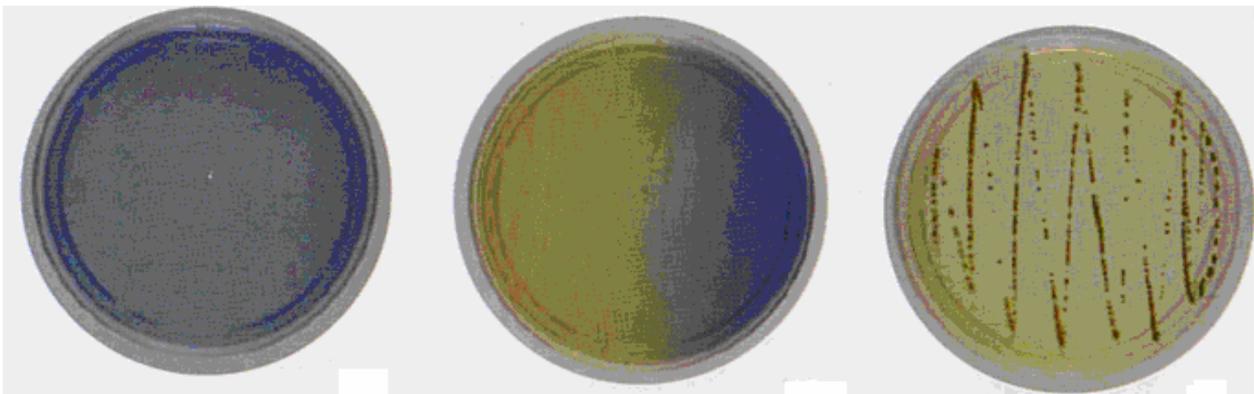
Attualmente il metodo più diffuso è la coltura su terreno solido selettivo agarizzato (Scatola Petri) specifico per *Brettanomyces*, dove oltre agli indicatori degli acidi organici (acetico in particolare), sono presenti anche rivelatori specifici dell'attività del microorganismo (precursori dei fenoli volatili). La maggiore selettività è fornita dai terreni che presentano l'etanolo come unica fonte di carbonio e un antibiotico come agente inibitore.

Questi terreni di coltura possono essere utilizzati con differenti metodiche di semina:

- Semina diretta per inclusione o adsorbimento su piastra del campione o le sue diluizioni (aspetto fondamentale per i vini non microfiltrati)
- Filtrazione su membrana da 0,45 µm e la sua deposizione sul terreno di coltura stesso (per i vini microfiltrati)

La morfologia caratteristica di questo lievito permette di identificarlo una volta isolato osservandolo al microscopio in campo chiaro: in funzione del suo ceppo di appartenenza le sue colonie presentano una morfologia differente. Inoltre, le cellule appartenenti alla stessa colonia presentano un elevato polimorfismo alternando forme ogivali o a forma di proiettile con altre leggermente cilindriche. La gemmazione può essere multilaterale o bipolare e qualche volta si osserva un pseudomicelio non settato.

E' importante inoltre segnalare che per quanto un terreno sia specifico, è probabile che permettano la crescita di altri lieviti. Per questo è molto importante che il personale tecnico sia qualificato e addestrato per valutare, in base a parametri oggettivi (morfologia cellulare e delle colonie e tempo necessario al loro sviluppo), la presenza ed entità della contaminazione da *Brettanomyces*.

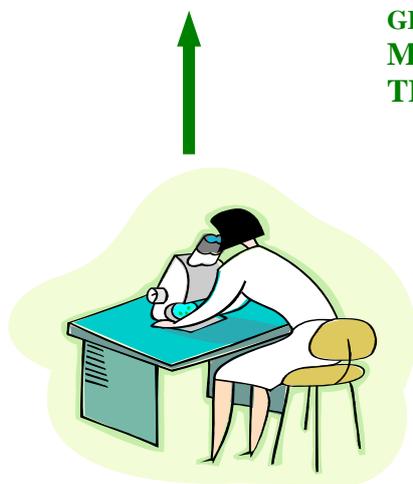


TERRENO DI COLTURA SPECIFICO E SELETTIVO

- Etanolo come fonte di carboni
- Antibiotico come inibitore

IDENTIFICAZIONE

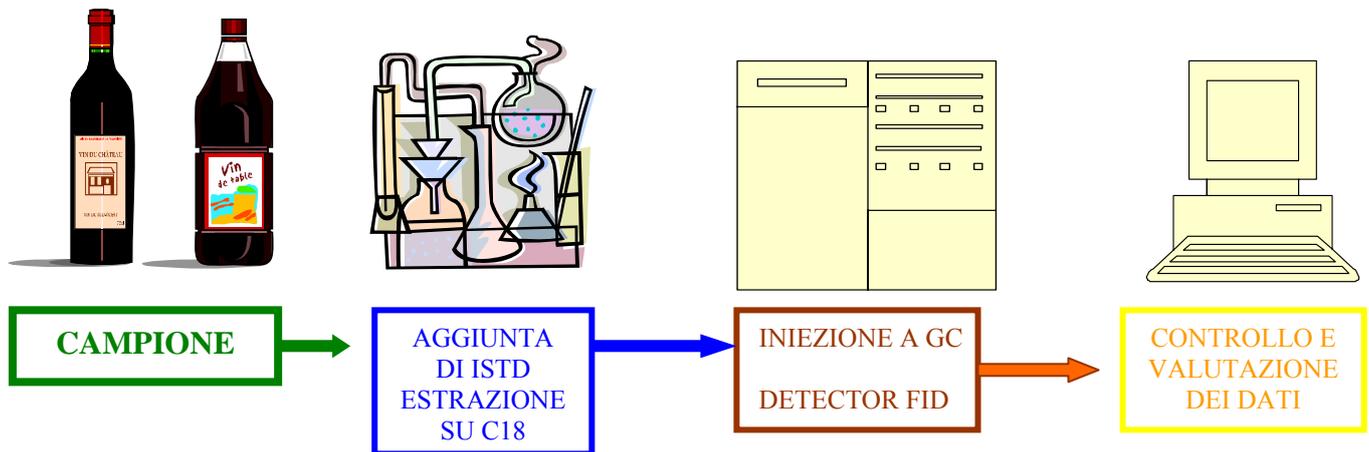
=> **MORFOLOGIA CELLULARE: POLIMORFISMO,
GEMMAZIONE E PSEUDOMICELIO
MORFOLOGIA COLONIE: TIPOLOGIA CEPPO
TEMPO DI SVILUPPO**



**PERSONALE TECNICO
QUALIFICATO E ADDESTRATO**

2. ANALISI STRUMENTALE.- Si basa nella determinazione per gascromatografia dei fenoli volatili. Il composto più rappresentativo il **4-Etilfenolo**.

Il 4-Etilfenolo viene trattenuto su di una cartuccia di C18; in seguito viene fluito con diclorometano e determinato quantitativamente per gascromatografia con l'utilizzo di un standard interno (sostanza estranea al vino che viene aggiunta, in concentrazione nota, al campione al inizio del processo di estrazione)



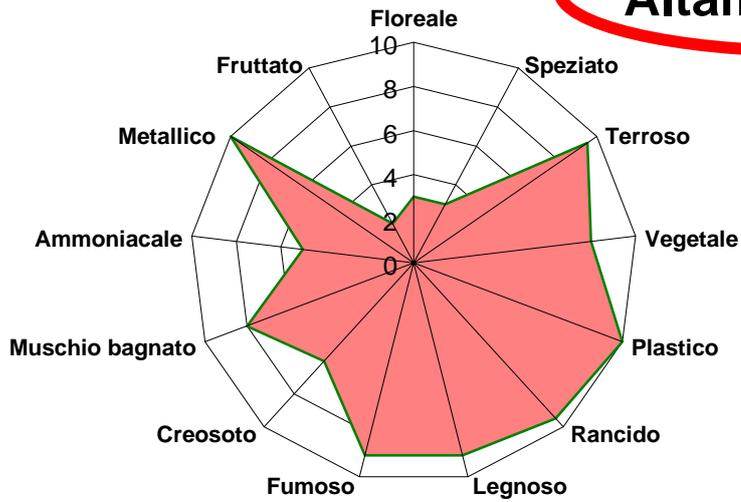
3. ANALISI SENSORIALE.- L'analisi sensoriale può essere utilizzato come metodo di controllo mediante la ricerca organolettica dei composti responsabili del carattere "Brett". Bisogna però ricordare che questi composti sono maggiormente percepibili quando il vino è meno strutturato e concentrato.

Al analisi sensoriale, in funzione del carattere "Brett", i vini possono dividersi in tre categorie:

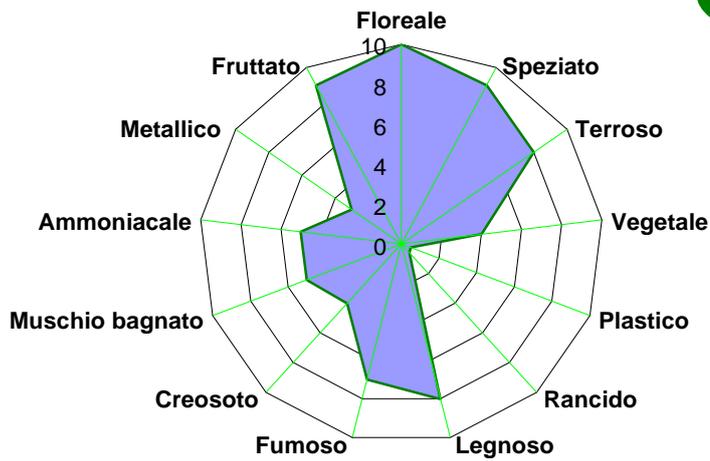
- **No Brett.**- Predominano i caratteri fruttato, speziato, floreale, terroso, legnoso. Non risultano caratteri associabili alla plastica.
- **Altamente Brett.**- Predomina i caratteri associabili alla plastica, rancido, fumoso, creosoto..., tutti caratteri negativi
- **Mediamente Brett.**- Presentano caratteristiche intermedie

Nei grafici mostrati a continuazione si possono confrontare i risultati condotti su vini con difetti causati da *Brettanomyces*. I membri di questo panel hanno concordato di attribuire al descrittore "plastico" i caratteri tipici di "Brett": sudore di cavallo, plastica, medicinale.

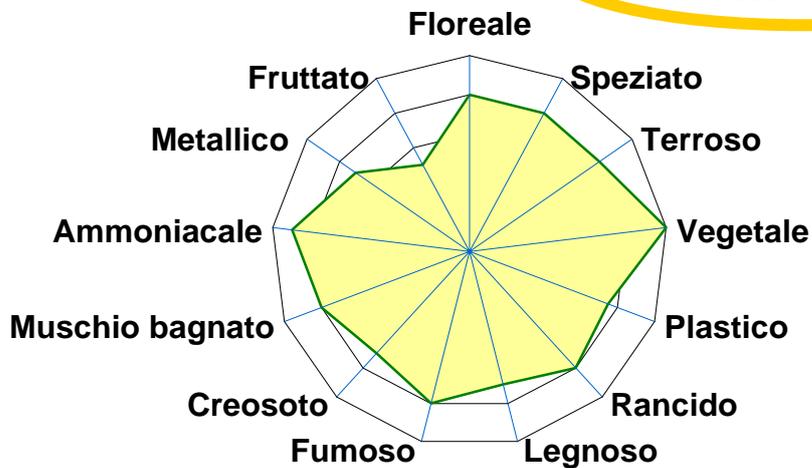
Altamente Brett



No Brett



Mediamente Brett



4. Come prevenirlo?

Si può considerare il *Brettanomyces* come un lievito da contaminazione, in quanto solitamente non è presente nel vino. Come tutti i problemi di natura microbiologica, anche per la prevenzione dell'insorgenza del "Brett" occorre determinare in primo luogo i punti critici il cui controllo è assolutamente necessario. Questi si possono suddividere in 5 aspetti:

1. CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DELLA CANTINA DA PARTE DI FONTI ESTERNE.-

Solitamente, anche se di gran importanza, viene sottovalutato. In generale sarebbe opportuno valutare ogni prodotto in entrata alla cantina per valutare il rischio potenziale dell'inquinamento.

E' molto importante fornire indicazioni su come effettuare le operazioni di raccolta e di conferimento delle uve. In questa maniera si potrebbe, per esempio, evitare che l'uva rimanesse a lungo sul trattore con il pericolo di inquinamento ed sviluppo dei lieviti selvaggi presenti sul uva raccolta.

Uno strumento di controllo molto efficace e piuttosto diffuso in altre zone vinicole è il controllo, al arrivo dei vini di provenienza esterna in cantina, degli fenoli volatili oltre alla ricerca microbiologica dei *Brettanomyces*.

2. VALUTAZIONE DELL'EFFECIENZA DELLE PROCEDURE DI SANITIZZAZIONE.-

La ricerca periodica del microrganismo all'interno degli strumenti comunemente utilizzati in cantina permette l'individuazione di possibili punti critici. Il monitoraggio all'interno delle vasche prima e dopo il trattamento permette di definire se questo è stato effettuato correttamente.

Per quanto riguarda i contenitori di legno, per evitare il problema *Brettanomyces* bisogna adottare un protocollo di igiene molto mirato di cui verrà poi controllata la sua efficacia. Le barriques devono essere lavate, sgocciolate e pio trattare con dischetti di zolfo che bruciando, in condizioni ermetiche, sterilizzeranno le doghe. Inoltre prima dell'utilizzo andranno nuovamente lavate con prodotti adeguati a sanificare il legno.

3. VALUTAZIONE E CONTROLLO DEI FATTORI FISICO-CHIMICI DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA.-

Bisogna tenere presente che numerosi studi hanno riscontrato la presenza di *Brettanomyces* nella microflora dei mosti in fermentazione. Raramente sono predominanti ma posso prendere il sopravento con l'avvio stentato con gli arresti della fermentazione. A questo punto può essere interessante tenere sotto controllo tutti i parametri che possono contribuire a garantire una corretta fermentazione di *Saccaromyces*:

- **temperatura**,
- apporto corretto di **ossigeno** (microossigenazione o rimontaggio).- Una microossigenazione condotta correttamente non porta al accumulo di ossigeno a patto che nel corso del processo non si superino valori di 50 – 80 ppb di O₂, valori microbiologicamente ininfluenti Attenzione ai travasi perché aumenta il rischio di contaminazione attraverso il trasferimento e il pompaggio del vino.
- **nutrienti**, soprattutto riferito alle sostanze azotate (Azoto prontamente assimilabile)

A questo punto conviene utilizzare **preparati enzimatici industriali** (per migliorare la qualità del mosto e l'estrazione del colore nella vinificazione in rosso) purificati della sua attività cinnamil esterasica; questo enzima è responsabile dell'idrolisi degli esteri tartarici degli acidi cinnamici del mosto.

Studi sperimentale effettuati confrontando un campione trattato un enzima pectolitico con attività cinnamato esterasa con un altro campione aggiunto di un enzima purificato hanno riscontrato un aumento fino al 50% di fenoli volatili del primo campione rispetto a quello dove non era presente l'attività cinnamato esterasa.

Inoltre, bisogna tenere in considerazione che il *Brettanomyces* per il suo sviluppo può utilizzare **tracce di zuccheri**, anche in ambiente anaerobico stretto. La fermentazione di una quantità di zuccheri (glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, saccarosio) intorno a i 0,3 g/l è sufficiente per indurre la formazione di etilfenoli in una concentrazione pari alla sua soglia di percezione (circa 425 µg/l)

4. VALUTAZIONE E CONTROLLO DEI FATTORI FISICO-CHIMICI DURANTE LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA.- Il primo punto in cui è importante incominciare a controllare la presenza di *Brettanomyces* è tra la fine della fermentazione alcolica è l'avvio della fermentazione malolattica. Durante questa fase utile effettuare il controllo almeno una volta al mese e realizzare un'analisi precoce del 4-Etilfenolo per disporre di un riferimento analitico.

Inoltre, in questa fase può essere interessante tenere sotto controllo tutti i parametri che possono contribuire allo sviluppo di questo lievito:

- **Temperatura:** ha un effetto positivo.
- **pH:** valori superiori a 3,5 hanno un effetto positivo
- **Alcol:** ha un effetto negativo
- **SO₂:** deve comunque essere mantenuta a livelli tra 20 e 25 mg/l

Dal punto di vista microbiologico e biochimico, bisogna ricordare l'influenza negativa della fermentazione malolattica sulla crescita di *Brettanomyces*: probabilmente i **batteri lattici sono in competizione per le sostanze nutritive**.

La chiusura della **fermentazione alcolica stentata o di malolattica difficile** creano le **condizioni adatte allo sviluppo di *Brettanomyces***. In queste condizioni i vini si lasciano spesso per lunghi periodi a temperature più elevate, con livelli basi di SO₂ ed in presenza di zuccheri. Se in queste condizioni i vini vengono a contatto con questo lievito si avvertirà in breve tempo il carattere "Brett" dovuto alla presenza di etilfenoli. In questo caso è certamente preferibile solfitare e filtrare su 0,45 µm prima di reinoculare, alla fine di prevenire l'alterazione di tutta la massa.

Un altro punto chiave da tenere sotto controllo è la fine della fermentazione malolattica.

5. VALUTAZIONE E CONTROLLO DEI FATTORI FISICO-CHIMICI DURANTE L'AFFINAMENTO IN LEGNO.- L'affinamenti in legno non è obbligatoriamente sinonimo di contagio, ma certamente l'impiego di **legno non nuovo**, mal conservato, in cantine poco adatte (temperatura ed umidità non idonee), colmature e travasi non tempestivi e con cattiva disinfezione dei fusti, rappresentano un insieme di fattori che favoriscono lo sviluppo di questi lieviti inquinanti.

Nel caso di **barriques nuove** la contaminazione è meno frequente. Sicuramente al arrivo in cantina sono essenti di *Brettanomyces*. Purtroppo alcuni fattori come il loro maggiore potenziale di ossidazione o il maggior consumo di vino hanno sì che il consumo di SO₂ sia più rapido e ciò le rende più facilmente attaccabili. A questo punto è molto importante la gestione della solforosa che è riconosciuto come il mezzo più potente per il controllo di questo lievito.

Per le **grandi masse di vino in stoccaggio** solo la ripetizione del controllo (microbiologico o la più veloce ricerca del 4-Etilfenolo) **ogni 1 – 2 mesi** permette di cautelarsi sufficientemente dall'insorgenza di una contaminazione di *Brettanomyces*. Per quanto riguarda alla **barrique**, l'analisi dovrebbe essere effettuata con **cadenza mensile** inizialmente su ognuna e successivamente si potrebbero raggruppare (massimo 5 barriques per ogni gruppo) mantenendo ogni gruppo ben identificato per individuarlo immediatamente nel caso di risultato positivo.

E' bene tenere in conto che l'analisi puntuale di un vino in barrique, il cui potenziale prezzo sia pari ad almeno 3,60 € a bottiglia non incide che per l'1% del suo valore. Ovviamente, tanto maggiore è il prezzo del vino, minore sarà l'incidenza del costo dell'analisi. Per contro il deprezzamento in seguito all'eventuale contaminazione potrebbe essere di gran lunga superiore (si potrebbe arrivare alla totale contaminazione della cantina con una perdita totale del vino in stoccaggio).

La strategia di solfitazione e di filtrazione di un vino rosso di pregio all'imbottigliamento non dovrebbe prescindere della valutazione e dei controlli dell'eventuale contaminazione di cellule di *Brettanomyces*.



