

## RISULTATI DI UN' INDAGINE SU "BRETT" NEL PINOT NOIR DEI FINGER LAKES

**Lorenza CONTERNO, Thomas HENICK-KLING**

Cornell University, Department of Food Science and Technology, New York State Agricultural Experiment Station

### Introduzione

*Brettanomyces bruxellensis* è stato associato con vini che hanno odori di "plastica bruciata", "lana umida", "sudore di cavallo" e di "stalla". Il lievito può crescere nei vini anche se il numero di cellule è basso e può sopportare lo stress combinato dell'acido acetico, dell'anidride solforosa libera, dell'acido tartarico e dell'etanolo. *Brettanomyces bruxellensis* tende a produrre grandi quantità di acido acetico e a convertire i composti fenolici fruttati in aromi non desiderati, quali il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo, che conferiscono al vino il sentore di plastica bruciata, di plastica Bandaid® e di stalla (Chatonnet *et al.*, 1992, 1997; Licker, 1998; Arvik, 2002).

Questi prodotti sono maleodoranti, ma concentrazioni basse di aromi "bretty" può aumentare la complessità dell'aroma del vino, se vengono tenuti a concentrazioni prossime alla soglia di percezione. Alcuni enologi sono convinti che la sola presenza del *Brettanomyces* sia negativa per la cantina. Ad altri piace il carattere che alcuni ceppi di *B. bruxellensis* possono conferire a vini non maturi e con pochi aromi di frutta. Considerata la presenza ubiquitaria di *Brettanomyces* (Fugelsang, 1997), uno studio è diventato prioritario da parte dei ricercatori. Abbiamo isolato *Brettanomyces* in numerosi vini di NY e in vini imbottigliati provenienti da altre parti degli USA ed Europa (Arvik, 2002). Un'ampia panoramica sul fenomeno "Brett" venne presentata al 31 Annual NY Wine Industry Workshop (Arvik and Henick-Kling, 2002).

In questa ricerca è stata effettuata una valutazione della ricorrenza di *Brettanomyces bruxellensis* in 28 campioni di Pinot nero di Finger Lake. Tali vini sono stati prodotti in cantine che facevano parte del Pinot Noir Alliance, che ha sostenuto anche il progetto del 2002. I risultati vennero paragonati con la precedente indagine sul Cabernet (Arvik and Henick-Kling in progress).

### Materiali e metodi

Vent'otto campioni di Pinot Noir di Finger Lake prodotti in 15 cantine della Pinot Noir Alliance vennero analizzati per la valutazione della concentrazione del 4-etilfenolo e del 4-etilguaiacolo. Cento millilitri di campione vennero filtrati sterili su una membrana Millipore 0.45 micron in condizioni sterili. La membrana venne incubata su un mezzo agar YMC in piatti Petri. I risultati vennero registrati dopo una settimana. Se si osservava una colonia, allora l'incubazione veniva protratta per 15 giorni

Diciannove campioni di vino sono stati analizzati. Venivano prelevati 500 mL da ogni bottiglia e centrifugati in un contenitore sterile (7000 giri/min x 15 min). Il pellet veniva raccolto in provette tramite una pulitrice sterile PBS; quindi veniva lavato due volte con la stessa pulitrice. La sospensione veniva osservata al microscopio (contrasto di fase, 400x), cui seguiva il test Brett di conferma (identificazione per fluorescenza ibridazione in situ usando una sonda PNA in quei campioni in cui veniva rilevata la presenza di cellule di *Brettanomyces bruxellensis* (in base alla loro morfologia).

### Risultati e discussione

La concentrazione del campione per centrifugazione serviva per rilevare la presenza delle cellule di *Brettanomyces bruxellensis* tramite osservazione al microscopio. Tale soluzione ci permise di vedere cellule con morfologia Brett anche quando non venivano rilevate colonie tramite filtrazione su membrana. (Tabella 1). Però le particelle solide presenti nei campioni centrifugati interferivano con il test di conferma del *Brettanomyces*. Per questa ragione, l'analisi del campione dopo centrifugazione

ci dava la possibilità di sospettare la presenza di *Brettanomyces* senza informazioni sul suo stato fisiologico (vivo o morto).

*Tabella 1: Presenza di cellule con morfologia Brett in campioni analizzati dopo filtrazione su membrana o centrifugazione.*

| Campione# | Filtrazione su membrana<br>CFU/100 mL | Centrifugazione<br>Si (1) o No (0) |
|-----------|---------------------------------------|------------------------------------|
| PN01      | 0                                     | 1                                  |
| PN02      | 0                                     | 0                                  |
| PN04      | 1                                     | 1                                  |
| PN05      | 0                                     | 1                                  |
| PN06      | 0                                     | 0                                  |
| PN08      | 0                                     | 1                                  |
| PN09      | 0                                     | 1                                  |
| PN10      | 0                                     | 1                                  |
| PN12      | 0                                     | 0                                  |
| PN13      | 0                                     | 0                                  |
| PN14      | 0                                     | 0                                  |
| PN16      | 0                                     | 0                                  |
| PN18      | 0                                     | 1                                  |
| PN20      | 0                                     | 1                                  |
| PN22      | 0                                     | 0                                  |
| PN24      | 116                                   | 1                                  |
| PN25      | 0                                     | 0                                  |
| PN26      | 0                                     | 0                                  |
| PN28      | 0                                     | 1                                  |

Sono state eseguite ulteriori ricerche per trovare un metodo per la valutazione dello stato fisiologico delle cellule (vive o morte).

Il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo sono stati trovati in numerosi campioni (Tabella 2) ed in quattro di loro la concentrazione è maggiore di 500 ng/mL.

*Tabella 2: contenuto di 4-etil guaiacolo e 4-etilfenolo nel Pinot Noir di Finger Lake.*

|      | 4-etil guaiacolo<br>ng/mL | 4-etil fenolo<br>ng/mL |
|------|---------------------------|------------------------|
| PN01 | <4                        | <4                     |
| PN02 | <4                        | <4                     |
| PN03 | 23                        | 74                     |
| PN04 | <4                        | 23                     |
| PN05 | <4                        | <4                     |
| PN06 | <4                        | <4                     |
| PN07 | 344                       | 1193                   |
| PN08 | 19                        | 174                    |
| PN09 | 20                        | 173                    |
| PN11 | <4                        | <4                     |
| PN10 | 20                        | 176                    |
| PN12 | <4                        | <4                     |

|      |     |     |
|------|-----|-----|
| PN13 | 24  | 60  |
| PN14 | <4  | <4  |
| PN15 | 311 | 468 |
| PN16 | 53  | 271 |
| PN17 | <4  | <4  |
| PN18 | 5   | 6   |
| PN19 | <4  | 7   |
| PN20 | 139 | 689 |
| PN21 | 88  | 301 |
| PN22 | 50  | 221 |
| PN23 | 203 | 236 |
| PN24 | 403 | 570 |
| PN25 | <4  | <4  |
| PN26 | <4  | <4  |
| PN27 | <4  | <4  |
| PN28 | <4  | <4  |

I campioni con più di 50 ng/mL di 4-etilguaiacolo e/o più di 300 ng/mL di 4-etilfenolo vennero classificati chimicamente come “bretty” (Cavin, 1993; Chatonnet, 1995). Il carattere “bretty” venne rilevati in sette vini con il test sensoriale. La presenza del microrganismo venne rilevata con la scatola Petri (cellule vitali) in solo due campioni, ma la morfologia Brett venne osservata al microscopio in dieci campioni. La concentrazione del campione con la centrifugazione del vino serviva per rilevare la presenza delle cellule di *Brettanomyces bruxellensis* tramite l’osservazione al microscopio. Questa soluzione ci consentì di rilevare le cellule con morfologia Brett, quando non venivano trovate colonie dopo filtrazione (Tabella 3). Comunque, le particelle solide trovate nei campioni centrifugati interferivano con il test di conferma Brett. Per questa ragione, l’analisi del campione dopo centrifugazione ci diede l’opportunità di sospettare la presenza di *Brettanomyces*, ma senza avere alcuna informazione sullo stato fisiologico (morto o vivo).

*Tabella 3: Presenza di cellule con morfologia Brett in campioni analizzati dopo filtrazione su membrana o centrifugazione.*

| Campione# | Filtrazione su membrana | Centrifugazione |
|-----------|-------------------------|-----------------|
|           | CFU/100 mL              | Si (1) o No (0) |
| PN01      | 0                       | 1               |
| PN02      | 0                       | 0               |
| PN04      | 1                       | 1               |
| PN05      | 0                       | 1               |
| PN06      | 0                       | 0               |
| PN08      | 0                       | 1               |
| PN09      | 0                       | 1               |
| PN10      | 0                       | 1               |
| PN12      | 0                       | 0               |
| PN13      | 0                       | 0               |
| PN14      | 0                       | 0               |
| PN16      | 0                       | 0               |
| PN18      | 0                       | 1               |
| PN20      | 0                       | 1               |
| PN22      | 0                       | 0               |
| PN24      | 116                     | 1               |

|      |   |   |
|------|---|---|
| PN25 | 0 | 0 |
| PN26 | 0 | 0 |
| PN28 | 0 | 1 |

Ulteriore lavoro di ricerca deve essere fatto per trovare un metodo per determinare lo stato fisiologico (vivo o morto).

*Tabella 4: Ricerca di Brettanomyces bruxellensis in campioni di Finger Lake Pinot Noir, mediante analisi microbiologica, chimica e sensoriale.*

|      | Classificazione chimica | Test Sensoriale | Conta su piastre | Ricerca al microscopio | Numero totale |
|------|-------------------------|-----------------|------------------|------------------------|---------------|
| PN01 | 0                       | 1               | 0                | 1                      | 2             |
| PN02 | 0                       | 0               | 0                | 0                      | 0             |
| PN03 | 0                       |                 | 0                |                        | 0             |
| PN04 | 0                       | 1               | 1                | 1                      | 3             |
| PN05 | 0                       | 0.5             | 0                | 1                      | 1.5           |
| PN06 | 0                       | 1               | 0                | 0                      | 1             |
| PN07 | 1                       |                 | 0                |                        | 1             |
| PN08 | 0                       | 0               | 0                | 1                      | 1             |
| PN09 | 0                       | 0               | 0                | 1                      | 1             |
| PN11 | 0                       |                 | 0                |                        | 0             |
| PN10 | 0                       | 1               | 0                | 1                      | 2             |
| PN12 | 0                       | 0               | 0                | 0                      | 0             |
| PN13 | 0                       | 0.5             | 0                | 0                      | 0.5           |
| PN14 | 0                       | 0.5             | 0                | 0                      | 0.5           |
| PN15 | 1                       |                 | 0                |                        | 1             |
| PN16 | 1                       | 0.5             | 0                | 0                      | 1.5           |
| PN17 | 0                       |                 | 0                |                        | 0             |
| PN18 | 0                       | 0.5             | 0                | 1                      | 1.5           |
| PN19 | 0                       |                 | 0                |                        | 0             |
| PN20 | 1                       | 1               | 0                | 1                      | 3             |
| PN21 | 1                       |                 | 0                |                        | 1             |
| PN22 | 1                       | 0.5             | 0                | 0                      | 1.5           |
| PN23 | 1                       |                 | 0                |                        | 1             |
| PN24 | 1                       | 1               | 1                | 1                      | 4             |
| PN25 | 0                       | 0.5             | 0                | 0                      | 0.5           |
| PN26 | 0                       | 1               | 0                | 0                      | 1             |
| PN27 | 0                       |                 | 0                |                        | 0             |
| PN28 | 0                       | 0.5             | 0                | 1                      | 1.5           |

Legenda: 0: no; 0.5: forse; 1: sì

**Punteggio:** assenza di test sensoriale e rilevazione al microscopio

Un immagine del Pinot Noir Survey può essere osservata in Figura 1 e Tabella 4 dove i campioni venivano classificati in base ai quattro parametri descritti. Nella figura si può vedere per quanti parametri numerosi campioni erano positivi all'analisi del *Brettanomyces*.

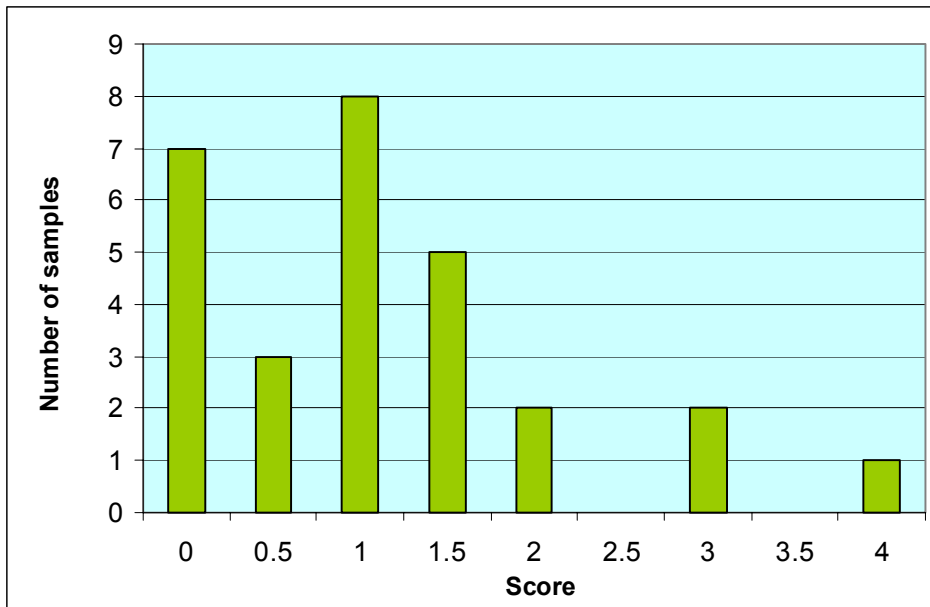


Figura 1: Ricerca di *Brettanomyces bruxellensis* nei campioni di Finger Lake Pinot Noir, valutati con analisi microbiologica, chimica e sensoriale.

Secondo tali parametri, meno del 50% dei campioni analizzati sono risultati positivi alla maggior parte delle analisi e in solo 7 campioni i cattivi odori vennero percepiti da tutti i degustatori. In 5 campioni, dove veniva percepito un odore sbagliato, non veniva trovato nessun marker chimico. E' possibile concludere che il Pinot Noir nella regione di Finger Lake non viene influenzato in modo evidente da *Brettanomyces*; comunque, i pochi casi osservati non devono essere ignorati. Infatti, come già osservato per il Cabemet Franc, solo il 36% dei campioni sono risultati negativi per tutti i parametri analitici utilizzati per la valutazione (Fig 2).

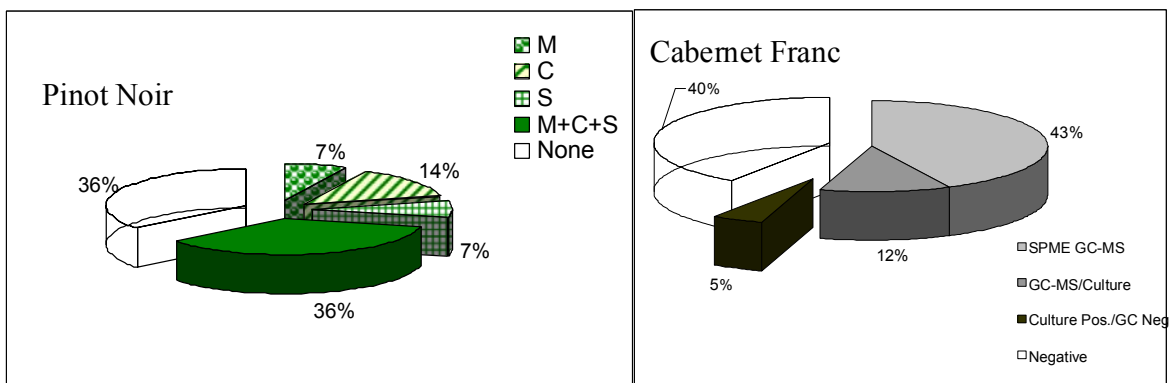


Figure 2: Ricerca di *Brettanomyces bruxellensis* in campioni di Finger Lake Pinot Noir, valutati con analisi microbiologica (M), chimica (C) e sensoriale (S), paragonata al Cabemet Franc Survey (da T. Arvik, personal communication)

In 6 campioni vennero trovati solo lieviti (2 campioni) o marker chimici (4 campioni), ma gli odori "Brett" non vennero rilevati dal panel di assaggiatori. Ciò dimostra che si può rilevare la presenza dell'attività di *Brettanomyces* prima che insorgano cattivi odori.

Nel 36% dei campioni l'attività di *Brettanomyces bruxellensis* venne rilevata con l'analisi sensoriale associata con la presenza delle cellule microbiche e/o di marker chimici. Comunque, l'analisi sensoriale sembra essere a volte l'unico parametro in grado di rilevare l'alterazione (7% dei campioni). L'assenza delle cellule potrebbe essere spiegata da una loro condizione non rilevabile (vitale ma non coltivabile in coltura o morta) .

Lavoro presentato al 32<sup>nd</sup> Annual New York Wine Industry Workshop, 2003

## Bibliografia

ARVIK T.J., CONTERNO L., HENICK-KLING T., (2002) *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: a global issue. Proceeding of 31<sup>st</sup> Annual New York Wine Industry Workshop. April 3-5. 124-125.

ARVIK T.J., HENICK-KLING T., (2002) Overview of *Brettanomyces*, its occurrence growth and effect on wine flavors. Proceeding of 31<sup>st</sup> Annual New York Wine Industry Workshop. April 3-5. 117-123. Reprint with permission from Practical Winery and Vineyard, May/June 2002.

CAVIN J.F., ANDIOC V., ETIEVANT P.X., DIVIES C. (1993) Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. American Journal of Enology and Viticulture. 44: 76-80.

CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N., PONS M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. Journal of the Science of Food and Agriculture. 60: 165- 178.

CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeast and lactic acid bacteria on the ethyl phenol content of red wines. American Journal of Enology and Viticulture, 46: 463-468.

CHATONNET P., VIALA C., DUBOURDIEU D. (1997) Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. American Journal of Enology and Viticulture. 48: 443- 448.

FUGELSANG K.C. (1997) Wine Microbiology. Chapman & Hall. New York

LICKER J.L. (1998) 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.