

LA PRESENZA, LA CRESCITA E GLI EFFETTI SULL'AROMA DEL VINO DI BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS

Torey ARVIK, Thomas HENICK-KLING

Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY

Brettanomyces bruxellensis può formare in alcuni vini rossi odori che ricordano la coperta di cavallo posta in una scatola metallica Band-Aids®. Alcuni, o una combinazione di tutti questi sapori e aromi possono essere trovati nei vini che contengono tale lievito. *Dekkera/Brettanomyces* sono noti e si trovano in alcuni ambienti particolari, quali la linfa degli alberi, caseifici, fabbriche di birra e soprattutto nelle cantine.

Vi sono cinque specie conosciute di *Dekkera/Brettanomyces*: *D. (B.) bruxellensis*, *B. custersianus*, *D. anomalus*, *B. naardenensis*, and *B. nanus*.³ Questi generi vennero riclassificati dopo aver avuto diversi sinonimi nel corso della storia della micologia. L'analisi della sequenza genica e i test biochimici tradizionali sono stati usati recentemente per riclassificare questo gruppo.

Qual è la differenza tra *Brettanomyces* and *Dekkera*? Per rispondere a questa domanda, occorre avere qualche conoscenza sul sesso dei lieviti.

Dekkera, che produce le spore quando la situazione diventa difficile, è la forma sessuale "perfetta" di *Brettanomyces*, dal punto di vista micologico. Quindi, il lettore troverà sovente nella letteratura il nome "*Dekkera/Brettanomyces*" per descrivere questo dualismo.

Concentriamoci sul termine *Brettanomyces*, dato che solo pochissime persone fortunate hanno avuto l'opportunità di osservare la forma *Dekkera* nel vino.⁷ *Brettanomyces bruxellensis* è stato isolato in un vino di 10 anni! Non è sorprendente per un microbiologo, ma gli enologi si spaventano al solo pensiero.

Sorprendentemente, nel periodo in cui si trovano in barrique o in bottiglia, *Brettanomyces* può fermentare piccole quantità di zuccheri, se ha a disposizione piccole quantità di ossigeno. Si suppone che *Brettanomyces* cresca attivamente nel vino per un breve periodo, sebbene nessuna ricerca abbia evidenziato questa ipotesi in modo diretto. "Brett" non può crescere attivamente in modo indefinito.

Comunque c'è un'ipotesi secondo la quale *Brettanomyces* (come moltri altri microorganismi) può rimanere vitale, ma non capace di formare colture (VNC) per lunghi periodi di tempo. In tale stato, le cellule, che non possono essere osservate tramite metodi colturali standard, continuano a metabolizzare nutrienti che trovano nel mezzo e sono quindi considerate vive. Questo è piuttosto comune per quei microbi specializzati considerati patogeni dell'uomo ed è stato osservato recentemente nei batteri del vino.⁸

Detto ciò, cosa si può dire circa il *B. bruxellensis* isolato nel vino di 10 anni? Probabilmente, si trattava di spore o cellule VNC che erano in una sorta di stasi dovuta alle condizioni ambientali. Entrambi gli stati fisiologici rimarrebbero vitali per molti anni alle condizioni moderate di stoccaggio di un vino rosso. Esse emergono quando si trovano in terreni colturali ricchi, cioè quando le condizioni ambientali sono adatte.

Cosa sta facendo "Brett" nel mio vino?

Fino a poco tempo fa, pronunciare la parola "Brett" tra gli enologi significava fare osservazioni denigratorie sulla loro stirpe. Adesso, pare che gli enologi desiderino discutere su questo tema in modo meno difensivo. Dopo tutto, vi sono vini rossi ritenuti di alto livello, che sono esempi eccellenti di "Brettiness" grazie ai loro aromi specifici. Gli enologi stanno imparando a riconoscere questi aromi complessi e a capire come si formano nel vino. Grazie alla migliore comprensione dell'ecologia di Brett e della formazione dei cattivi odori, si spera che gli enologi saranno in grado di controllare la formazione di questi odori nel vino.

Molte cantine hanno avuto l'esperienza di *Brettanomyces*, cercando di controllarlo. Numerose cantine ci hanno fatto giurare segretezza sul loro "problema di contaminazione". Alcuni affermavano che stavano "lavorando con Brett" per cercare vini più complessi, ma per alcuni vini rossi era un problema gravissimo. Un lavoro identificò due ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* indigeni della cantina che si alternarono in tre vendemmie.^{1,10}

Recentemente, l'atmosfera intorno a *Brettanomyces* nell'industria del vino è cambiata. I giornalisti e scrittori in campo enologico hanno rimproverato gli enologi californiani di essere troppo "igienisti". Alcuni si sono spinti nel dire che gli odori e sapori Brett nel vino sono desiderabili, come evidenziato dall' esorbitante quantità di denaro pagato per quelle bottiglie che avevano il "carattere tipico di un Bordeaux classico". Il dibattito è cominciato e gli enologi con cui abbiamo lavorato non sono affatto contenti della perdita di fruttato e degli aromi varietali causata da un problema facilmente risolvibile.

Qual è la storia di *Brettanomyces*?

Le specie di *Brettanomyces* hanno una lunga storia di aneddoti che li collega a diversi cibi. Le cronache dell'industria enologica riportano diversi nomi (e scoperte) per lo stesso organismo negli ultimi 110 anni.¹ Vi sono numerosi articoli in letteratura che descrivono la contaminazione di diverse bevande, in particolare del vino e della birra che contengono molti lieviti nelle bottiglie e che presentano odori cattivi (soprattutto i vini rossi).¹¹

Un autore descriveva l'uso brevettato di *Brettanomyces* nella fermentazione secondaria di birre particolari. Il nome *Brettanomyces* venne dato ufficialmente al lievito "Torula-similare" che venne caratterizzato da N. Hiltje Clausen, nel 1904, quale responsabile della produzione delle "vere birre inglesi".²

La storia di Clausen è la seguente: l'utilizzo in Inghilterra di colture starter pure di *Saccharomyces* rovinò completamente l'aroma delle birre. I chimici di tutto il mondo si chiedevano perché gli inglesi non potessero riunirsi per produrre le stesse birre ale con il nuovo sistema mono-lievito.

Clausen dimostrò sperimentalmente che *Brettanomyces* effettuava fermentazioni secondarie nelle botti e quindi era responsabile della produzione del tipico carattere inglese delle birre ale. La birra viene descritta in modo ironico come "simile al vino". E' interessante notare che i produttori di birra possono acquistare ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* (a.k.a. *B. lambicus*) dalle aziende produttrici di lieviti starter che danno la stessa espressione caratteristica "vinosa" delle birre ale inglesi e belghe.

Vi sono pochi descrittori positivi dei composti derivanti da *Brettanomyces bruxellensis* nei vini rossi. Alcune qualità "simili al vino" di birre particolari vengono descritte nei vini rossi con i termini "medicinale", "animale", "calza sudata", "stalla", "fumo", "metallico", "Bandaid®," e "speziato".^{1,12}

Comunque, alcuni descrittori come il "chiodo di garofano", "fumo" e "speziato" sono estremamente ricercati nell'aroma "floreale" e "fruttato" tipico del Cabernet Sauvignon, Merlot o del Cabernet Franc. Nei vini che hanno meno intensità (con minor corpo e estratti), il "brettiness" può diventare troppo preponderante e quindi può rovinare il valore del prodotto finale.^{12,17}

C'è un'altra considerazione: poche persone sono in grado di percepire tutte le sfaccettature del tipico difetto Brett nei vini rossi. Alcuni sentono l'odore medicinale del 4-etilfenolo e poco l'odore di "mela verde" e di "capra bagnata" degli acidi valerico e isovalerico, prodotti in diverse quantità.^{1,13,17} Altri percepiscono un odore di "animale" e di "stalla".^{1,13}

Poche persone sentono in bocca l'odore di "topo" o di "crosta di pane", che vengono prodotti dall'ossidazione delle acetil-tetraidropiridine volatili.^{14,24} E' importante notare che il carattere di topo di un vino probabilmente ha una correlazione meno stretta con *Brettanomyces* che con altri batteri.¹⁴

Paul Henschke dell' Australian Wine Research Institute aggiunge: "In tutti i nostri anni di lavoro con vini che fanno di topo, siamo stati in grado di sentire il cattivo odore di topo in un solo caso catastrofico, in cui il vino era incredibilmente volatile e fuori scala per i fenoli volatili."

Nessuno degli attributi considerati poteva essere descritto come positivo. Comunque, come detto precedentemente, un vino pieno e complesso si può ottenere con piccole quantità di singoli odori malsani, se il contesto è corretto.

Questo porta a credere ai racconti degli enologi, quando descrivono le loro numerose esperienze con Brett. “Sembra che il ceppo che avevo stesce operando bene nel mio vino; poi forse mi è arrivato un altro ceppo l'anno scorso e tutto ha iniziato ad avere cattivo odore.” I ceppi di *B. bruxellensis* sono buoni o cattivi?

Dopo aver incontrato numerosi enologi ad un seminario “Mega-Brett” sponsorizzato da Vinquiry in Santa Rosa, CA, nel 2001, sembrava che l'industria avesse deciso di indagare sull'ipotesi “ Brett buoni contro Brett cattivi”.

Il nostro laboratorio ed altri stanno cercando di caratterizzare lieviti di tutto il mondo con diverse tecnologie, per vedere se esistono ceppi che possono conferire buoni aromi Brett (fumo, speziato) o che danno solo cattivi odori.

Come lavora *Brettanomyces*?

Come tutti i superstiti, *Brettanomyces* mangia quello che trova. Come ci si può aspettare, tanto più l'ambiente è selettivo, tanto più facile è per un microorganismo tollerante competere con successo con i suoi rivali per le risorse limitate.

Con *Brettanomyces bruxellensis*, piccole quantità di zuccheri fermentescibili (0.1 g/L) e concentrazioni elevate di etanolo (fino al 14%) possono fungere da combustibile.^{1,4} Una piccola quantità di ossigeno è richiesta per la crescita di Brett nel vino.^{1,4,14} Brett può produrre 2.0 g/L di acido acetico prima che la crescita venga seriamente compromessa.¹⁶ Questo è il motivo per cui è difficile predire quello che può capitare in bottiglia a un vino non filtrato.

Il peggior composto associato a Brett è il 4-etilfenolo. Vi sono almeno 10 nuovi composti che possono rilasciare aromi simili di “plastica” e tra questi troviamo il 4-etilguaiacolo, con odore di “fumo” e di “speziato” in alcuni vini.¹

La produzione del 4-etilfenolo dall'acido p-cumarico viene svolta in brevi passaggi. Il p-cumarato viene degradato a 4-vinilfenolo, un composto con una elevata soglia di percezione. Non è insolito, anche per *Saccharomyces cerevisiae*, produrre il 4-vinilfenolo durante la fase di fermentazione attiva, non nelle stesse quantità di Brett.^{13,17} Il passo finale, in cui il 4-vinilfenolo si trasforma in 4-etilfenolo, è tipica di *Brettanomyces*. Si pensa che questa conversione avvenga in modo continuo nell'arco di diversi mesi, sebbene nessuno conosca ancora esattamente l'intera fisiologia (vedi Boulton, R., B. et al., 1996).

Osservazioni fatte in cantine e laboratori hanno mostrato che le condizioni di crescita, le concentrazioni di diversi cofattori, il numero di lieviti e la temperatura nel contenitore contaminato influenzano la produzione di cattivi odori.^{1,9,10,17}

Vi sono due ipotesi per spiegare il motivo per cui *B. bruxellensis* decarbossila il 4-vinilfenolo a 4-etilfenolo. Secondo una teoria *Brettanomyces* ricava energia dalla trasformazione sotto forma di un piccolo gradiente di elettroni con produzione di una piccola quantità di ATP. Questa teoria ci sembra valida poiché *Oenococcus oeni* fa la stessa cosa con la conversione dell'acido malico in acido lattico ottenendone lo stesso beneficio.¹⁸ Si può teorizzare che si possa sviluppare un gradiente di ioni H⁺ e che l'eccesso venga usato per formare ATP.

Secondo l'altra teoria, Brett detossifica il p-cumarato tramite la decarbossilazione e riduzione a 4-vinilfenolo. Dopo tutto, se lo fa *S. cerevisiae*, perché non *Brettanomyces bruxellensis*? Non vi sono evidenze in letteratura che possano confermare tali ipotesi. Quindi, il problema del “perché” deve essere approfondita. La linea di fondo è che sarebbe utile effettuare molti studi sugli aspetti fisiologici di base di molti ceppi.

Dove è stato trovato *Dekkera/Brettanomyces*?

Brett è ubiquitario. Ciò vuol dire che si cerca seriamente lo si può trovare in qualsiasi parte del mondo. Nei vigneti, nell'acqua, nel terreno, nel mosto d'uva, in una stanza fredda, nelle vasche di fermentazione, sui pavimenti di cemento e nelle barrique.

Brettanomyces bruxellensis si stabilisce in una cantina, quando l'igiene della cantina non è sotto controllo, quando la SO₂ non viene usata correttamente, quando le barrique o contenitori infettati vengono trascurati e si lascia che l'ossigeno venga assorbito dall'aria. *Brettanomyces* è unico nell'utilizzare "l'effetto Custer," un modo per completare la fermentazione alcolica in presenza di piccole quantità di ossigeno.^{1,4,15}

Non dobbiamo dimenticare l'effetto fungistatico della SO₂ su Brett. Mantenendo 80ppm di SO₂ totale (≤ pH 3.5) la crescita di Brett viene fermata. Inoltre, la temperatura è critica. La crescita è molto più veloce sopra a 20°C e si ferma sotto gli 8°C. La filtrazione può eliminare fisicamente Brett. Gran parte del problema dei vini Brettly deriva dal fatto che alcuni enologi seguono la moda di imbottigliare i vini senza filtrazione.

Brett può essere monitorato, ma non controllato. Le barrique che non sono controllate e che non vengono colmate frequentemente sono suscettibili a crescite incontrollate di *Brettanomyces*. Gli enologi potrebbero voler considerare quello che è successo all'industria europea del bestiame.

Se si va in Europa adesso, in certi casi chiedono di camminare in un bagno disinfettante dei piedi per prevenire la diffusione di virus ed altri microorganismi potenzialmente dannosi. La stessa cosa dovrebbe capitare nelle cantine. Occorre pensare ai posti dove sono stati i piedi e bisognerebbe togliere le scarpe.

Quando si usa una canna per pulire il pavimento dal mosto o dal vino, i microbi sotto forma di aerosol vanno nell'aria e sui muri, nelle barrique. Possono viaggiare anche quando gli enologi visitano posti altamente inquinati senza disinfettare le loro scarpe e cambiare i vestiti prima di lavorare con il vino.

Non stiamo dicendo che le cantine debbano diventare stanze pulite. Comunque, piccole precauzioni potrebbero far diminuire l'incidenza della contaminazione. Se un giorno si lavora in cantina e il giorno seguente si va in un altro posto, non si dovrebbe entrare in cantina dopo aver maneggiato altre attrezzature o dopo aver visto un'altra cantina o uve, senza interrompere il ciclo che potrebbe introdurre nuovi organismi nelle zone di vinificazione. Brett può entrare con le uve ma può essere ucciso da una corretta vinificazione e dalle opportune pratiche di sanificazione. Non c'è nessun bisogno di introdurre i lieviti di un'altra cantina nella propria.

Vi sono alcune indicazioni che Brett entri nelle cantine con l'uva. Il fatto che sia presente in piccole quantità rende difficile l'isolamento. Con un tempo sufficiente si svilupperanno in un numero tale da dare problemi. Ancora più comune è l'entrata con vino o barrique di altre cantine.

Il problema più importante è che Brett aspetta l'occasione migliore per emergere. Una popolazione piccola di Brett potrebbe aspettare in una barrique o altrove nell'ambiente della cantina le condizioni adatte per la crescita!

Se si ha a che fare con infezioni di *Brettanomyces* in una o due barrique, occorre isolarle e usare attrezzature diverse e dedicate (se possibile) per effettuare le operazioni necessarie. Se possibile, occorre filtrare il vino delle barrique e pulire le barrique prima di aggiungere lo zolfo. Si potrebbe immagazzinare il vino filtrato in un altro recipiente per qualche tempo e forse considerare di usarlo (dopo aver controllato la sua stabilità) per un taglio.

Il lavoro di Mark Sefton et al. Ha mostrato che le barrique, infettate con *B. bruxellensis* non possono essere sterilizzate efficacemente.²³ Né un attento lavaggio e sciacquatura con acqua solfitata, né la raschiatura o la ritostatura, né un trattamento con l'ozono riesce a sterilizzare una barrique. Non tutti i Brett possono essere rimossi o uccisi, in quanto il volume interno è molto ampio e il legno è poroso.^{7,23}

Anche la NASA condivide un problema simile a quello degli enologi: quando si verifica un incidente nel corso di una missione (o vendemmia), può essere disastroso e irrecuperabile. Per questa ragione, gli ingegneri della NASA hanno sviluppato l'Analisi dei Rischi e un programma dei Punti Critici di Controllo (HACCP). Questa è proprio una filosofia di controllare e ricontrollare i punti cruciali in un sistema per essere sicuri che ci possa essere un rimedio, se qualcosa va storto. Quindi, una volta che si scopre una barrique infetta, occorre considerarla contaminata per tutto il resto della propria vita. Il vino dovrebbe essere filtrato, solfitato e controllato per verificare l'assenza di Brett prima di un taglio o dell'imbottigliamento. Avere l'opportunità di tagliare i cattivi odori non è la giusta soluzione.

Mentre gli enologi lottano con strani modelli di contaminazione, anche in presenza di una buona igiene di cantina, localizzare le sorgenti della contaminazione potrebbe essere troppo tardi in molti casi. L'utilizzo di pipette di plastica sterile al posto di un unico preleva-campioni potrebbe aiutare a ridurre la possibilità di diffusione di *Brettanomyces*.

L'attrezzatura per il campionamento può essere sterilizzata bollendola per 15 minuti o con il 70% di etanolo. Paul Henschke aggiunge: "...organismi che non producono spore come *Brettanomyces* possono essere uccisi con l'esposizione all'acqua bollente per 10 minuti o con etanolo al 70% per 5 minuti (Mettere un preservativo al preleva campioni è molto efficace per controllare l'infezione da Dekk!!)"

Il vino privo di Brett (filtrato, pastorizzato, o trattato con Velcorin®) per la colmatura delle barrique aiuterà nella prevenzione di ulteriori contaminazioni. Mantenere le barrique colme evitando di far prendere aria, ritarderà la crescita di popolazioni indigene Brett limitando quell'ossigeno in più che è favorevole a Brett. La migliore maniera per escludere l'ossigeno è di chiudere ermeticamente e lasciare la barrique da sola!!

Ciò introduce un altro argomento: micro-ossigenare o non micro-ossigenare? Bene, Dr. Ralph Kunkee (UC Davis) ed pochi altri microbiologi che conoscono *Brettanomyces* consigliano di non micro-ossigenare a meno di avere un buon programma per il monitoraggio del 4-etilfenolo e del 4-etilguaiacolo e di poter effettuare colture su substrati particolari. I laboratori enologici in genere effettuano queste analisi a prezzi moderati.

Sfortunatamente non tutti gli aromi e cattivi odori Brett possono essere rilevati e monitorati nello stesso modo del 4-etilfenolo e l'utilizzo di mezzi di coltura in genere è un 'indagine troppo lenta. Quindi, si rendono necessari nuovi metodi per poter prevenire la crescita di *Brettanomyces* e per rilevare la loro presenza nelle fasi precoci della vita di un vino.²³

Secondo la nostra esperienza, non si può correlare la concentrazione del 4-etilfenolo direttamente con il numero di cellule vitali di *B. bruxellensis*. Né si può pensare che l'assenza del 4-etilfenolo corrisponda all'assenza di Brett nel vino. Comunque crediamo che questo metodo possa monitorare le alterazioni provocate da una popolazione attiva di Brett in una barrique nel tempo.

Effetto di *Brettanomyces* sugli aromi del vino

Gli effetti primari osservati nei vini contaminati da Brett riguardano una perdita di fruttato e un aumento della complessità del vino nel breve periodo. A lungo termine, l'aumento di cattivi odori come Band-Aid®, creosoto, gomma bruciata e la perdita di aromi fruttati e floreali sono evidenti.

In uno studio effettuato in un'importante cantina della California, si seguirono tre vendemmie per lo sviluppo di Brett e di alterazioni di altri componenti del vino. L'aspetto più significativo fu che i composti dell'aroma associati con l'aspetto varietale vennero convertiti in gran misura in composti maleodoranti.

Gli acidi cinnamici (come l'acido p-cumarico) conferiscono aromi floreali e di miele al vino. Dato che Brett converte questi composti per rimanere vitale in bottiglia per un periodo lungo, ha senso che quegli aromi delicati vengano persi con un'attività prolungata di Brett. La gas cromatografia-olfattometria (GCO) ha mostrato questo effetto nella cantina menzionata. Aromi medicinali e metallici sostituiscono gli aromi floreali.¹

Vi sono diversi gradi e tipi di carattere Brett nei vini. Non tutti i difetti Brett vengono percepiti da tutte le persone. Alcune persone hanno un'anosmia (incapacità di odorare) per i sentori animali e di stalla che sono comuni ai vini contaminati, altre percepiscono meglio gli odori di plastica (come il 4-etilfenolo). Entrambi i gruppi di composti hanno soglie di percezione molto diverse e molte persone non hanno i recettori per poterli rilevare.^{1,21}

E' importante ricordare che molti composti trovati nei vini Brett avevano aromi simili alla plastica a soglie di percezione molto diverse nei panel di degustazione.¹ La soglia del 4-etilfenolo in acqua è di circa 50 ng/L. Quella del 4-etilguaiacolo è di 500 ng/L. Insieme ad altri composti odorosi con soglie simili, si nota un effetto additivo nell'assaggiatore. Brett è un fenomeno molto complesso nei vini ricchi.

“Il sentore di topo” è un altro odore attribuito a *Brettanomyces bruxellensis* e ad alcuni batteri *Lactobacillus*. Un vino “di topo” viene percepito come retrogusto, non come un odore. “Il sentore di topo” viene creato dagli isomeri del 2-acetil-tetraidropiridina e della 2-acetil-1-pirrolina, che vengono ossidati nella bocca del degustatore e percepiti a livello retronasale.^{14,24} Questi composti vengono normalmente associati con la crosta di pane, popcorn stantio e con urina di topo.

La soglia di percezione delle 2-acetil-tetraidropiridine è di circa 1.6 ng/L! Inoltre, Dr. Paul Henschke con i suoi collaboratori hanno mostrato che le specie di *Brettanomyces* e *Dekkera* testate possono produrre odori di topo e le acetiltetraidropiridine.²⁴

Che cosa riserva il futuro per Brett?

Entro i prossimi cinque anni, verrà sviluppato un metodo di ricerca molecolare che fornirà risultati numerici in un giorno. Il nostro laboratorio continua a sviluppare metodi per questo scopo. Al momento, si sta lavorando su sonde che sono specifiche per le sequenze geniche di *Brettanomyces bruxellensis* con una specificità del 100%.²²

Vi sono problemi per la detenzione di qualsiasi organismo, quando si usano metodologie con il DNA. Un problema è che il DNA è relativamente stabile (così come alcuni tipi di RNA). Se queste molecole vengono rilevate senza che vi siano cellule vitali di *B. bruxellensis* nel vino, allora il risultato ottenuto è un falso positivo. Cioè, sembra che ci sia Brett che cambia il carattere fruttato del vino ed in realtà non c'è.

Le tecnologie DNA sono così sensibili che il problema di falsi positivi deve essere affrontato da coloro che sviluppano nuovi metodi di rilevazione molecolare. Comunque, anche i metodi tradizionali di conta di colture danno facilmente falsi negativi (cellule Brett che non crescono non fanno colonie, ma metabolizzano gli acidi cinnamici).

Chi paga? Se si considera che una barrique può valere \$4,000 o più, potrebbe valere la pena di effettuare un test che costa \$50 ogni due mesi per rilevare e contare *Brettanomyces* prima che insorgano problemi e cattivi odori. Il costo dell'attrezzatura per svolgere questo lavoro sarebbe alto all'inizio, ma la rilevazione di Brett nelle barrique prima di arrivare alla soglia di percezione con metodi chimici e molecolari potrebbe ripagarla in pochi anni! Innanzitutto, occorre cercare questi servizi nei laboratori enologici.

L'industria del vino è stata lenta nel cercare metodi di rilevamento e di caratterizzazione molecolare. I produttori di vino non l'hanno fatto, poichè i microbi che sopravvivono nel vino, non sono patogeni. L'industria alimentare ha retto l'urto con le spese dello sviluppo di protocolli standard e attrezzature. Adesso abbiamo un'opportunità d'oro di utilizzare questi metodi, solo se si riesce a superare l'inibizione culturale e la limitazione del costo prevenendone un uso quotidiano.

In fine, riteniamo necessario valutare la capacità degli enzimi di convertire i precursori in odori sgradevoli. Cosa succede veramente quando le cellule di *Brettanomyces bruxellensis* si rompono rilasciando il loro contenuto nel vino? Gli enzimi, che erano contenuti all'interno della cellula, possono continuare ad alterare il vino in modo negativo? Per quanto tempo vanno avanti? Questa idea fa venire i brividi agli enologi.

Conclusione: La percezione è fondamentale

Molti enologi hanno proposto teorie sul perché avvengano le reazioni in un vino contaminato da Brett. Altri hanno proposto soluzioni che richiederebbero molto tempo per avere effetto sulla gestione di Brett nelle cantine. Tra tutti questi argomenti troviamo la proposta di usare i prodotti sterilizzanti delle bevande commerciali e la pastorizzazione flash.

Gli argomenti discussi intendono favorire la conoscenza di *Brettanomyces* ed analizzare i problemi generali associati alle infezioni da *Brettanomyces* nelle cantine. *Brettanomyces* è tuttora una questione scottante, se paragonata ad altri problemi in viticoltura e alla gestione economica della conduzione di una cantina. Dov'è il fondamento della ricerca?

Alcuni nell'industria hanno rimosso completamente il problema, proclamando una relazione simbiotica naturale tra un buon vino e Brett.

Alcune persone con cui abbiamo parlato a proposito dell'idea di un "buon Brett", credono che sia una scusa per produrre un vino difettoso. Dopo tutto, se un vino è stato vinificato in condizioni che promuovevano lo sviluppo di uno specifico ceppo di *Brettanomyces bruxellensis*, con la possibile competizione di altri ceppi "cattivi", dove avrebbe senso controllare la produzione? Forse nella selezione dei ceppi e nella filtrazione selettiva.

Un compratore di vino ci disse che era deluso dagli enologi e giornalisti che promuovevano "il carattere Brett" nel vino. Aveva creduto che l'era di fare "vini sporchi" fosse finita. Abbiamo ancora davanti alcuni anni di ricerca di base, prima di poter affermare di controllare l'impatto con Brett. Sembra che l'industria enologica abbia selezionato Brett ed altri organismi specifici in base alle loro capacità di competere in piccole nicchie.

Ma siamo scienziati e penso che gli enologi sarebbero contenti se fosse possibile avere il controllo microbiologico di un sistema biologico dinamico. Fino ad allora, riteniamo che *Brettanomyces* continuerà a far sprecare tempo in dibattiti sui fondi della ricerca. E' per questo motivo che le cantine fanno per proprio conto un lavoro per definire il comportamento di *Brettanomyces bruxellensis*.

A proposito, se qualcuno dovesse avere uno o più ceppi, saremmo felici di riceverli! Stiamo costruendo un database delle caratteristiche e dei marker molecolari, così che qualora qualcuno dovesse scoprire un subtipo specifico di *B. bruxellensis* che conferisce al vino solo caratteristiche positive, potremmo avere informazioni su di esso. La cosa più importante che abbiamo imparato, lavorando con Brett, è che bisogna tenere a mente la percezione del consumatore.

Molti anni fa, venne acquistata una bottiglia di vino rosso in California col solo proposito di portarla al laboratorio per eseguire analisi su Brett. La "puzza" era notevole. Si riusciva con fatica a portarla alla bocca! Abbiamo anche avuto simili vini francesi che avevano anche più di cinque anni che avevano odori persino peggiori e questo è stato il "carattere francese" più pronunciato che abbiamo mai sentito in un vino della California o di New York.

Potei permettermi di comprare solo una bottiglia (\$25), non potendo giustificare la spesa per una cassa di un simile vino, ma vorrei averlo fatto. La lezione che insegna è importante. Le note della degustazione degli enologi affermavano che si trattava di un esempio egregio di un blend di Bordeaux. Annunziarono il suo arrivo per il Millennio. Recentemente la cantina ha venduto l'ultima bottiglia a molto di più di \$25. E' un lato da considerare, quando ci si ferma a pensare cosa stia facendo Brett al tuo vino.

D'altro lato, abbiamo analizzato vini nel nostro laboratorio che esibivano aromi Bretty e che erano sicuramente in linea con le caratteristiche regionali, ma erano stati giudicati negativamente dai compratori per il loro carattere Bretty. Il costo di tale rifiuto dovuto ad una sensibilità eccessiva a Brett non danneggia solo i margini di profitto di una cantina, ma anche la reputazione.

Relazione presentata al 31st Annual New York Wine Industry Workshop, 2002

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Drs. Ralph Kunkee and Dr. Paul A. Henschke per la loro analisi attenta e profonda di questo lavoro. Ringraziamo anche Dr. Jonathan Licker per la sua approfondita ricerca negli aspetti storici del problema. In fine, ringraziamo Dr. Carl Shively per i suoi commenti su tale argomento importante.

Referenze

1. Licker, J. L., "The sensory analysis and Gas Chromatography-Olfactometry (GCO) of wines with 'Brett' flavor." Master's Thesis. Cornell University Department of Food Science and Technology. May, 1998.
2. Clausen, N. H., "On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers." Journal of the Institute of Brewing. 1904, 10, 308-331.
3. Herderich, M.; Costello, P.J.; Grbin, P.R.; Henschke, P.A. "Occurrence of 2-acetyl-1-pyrroline in mousy wines." Nat. Prod. Let. 7: 129-132; 1995.
4. Kurtzman, C. P. and J. W. Fell (Eds.), "The Yeasts: a taxonomic study" 4th Edition. 1998. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.

5. Dickinson-J-Richard. "Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast." *Microbiology (Reading)* 142 (6). 1996. 1391-1397.
6. Boekhout, T., C. P. Kurtzman, K. O'Donnell and M. T. Smith, "Phylogeny of the Yeast Genera *Hanseniaspora* (Anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (Anamorph *Brettanomyces*, and *Eeniella* as Inferred from Partial 26S Ribosomal DNA Nucleotide Sequences." *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, 44 (4) p. 781-786
7. Kunkee, R., Personal communication in review of this manuscript. 2001
8. Millet-V. Lonvaud-Funel-A., "The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage." *Letters in Applied Microbiology*. 30 (2). Feb. 2000. 136-141.
9. Egli C.M., Henick-Kling, T. "Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the RNA internal transcribed spacer region." *Am. J. Enol. & Vitic.* (accepted 5/2001)
10. Mitrakul C.M., Henick-Kling, T, Egli C.M. "Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods." *Food Microbiol.* 16:3-14; 1999.
11. Wright, J. M., and Parle, J. N. "*Brettanomyces* in the New Zealand wine industry." *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1974, 17, 273-278.
12. Arvik, T. "Brett 101: Overview of *Brettanomyces*, its Occurrence, Growth and Effect on Wine Flavors." Presentation: Vinquiry's MegaBrett Symposium. Santa Rosa, CA. June 6, 2001.
13. Heresztyn, T. "Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast." *Archives of Microbiology* 1986, 146, p.96-98.
14. Heresztyn, T. "Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1986, 37, p. 127-132.
15. Custers, M. T. J. "Onderzoekingen over het Gistseglacht *Brettanomyces*." Thesis, Delft University, 1940.
16. Freer-S-N., Dien-B-S., Matsuda-S., and Bothast-R-J. "Acetic acid production by *Brettanomyces* yeast." Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology. 100. 2000. Abstract number 503.
17. Chatonnet, P., D. Dubourdieu and J. N. Boidron "The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1995, 46, p. 463-468.
18. Cox, D. J. "Studies on the energetics and growth benefit of malolactic fermentation in lactic acid bacteria." Ph.D. Dissertation, Cornell University, 1991.
19. Cavin, J. F., V. Andioc, P. X. Etiévant, and C. Divies "Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1993, 44, p. 76-80.
20. Cox, Donald J., and Henick-Kling, Thomas. "Proton-motive force and ATP generation during malolactic fermentation." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 46 (3). 1995, p.319-323
21. Lawless, H. T. and Heymann, H. "Sensory Evaluation of Food;" Chapman & Hall: New York, 1998.
22. Stender, Henrik, Kurtzman, Cletus. Hyldig-Nielsen-Jens-J. Sorensen-Ditte. Broomer-Adam. Oliveira-Kenneth. Perry-O'Keefe-Heather. Sage-Andrew. Young-Barbara. Coull-James. "Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes." *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2). February, 2001 p. 938-941
23. Pollnitz, A.P.; Pardon, K.H.; Sefton, M.A. "4-Ethylphenol, 4-ethylguaiacol and oak lactones in Australian red wines." *Aust. Grapegrower & Winemaker* (438): 45-52; 2000
24. Grbin, P.R.; and Henschke, P.A. "Mousy off-flavor production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts." *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 255-262; 2000.
25. Boulton, R. B., V. Singleton, L.F. Bisson and R. Kunkee. *Principles and Practices of Winemaking*. 1996. Chapman & Hall Publishers New York, NY.