

Controllo dei precursori varietali dei fenoli volatili e del *Brettanomyces* mediante utilizzo di batteri lattici selezionati

Sibylle KRIEGER-WEBER^a, Magali DELERIS-BOU^b, Ann DUMONT^c, J. Francesco LO PARO^d, Paola VAGNOLI^d

^a *Lallemand, Office Korntal-Münchingen, Germania*

^b *Lallemand SAS, Blagnac, Francia*

^c *Lallemand Inc., Montréal QC, Canada*

^d *Lallemand Inc. Succursale Italiana, Castel D'Azzano (VR)*

Introduzione

Dall'uva alla bottiglia ogni fase del lavoro in cantina ha un'influenza determinante sulla qualità del vino finale. I cambiamenti climatici e le variabili dovute all'annata influiscono sulla qualità della materia prima, sui livelli zuccherini e sul pH. Anche la presenza di microrganismi è soggetta a forti cambiamenti, dato che i livelli zuccherini e di pH influenzano grandemente la microflora indigena nel mosto.

Le complesse interazioni tra microrganismi del mosto e del vino devono essere gestite dall'enologo non solo durante la fermentazione alcolica e malolattica ma anche durante le prime fasi di affinamento.

Ad esempio *Brettanomyces*, preferendo pH più elevati per crescere, è molto influenzato dalla matrice in cui si trova oltre che dai microrganismi con cui deve condividere il suo habitat. Si tratta di un microrganismo opportunisto, relativamente tollerante dei solfiti (Edwards 2011) che va adeguatamente tenuto sotto controllo poiché contaminante.

***Brettanomyces* – una complicazione ricorrente**

I lieviti *Brettanomyces/Dekkera* sono ben noti per la loro capacità di arrecare danni rilevanti alla qualità dei vini dovuti a intorbidamento, produzione di acido acetico e fenoli volatili responsabili dei ben noti difetti di medicinale, cerotto e sudore di cavallo (Fugelsang *et al.* 1993, Heresztyn 1986). E' stata dimostrata una correlazione inversa tra il contenuto di 4 etil-fenolo nel vino ed il punteggio raggiunto nei test di analisi sensoriale; alcuni autori hanno anche messo in luce il possibile effetto di mascheramento del "carattere Brett" dovuto ad altri composti come acido isobutirrico e isovalerico (Romano *et al.*, 2009).

Non è semplice controllare la proliferazione di questo lievito in cantina dal momento che è capace di svilupparsi in condizioni molto limitanti come alcol elevato, carenza di fattori nutritivi, elevata SO₂, etc. Esso compare nel vino principalmente durante le fasi di invecchiamento, tuttavia è stato possibile isolare il *Brett* durante ogni tappa del processo di vinificazione e della conservazione in bottiglia.

Il primo passo per prevenire lo sviluppo del *Brettanomyces* è assicurare un rapido avvio della fermentazione alcolica (FA) con un efficace inoculo di lieviti selezionati ed un corretto apporto nutrizionale.

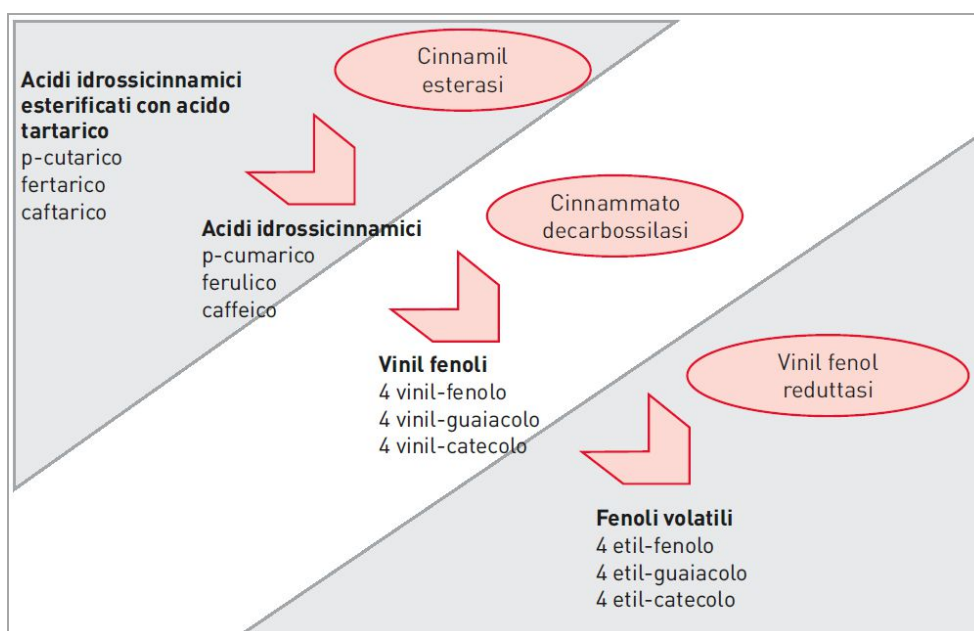
Un altro fattore che interagisce fortemente con lo sviluppo del *Brett* è la gestione della FML: ciò influisce sulle tempistiche della solfitazione, sulla sua crescita e sull'eventuale liberazione di precursori dei fenoli volatili.

1. Metabolismo alla base della formazione dei fenoli volatili

I ben conosciuti difetti olfattivi causati dal Brett sono dovuti principalmente dal rilascio di 4 etil-fenolo (4-EF), 4 etil-guaiacolo (4-EG), e 4 etil-catecolo (4-EC). La formazione di questi fenoli volatili deriva dalla trasformazione microbica degli acidi cinnamici (p-cumarico, ferulico e caffeico) presenti nell'uva in forma libera o esterificata con acido tartarico. La concentrazione di questi precursori è molto variabile in funzione della varietà, delle tecniche colturali, del clima e delle pratiche di vinificazione attuate. E' importante ricordare che *Brettanomyces* è in grado di formare fenoli volatili soltanto dalle forme libere di questi acidi cinnamici (Schopp *et al.* 2013).

Le due tappe con cui il Brett trasforma gli acidi cinnamici in fenoli volatili coinvolgono due enzimi chiave quali la cinnamato-decarbossilasi e la vinil-fenol-reduttasi (Fig. 1).

Figura 1. Meccanismo di formazione degli etil-fenoli nel vino



Le forme esterificate degli acidi cinnamici (gli acidi p-cumarico, ferulico e caffeico) rappresentano quindi una riserva di precursori che, se convertiti nelle forme libere, possono aumentare la suscettibilità del vino nei confronti dei fenoli volatili.

E' noto in letteratura che *Brettanomyces* non è il solo microrganismo in grado di produrre fenoli volatili. Alcuni ceppi di *S. cerevisiae* possiedono attività cinnamil esterasica e cinnamato decarbossilasica, ma non vinil fenol reduttasica; piuttosto conosciuta è anche l'attività cinnamil esterasica di certi preparati enzimatici pectolici estratti da *Aspergillus niger*.

Alcuni batteri dei generi *Pediococcus* e *Lactobacillus* (Couto *et al.* 2006) sono anch'essi in grado di liberare fenoli volatili a partire dagli acidi cinnamici. Alle stesse conclusioni è giunto uno studio di Fras *et al.* del 2014 che dimostrava come alcuni ceppi di *Lactobacillus plantarum* siano in grado di mettere in atto gli stessi metabolismi sin qui descritti. Un altro recente studio di Burn e Osborne (2013) ha messo in luce come alcuni ceppi della specie *Oenococcus oeni* siano in grado di idrolizzare gli acidi idrossicinnamil tartarici aumentando la concentrazione di precursori dei fenoli volatili a disposizione di *Brettanomyces*.

Questi nuovi studi confermano come il controllo della microflora batterica in cantina sia un fattore non trascurabile per la qualità del vino, anche in un'ottica di prevenzione dei fenoli volatili.

2. Uso di batteri selezionati non in grado di formare precursori dei fenoli volatili

In linea teorica, minore è la concentrazione di precursori nel vino, più bassa è l'incidenza potenziale degli *off-odours* dovuti ai fenoli volatili nel prodotto finito. Partendo da questo presupposto, lo studio di Burns e Osborne (2013) ha indagato sulla capacità di degradare gli acidi idrossicinnamil tartarici da parte di alcuni ceppi di *Oenococcus* e *Lactobacillus*.

In alcune prove svolte su Pinot Noir inoculati con differenti ceppi di batteri è stato preso come indice della presenza dell'attività cinnamil-esterasica il cambiamento di concentrazione degli acidi idrossicinnamici (liberi ed esterificati) rispetto ad un controllo con fermentazione malolattica (FML) bloccata.

I ricercatori hanno riscontrato che alcuni ceppi di batteri (risultati non mostrati) possiedono un'attività cinnamil esterasica capace di incrementare in modo rilevante la concentrazione degli acidi p-cumarico e ferulico, precursori del 4 etil-fenolo e 4 etil-guaiacolo. Ad esempio, su Pinot Noir ciò ha portato ad una concentrazione di 4-EG tripla rispetto al controllo e a un incremento del 4-EF da 263 a 1579 µg/L.

Alla luce di questa scoperta, Lallemand, in collaborazione con James P. Osborne dell'Oregon State University, ha esaminato nei propri ceppi selezionati di *O. oeni* e *Lactobacillus plantarum* la presenza o meno dell'attività cinnamil esterasica.

I primi risultati ottenuti hanno dimostrato che i batteri enologici selezionati *O. oeni*, PN4[®], O-Mega[®], Beta[®], ed il *Lb. plantarum* V22[™] (tabella 1) non sono in grado di degradare gli acidi idrossicinnamil tartarici e pertanto non aumentano la quantità di precursori potenzialmente trasformabili in fenoli

volatili. Successivamente anche i ceppi VP41[®], Alpha[®], AcidopHil+[™], 31[®], Elios Blanc[®] ed Elios1 si sono dimostrati esenti da questa attività.

Tabella 1. Concentrazione degli acidi idrossicinnamil tartarici e idrossicinnamici (mg/L) in un vino Pinot Noir quattro settimane dopo l'inoculo con batteri selezionati in rapporto ad un controllo senza FML. Sintesi dei risultati di tre test svolti singolarmente.

	Acido caftarico	Acido cutarico	Acido caffeico	Acido p-cumarico	Acido ferulico
Controllo senza FML	37.3 ± 0.5	7.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Ceppo cinnamil esterasi positivo	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	33.8 ± 0.7	5.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2
34C1	36.3 ± 0.4	7.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Lalvin Elios Blanc[®]	36.3 ± 0.3	7.6 ± 0.2	3.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1
AcidopHil+[™]	36.6 ± 0.5	7.9 ± 0.1	3.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Controllo senza FML	25.0 ± 0.4	6.8 ± 0.2	3.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	n.d.
Uvaferm Alpha[®]	25.7 ± 0.2	6.9 ± 0.1	5.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	n.d.
Lalvin VP41[®]	22.4 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	n.d.
Lalvin Elios1[®]	25.8 ± 0.3	6.8 ± 0.2	5.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	n.d.
Controllo senza FML	25.1 ± 1.1	6.8 ± 0.5	2.2 ± 0.2	0.9 ± 0.3	4.1 ± 0.3
PN4[®]	23.2 ± 0.4	6.6 ± 0.1	2.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	3.5 ± 0.2
O-Mega[®]	24.1 ± 1.3	6.9 ± 0.4	3.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	3.3 ± 0.3
BETA[®]	25.0 ± 2.2	7.0 ± 0.6	2.6 ± 0.5	0.8 ± 0.3	4.2 ± 0.5
Lb. plantarum V22[®]	25.8 ± 1.3	7.1 ± 0.3	2.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1
Lalvin 31[®]	27.5 ± 0.2	6.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	n.d.

3. Antagonismo batteri lattici - *Brettanomyces*: chi ha la meglio?

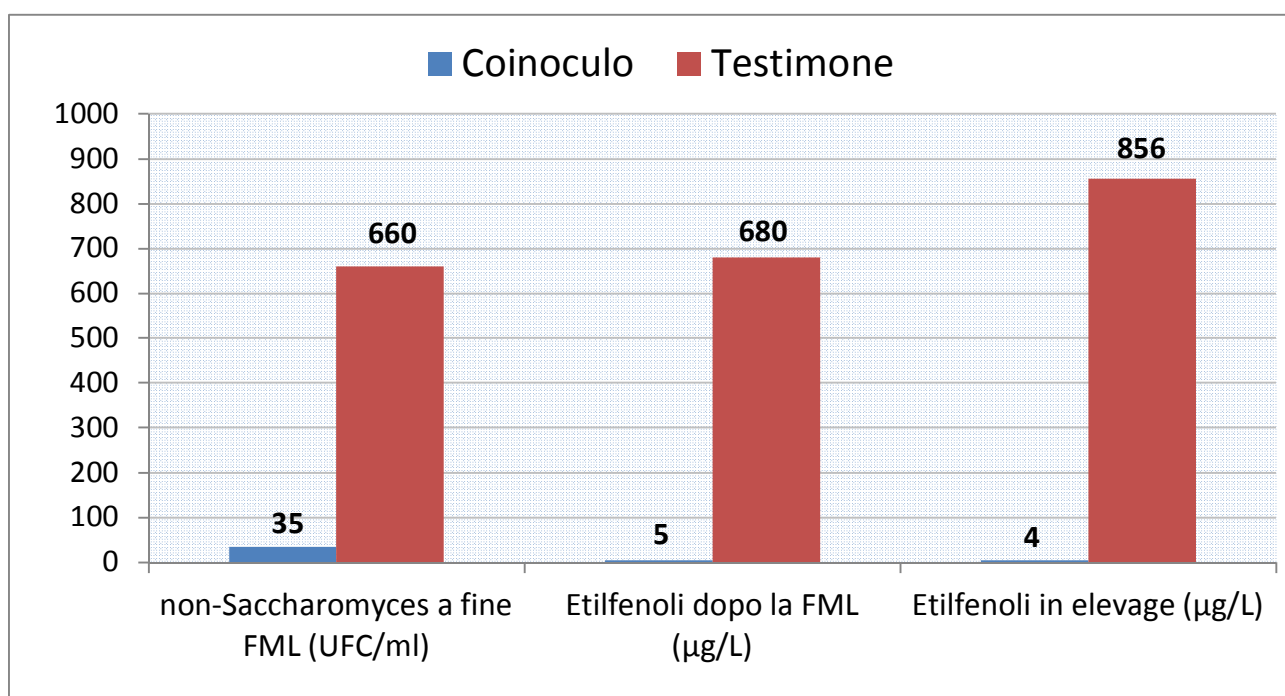
Il primo passo per tenere sotto controllo il *Brettanomyces* è sicuramente l'attuazione delle buone pratiche di vinificazione e di igiene in cantina. Trattandosi di parametri strettamente interdipendenti, è importante prestare la massima attenzione alla qualità dell'uva, ai livelli di anidride solforosa in funzione del pH, alla T° di conservazione del vino e all'ossigeno disciolto. Una buona igiene in cantina, combinata a un corretto dosaggio di SO₂, riduce notevolmente il rischio di contaminazione microbica.

Tuttavia questo non è sempre sufficiente; ad esempio l'intervallo fra FA e FML è un momento ideale per lo sviluppo del *Brettanomyces*: il vino non è protetto da SO₂, sono ancora presenti dei nutrienti residui della FA e non vi è praticamente alcuna competizione con altri microrganismi del

vino, dal momento che i lieviti *Saccharomyces* stanno morendo ed i batteri devono ancora consolidare la loro presenza.

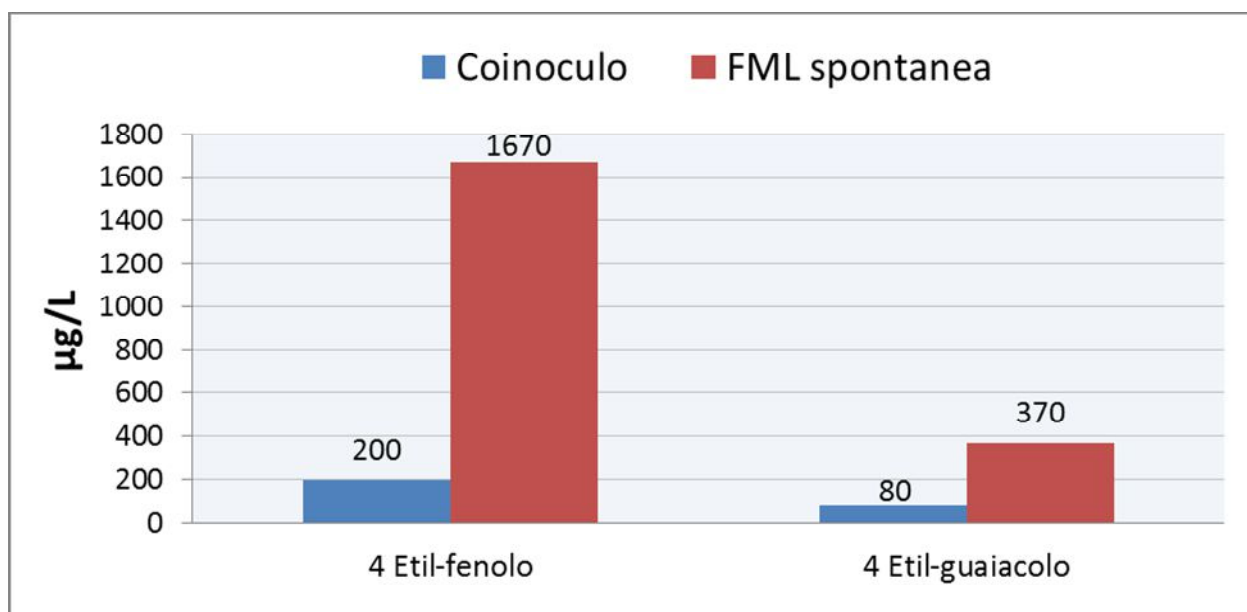
Un inoculo precoce di batteri selezionati subito dopo il termine della FA o in coinoculo si è dimostrato efficace nella prevenzione del *Brettanomyces*, semplicemente perché porta ad un incremento di competizione nella stessa nicchia ecologica. In uno studio condotto nel 2007 da Pillet *et al.* su Cabernet Franc della Gironda (Francia) coinoculato con *O. oeni* Uvaferm Beta® la FML si è svolta senza problemi e, cosa più importante, con un livello di lieviti non-*Saccharomyces* (successivamente riconosciuti come *Brettanomyces*) e di etilfenoli significativamente più basso (Fig. 2).

Figura 2. Popolazione microbica ed etilfenoli in un Cabernet Franc (Francia) coinoculato con batteri selezionati in confronto con una FML spontanea.



In un test simile su Cabernet Franc del Languedoc-Roussillon (Fig. 3) sono stati ottenuti dei vini con livelli di etilfenoli notevolmente inferiori rispetto ai vini con FML spontanea. Nel vino coinoculato il livello di 4-etilfenolo è risultato otto volte inferiore (200 contro 1670 µg/L), quello di 4-etilguaiacolo quattro volte più basso (80 contro 370 µg/L).

Figura 3. Livelli di etilfenoli dopo la fermentazione malolattica in un Cabernet Franc del Languedoc-Roussillon



Oltre al coinoculo, anche un inoculo con batteri selezionati subito al termine della FA può prevenire la crescita dei microrganismi contaminanti. Gerbaux *et al* (2009) su un Pinot Noir della Borgogna hanno dimostrato, con test in laboratorio ed in cantina, che un inoculo precoce di batteri a fine FA è stato efficace per il controllo del *Brettanomyces*. In particolare, i risultati presentati nella tabella 2 mettono in evidenza il ruolo della temperatura sulla crescita dei batteri e sulla durata della FML.

Lo studio ha messo in luce che l'inoculo con batteri selezionati è auspicabile soprattutto in condizioni difficili per lo sviluppo della microflora spontanea, poiché permette di ridurre l'esposizione del vino alla crescita del *Brettanomyces*.

I risultati della tabella 2 indicano che i vini inoculati con due diversi batteri iniziano la FML molto prima, riducendo ampiamente le tempistiche ed i livelli di 4-EG e 4-EF finali. I dati dell'analisi sensoriale confermano una qualità globale inferiore ed una maggiore intensità dei difetti legati a odori animali nei vini gestiti con FML spontanea.

Tabella 2. Produzione di fenoli volatili in un Pinot Noir della Borgogna inoculato con batteri selezionati in post fermentazione alcolica rispetto ad una malolattica spontanea.

	T° di cantina 18-19 °C			T° di cantina 14-15 °C		
	Controllo (a)	Batterio 1 (Lalvin 31)	Batterio 2	Controllo (a)	Batterio 1 (Lalvin 31)	Batterio 2
Durata della FML (giorni)	58	16	13	124	31	27
Fenoli volatili (µg/L)						
4 etil-guaiacolo	404	8	7	551	20	15
4 etil-fenolo	870	17	9	1119	46	32
Punteggio all'analisi sensoriale (scala da 1 a 10)						
Qualità visiva	5,6	6,0	6,0	6,0	5,1	5,1
Qualità aromatica	3,8	5,1	4,7	3,4	4,8	5,0
Qualità gustativa	3,8	4,9	4,3	3,5	4,9	4,5
Giudizio globale	3,4	4,7	4,3	3,5	4,9	4,5
Sentori animali	3,8	0,7	0,9	4,4	0,4	1,0

Conclusioni

Gli enologi hanno al giorno d'oggi un'ampia disponibilità di informazioni sul modo migliore per prevenire o curare le contaminazioni dovute al *B. bruxellensis* nel vino.

Sul fronte microbiologico è stato dimostrato che una fermentazione alcolica ben gestita ed un inoculo con batteri selezionati accompagnato da una fermentazione malolattica rapida e completa sono il primo passo per limitare queste contaminazioni. Grazie ad esperienze sperimentali è stato verificato che un inoculo con 10⁶ cellule/ml di batteri selezionati può bloccare la crescita di questo pericoloso microrganismo. Numerose prove sul campo hanno messo in luce come il coinoculo lieviti-batteri o un inoculo precoce di batteri lattici al termine della fermentazione alcolica sia efficace per prevenire la formazione di etil-fenolo ed etil-guaiacolo a confronto con una FML gestita spontaneamente. Anche la scelta di un batterio appropriato è essenziale per evitare possibili degradazioni degli acidi idrossicinnamici-tartarici con formazione dei precursori dei fenoli volatili (acido *p*-cumarico soprattutto) potenzialmente attaccabili da *Brettanomyces*.

I batteri enologici Lallemand sono stati testati e caratterizzati come esenti da questa attività cinnamici esterasica e pertanto non possono formare precursori dei fenoli volatili, pertanto abbiamo deciso di designare questi batteri come *fenol negativi*.

Ringraziamenti

Uno speciale ringraziamento va al Dr. James Osborne e al suo team alla Oregon State University per il lavoro di caratterizzazione sui batteri malolattici Lallemand.

Bibliografia

Burns, T. R., and J. P. Osborne. 2013. Impact of Malolactic Fermentation on the Color and Color Stability of Pinot noir and Merlot Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 64(3):370-377.

Couto, J. A., F. M. Campos, A. R. Figueiredo, and T. A. Hogg. 2006. Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:166-171.

Fras, P., F. M. Campos FM, T. Hogg, and J. A. Coutu. 2014. Production of volatile phenols by *Lactobacillus plantarum* in wine conditions. *Biotechnol Lett.* 36(2):281-285.

Fugelsang, K. C., M. M. Osborn, and C. J. Muller. 1993. *Brettanomyces* and *Dekkera*: Implications in winemaking. American Chemical Society Symposium Series. 536:110-129.

Gerbaux, V., C. Briffox, A. Dumont, and S. Krieger. 2009. Influence of inoculation with malolactic bacteria on volatile phenols in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 60(2):233-235.

Heresztyn, T. 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:127-132.

Osborne, J. P., S. Chescheir, and D. Philbin. 2013. Impact of *Oenococcus oeni* on wine hydroxycinnamic acid content and production of volatile phenols by *Brettanomyces*. Proceedings ASEV 2013 National Conference: Oral Presentation Abstracts (research reports).

Pillet, P., E. Dessup, and E. Rémond. 2007. Préserver les arômes fruités du vin: nouveaux enjeux dans la gestion de la fermentation malolactique. Partie 2/2: La co-inoculation en levures et bactéries lactiques: préserver les arômes fruités et lutter contre les contaminations de type *Brettanomyces*. *Revue des Oenologues.* 124:1-3.

Romano, A., Perello M. C., Lonvaud-Funel A., Sicard, G., De Revel G. 2009. Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". *Food Chemistry* 114 (2009) 15–19.

Schopp, L. M., J. Lee, J. P. Osborne, S. C. Chescheir, and C. G. Edwards. 2013. Metabolism of nonesterified and esterified hydroxycinnamic acids in red wines by *Brettanomyces bruxellensis*. *J. Agric. Food Chem.* 61:11610-11617.