

## BRETTANOMYCES E VINO: RISCHI, PREVENZIONE E RIMEDI

Andrea MINACCI e Stefano FERRARI, ISVEA, Poggibonsi (SI)

### Biologia del Brett e del difetto sensoriale

I lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces/Dekkera*, (fam. *Cryptococcaceae*), sono quelli maggiormente diffusi nelle bevande alcoliche dopo *Saccharomyces cerevisiae*.

Le prime notizie su questo microrganismo derivano dall'industria birraria e risalgono al 1904. Per quanto concerne la classificazione tassonomica di *Brettanomyces* e della sua forma sporigena *Dekkera*, tutte le sue forme note, grazie all'utilizzo di metodiche di analisi molecolare, sono state attribuite a cinque sole specie: *B. nanus*, *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis*. Di tutte quelle citate, la specie più diffusa nel vino è *B. bruxellensis*, benché talvolta siano stati isolati anche ceppi di *B. anomalus*.

Questo microrganismo è tra i maggiori responsabili dell'origine di odori e aromi sgradevoli nel vino che possono causarne considerevoli deprezzamenti; simili effetti – quantitativamente meno rilevanti – possono essere dovuti ad alcune specie di batteri lattici ed al lievito *Pichia guillermondii*. I difetti organolettici originati da *Brettanomyces* e riscontrati in vini di tutto il mondo possono essere ricondotti a descrittori quali: panno bagnato, orina di topo, sudore di cavallo, stalla, vernice, plastica, ecc.; usualmente tali odori sono definiti come “nota Brett”. La presenza del difetto condiziona pesantemente il profilo aromatico dei vini fino al punto di stravolgerlo completamente (dall'appiattimento dell'aroma fino alla comparsa della nota Brett). Il motivo principale risiede nel fatto che *Brettanomyces* produce una gamma di composti designati nell'insieme “fenoli volatili”, tra i quali si annoverano il 4-etilfenolo, il 4-etilguaiacolo (riferibili ai descrittori: cerotto, plastica, fumo, speziato), ed in alcuni vini bianchi il 4-vinilguaiacolo ed il 4-vinilfenolo. Di recente è stato identificato anche il 4-etilcatecolo, dotato di una spiccata nota animale, prodotto da *Brettanomyces* utilizzando come precursore l'acido caffeico.

La via biosintetica che porta alla sintesi di questi composti prevede come substrato gli acidi idrossicinnamici presenti già nell'uva: *Brettanomyces* opera la loro decarbossilazione a 4-vinilfenoli, similmente a quanto effettua *S. cerevisiae*, il quale è però inibito nella successiva trasformazione dai polifenoli. *Brettanomyces* è in grado di condurre la successiva riduzione a 4-etilfenoli. Secondo una teoria molto attuale, attraverso quest'ultima trasformazione *Brettanomyces* produrrebbe ATP, in maniera analoga a quanto fanno i batteri lattici durante la trasformazione dell'acido malico.

Sembra che alcune cultivar tendano più di altre ad esprimere la “nota Brett”. Ciò potrebbe derivare da un maggior tenore di precursori, la cui ricchezza può dipendere dalle caratteristiche intrinseche alla varietà, dall'attività secondaria di enzimi pectolitici (anche esogeni), oppure dalle specifiche procedure di vinificazione.

Oltre a fenoli volatili, *Brettanomyces* produce quantitativi ragguardevoli di acido acetico ed acidi grassi C8 e C14 ed i relativi esteri etilici, tutti composti in grado di interferire con una regolare fermentazione alcolica.

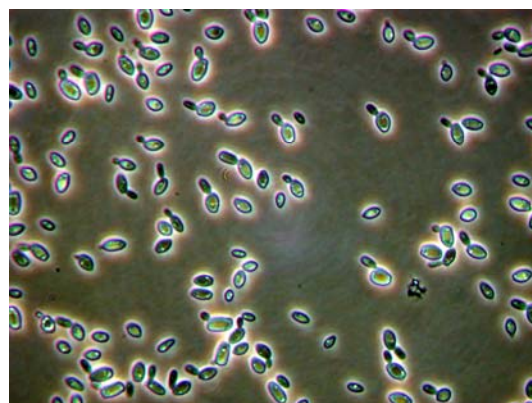


Fig. 1 – Immagine di una coltura di *Brettanomyces* al microscopio ottico in contrasto di fase. L'osservazione al microscopio di un vino non riesce da solo a mettere in evidenza una contaminazione.

## **Il Brett in cantina**

La cantina non è che il punto di arrivo di *Brettanomyces*: come avviene per tutti i lieviti presenti nel vino, e per lo stesso *S. cerevisiae*, esso proviene dall'esterno - in particolare dalla vigna, dove gli organi vegetali ed il terreno lo possono ospitare.

Una volta giunto in cantina, questo microrganismo può colonizzare tutti i materiali porosi presenti, soprattutto il legno delle botti e delle barrique, ma anche le vasche in cemento non perfettamente vetrificato, le asperità delle tubature - e comunque potenzialmente tutte le superfici.

Nel prodotto lo sviluppo del difetto è contemporaneo a quello del microrganismo; poiché *Brettanomyces* è un lievito con scarsa attitudine fermentativa - e soprattutto non competitivo rispetto a *S. cerevisiae* - esso inizia a manifestarsi a partire dalla fine della fermentazione alcolica, quando *S. cerevisiae* comincia a morire e lisare, in corrispondenza delle fasi di vinificazione in cui l'azione della SO<sub>2</sub> molecolare si mantiene necessariamente più blanda (fermentazione malolattica, stabilizzazione del colore, microossigenazione, affinamento in barrique).

Il vino è molto ostile per tutti gli altri lieviti, in quanto è un mezzo povero sia di zuccheri che di nutrienti e ricco di etanolo (che in condizioni di ossidazione spinta *Brettanomyces* utilizza per svilupparsi, come i lieviti "Flor"); tuttavia tali condizioni risultano comunque compatibili con il metabolismo di *Brettanomyces* che, essendo molto lento, può continuare ad operare per molti mesi o addirittura anni le trasformazioni metaboliche di cui è capace.

Numerosi centri di ricerca hanno condotto studi volti ad individuare ceppi *positivi* di *Brettanomyces* eventualmente capaci di esaltare la complessità aromatica dei vini senza detrimento per le loro proprietà organolettiche, ma tale caratteristica non è mai stata posta in evidenza.

*Brettanomyces* non è un problema confinato alle produzioni artigianali, o alle cattive condizioni igieniche tuttora riscontrabili in alcune cantine: proprio per la tipologia dei vasi vinari in cui trova le condizioni ideali (recipienti in legno), diventa un problema soprattutto per i vini di pregio che vi devono maturare per tempi più o meno lunghi.

Alla luce di quanto fin qui riportato, e con l'aggiuntiva considerazione del costo di una barrique - che induce ad esasperarne l'utilizzo - è immediato intuire come una sua contaminazione esponga a rischi elevatissimi il vino (o meglio *i vini*) che essa successivamente ospiterà, anche per le oggettive difficoltà che si incontrano nella sua pulizia e disinfezione.

## **Il recupero della barrique**

È infatti da porre in rilievo che gli studi a tutt'oggi effettuati hanno permesso di identificare *Brettanomyces* ben oltre il centimetro di profondità nelle porosità del legno, ed è difficile definire una procedura di sanitizzazione standardizzata nel rispetto del legno e dei suoi costituenti.

Tra le procedure saggiate, alcune si basano principalmente sull'azione meccanica, talvolta associata alle elevate temperature: attualmente è allo studio per questo scopo anche l'utilizzo delle microonde.

Maggiori sforzi sono stati dedicati alla predisposizione di metodi di lavaggio chimici (soluzioni caustiche, di metabisolfito, di permanganato, polifosfati, carbonati ed altri sali - eventualmente in combinazione tra loro; insufflazione gassosa diretta di SO<sub>2</sub>; ozono, acido peracetico, acido sorbico, pimaricina, ecc.). L'impiego di dimetilcarbonato o dietilcarbonato è da sconsigliare per la possibilità di derivare residui di metanolo o etil carbammato.

Le incertezze correlate all'uso dei suddetti mezzi derivano, a seconda dei casi, dalla dubbia efficacia dell'azione fungicida - soprattutto in considerazione della composizione organica del substrato - dagli effetti potenzialmente negativi sulle proprietà del legno, ovvero dalla possibile alterazione della composizione del vino che vi entrerà in contatto.

Con questa premessa emerge con grande evidenza l'importanza di attuare una attenta valutazione dei rischi connessi alla presenza e alla diffusione di questo microrganismo nei vini.

## **Prevenire paga**

Come per 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, la cui individuazione può essere effettuata focalizzando gli aspetti riportati di seguito:

- 1. Controllo della contaminazione della cantina da parte di fonti esterne.**
- 2. Valutazione dell'efficienza delle procedure di sanitizzazione degli strumenti utilizzati per la vinificazione e lo stoccaggio, nonché dei locali della cantina.**
- 3. Monitoraggio della contaminazione nelle fasi-chiave del processo.**

#### **1. Controllo della contaminazione della cantina da parte di fonti esterne.**

Questo controllo, nonostante rappresenti la tappa cruciale di prevenzione nei confronti della contaminazione primaria, è spesso sottovalutato. Oltre ad una procedura di difesa in senso lato, esso può fornire indicazioni puntuali, ad esempio, sulla conformità delle operazioni di raccolta e di conferimento delle uve.

Uno strumento di controllo piuttosto diffuso è rappresentato dall'analisi dei vini di provenienza esterna. Oltre all'esecuzione delle analisi finalizzate al conferimento dell'ordine d'acquisto (tra le quali sono sovente annoverati anche i fenoli volatili), viene frequentemente adottata la prassi di controllare i parametri di natura microbiologica per valutarne lo stato sanitario, con particolare attenzione per la ricerca di *Brettanomyces*.

In generale, sarebbe opportuno valutare su ogni prodotto in entrata in cantina il rischio di contaminazione al fine di adottare le più opportune pratiche preventive; un esempio eloquente è rappresentato dai chips, i quali - dove il loro uso è consentito - vengono spesso sottoposti a controllo microbiologico al loro ingresso.

#### **2. Valutazione dell'efficienza delle procedure di sanitizzazione.**

La ricerca periodica del microrganismo all'interno degli strumenti comunemente utilizzati in cantina (presse, pompe, tubature, valvole, griglie di scolo, ecc.) permette di identificare i possibili punti critici da verificare e soprattutto la frequenza delle relative procedure di igiene al fine di evitare ulteriori contaminazioni. Il monitoraggio all'interno delle vasche prima e dopo il trattamento permette di definire l'efficienza delle procedure attuate.

Per quanto riguarda i contenitori in legno, uno screening accurato permette di stabilire il loro livello di igiene e di valutare quando cessa di rispondere agli standard di pulizia prefissati. In molti casi viene effettuata la ricerca del *Brettanomyces* e degli altri microrganismi direttamente sulle acque di lavaggio di botti e barrique al fine di valutare l'effettiva efficacia dei processi di pulizia intrapresi.

Per quanto comporti procedure di campionamento e di preparazione del campione comprensibilmente più complesse, in casi particolari si esegue l'analisi su frammenti di legno prelevati dall'interno delle barrique.

#### **3. Monitoraggio della contaminazione nelle fasi-chiave del processo.**

Il primo punto in cui è indispensabile cominciare a valutare i rischi ed effettuare l'analisi è tra la fine della fermentazione alcolica e l'avvio della fermentazione malolattica; nel caso che quest'ultima stenti a partire, è bene ripetere il controllo almeno una volta ogni 2-3 settimane. Durante questa fase sarebbe utile effettuare anche un'analisi precoce dei fenoli volatili per disporre successivamente di un riferimento analitico.

Altro punto chiave importante da focalizzare è immediatamente dopo la fine della fermentazione malolattica.

Per le grandi masse di vino in stoccaggio - soprattutto in contenitori in legno - solo con la ripetizione del controllo almeno una volta ogni 1-2 mesi è possibile cautelarsi sufficientemente dall'insorgenza di una contaminazione pernicioso, se possibile associando sempre la ricerca di *Brettanomyces* a quella di batteri lattici ed acetici e di altri lieviti indesiderati.

Per quanto riguarda le barrique, l'analisi dovrebbe essere effettuata su ciascun contenitore ad intervalli mensili; nel caso che ciò non sia ritenuto opportuno, ed in particolare per i controlli successivi al primo, è bene raggruppare le barrique in piccoli gruppi ben identificati (massimo 5 barrique a gruppo) ed effettuarne ogni mese il controllo: nel caso di presenza di *Brettanomyces*, diventa in questo caso molto più facile isolare la partita incriminata prima di riunire la massa. È opportuno tener conto del fatto che la riunione di  $n$  campioni riduce la puntualità di qualunque dato

analitico dal 100% al  $(100/n)\%$ ; inoltre, paradossalmente, qualora l'incidenza dei contenitori contaminati sia superiore a tale percentuale  $(100/n)\%$ , il numero di analisi necessarie ne potrebbe facilmente risultare incrementato.

È bene tener conto che **l'analisi puntuale di un vino in barrique, il cui potenziale prezzo di vendita 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 quanto minore è l'incidenza del costo dell'analisi - mentre, per contro, tanto più ingente potrebbe risultarne il deprezzamento in seguito all'eventuale sviluppo di una contaminazione da *Brettanomyces*.

Nel caso di contenitori di grandi dimensioni, l'incidenza del costo dell'analisi risulta ovviamente ancora più limitata, e la strategia di solfitazione e di filtrazione di un vino rosso di pregio all'imbottigliamento non dovrebbe mai prescindere dalla consapevolezza della sua contaminazione microbiologica. Un'altra ottica di valutazione corretta dell'opportunità del controllo è quella in funzione della massa del vino potenzialmente contaminabile. Infatti, talvolta, il rilevamento di una presenza significativa di cellule di *Brettanomyces* su una piccola massa, ha permesso di evitare l'amplificazione parossistica del danno al taglio di entità rilevante cui era destinata.

I controlli microbiologici, ovviamente, possono sempre essere integrati - in particolare nei momenti più critici - dall'analisi chimica dei fenoli volatili.



*Fig. 2 – Coltura di Brettanomyces su terreno agarizzato selettivo. L'impiego di specifici terreni di coltura, con presenza di antibiotici in quantità ben dosate, permette di quantificare con buona precisione la contaminazione da Brettanomyces in un liquido o su un contenitore.*

### ***I metodi usuali di controllo del Brettanomyces.***

Come per 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 al vapore.

Attualmente il metodo di analisi più diffuso è la coltura su terreno solido selettivo agarizzato (piastre Petri). Il problema maggiore con *Brettanomyces* è la sua bassa velocità di crescita rispetto a tutti gli altri lieviti e muffe presenti normalmente nel campione, per cui la conferma della sua presenza comporta tempi lunghi: lo sviluppo di lieviti già dopo pochi giorni è di per sé indice di contaminazione di altra origine. Se a tale scopo non si facesse uso di terreni selettivi, sarebbe impossibile valutare efficacemente la presenza del microrganismo specifico, poiché la microflora complessiva presente nel campione lo maschererebbe senz'altro; d'altra parte, se si imponessero condizioni troppo selettive si rischierebbe di ottenere una sottostima della reale carica di microrganismi nel campione in esame, per l'eccessiva esclusione di quelli non coltivabili.

Da questo complesso quadro scaturisce l'esigenza di dosare antibiotici e fattori nutritivi con modalità del tutto differenti rispetto ai tradizionali terreni di coltura.

Grazie all'imponente lavoro di ricerca e sensibilizzazione compiuto in questi ultimi anni, dai terreni generici per lieviti (quali il WL-agar aggiunto di cicloesemide, ovvero il WLD-agar) si è passati all'uso di terreni più specifici e selettivi per *Brettanomyces* (come DBDM ed altri), dove oltre agli

indicatori degli acidi organici (acetico in particolare), sono presenti anche rilevatori specifici dell'attività del microrganismo (precursori dei fenoli volatili).

I terreni di coltura descritti possono essere utilizzati sia con metodiche di semina diretta per inclusione o adsorbimento su piastra (Spreading) del campione o di sue diluizioni scalari (aspetto di fondamentale importanza per i vini non microfiltrati), che per filtrazione su membrana da 0,45 µm e sua deposizione sul terreno di coltura stesso (pratica generalmente riservata ai vini microfiltrati).

La morfologia caratteristica di questo lievito permette di identificarlo con sicurezza una volta isolato con l'utilizzo di preparati freschi ed un semplice microscopio ottico in campo chiaro o in contrasto di fase.

Le cellule appartenenti alla stessa colonia si presentano al microscopio con un elevato polimorfismo, alternando forme subglobulari (spesso ogivali o a forma di proiettile) con altre leggermente più cilindriche. La gemmazione può essere multilaterale o bipolare; raramente si è osservato uno pseudomicelio non settato.

La presenza sia di cellule vitali che quiescenti - con dimensioni ancora più piccole e strette - ed il frequente rinvenimento di una contaminazione in vini sottoposti a filtrazione sterile, hanno fatto supporre che nemmeno quest'ultima possa rappresentare uno sbarramento assoluto per *Brettanomyces*; riteniamo però che una simile affermazione non si possa suffragare con sufficiente certezza, dato che le condizioni di sterilità ed asepsi non sono sempre effettive in cantina.

Oggi sono disponibili prodotti commerciali già pronti in piastra o da preparare al momento dell'uso per mezzo dei quali, se si è in possesso della necessaria capacità e competenza, è possibile effettuare direttamente in azienda un primo screening di autocontrollo microbiologico.

Per quanto un terreno sia specifico, è comunque probabile che anche altri lieviti possano svilupparvisi. La corretta valutazione e il controllo dei risultati che scaturiscono dalla lettura su piastra delle colonie microbiche è un fattore determinante per il laboratorio microbiologico, e ciò vale a maggior ragione per la ricerca di un microrganismo con le peculiarità del *Brettanomyces*. Per questo - come per tutti gli altri controlli microbiologici classici - l'investimento più importante da cui non si può prescindere è quello relativo al personale tecnico qualificato per valutare, in base a parametri oggettivi (fondamentali la morfologia delle cellule e delle colonie ed il tempo necessario al loro sviluppo), la presenza e l'entità della contaminazione da *Brettanomyces*: *conditio sine qua non* è impossibile scongiurare di commettere grossolani errori di interpretazione della lettura delle piastre. Per questo motivo, se non si è in possesso della strumentazione necessaria o non si dispone di personale tecnico con le specifiche competenze, è opportuno fare riferimento ad un laboratorio di fiducia specializzato nel campo della microbiologia enologica.

### **Le metodiche più sofisticate e le prospettive future**

Gli sviluppi del controllo del *Brettanomyces* volgono in particolare alla messa a punto di metodologie più precise ed affidabili che possibilmente consentano la valutazione del rischio in tempi più brevi di quelli attuali.

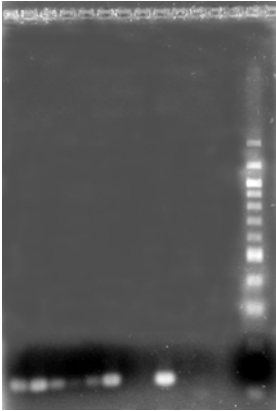
Se la possibilità di messa a punto di terreni di coltura sempre più efficienti diviene progressivamente più esile, l'applicazione in campo enologico delle moderne tecniche di analisi molecolare mutate dal settore clinico (in particolare sul DNA) diventa sempre più fattiva. Tali metodiche, una volta messe a punto, risultano estremamente rapide e permettono l'approccio al problema sia dal punto qualitativo che quantitativo.

In particolare, le metodiche di cui attualmente si dispone fanno capo alla tecnica della **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*).

L'impiego di tale tecnica, e la continua ricerca di metodiche di estrazione del DNA direttamente dalla matrice vino, ci permettono ormai di valutare la presenza del lievito *Brettanomyces* in tempi brevissimi. Una volta standardizzata, essa ne consente la rilevazione con una soglia di sensibilità molto bassa, leggermente variabile in dipendenza della matrice. Grazie all'utilizzo di sonde specifiche, è possibile contemporaneamente identificare con certezza la specie di appartenenza.

La tecnica, che si basa sull'identificazione di uno specifico frammento di DNA, è sensibile anche alla presenza di cellule in fase non attiva di sviluppo, comprese quelle che sono vitali ma non risultano coltivabili qualora seminate su terreno selettivo. La bassa stabilità nel tempo in ambiente acido del DNA libero da strutture cellulari (parete, nucleo) rende marginale l'eventualità che un

eventuale risultato positivo sia da attribuirsi alla sola presenza di cellule morte. Gli elevati costi di produzione unitari di questa analisi possono ridursi significativamente in caso di una sua applicazione intensiva, giustificando – anche economicamente – la sua adozione non più su coacervi di vini ma su singole barrique.



*Fig. 3 – L'applicazione delle metodiche di biologia molecolare permette di ottenere risultati molto precisi in tempi rapidi. Foto di una corsa PCR che evidenzia il DNA di Brettanomyces*

L'evoluzione futura di questa tecnica si prospetta nell'abbinamento dell'informazione quantitativa a quella qualitativa, grazie all'utilizzo della **Real-Time PCR**. Allorquando essa permetterà di associare la ricerca contemporanea - ma *specificata* - di lieviti e batteri, questa tecnica renderà probabilmente il controllo microbiologico di fatto molto più simile alle normali analisi chimiche di processo, fornendo uno strumento imprescindibile per ridurre i tempi di intervento in cantina.