

DOCUMENTO  
TECNICO

**Roberto Foschino  
Ileana Vigentini  
Claudia Picozzi**

*DiSTAM, Dipartimento di Scienze e  
Tecnologie Alimentari e  
Microbiologiche,  
Università degli studi di Milano*



*Da sinistra:  
I. Vigentini,  
R. Foschino,  
C. Picozzi*

## BRETTANOMYCES: CONOSCERE LE POTENZIALITA' DI SVILUPPO E DI ALTERAZIONE IN VINO

L'articolo si prefigge di aggiornare le conoscenze relative agli aspetti eco-fisiologici di *Dekkera bruxellensis* nella filiera enologica per meglio approntare le opportune strategie di prevenzione e di lotta. Questa è infatti la specie più frequentemente coinvolta nel vino ove è capace di produrre importanti quantità di ac. acetico e di fenoli volatili, molecole ritenute inaccettabili al di sopra di una certa concentrazione, rappresentando il difetto sensoriale definito come carattere "Brett".

### Introduzione

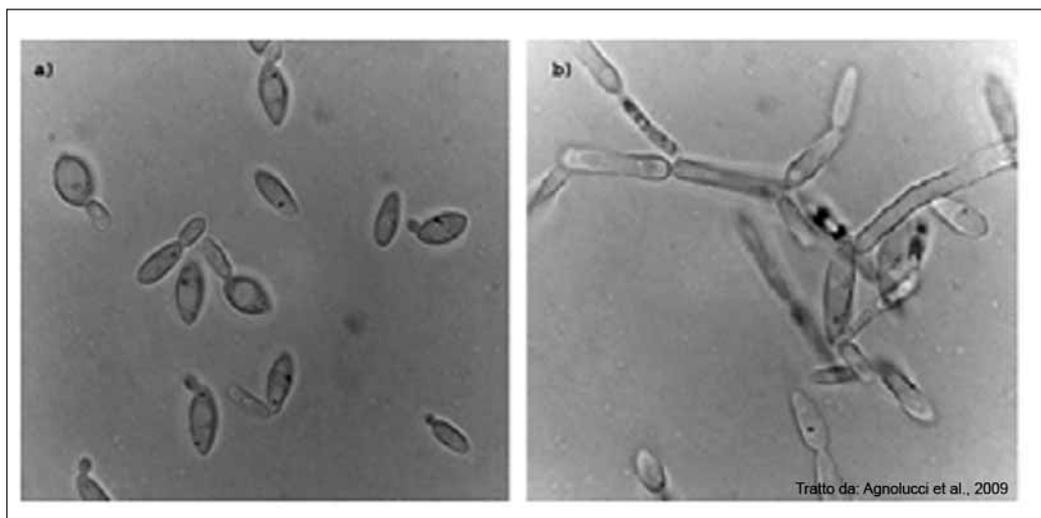
Nella produzione del vino il ruolo svolto dai lieviti è indiscutibilmente positivo ed insostituibile. Tuttavia, in conseguenza della eterogeneità delle popolazioni microbiche che contaminano naturalmente ed inevitabilmente le materie prime, nonché grazie alle capacità adattive di alcune specie che si insediano nell'ambiente vinario, si possono verificare fenomeni di sviluppo secondario di saccaromiceti

che possono compromettere la qualità del prodotto finito. In particolare, per i vini affinati in botte, vi è una preoccupazione crescente nei riguardi di un'alterazione condotta da lieviti appartenenti ai generi *Brettanomyces*/*Dekkera* in grado, grazie alle loro specifiche attività enzimatiche, di deteriorare pesantemente il profilo aromatico. L'argomento, per la verità, è tuttora dibattuto tra gli enologi soprattutto d'Oltralpe e d'Oltreoceano; alcuni di essi infatti sostengo-

no che certi sentori non solo sono accettabili, ma anzi caratterizzano tipicamente certuni prodotti invecchiati su legno ... probabilmente è la dose che fa la differenza e, in effetti, alcuni recenti studi (Agnolucci et al., 2009; Conterno et al., 2006; Vigentini et al., 2008), mettono in evidenza una diversità di comportamento a livello di ceppo, tra individui appartenenti alla stessa specie, nella produzione di composti sgradevoli.

*Premio "Assoenologi per la  
ricerca scientifica in viticul-  
tura ed enologia" 2010*

**Fig. 1 - Morfologia cellulare di *Brettanomyces bruxellensis* ottenuta al microscopio ottico a: a) all'inoculo e b) dopo 80 giorni**



## Cenni storici e nomenclatura

Il primo riferimento storico relativo al genere *Brettanomyces* risale al 1904 quando Claussen riuscì ad isolare un ceppo di lievito da una lenta fermentazione secondaria avvenuta in una birra inglese. Gli aromi prodotti da questo tipo di microrganismo divennero caratteristici di alcune birre inglesi, di tipo "ale", cosicché il lievito assunse il nome di *Brettanomyces* che significa 'fungo britannico'. Nel 1940 Custers realizzò il primo studio sistematico su diversi ceppi del genere *Brettanomyces*, per la maggior parte isolati da birra ma anche, per la prima volta da vino, descrivendone le caratteristiche fenotipiche. Venti anni dopo, Van der Walt attraverso osservazione microscopica riconobbe che alcune cellule erano in grado di differenziarsi in aschi, dimostrando la possibilità da parte di talune colture di condurre un ciclo sessuale.

La classificazione del genere venne dunque rivista conducendo alla seguente suddivisione: i ceppi capaci di formare spore all'interno di un asco vennero raggruppati nel genere *Dekkera*, mentre quelli di cui non si riconosceva la forma sessuata rimasero a costituire il genere *Brettanomyces*.

## Tassonomia e morfologia

Nella classificazione proposta da Kurtzman e Fell del 1998, entrambi questi generi cadono nella divisione *Ascomycota*, nella famiglia delle *Saccharomycetaceae*, che comprende sia lieviti sporigeni (detti anche teleomorfici, o funghi perfetti) sia lieviti asporigeni (detti anche anamorfici, o funghi imperfetti). Attualmente sono cinque le specie appartenenti al genere anamorfico e cioè *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* e *B. nanus*, mentre due sono le specie teleomorfiche e cioè *D. anomala* e *D. bruxellensis* (Kurtzman e Fell, 2000; Oelofse et al., 2008). Nel contesto prettamente enologico la separazione tra *Brettanomyces* e *Dekkera* è insignificante poiché le tecniche colturali e molecolari usuali non consentono di discriminare tra i due generi e non vi sono evidenze sperimentali di differenze nella manifestazione del fenomeno alterativo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Al microscopio le cellule, anche appartenenti alla stessa colonia, mostrano un elevato polimorfismo, alternando forme ellissoidali o ogivali di dimensioni 2 - 5  $\mu\text{m}$ , con altre cilindriche, talora molto allungate, di dimensioni 5 - 25  $\mu\text{m}$ . La gemmazione può es-

sere bipolare o multilaterale. Le cellule si presentano singole, in coppia, in corte catenelle o a grappoli. In colture vecchie o in condizioni stressanti possono formare pseudocelicio settato (Fig. 1).

Durante una carenza nutrizionale molto prolungata, le cellule di *Brettanomyces* possono entrare in uno stato definito Vitale ma Non Coltivabile (VNC) e cioè non sono più in grado di formare direttamente colonie in piastra, ma necessitano una fase di arricchimento in brodo per riprendere una crescita normale (Millet e Lonvaud, 2000). Sotto questa forma le singole cellule possono ridursi notevolmente di dimensione in modo tale da poter attraversare membrane da microfiltrazione (0.45  $\mu\text{m}$ ).

Nel genere *Dekkera* le cellule vegetative diploidi si trasformano direttamente in aschi contenenti da 1 a 4 meiospore aploidi.

## Nicchia ecologica e diffusione

Nonostante siano pochi gli studi di tipo ecologico che si sono occupati di *Brettanomyces* è tuttavia possibile affermare come tale lievito si possa considerare un microrganismo ambientale, pressoché ubiquitario alle nostre latitudini. Esso è stato prevalentemente riscontrato sulle bucce di frutti zuccherini e in prodotti derivati da vegetali fermentescibili, o associato ad insetti. In particolare, le specie *B. anomalus* e *B. bruxellensis* sono state isolate in birre inglesi ed americane (tipo "ale" e tipo "stout") e in birre tradizionali belghe con rifermentazione (tipo "lambic") ove svolgono uno specifico ruolo di produzione di aromi tipici, in sidro, in mosto di uva, in vini tipo "sherry", in vini rossi da invecchiamento e in vini spumanti con metodo classico, dove generano odori e sapori sgradevoli. *D. anomala* è stata ritrovata anche su formaggio pecorino (Consentino et al., 2001). La specie *B. custersianus* è stata isolata in birra

africana preparata con miglio maltato ("Bantu-beer") e in salamoie con olive; per contro la specie *B. naardenensis* è stata riscontrata in bevande gasate alterate, quali limonata, acqua tonica, ginger, cola. Quest'ultima specie è anche quella più studiata ed utilizzata per la produzione di bioetanolo a partire da fonti vegetali alternative, quali residui legnosi.

Studi recenti riportano come *B. bruxellensis* sia presente lungo tutta la filiera viti-vinicola, dal campo, sulle uve, fino allo stabilimento di trasformazione, e non solo sulle superfici di legno, ma anche nelle vasche di cemento e di acciaio (Agnolucci et al., 2007; Du Toit e Pretorius, 2000) e nell'aria della cantina (Connell et al., 2002). Infine anche residui organici raccolti da pompe utilizzate per il trasferimento dei mosti e dei vini sono risultati contaminati da tale specie (Fugelsang, 1998).

## Respirazione e fermentazione

I lieviti del genere *Brettanomyces* mostrano un metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo a seconda della specie e delle condizioni di crescita. La prima fase del processo di degradazione de-

gli zuccheri, nota anche come glicolisi, comporta la conversione di una molecola di esoso (glucosio) in due molecole di piruvato, seguendo la via Embden Meyerhof Parnas (EMP). Queste trasformazioni si svolgono nel citoplasma cellulare e sono comuni sia alla respirazione che alla fermentazione.

La respirazione, che viene attivata solo in presenza di ossigeno, ha tre funzioni principali quali produrre energia (ATP), generare potere riducente (NADH) e formare composti intermedi del carbonio per le biosintesi cellulari. L'acetil-CoA, prodotto da piruvato per azione della piruvato-deidrogenasi, entra nel ciclo di Krebs, che ha luogo nei mitocondri, producendo un guadagno energetico di 38 ATP per molecola di glucosio utilizzata.

Durante il metabolismo fermentativo, attivo in assenza di ossigeno, l'ac. piruvico prodotto alla fine della glicolisi viene decarbossilato ad acetaldeide che a sua volta viene ridotta ad etanolo utilizzando il NADH. Il saldo di energia della via anaerobica è molto basso ed equivalente a 2 ATP per molecola di glucosio. Sebbene la resa teorica di etanolo è di 0,51g di etanolo/g di glucosio consumato, le reazioni metaboliche primarie, di sintesi delle struttu-

re cellulare e di formazione di composti secondari (ac. acetico, sostanze di riserva) limitano il rendimento a 80-90% del suo valore teorico (Kappeli, 1986). La tecnica di micro-ossigenazione per l'ottimizzazione dell'affinamento dei vini è stata ritenuta responsabile di favorire i microrganismi che causano alterazioni, e in particolare *Brettanomyces* (Lonvaud-Funel, 2000). L'ossigeno infatti stimola la crescita e la fermentazione alcolica di tale genere, nonché la sintesi di ac. acetico (Aguillar Uscanga et al., 2003; Ciani et al., 2003); al contrario diversi autori concordano che in anaerobiosi stretta la concentrazione in ac. acetico prodotto risulti molto bassa (Ciani e Ferraro, 1997; Gilis et al., 2003).

## Le fonti di carbonio

### 4.1 Assimilazione delle fonti di carbonio.

La specie *B. bruxellensis* è nota per essere in grado di metabolizzare glucosio, fruttosio e galattosio, tra i monosaccaridi, e saccarosio, maltosio, trealosio e cellobiosio, tra i disaccaridi. Arabinosio, lattosio, raffiniosio, ribitolo, glicerolo e mannitolo, così come, malato, succinato e citrato sono invece metabolizzati da un

numero ridotto di ceppi appartenenti alla medesima specie (Conterno et al., 2006). Per contro, si ricorda che *Saccharomyces* non ha la capacità di fermentare lattosio, melibiosio, cellobiosio, o zuccheri a 5 atomi di carbonio, come ad esempio xilosio o arabinosio (Jones et al., 1981).

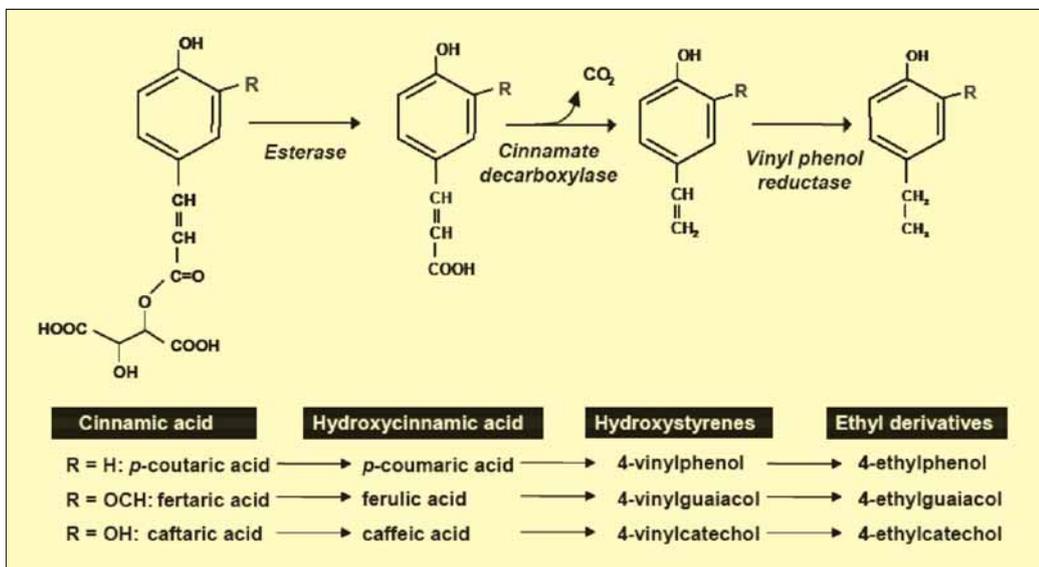
Attualmente, poche informazioni e talvolta contraddittorie sono disponibili sui meccanismi di assimilazione degli zuccheri per il genere *Brettanomyces* (Gaunt et al., 1988; Gancedo e Serrano, 1989). Géros e collaboratori (1997) hanno osservato due tipi di trasportatori del glucosio in *Dekkera anomala*: un trasportatore a bassa affinità che accetta anche il fruttosio ed uno ad alta affinità solo per il glucosio.

Tra gli zuccheri utilizzati da *Brettanomyces*, il cellobiosio ha un grande interesse industriale: l'obiettivo è quello di sfruttare questa capacità catabolica per il recupero dei substrati che contengono cellulosa in un processo di saccharificazione e fermentazione simultanee (SSF) che consentirebbe la produzione di etanolo in condizioni economiche vantaggiose. Nel campo enologico il cellobiosio è il principale disaccaride che si forma durante la tostatura delle botti e che quindi può essere la fonte di energia disponibile per supportarne lo sviluppo (Boulton et al., 1996). *Brettanomyces* può crescere anche su etanolo e acetato, come unica fonte di carbonio, quando in condizioni di aerobiosi (Géros, et al., 2000, Rodrigues et al., 2001). Il nostro lavoro ha evidenziato anche la potenziale capacità di alcuni ceppi di *D. bruxellensis* di utilizzare lattato con produzione di acetato, anche in condizioni di anaerobiosi (Vigentini et al., 2008), aprendo un passaggio nella comprensione delle interazioni che tale specie può intraprendere con i batteri malolattici.

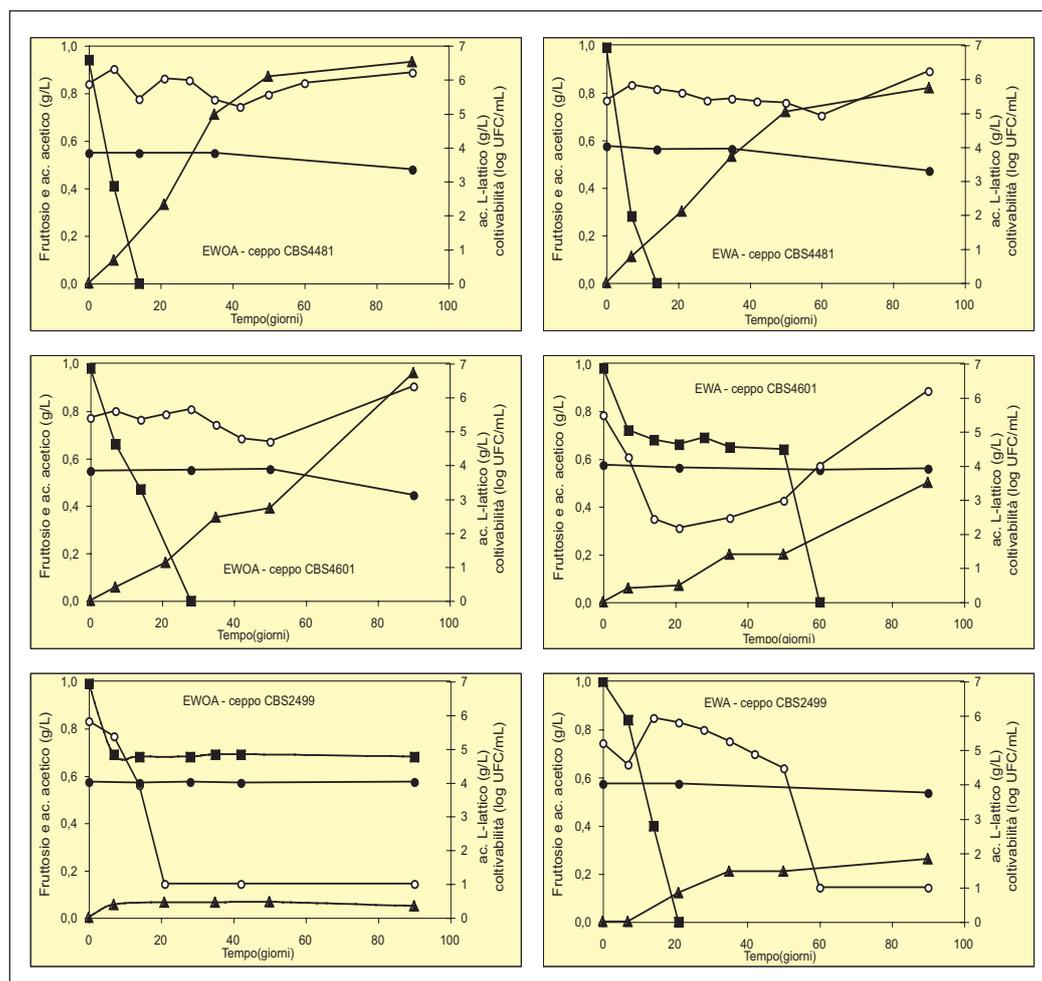
### 4.2 Meccanismi di repressione da catabolita.

L'attivazione delle vie metaboliche dipende sia da mec-

**Fig. 2 - Vie biochimiche di formazione dei fenoli volatili (tratto da Oelofse et al., 2008)**



**Fig. 3 - Andamento di alcuni parametri durante la crescita di tre ceppi di *Dekkera bruxellensis* in simil-vino, senza fase di adattamento (EWOA) e con adattamento all'etanolo 10% v/v (EWA). La concentrazione di fruttosio (■), ac. acetico (▲) e ac. L-lattico (●) è espressa in g/L. La coltivabilità (○) è riportata come log UFC/mL**



canismi genetici che da fattori ambientali quali pH, temperatura, pressione parziale di ossigeno e concentrazione di substrati. In particolare, la quantità di glucosio e la presenza di ossigeno nel mezzo culturale svolgono un ruolo importante nel meccanismo di repressione nella trascrizione dei geni necessari al catabolismo di fonti di carbonio alternative. Diversi meccanismi di regolazione, quali l'effetto Pasteur, l'effetto Crabtree e l'effetto Custers, sono stati descritti dapprima nel lievito *S. cerevisiae* e quindi investigati in *Brettanomyces*.

**Effetto Pasteur** - Si ha quando alcuni lieviti mostrano una diminuzione della velocità di consumo dei carboidrati quando passano da una

condizione di anaerobiosi ad una di aerobiosi. Tale fenomeno trova spiegazione nel fatto che i processi respirativi sono più favorevoli, dal punto di vista energetico, rispetto ai processi fermentativi.

La parziale inibizione della fermentazione in aerobiosi è spiegabile osservando le diverse affinità che gli enzimi piruvato deidrogenasi e piruvato decarbossilasi possiedono per il piruvato. Inoltre, l'effetto Pasteur è strettamente legato all'azione della fosfofruttochinasi che viene disattivata da alte concentrazioni di ATP, causando quindi una diminuzione del consumo di glucosio (Ribéreau-Gayon et al., 1998).

Tale effetto è di bassissima entità per i lieviti fermentativi ed è stato osservato solo nella

specie *B. anomalus* (Gaunt et al., 1988).

**Effetto Crabtree** - *S. cerevisiae* è in grado di fermentare il glucosio ad etanolo ed anidride carbonica e in anaerobiosi questo è l'unico modo che la cellula possiede per produrre energia. Tuttavia, in presenza di ossigeno e con una concentrazione zuccherina nel mezzo che supera il valore di 9 g/L avviene comunque una produzione di etanolo, e dunque è attiva la via fermentativa. Anche la maggior parte delle specie appartenenti al genere *Brettanomyces* presentano questo fenomeno e per questo vengono considerate "Crabtree positive" (van Dijken e Scheffers, 1986).

**Effetto Custers** - Il genere *Brettanomyces* è noto essere sensibile alla disponibilità di ossigeno. A tal proposito, Scheffers e Wikén (1969) introdussero il termine "effetto Custers" definendolo come l'inibizione della fermentazione alcolica nel passaggio alle condizioni anaerobiche ed osservando la forte tendenza a produrre ac. acetico da glucosio. Tale fenomeno è determinato dal fatto che l'al-deidrogenasi in *Brettanomyces* è un enzima che viene espresso in modo costitutivo e cioè indipendentemente dalle condizioni di crescita, il che conduce alla inevitabile formazione di acetato provocando uno squilibrio redox della coppia  $NAD^+/NADH$  a favore del  $NADH$ . Nella specie *B. intermedius*, oggi riclassificato in *D. bruxellensis*, l'effetto Custers risulta transiente e la crescita riprende con formazione di etanolo (Wijsman et al., 1984).

## Aspetti enologici

### 5.1 La resistenza all'etanolo.

Tra i fattori ambientali che condizionano la sopravvivenza delle popolazioni microbiche nel vino l'etanolo rappresenta la principale causa di stress e dunque di selezione. L'effetto tossico dell'alcol sulle cellule di *Brettanomyces*

ces, come per altri blastomiceti, si esplica nelle seguenti modificazioni:

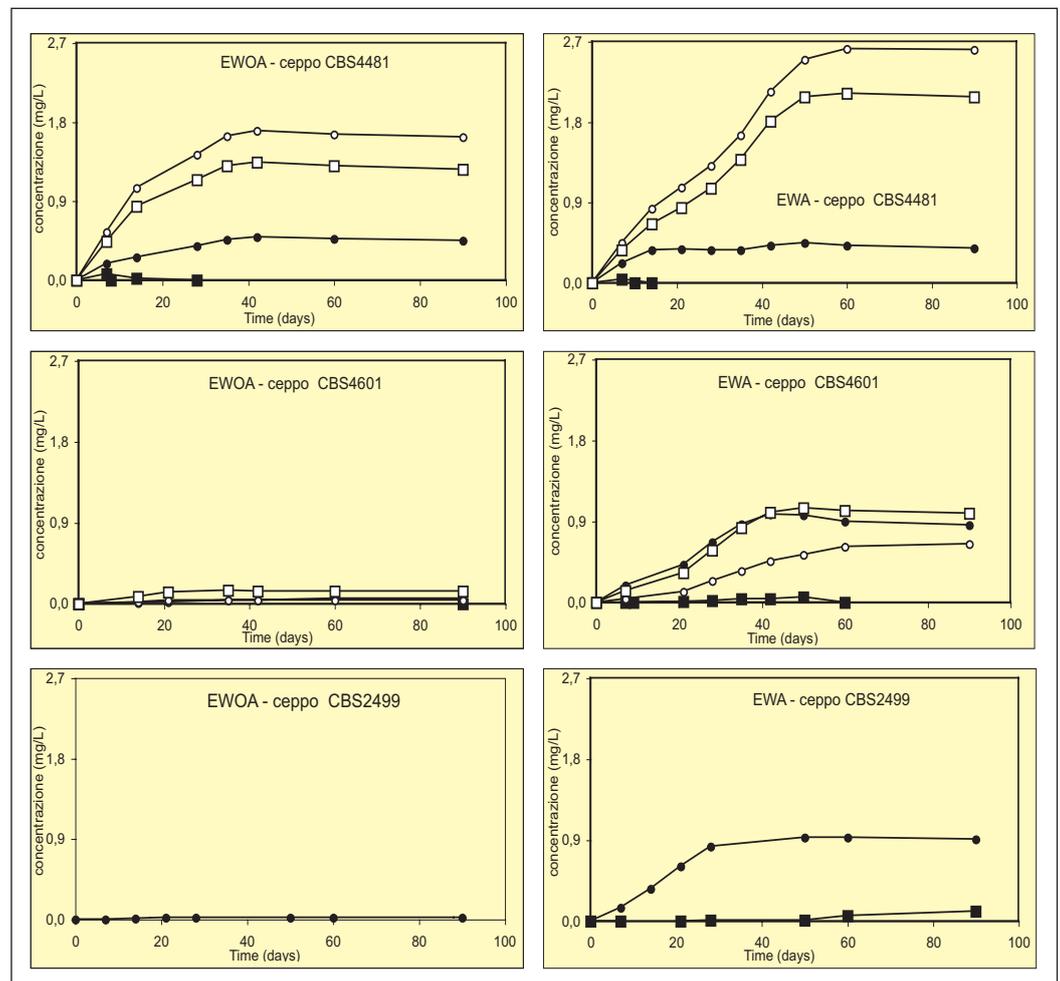
- riduzione della fluidità delle membrane attraverso la diminuzione dello stato di idratazione delle teste polari dei fosfolipidi, che a sua volta comporta il malfunzionamento dei trasportatori (proteine carrier), indispensabili per veicolare zuccheri ed amminoacidi nel citoplasma;
- modulazione negativa degli scambi ionici, poiché l'etanolo rende possibile l'ingresso di protoni con conseguente acidificazione intracellulare. Per ripristinare condizioni di pH idoneo al mantenimento delle funzioni vitali la cellula estrude  $H^+$  con l'impiego di una pompa ATP dipendente, che sottrae energia al sistema;
- denaturazione delle proteine funzionali con conseguente riduzione o perdita di specifiche attività enzimatiche.

In *D. bruxellensis* l'incremento di concentrazione di etanolo fino al 8% v/v non determina, in un mezzo colturale contenente zuccheri (20g/L), un cambiamento nella velocità di crescita. Quest'ultima viene invece ridotta quando è presente tra il 10 e il 12% v/v di etanolo, per annullarsi a concentrazioni  $\geq$  al 14% v/v (Dias et al., 2003). Tuttavia le osservazioni sperimentali portano a considerare che, come accade per *S. cerevisiae*, l'alcol-tolleranza è un carattere ceppo dipendente e può essere indotta attraverso una fase di adattamento.

In effetti la risposta fisiologica del lievito alle condizioni di stress comporta i seguenti fenomeni:

- sintesi di proteine definite "da stress" (*heat shock proteins*) che consentono di proteggere gli enzimi dalla denaturazione, riportando alla conformazione attiva le proteine funzionali, e che operano da regolatori negativi della pompa ATP dipendente aiutando a ridurre il dispendio energetico;
- aumento degli acidi grassi insaturi nei fosfolipidi e di ergosterolo, per contrastare la riduzione della fluidità delle membrane.

**Fig. 4 - Produzione di fenoli volatili durante la crescita di tre ceppi di *Dekkera bruxellensis* in simil-vino, senza fase di adattamento (EWOA) e con adattamento all'etanolo 10% v/v (EWA). La concentrazione di 4-vinil-fenolo (●), 4-vinil-guaiacolo (■), 4-etil-fenolo (○) e 4-etil-guaiacolo (□) è espressa in mg/L**



## Qualità e sicurezza

### 6.1 La resistenza alla $SO_2$ .

Il potenziale antimicrobico dell'anidride solforosa rende ideale il suo impiego nella stabilizzazione del vino. I dati disponibili in letteratura sull'effetto dell' $SO_2$  in *D. bruxellensis* sono tuttavia controversi (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2006) poiché spesso i lavori sperimentali si riferiscono a livelli di  $SO_2$  totale o libera, che non hanno senso da un punto di vista enologico se non circostanziati da informazioni relative a pH, etanolo, composizione del vino. L'efficacia della sostanza antimicrobica è infatti esplicita dalla forma moleco-

lare: per il controllo di *Brettanomyces* viene normalmente raccomandato un livello di 0.5 - 0.8 mg/L di  $SO_2$  molecolare. Alcuni ricercatori (Du Toit et al., 2005) hanno impiegato due tecniche diverse (conta su terreno colturale e in parallelo osservazione microscopica in epifluorescenza) per valutare la vitalità di una popolazione di *D. bruxellensis* sottoposta a trattamento con differenti dosi di  $SO_2$  molecolare. Gli esperimenti hanno evidenziato come l'anidride solforosa possa indurre uno stato di non coltivabilità (VNC) già a concentrazioni intorno a 0.25 mg/L di  $SO_2$ , mentre a 0.8 mg/L si determina un abbattimento completo della vitalità. Siccome durante l'invecchiamento in botte si assiste ad

una riduzione progressiva della concentrazione di  $SO_2$ , la gestione di tale antimicrobico nel periodo di affinamento diventa cruciale per il controllo dell'eventuale contaminazione. La pratica condotta da alcuni produttori di aggiungere piccole e frequenti dosi di  $SO_2$  risulta però controproducente poiché porta alla selezione di ceppi maggiormente resistenti (Coulter et al., 2004). Il meccanismo molecolare impiegato da *D. bruxellensis* per detossificare l'azione dell' $SO_2$  non è ora conosciuto.

### 6.2 La produzione di fenoli volatili.

La responsabilità della produzione di fenoli volatili in vino da parte di ceppi appartenenti al genere *Brettanomyces*

è ben documentata in bibliografia. Questi composti, in particolare i 4-etil-fenoli, generano, a seconda della concentrazione, aromi sgradevoli che richiamano sentori di sudore di cavallo, cuoio, pelle animale oppure odore di medicinale, cerotto, plastica bruciata con sapori di speziato, di chiodi di garofano. La formazione di fenoli volatili è il risultato di trasformazioni enzimatiche che avvengono a partire dagli acidi idrossicinnamici, naturalmente presenti nelle uve, ove si ritrovano esterificati con l'ac. tartarico. L'attività cinnamoil-esterasica di alcuni enzimi fungini aggiunti o residuali, o derivanti da batteri, rende dapprima liberi l'ac. p-cumarico, l'ac. ferulico e l'ac. caffeico. Successivamente i lieviti in questione, come altri saccaromiceti, sono in grado di decarbossilare gli acidi idrossi-cinnamici liberi formando i rispettivi derivati idrossi-stirenici, quali 4-vinil-fenolo, 4-vinil-guaiacolo e 4-vinil-catecolo, anch'essi con proprietà sensoriali negative. Infine tali molecole sono ridotte nei corrispondenti etil-derivati, 4-etil-fenolo, 4-etil-guaiacolo e 4-etil-catecolo (Heresztyn, 1986a; Chatonnet et al., 1997; Hesford et al., 2004). È proprio quest'ultimo passaggio dovuto ad una specifica attività vinil-fenolo-reduktasica che risulta distintiva delle specie *D. anomala* e *D. bruxellensis*, e che consente la formazione di etil-fenoli in vino a concentrazioni superiori alla soglia di percezione. Il contenuto di fenoli volatili che si forma dipende dalla quantità di precursori presenti nel mezzo di partenza, dalle condizioni ambientali e dalla capacità del ceppo di operare le trasformazioni. Mediamente il valore del rapporto tra la concentrazione di 4-etil-fenolo e quella di 4-etil-guaiacolo si situa intorno a 4.

In Fig. 2 viene esposta la via di formazione dei 4-etil-fenoli a partire dagli acidi cinnamici. Come tutte le sostanze odorose, i composti fenolici succitati, possono essere avvertiti solo quando raggiungono una concentrazione minima, denominata soglia di

**Tab. 1 - Informazioni relative ai fenoli volatili**

Sostanza	Concentrazione riscontrabile in vino ( $\mu\text{g/L}$ )	Soglia di percezione ( $\mu\text{g/L}$ )	Descrittore
4-Vinil-fenolo	1-10	400-700	Fenolico, vernice, medicinale
4-Vinil-guaiacolo	1-15	30-380	Speziato, chiodo di garofano
4-Etil-fenolo animale	100-3600	30-440	Sudore di cavallo, cuoio, pelle
4-Etil-guaiacolol	1-400	20-50	Speziato, chiodo di garofano

percezione. La sensazione dell'odore, oltre che dall'individuo, dipende anche dal solvente in cui tali molecole sono sciolte e dunque in letteratura si possono riscontrare differenti valori di soglia di percezione in funzione del tipo di vino o di altro mezzo acquoso in cui le prove sensoriali sono state realizzate (Tab. 1).

### 6.3 La formazione di ammine biogene.

Tra i rischi i principali riguardanti la sicurezza nel consumo del vino la formazione di ammine biogene costituisce senza dubbio un tema attuale e futuro. Tali molecole, se presenti ad alte concentrazioni (> 200 mg/kg), possono causare problemi di intossicazione o fenomeni di intolleranza nei consumatori; in particolare l'istamina e la tiramina sono le più tossiche per la salute umana, con effetti diretti sul sistema circolatorio e nervoso dell'individuo. L'Unione Europea ha già emanato regolamenti che prevedono limiti massimi accettabili di istamina per alcuni alimenti e, specificamente nel settore enologico, alcuni Paesi del Nord Europa hanno già provveduto a stabilire valori soglia raccomandati. L'accumulo di ammine biogene nel prodotto è dovuto all'azione di microrganismi in grado di decarbossilare gli aminoacidi; le ammine biogene più frequentemente riscontrate in vino sono istamina, tiramina, putrescina, cadaverina, fenilettilamina, spermina e spermidina. Il tipo e la quantità di ammina riscontrati dipendono tuttavia dall'entità del precursore e dall'attività enzimatica

disposta dal microrganismo. Nel vino i batteri malolattici sono i maggiori responsabili di questo fenomeno. Tuttavia recenti studi hanno evidenziato l'attitudine dei lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* a produrre ammine biogene (Agnolucci et al., 2009; Caruso et al., 2002; Granchi et al., 2005; Vigentini et al., 2008); la capacità di formare queste sostanze sembra essere ceppo-dipendente. I determinanti genetici delle decarbossilasi per *B. bruxellensis* non sono stati ancora identificati.

## Caratteristiche fisiologiche

### 7.1 Comportamento di differenti ceppi di *Dekkera bruxellensis* in vino modello.

Il lavoro sperimentale che viene presentato ha avuto come obiettivo lo studio delle caratteristiche fisiologiche di differenti ceppi *D. bruxellensis* per comprendere in maniera più approfondita le correlazioni esistenti tra crescita cellulare, consumo di fonti di carbonio, produzione di ac. acetico, fenoli volatili e ammine biogene, in condizioni enologiche.

Dopo uno screening iniziale che ha previsto la valutazione della capacità di produrre 4-etil-fenoli da parte di diciassette ceppi appartenenti alla specie *D. bruxellensis*, provenienti dalla collezione internazionale CBS (Centraal-Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) e isolati da mosti o vini in differenti zone geografiche, sono stati selezionati i seguenti cinque ceppi: CBS 2336 (basso produttore, isola-

to da vino in Francia, Gironde, S. Emilion), CBS 2499 (basso produttore, isolato da vino in Francia, Medoc, Quinsac), CBS 4459 (medio produttore, isolato da vino bianco secco in Sudafrica), CBS 4481 (alto produttore, isolato da vino spumante in Sudafrica), CBS 4601 (medio produttore, isolato da vino in Sudafrica). Un ceppo vinario di *S. cerevisiae* (L288) proveniente dalla collezione microbica ESAVE (Ente per gli Studi e l'Assistenza. Viticola ed Enologica dell'Emilia Romagna, Tebano, RA, Italia) è stato incluso nella sperimentazione come controllo.

### 7.2 Condizioni di crescita.

Le prove di crescita dei ceppi sono state realizzate in un vino modello definito "similvino", cioè un mezzo sintetico sterile, avente composizione simile ad un vino secco dopo trasformazione malolattica.

La sua formulazione era la seguente: 11.5% (v/v) etanolo, 5 g/L glicerolo, 5 g/L ac. tartarico, 0.5 g/L ac. L-malico, 0.2 g/L ac. citrico, 4 g/L ac. L-lattico, 1 g/L fruttosio, 6.7g/L fonti di azoto organico, 0.12 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5 mL/L Tween80, 20 mg/L uracile, 15 mg/L ergosterolo, 10 mg/L acidi p-coumarico, 10 mg/L ac. ferulico, pH = 3.3. L'aggiunta di ac. lattico è stata volutamente abbondante per saggiare l'eventuale capacità dei ceppi di utilizzare tale fonte di carbonio.

Per ogni ceppo sono stati allestiti due esperimenti differenti per valutare il possibile adattamento di *D. bruxellensis* allo stress da etanolo. Nel primo, detto EWOA (*Esperi-*

**Tab. 2 - Coefficienti di correlazione (r) tra le variabili monitorate negli esperimenti**

	OD	Coltivabilità	Fruttosio	Acetato	Ac. L-Lattico	4-Etil-fenolo	4-Etil-guaiacolo
OD	1.000	0.600** (96)	-0.800** (61)	0.943** (56)	-0.754** (23)	0.689** (68)	0.629** (68)
Coltivabilità		1.000	-0.332* (61)	0.461** (55)	-0.786** (19)	0.244 (66)	0.192 (71)
Fruttosio			1.000	-0.709** (44)	0.441 (16)	-0.527** (47)	-0.533** (47)
Acetato				1.000	-0.778** (23)	0.676** (37)	0.622** (37)
Ac. L-Lattico					1.000	-0.412 (18)	-0.378 (18)
4-Etil-fenolo						1.000	0.951** (46)
4-Etil-guaiacolo							1.000

Livello di significatività:  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$

Il numero di osservazioni, per ogni coppia di variabili considerata, è mostrato in parentesi

*ment WithOut Adaptation*) l'inoculo del simil-vino, realizzato ad una concentrazione di  $10^5$  UFC/mL, è stato preparato impiegando cellule coltivate in brodo colturale; la condizione EWOA è stata predisposta per simulare una situazione nella quale il lievito contamina un vino dopo la fine della fermentazione alcolica. Nel secondo esperimento, detto EWA (*Experiment With Adaptation*) l'inoculo del simil-vino, eseguito alla medesima concentrazione cellulare, derivava da una popolazione cellulare che era stata coltivata in un mezzo colturale contenente etanolo al 10% (v/v); la condizione EWA mimava dunque una situazione nella quale il lievito contaminante era presente nel mosto e si adattava durante la fermentazione alcolica.

Successivamente le sospensioni cellulari così approntate sono state suddivise in aliquote da 10 mL utilizzando provette sterili, ermetiche, riempite senza spazio di testa. Queste sono quindi state incubate a 27° C per tre mesi ed il loro contenuto è stato analizzato a cadenze temporali regolari (ogni settimana per i primi 42 giorni). La concentrazione di ossigeno disciolta nel simil-vino è stata misurata utilizzando un elettrodo polarografico: la concentrazione era attorno al 98% di saturazione all'inizio della sperimentazione mentre si riduceva al di sotto del 30% (corrispondente ad un valore  $< 1.8$  mg/L di  $O_2$ ) a fine sperimentazione, simulando un ambiente semi-anaerobico come

quello si riscontra in un vino in affinamento. Per evitare che la fase di prelievo cambiasse le condizioni ed influenzasse i risultati, ogni provetta aperta veniva eliminata dopo l'analisi.

## Metodi analitici e risultati

### 8.1 Analisi microbiologiche e chimiche.

Per ogni ceppo e per ogni punto del monitoraggio sono state eseguite le seguenti analisi:

- sviluppo cellulare, valutato mediante misurazione spettrofotometrica della densità ottica a 640 nm;
- coltivabilità cellulare, stabilita come numero di colonie su terreno YEPD agarizzato incubando le piastre a 25°C per 5 giorni;
- concentrazioni di D-fruttosio, etanolo, glicerolo, ac. acetico, ac. L-malico, ac. citrico e ac. D-/L-lattico, determinate tramite l'uso di kit enzimatici basati su tecnica spettrofotometrica;
- concentrazioni di 4-vinil-fenoli e 4 etil-fenoli, determinate mediante separazione cromatografica in HPLC e rilevazione in UV (Vigentini et al., 2008);
- concentrazione di ammine biogene, analizzate dopo derivatizzazione con dabsyl, mediante separazione cromatografica in HPLC e rilevazione in UV, secondo il protocollo previsto da Krause et al. (1995).

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate in

doppio.

### 8.2 Risultati della crescita in simil-vino.

In generale i dati raccolti indicano chiaramente che l'entità del deterioramento del prodotto (simil-vino) a seguito dello sviluppo di *D. bruxellensis* è dipendente dal ceppo ed è associato alla capacità di crescita della popolazione cellulare nelle condizioni adottate.

A titolo esemplificativo vengono riportati nella Fig. 3 i risultati analitici dei parametri indagati ottenuti durante il monitoraggio di tre ceppi che hanno mostrato comportamenti nettamente differenti.

Il ceppo CBS 4481 ha manifestato un'evoluzione dei parametri sovrapponibile nella condizione senza adattamento (EWOA) e in quella con adattamento all'etanolo (EWA); la vitalità è rimasta elevata per tutta la durata degli esperimenti, mantenendo invariata la capacità di formare colonie fino al termine delle prove ( $> 10^6$ UFC/mL). Esso ha evidenziato un'alta velocità di crescita e una grande produzione di ac. acetico (0.93 - 0.82 g/L rispettivamente in EWOA e in EWA). Il fruttosio è stato esaurito in due settimane e successivamente il microrganismo ha cominciato a consumare l'ac. L-lattico (0.48 g/L in EWOA - 0.72 g/L in EWA) e l'ac. malico (0.10 g/L in EWOA - 0.08 g/L in EWA).

Assai diversi sono stati gli andamenti osservati per il ceppo CBS 4601 nelle due

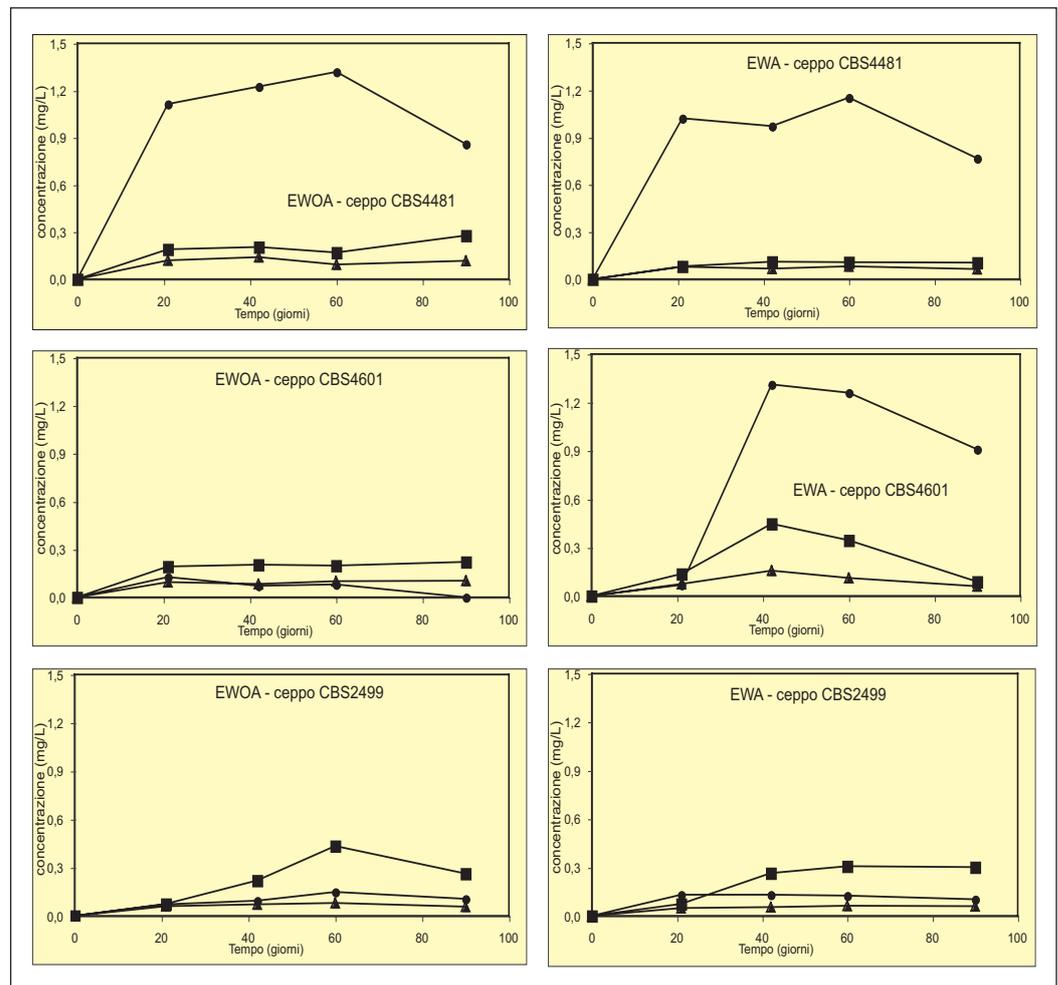
condizioni. Nell'esperimento delle cellule senza adattamento (EWOA) la vitalità è risultata costante ( $10^5 - 10^6$  UFC/mL) mentre in quello con cellule già adattate all'alcol (EWA) si è assistito, inaspettatamente, ad un abbassamento della coltivabilità ( $10^3$  UFC/mL) fino a circa il 40° giorno, per avere poi una ripresa della moltiplicazione cellulare fino alla fine delle prove ( $> 10^6$  UFC/mL).

Nella prima condizione (EWOA) il fruttosio risultava esaurito in 30 giorni, l'ac. L-lattico e l'ac. malico venivano consumati (rispettivamente 0.71 g/L e 0.04 g/L) a partire dal 50° giorno con evidente produzione di ac. acetico (0.96 g/L). Nell'esperimento con adattamento (EWA) l'utilizzo del fruttosio è avvenuto in una primissima fase iniziale, dopodiché il contenuto è rimasto costante per 40 giorni per poi essere esaurito solo al 60° giorno. Il consumo di ac. L-lattico e ac. malico è stato assai ridotto rispetto alle precedenti situazioni (0.10 g/L e 0.04 g/L) come pure la produzione di ac. acetico (0.48 g/L).

Anche il ceppo CBS 2499 ha evidenziato un comportamento differente negli esperimenti con e senza adattamento. Nella prima condizione (EWOA), esso ha mostrato un consumo limitato di fruttosio durante la prima settimana e la capacità di formare colonie si è mantenuta solo nei primi 20 giorni dall'inizio dell'esperimento. Nella seconda condizione invece (EWA) si è manifestata una crescita nelle prime tre settimane con contemporaneo esaurimento del fruttosio. Dopodiché la coltivabilità è crollata intorno al 60° giorno; il consumo di ac. L-lattico assai è stato ridotto e la produzione di ac. acetico è stata contenuta (0.27 g/L).

Riassumendo e tenendo conto anche dei risultati ottenuti con gli altri ceppi di *D. bruxellensis* sottoposti ad indagine, si osservava che il fruttosio era la prima fonte di carbonio a venir utilizzata da tutti i ceppi e che la crescita di quest'ultimi era sostanzial-

**Fig. 5 - Produzione di fenoli volatili durante la crescita di tre ceppi di *Dekkera bruxellensis* in simil-vino, senza fase di adattamento (EWOA) e con adattamento all'etanolo 10% v/v (EWA). La concentrazione di 4-vinil-fenolo (●), 4-vinil-guaiacolo (■), 4-etil-fenolo (○) e 4-etil-guaiacolo (□) è espressa in mg/L**



mente collegata al suo consumo. L'ac. L-lattico e L-malico venivano degradati solo nel momento in cui il fruttosio era già esaurito; d'altra parte l'ac. citrico, l'etanolo e il glicerolo non sono mai stati metabolizzati. Tutti i ceppi saggiati in grado di crescere nelle condizioni sperimentali adottate, producevano circa 0.2-0.3 g/L di glicerolo.

## Il carattere "Bret" in vino modello

### 9.1 Produzione di fenoli volatili.

Nella Fig. 4 sono riportati gli andamenti della produzione di fenoli volatili per i tre ceppi già precedentemente scelti.

Nella condizione senza

adattamento (EWOA) il ceppo CBS 4481 ha evidenziato una marcata e continua produzione, fino a circa il 40° giorno, di 4-etil-fenolo (1.7 mg/L), di 4-etil-guaiacolo (1.3 mg/L) e di 4-vinil-fenolo (0.5 mg/L). Nell'esperimento in cui le cellule venivano previamente adattate all'etanolo (EWA) le quantità di etil-fenoli prodotti sono state significativamente più elevate (2.7 mg/L di 4-etil-fenolo e 2.0 mg/L di 4-etil-guaiacolo), mentre la concentrazione nel di 4-vinil-fenolo rimaneva costante intorno a 0.45 mg/L.

La maggior differenza di comportamento tra le due condizioni sperimentali adottate è stata quella osservata per il ceppo CBS 4601: la popolazione cellulare senza adattamento (EWOA) ha pro-

dotto bassissime quantità di fenoli volatili ( $< 0.2$  mg/L), mentre dopo adattamento in etanolo (EWA) essa ha riversato nel mezzo circa 1.0 mg/L di 4-etil-guaiacolo, 0.9 mg/L di 4-vinil-fenolo e 0.5 mg/L 4-etil-fenolo.

Sorprendentemente Il ceppo CBS 2499 non ha accumulato alcun composto fenolico nella condizione EWOA, mentre nella condizione con adattamento (EWA) ha prodotto unicamente 4-vinil-fenolo (fino a 0.9 mg/L).

Il ceppo di controllo *S. cerevisiae* L288, come atteso, ha riversato nel simil-vino fino a 0.56 mg/L di 4-vinil-fenolo e 0.15 mg/L di 4-vinil-guaiacolo nella condizione EWOA; una inferiore quantità delle stesse molecole è stata rilevata nella condizione

EWA (dati non esposti).

## 9.2 Formazione di ammine biogene.

Tutti i ceppi indagati sono stati in grado di produrre quantità rilevabili di putrescina, cadaverina e spermidina (Fig. 5). In particolare il ceppo CBS 4481 ha accumulato spermidina fino a 1.3 mg/L (in condizione EWOA) e 1.2 mg/L (in condizione EWA) entro 60 giorni, prima di manifestare una riduzione rispettivamente a 0.85 mg/L e 0.70 mg/L verso la fine della prove.

Nell'esperimento senza adattamento (EWOA) la popolazione cellulare di CBS 4601 ha sintetizzato una quantità delle tre poliammine relativamente bassa (< 0.3 mg/L); invece nella condizione con adattamento (EWA) si osservava una netta formazione di spermidina (1.3 mg/L), putrescina (0.4 mg/L) e cadaverina (0.15 mg/L) intorno al 40° giorno che successivamente andava scemando.

Il ceppo CBS 2499 produceva principalmente putrescina fino a 0.4 mg/L (in condizione EWOA) e 0.3 mg/L (in condizione EWA) verso il 60° giorno.

In ogni caso la formazione di ammine biogene non sembra essere collegata alla crescita.

## Discussione dei risultati

I dati ottenuti dalle prove sperimentali sono stati sottoposti ad analisi statistica per comprendere quali relazioni significative potessero sussistere tra le diverse variabili misurate. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati attraverso il modello generale (Tab. 2) (Camussi et al., 1986); solo i valori diversi da zero sono stati considerati. I risultati dell'analisi relativi ai valori di etanolo, glicerolo, ac. malico, 4-vinil-fenolo e 4-vinil-guaiacolo non sono stati riportati poiché non hanno mostrato nessuna interazione significativa. I valori delle conte in piastra hanno mostrato una correlazione negativa

con i valori di ac. L-lattico, indicando che l'incremento di biomassa osservato era effettivamente legato all'utilizzo dell'ac. L-lattico. Sono state osservate correlazioni significative di segno negativo tra valori di fruttosio e di ac. acetico e tra valori di ac. L-lattico e di ac. acetico evidenziando l'attitudine di *D. bruxellensis* a formare ac. acetico come un prodotto finale e, interessante, a consumare lattato come fonte di carbonio.

Le concentrazioni di 4-etil-fenolo e 4-etil-guaiacolo sono risultate positivamente correlate tra di loro, con i valori di densità ottica e di ac. acetico, mentre hanno mostrato una correlazione negativa con i valori di fruttosio. Infine, i valori dei fenoli volatili sono stati sottoposti ad analisi della varianza allo scopo di verificare gli effetti di due differenti fattori: la condizione sperimentale (EWOA, EWA) ed il ceppo. Nel caso di 4-etil-fenolo, nessuna differenza significativa è stata osservata tra EWOA ed EWA, mentre differenze significative sono state trovate tra i diversi ceppi ( $P < 0.01$ ). Al contrario, l'ANOVA ha dimostrato che entrambi i fattori (condizione e ceppo) significativamente influenzano la produzione di 4-etil-guaiacolo ( $P < 0.01$ ).

I risultati ottenuti mettono in evidenza come *D. bruxellensis* dopo l'esaurimento del fruttosio, in presenza di una bassa concentrazione di ossigeno disciolto, è in grado di consumare gli acidi L-lattico e L-malico e al contrario, l'ac. citrico ed etanolo non sono stati impiegati come fonte di carbonio.

La produzione di acetato è avvenuta in parallelo con la crescita, come già citato da altre fonti (Ciani e Ferraro, 1997), e due tra i ceppi saggiati (*D. bruxellensis* CBS 4481 and CBS 4601) hanno prodotto ac. acetico in quantità eccedenti le soglie massime concesse dalla legislazione UE inerenti la produzione di vini ad alta qualità. L'etanolo rappresenta ancora il fattore di maggiore stress per una popolazione microbica e vini ad elevato contenuto al-

colico non mostrano alte concentrazioni di fenoli volatili (Rodrigues et al., 2001). I nostri risultati indicano che la tolleranza all'etanolo in *D. bruxellensis* è un carattere ceppo-dipendente.

La fase di adattamento in terreni contenenti etanolo 10% v/v, ha infatti generato differenti risposte nei diversi ceppi: in alcuni casi la pre-esposizione ha influito negativamente sulla successiva crescita nel simil-vino; in altri, la fase di adattamento all'etanolo ha comportato una migliore risposta della popolazione in termini di vitalità e produzione di metaboliti. Per quanto riguarda la produzione di fenoli volatili, i ceppi analizzati in questo studio hanno mostrato una ampia eterogeneità di comportamento e tuttavia si è osservato come tali trasformazioni siano connesse alla crescita cellulare, e dunque legate ad attività metaboliche primarie, come il recupero il potere riducente all'interno del citoplasma.

Diverse e complementari sono le disposizioni tecniche e analitiche applicate attualmente per prevenire e combattere l'alterazione *Brettanomyces/Dekkera* durante la produzione del vino. Tra queste ci sono il mantenimento di rigorose condizioni igieniche in cantina, il monitoraggio degli zuccheri residui, il controllo della temperatura, l'impiego dell'SO<sub>2</sub>, i trattamenti disinfezione delle botti e la riduzione di riutilizzo delle stesse, etc (Lonvaud-Funel e Renouf, 2005; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Oelofse et al., 2008). Anche se queste pratiche spesso aiutano a contenere o risolvere il problema, non è perfettamente chiaro in che modo agiscano e perché abbiano successo.

La ragione di questo limite è che le attuali conoscenze sulla fisiologia di *Brettanomyces/Dekkera* sono ancora limitate, soprattutto in condizioni enologiche. Un altro tema importante è comprendere se il potenziale alterativo dipende dal ceppo e dunque confutare la tesi che la contaminazione da *D. bruxellensis* necessariamente comporti una

produzione di fenoli volatili a concentrazioni inaccettabili. Tutte queste considerazioni sono state la base del presente lavoro.

## Bibliografia

- Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A., Nuti, M. (2007). Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real time PCR. *It. J. Food Sci.* 19: 155-166.
- Agnolucci M., Vigentini I., Capurso G., Merico A., Tirelli A., Compagno C., Foschino R., Nuti M. (2009) "Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines". *Int. J. Food Microbiol.*, 130 (3): 238-244.
- Aguilar Uscanga M.G., Delia M.-I., Strehaiano P. (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: 157-162.
- Boulton R., Singleton V., Bisson L., Kunkee R. (1996) *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman Hall, New York.
- Camussi A., Moller F., Ottaviano E., Sari Gorla M. (1986) *Statistical Methods for the Biological Investigation*, Zanichelli, ed., Bologna.
- Caruso M., Fiore C., Contursi M., Salzano G., Paparella A., Romano P. (2002). Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 159-163.
- Chatonnet P., Viala C., Dubourdieu D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48: 443-448.
- Ciani M., Ferraro L. (1997) Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sci. Food Agric.*, 75: 489-495.
- Ciani M., Maccarelli F., Fatichenti F. (2003). Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* ye-

- asts under different conditions of aerobiosis. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 419-422.
- Connell L., Stender H., Edwards C. G. (2002). Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53(4):322-324.
- Conterno, L., Joseph, L.C.M., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F. (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57 (2): 139-147.
- Cosentino S., Fadda M.E., Deplano M., Mulargia A.F., Palmas F. (2001). Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 53-58.
- Coulter, A., Robinson, E., Cowey, G., Francis, I.L., Lattey, K., Capone, D., Gishen, M. & Godden, P.W., (2004). *Dekkera/Brettanomyces* yeast – an overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control. In: Bell, S., de Garis, K., Dundon, C., Hamilton, R., Partridge, S. & Wall, G. (eds). *ASVO Proc. Grapegrowing at the Edge, Managing the Wine Business, Impacts on Wine Flavour, Barossa, Australia: The Australian Society of Viticulture and Oenology*. pp. 51-55.
- Dias L., Pereira-da-Silva S., Tavares M., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20: 377-384.
- Du Toit W.J., Pretorius I.S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature's own arsenal – A review. *South Afr. J. Enol. Vitic.*, 21:74-96.
- Du Toit WJ, Pretorius I.S., Lonvaud-Funel A. (2005) The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 862-871.
- Fugelsang, K.C. (1998). *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr. Hyde des vins? *Biofutur*, 182: 22-23.
- Galil J. F., Ducourmau P., Leaute B., Strehaiano, P. (2003). Effet des apports d'oxygène et des sucres résiduels sur la croissance de *Brettanomyces* sp. et la production de phénols volatils. Communication au VIIe Symposium International d'OEe-nologie. 19-21 Juin 2003.
- Gancedo C, Serrano R (1989). Energy-yielding metabolism. In: *The Yeasts: Metabolism and Physiology of Yeasts*. 2nd ed. Vol. 3. Rose A. H. and Harrison J. S. Academic Press Limited. London. 205-251.
- Gaunt D.M., Degn H., Lloyd D. (1988). The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast* 4: 249-255.
- Geros H., Azevedo M.M., Cassio, F. (2000). Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 59-62.
- Geros H., Cassio F., Leao C. (1997). Glucose transport mechanism in the yeast *Dekkera anomala*. 18th ISSY. *Yeast Nutrition and Natural Habitats*, 24-29 August, 1997. Bled, Slovenia.
- Granchi L., Romano P., Mangani S., Guerrini S., Vincenzini M. (2005) Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bull OIV* 895: 595-609.
- Heresztyn T. (1986) Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts. *Arch. Microbiol.*, 146: 96-98.
- Hesford F., Schneider K., Porret N.A., Gafner J. (2004). Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wine tainted by *Brettanomyces* off-flavor. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55:304A.
- Jones R.P., Pamment N., Greenfield P.F. (1981). Alcohol fermentation by yeast. The effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* 16: 42-45.
- Kappeli O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. *Adv. Microbiol. Physiol.* 28: 181-209.
- Krause I., Bockhardt A., Neckermann H., Henle T., Klostermeyer H. (1995). Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *J. Chrom. A* 715: 67-79.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (2000). (4th ed. revised). *The yeasts. A taxonomic study*. Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Lonvaud-Funel, A. (2000). Les aspects microbiologiques de l'élevage des vins rouges en barriques. Vème colloque des Sciences et Techniques de la Tonnellerie. *Connaissances actuelles et avenir de l'élevage en barriques*, 47-51.
- Lonvaud-Funel A., Renouf V. (2005). Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques usagées. *Rev. Fr. Oenol.* 211, 10-14.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 86: 23-50.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (2006). *Dekkera/Brettanomyces* spp. Chapter 13. In: Blackburn, C. de W. (ed). *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Ltd, Abington, Cambridge, UK. pp. 353-398.
- Millet V., Lonvaud-Funel A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 136-141.
- Oelofse A., Pretorius I.S., du Toit M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 29 (2): 128-144.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A (1998). *Traité d'oenologie - tome 1 - Microbiologie du vin, vinification*, Du-nod (Eds), Paris.
- Rodrigues N., Gonclaves G., Pereira-da-Silva S., Malfeito-Ferreira M. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90:58-599.
- Scheffers W.A., Wiken T.O. (1969) The Custers effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 35 (suppl) *Yeast Symposium* 1969.
- Van Dijken P.J., Scheffers W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 199-224.
- Vigentini I., Romano A., Compagno C., Merico A., Molinari F., Tirelli A., Foschino R., Volonterio G. (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8 (7): 1087-1096.
- Wijsman M.R., van Dijken J.P., van Kleeff B.H., Scheffers W.A. (1984). Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 50(2):183-92.

#### Ringraziamenti.

Gli autori sono lieti di ringraziare le persone che hanno proficuamente collaborato alla realizzazione di questi e ad altri studi realizzati sul tema *Brettanomyces: Agnolucci Monica (Università di Pisa), Compagno Concetta (Università di Milano), Lustrato Giuseppe (Università del Molise), Merico Annamaria (Università di Milano), Molinari Francesco (Università di Milano), Nuti Marco Paolo (Università di Pisa), Ranalli Giancarlo (Università del Molise), Tirelli Antonio (Università di Milano)*. Il lavoro è stato finanziato dal MIUR nell'ambito del PRIN (bando 2007) con il progetto intitolato "Strategie di analisi e di controllo dello sviluppo di