

DOCUMENTO
TECNICO

Franco Alessandria
Paola Borlatto
Marco Cerruti
Marco Echafte
Barbara Roba

Enocontrol - Alba (CN)

*Da sinistra:
 P. Borlatto
 F. Alessandria*

INDAGINE SUL CONTENUTO IN ETILFENOLI E SULLA PRESENZA DI BRETTANOMYCES IN VINI ALBESI

La ricerca svolta è consistita in uno screening sulla presenza di fenoli volatili in vini dell'Albese. I risultati evidenziano una buona percentuale di campioni analizzati con un quantitativo di 4-etilfenolo superiore al valore soglia. Sensorialmente, si rilevano il mascheramento dei caratteri di tipicità di ciascun vitigno e, in alcuni casi, le peculiari sensazioni olfattive negative.

Introduzione

Negli ultimi anni la produzione enologica ha visto crescere in misura considerevole le qualità specifiche dei suoi prodotti, in funzione di una richiesta dei consumatori sempre più orientata verso prodotti di costante ed elevata qualità. In quest'ottica la produzione si è indirizzata verso vini rossi caratterizzati da una maggiore complessità, derivanti da uve più mature, con elevati tenori alcolici ed estratto e pH più alti.

Inoltre si è venuta progressivamente affermando la tendenza a non intervenire in maniera pesante sui vini, soprattutto con la filtrazione, per preservarne la tipicità e l'integrità.

Molto spesso però, la leggerezza degli interventi può sconfinare nelle alterazioni, come nel caso della contaminazione da parte delle specie di lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* (o alla sua forma sporulante *Dekkera*). Questi microrganismi, che presentano un elevato

polimorfismo, in presenza di ossigeno producono molto acido acetico ed acido solfidrico, ma possono svilupparsi anche in anaerobiosi stretta, stimolati da una piccola quantità di zuccheri residui, producendo 4-etilfenolo dall'acido p-cumarico e 4-etilguaiacolo dall'acido ferulico (Chatonnet, 1993). Questi composti sono stati identificati come i principali responsabili della comparsa di odori fenolici ed animali (Licker et al., 1998), che richiamano i sentori di fattoria,



sudore di cavallo, medicinale, pelle animale, cuoio, affumicato (Pollnitz et al., 2000), cerotto tipo band-aid, plastica bruciata (Lanati e Marchi, 2003), solvente (Gilis et al.).

La soglia di percezione degli etilfenoli nei vini (4-etilfenolo + 4-etilguiacolo) è stata indicata da Chatonnet (1993) in 425 µg/L, mentre l'odore tipico del 4-etilfenolo, sempre secondo Chatonnet, diventa nettamente percepibile a partire da circa 620 µg/L e particolarmente dominante per concentrazioni che superano questo valore. Tuttavia la soglia di percezione degli etilfenoli può variare in relazione alla complessità del vino, al tenore alcolico ed alle sue condizioni di affinamento. In ogni caso questo carattere "fenolico" maschera le caratteristiche sensoriali di un vino, soprattutto quelle floreali e fruttate causando una perdita considerevole di qualità e di tipicità (Gerbaux e Vincent, 2001).

Brettanomyces è un lievito molto diffuso: è stato isolato dall'uva, da altri frutti, dal mosto, dal vino, dalle attrezzature di cantina, dalle canaline di scolo e dal personale di cantina. Non esiste quindi un sito contaminato o uno indenne: tutti i siti di vinificazione e di affinamento ospitano questo tipo di microrganismi (Malfeito Ferreira, 2002); ciò che differisce è il livello di contaminazione e le condizioni di gestione delle popolazioni in cantina.

La contaminazione più frequente avviene sul prodotto finito, nel corso del processo di affinamento, quando ormai le fermentazioni alcolica e malolattica sono terminate. In questo momento non esistono più i fenomeni di antagonismo e di competizione tra microrganismi, cosicché *Brettanomyces bruxellensis* (la specie più presente nel vino), può utilizzare le tracce di zuccheri residui presenti in tutti i vini (principalmente glucosio e fruttosio).

L'affinamento in barriques non induce sistematicamente una contaminazione dei vini e la comparsa di un carattere

"fenolico". Comunque, la conservazione in legno, l'utilizzo di barriques usate mal conservate o non adeguatamente lavate per paura di impoverirne troppo la qualità del legno, cantine di affinamento poco adatte (variazioni di temperature), rabbocchi (ossidazione eccessiva) e travasi insufficienti (frequenza di disinfezioni dei fusti) rappresentano una somma di circostanze che favoriscono la contaminazione e lo sviluppo di germi e del *Brettanomyces* in particolare (Bertrand, 2002). Anche l'impiego di barriques nuove, tuttavia, è favorevole al loro sviluppo: è stato ipotizzato, infatti, che qualche specie possa utilizzare il cellobiosio (disaccaride prodotto dalla degradazione della cellulosa) come fonte di carbonio per proliferare (Licker et al., 1998). Il legno nuovo però non è una fonte di inoculo, poichè la tostatura sterilizza perfettamente le barriques. Tuttavia va considerato il fatto che la concentrazione dell'anidride solforosa libera tende a diminuire molto più rapidamente nelle barriques nuove che in quelle usate, ed è noto che al di sotto di un certo livello di anidride solforosa *Brettanomyces* non è più inibito e compare un'alterazione proporzionale alla popolazione microbica (Chatonnet, 2000).

Per combattere questi lieviti di contaminazione occorre prevenire le alterazioni, attuando una rigorosa igiene di cantina, solfitando regolarmente tutti i vini in stoccaggio, eventualmente eliminando i contenitori contaminati.

Inoltre bisogna prestare particolare attenzione all'impiego di enzimi esogeni, poichè gli enzimi non purificati possiedono spesso un'attività collaterale di tipo cinnamil-esterasica che conduce alla formazione di acidi cinnamici i quali, per azione del *Brettanomyces*, possono essere prima decarbossilati a vinilfenoli e quindi ridotti a etilfenoli.

La comparsa di questi difetti sensoriali dovuti alla presenza di *Brettanomyces*

non è dunque da sottovalutare, soprattutto perché i consumatori sono sempre più attenti ed allenati a riconoscerli anche a basse concentrazioni.

Materiali e metodi

Nel corso della normale attività di analisi del laboratorio, sono stati selezionati cinquanta campioni di vino nei quali sono state riscontrate deviazioni olfattive potenzialmente riconducibili alla presenza di *Brettanomyces*. Si tratta di percezioni le cui etichette semantiche maggiormente utilizzate sono: "stalla", "animale", "vernice". I vini scelti sono stati assaggiati dal panel aziendale composto da sei elementi, durante cinque sedute di analisi sensoriale e, successivamente, sottoposti ad analisi chimica per la rilevazione degli etilfenoli.

L'esame sensoriale è consistito nella valutazione olfattiva dei campioni con successiva indicazione sulla scheda di assaggio appositamente creata (Fig.1) della rilevazione o meno delle sensazioni tipiche e, qualora rilevate, della loro intensità (bassa, media o alta). È stata inoltre contemplata la possibilità di indicare sulla scheda una precisa etichetta semantica ad ogni sensazione evocata dai singoli campioni.

Al fine di evitare influenze date dall'ordine di presentazione dei campioni, questi sono stati serviti secondo un piano d'assaggio definito: ogni giudice ha dunque assaggiato i vini in ordine diverso. I campioni sono stati presentati codificati con un numero di tre cifre casuali e, per ogni seduta, sono stati inseriti nel piano di assaggio anche alcuni "campioni testimone" (due o tre a seconda dei casi), vini cioè con valori di 4-etilfenolo al di sotto della soglia di percezione (620µg/L). Per ciascuno dei campioni "sospetti" sono inoltre state eseguite analisi relative a: alcool, estratto secco, polifenoli totali, zuc-



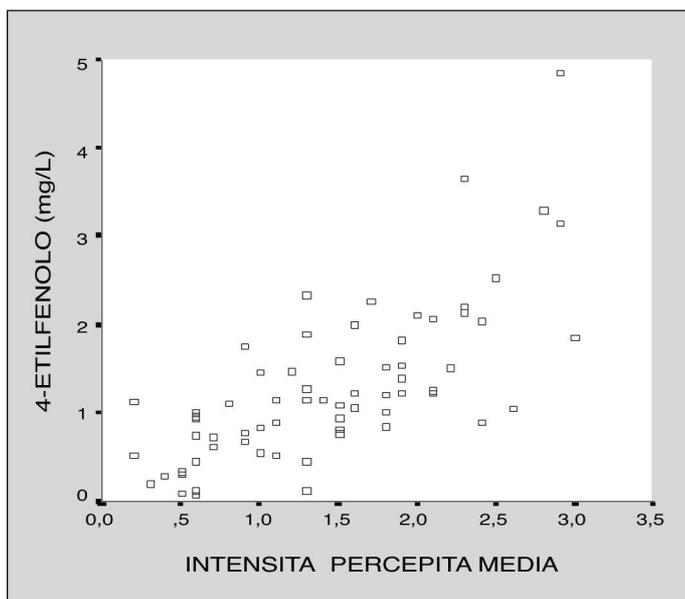
Fig. 1 - Scheda valutazione sensoriale etilfenoli

Data Giudice

Il giudice valuti la presenza o l'assenza delle sensazioni tipiche derivanti dagli etil fenoli e, qualora ne riscontrasse la presenza, anche l'intensità (Bassa, Media, Alta) ed eventualmente una più precisa definizione semantica.

				B	M	A	
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione
.....	Assenza odori fenolici	1	Odori fenolici	1	1	1	sensazione

Note

Fig. 2 - Valutazioni sensoriali medie/ contenuto 4-etilfenolo

cheri, pH, acidità volatile, anidride solforosa libera e totale al fine di verificare un'eventuale correlazione delle suddette sostanze sia con la presenza di 4-etilfenolo sia con l'intensità della percezione a parità di valori chimici.

Il passo successivo è consistito nella scelta di diciassette

aziende tra quelle produttrici dei vini precedentemente analizzati, presso le quali effettuare un prelievo di campioni da sottoporre ad analisi sensoriale, alle analisi chimiche e ad analisi microbiologiche per la ricerca del *Brettanomyces*.

Il criterio per la selezione delle aziende è stato il livello

di 4-etilfenolo riscontrato nelle analisi chimiche, in modo da creare un ventaglio di livelli di una certa variegatura.

In ciascuna azienda sono state prelevate tre bottiglie nuove successivamente sottoposte ad avvinamento. Relativamente ai contenitori: nelle vasche in acciaio, cemento, legno e vetroresina il prelievo è stato effettuato dalla valvola di fondo, mentre dalle barriques e dai tonneaux è avvenuto dopo battonnage. Si riportano in Tab. 2 la tipologia e l'annata dei vini prelevati nonché il contenitore in cui erano stoccati al momento del prelievo.

Protocollo analisi chimiche

La valutazione degli etilfenoli nel vino è stata effettuata seguendo il metodo proposto da Monje et al. (2001). Esso prevede l'utilizzo della microestrazione in fase solida con spazio di testa (HS-SPME) accoppiata alla gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). L'analisi statisti-

ca, l'ottimizzazione dei parametri HS-SPME e i dati di precisione sono contenuti nella stessa pubblicazione.

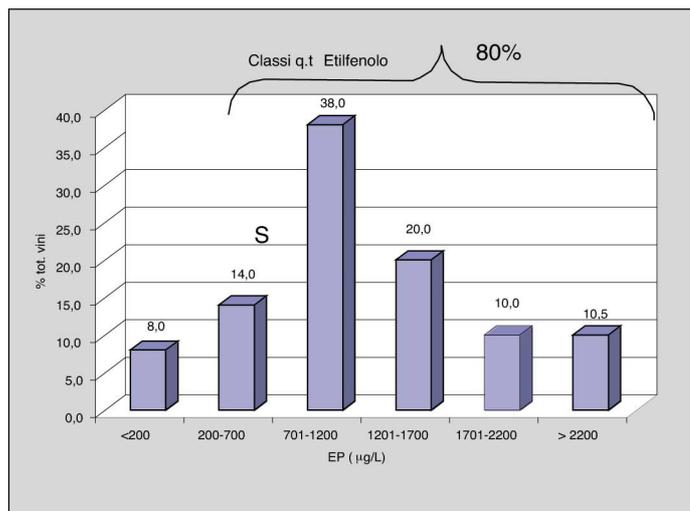
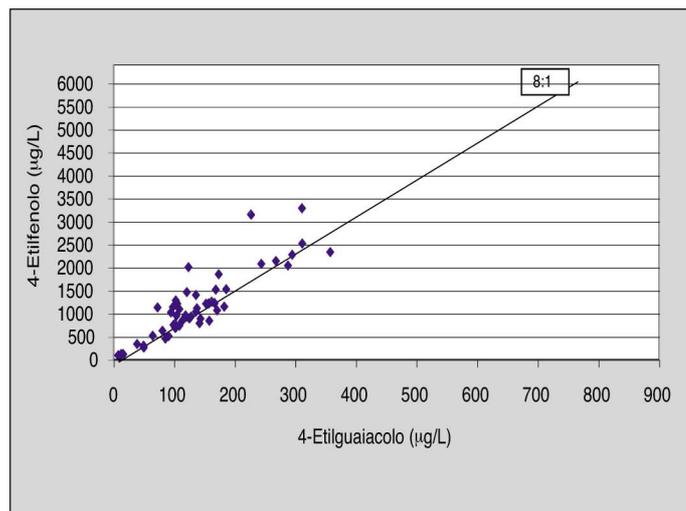
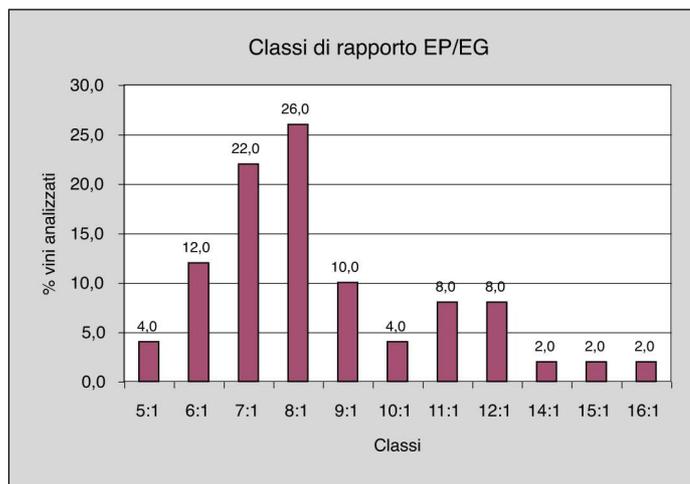
Reagenti. La fibra in poliaccrilato, il 4-etilfenolo (EP), il 4-etilguaiacolo (EG), il 3,4-dimetilfenolo (Standar Interno) e tutti gli altri reagenti sono stati reperiti in commercio.

Preparazione della soluzione modello di vino e delle soluzioni standard. La soluzione modello di vino è stata preparata in acqua distillata contenente circa il 12% di etanolo, 2,5 g/L di acido tartarico e 1 g di potassio idrogeno fosfato. Il pH di tale soluzione è stato portato a circa 3,4.

In seguito è stata preparata una soluzione standard di entrambe i fenoli volatili (EP ed EG) pesando esattamente circa 1000 mg/L di EP e 600 mg/L di EG nella soluzione modello di vino.

È stata successivamente preparata una soluzione di SI pesando esattamente circa 1000 mg/L di 3,4 dimetilfenolo nella stessa soluzione modello di vino.



Fig. 3 - Suddivisione del contenuto in 4-etilfenolo per classi nei vini esaminati**Fig. 4 - Rapporto etilfenolo ed etilguaiacolo nei vini esaminati****Fig. 5 - Classi di frequenza del rapporto etilfenolo/etilguaiacolo nei vini esaminati**

Procedura adottata

Taratura. Per successiva diluizione della soluzione standard di fenoli volatili è stata preparata una soluzione a 1 mg/L di EP e a 0,6 mg/L di EG. A 100 ml di tale soluzione sono stati aggiunti 0,500 ml di soluzione di SI. La taratura è stata effettuata utilizzando tale soluzione.

Procedura per la microestrazione in fase solida. Il campione preparato come descritto in precedenza (volume: 2 ml) è stato posto in un vial da 4 ml contenente NaCl (1 g) e chiuso con l'apposito tappo munito di setto in PT-

FE. La HS-SPME è stata condotta sotto agitazione magnetica utilizzando una ancorretta di 10 mm a una velocità di 300 rpm.

La soluzione è stata riscaldata a 55°C ed estratta con una fibra in poliacrilato da 85 mm per 40 minuti inserendo la fibra all'interno del vial in spazio di testa. I composti adsorbiti sono stati desorbiti inserendo la fibra nell'iniettore GC per 3 minuti.

Analisi gascromatografica. L'analisi è stata effettuata con gascromatografo dotato di detector a ionizzazione di fiamma su una colonna capillare Supelcowax 10 (30 m x 0,32 mm x 0,25mm). Come gas di trasporto è stato utiliz-

zato elio a un flusso di 1 ml/min. Come iniettore è stato utilizzato uno split/splitless con rapporto di splittaggio 1/30 e mantenuto a 250°C. La temperatura del detector era di 250°C.

Il forno prevedeva il seguente programma di temperature: iniziale 40°C per 1 minuto, prima rampa a 180°C a 10°C/min, isoterma a 180°C per 0,5 minuti, seconda rampa a 205°C a 3°C/min, isoterma a 205°C per 0,5 minuti, terza rampa a 230°C a 10°C/min, isoterma a 230°C per 5 minuti. Il gascromatografo è stato dotato di filtro per l'ossigeno e l'acqua contenuti nel gas di trasporto.

Le determinazioni analitiche dell'alcol, degli zuccheri riduttori, dell'estratto secco netto, del pH, dell'acidità volatile, dell'anidride solforosa totale e libera sono state eseguite seguendo le metodiche ufficiali (Regolamento CEE 2676/90); l'indice di polifenoli totali è stato determinato come riportato da Di Stefano et al. (1989).

Procedura analisi microbiologica. Il terreno di crescita impiegato è stato il WL Nutrient Agar addizionato dell'agente selettivo CEX (Cicloesimide o Actidione) che inibisce la sintesi proteica nella maggior parte dei lieviti e muffe, ma non di *Brettanomyces* e pochi altri lieviti.

Il WL consente una buona crescita delle colonie che assumono colorazione e/o morfologia diverse a seconda del genere. La crescita di *Brettanomyces* è comunque lenta rispetto ad altri lieviti (6-8 giorni), con colonie dal diametro ridotto, color crema, elevazione a cupola, superficie liscia e consistenza cremosa.

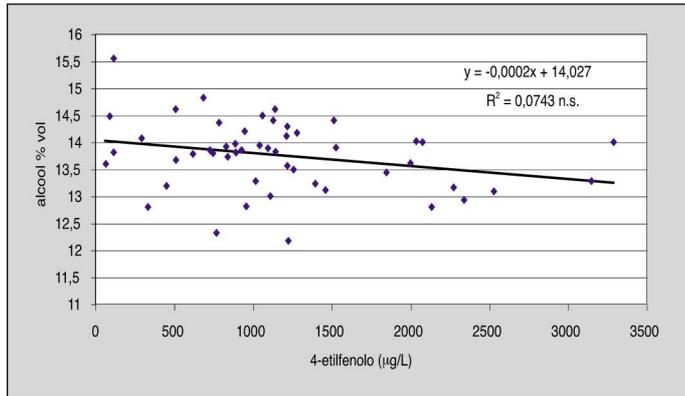
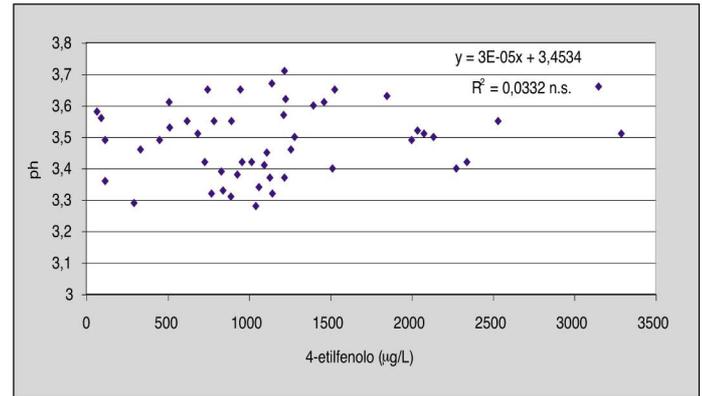
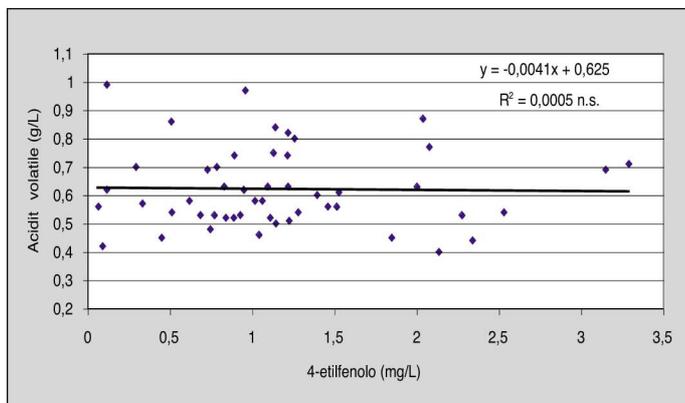
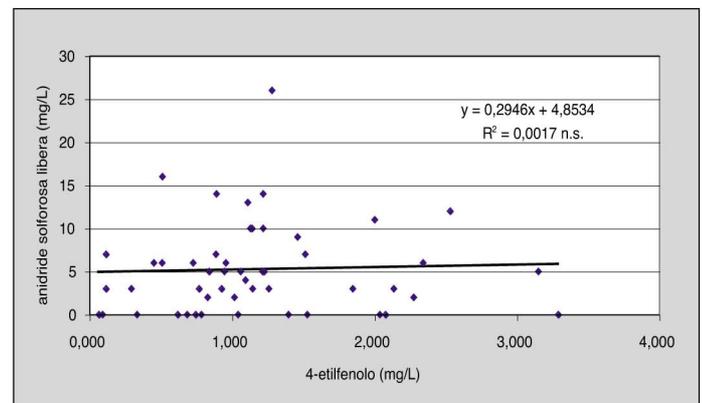
Per evitare interferenza da parte della componente batterica, in particolare dei batteri lattici, viene aggiunto al terreno un antibiotico in minima dose.

Successivo criterio di identificazione è l'osservazione al microscopio ottico della morfologia cellulare. Per ogni campione vengono allestite 5 piastre: si filtra su membrana 0,45 µm volumi di 100 mL, 10 mL e 1 mL (+ 9 di acqua sterile) e per spatolamento di 0,1 mL del campione tal quale e diluito 10 volte. In questo modo si spazia un range di concentrazione che va da 1 cellula/100 mL di vino a circa 20000 cellule/mL.

Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale dei vini oggetto del presente lavoro conferma una generale tendenza del gruppo di assaggio ad attribuire valutazioni più alte ai campioni



Fig. 6 - Correlazione fra 4-etilfenolo e gradazione alcolica nei vini esaminati**Fig. 7 - Correlazione fra 4-etilfenolo e pH nei vini esaminati****Fig. 8 - Correlazione fra 4-etilfenolo e acidità volatile nei vini esaminati****Fig. 9 - Correlazione fra 4-etilfenolo e SO₂ libera nei vini esaminati**

contraddistinti da un elevato livello di 4-etilfenolo (Fig.2).

L'attribuzione delle etichette semantiche alle sensazioni percepite è stata caratterizzata da una grande varietà di connotazioni. Le etichette utilizzate con maggiore frequenza sono state, oltre alle classiche "stalla", "cavallo", "animale" anche "tempera/vernice", "vegetale", "medicinale", "fumo", "affumicato". La complessità delle sensazioni olfattive rilevabili in vini "con carattere Brett", è confermata dalla bibliografia in materia. In particolare, un lavoro di Licker et al. (1998) realizzato su vini Cabernet Sauvignon, pone in evidenza come i composti odorosi rilevati con la tecnica della gascromatografia accoppiata all'olfattometria in vini "contaminati", si siano presentati secondo un ordine che identifica il 4-etilfenolo solo al tredicesimo posto, preceduto da sostanze di va-

ria natura come l'acido isovalerico (rancido), il β -damascenone (fruttato) e addirittura elementi sconosciuti.

Analisi chimica

I vini esaminati (Tab. 1), di diversa denominazione ed annata, sospettati di "carattere Brett" a un primo screening sensoriale, presentano in percentuale molto elevata (pari all'80%) un contenuto in 4-etilfenolo superiore alla soglia di percezione, comunemente definita in 620 $\mu\text{g/L}$ (Chatonnet et al., 1992). Il contenuto medio riscontrato in 4-etilfenolo è stato di 1177 $\mu\text{g/L}$, con una escursione dei valori compresa fra un minimo di 66 $\mu\text{g/L}$ ed un massimo di 3290 $\mu\text{g/L}$. Il 4-etilguaiacolo presenta un valore medio di 142 $\mu\text{g/L}$, registrando un minimo di 8 $\mu\text{g/L}$ ed un massimo di 358 $\mu\text{g/L}$.

La somma degli etilfenoli presenta un valore medio di 1317 $\mu\text{g/L}$, con un minimo di 75 $\mu\text{g/L}$ ed un massimo di 3601 $\mu\text{g/L}$. Se a riferimento viene considerata la soglia di percezione degli etilfenoli di 425 $\mu\text{g/L}$ descritta in letteratura, (Chatonnet et al., 1992), si può notare come ben l'88% dei campioni esaminati registri un contenuto superiore a suddetto valore.

Più di un terzo dei campioni esaminati (38%) presenta un contenuto in 4-etilfenolo distribuito fra 700 e 1200 $\mu\text{g/L}$, che risulta la classe di frequenza di gran lunga più rappresentata; il 20% dei campioni evidenzia un contenuto compreso fra 1200 e 1700 $\mu\text{g/L}$, mentre le classi di frequenza più elevate comprese fra 1700 e 2200 $\mu\text{g/L}$ e oltre 2200 $\mu\text{g/L}$ risultano rispettivamente distribuite fra il 10% ed il 10,5% (Fig. 3).

Occorre comunque rileva-

re che quasi il 60% dei campioni fa registrare un contenuto di 4-etilfenolo superiore a 1000 $\mu\text{g/L}$, risultando quindi potenzialmente contraddistinti da un "carattere Brett" sensorialmente percepibile con maggiore evidenza.

Il 20% dei campioni sospettati di presentare un "carattere Brett" non ha ottenuto riscontro nell'analisi chimica dove sono stati rilevati valori di 4-etilfenolo inferiori alla soglia di percezione, consentendo di rimarcare l'oggettiva difficoltà di associare con sicurezza tale carattere alla presenza di una deviazione sensoriale.

Il rapporto fra 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo risulta abbastanza diversificato (Figg. 4-5), variando da 5:1 fino a 16:1. La maggior frequenza dei valori (48%), tuttavia, si aggira intorno a 7:1 e 8:1, rapporti che concordano con quelli descritti in bibliografia (Chatonnet et al., 1992).



Tab. 1 - Contenuto in etil fenoli e valutazione di alcuni parametri analitici nei vini esaminati

Campione	Annata	Tave	E.S.R.	I.P.T.	Z.R.	pH	A.V.	SO ₂ T.	SO ₂ L.	EP	EG	Σ (EP, EG)
Vino base barbera	2001	14,00	26,6	1847	2,3	3,51	0,71	19	tracce	3290	311	3601
Vino base barbera	2001	13,28	26,6	1724	2,0	3,66	0,69	58	5	3150	227	3377
Vino base dolcetto	2002	13,09	29,6	2298	2,8	3,55	0,54	57	12	2531	311	2842
Vino base barbera	2003	12,93	27,5	1808	2,3	3,42	0,44	38	6	2341	358	2699
Vino base dolcetto	2003	13,16	28,1	2109	2,1	3,40	0,53	29	2	2275	295	2570
Vino base nebbiolo	2003	12,80	28,7	2908	4,5	3,50	0,40	38	3	2135	268	2403
Vino base nebbiolo	1999	14,00	26,3	2719	1,5	3,51	0,77	18	tracce	2077	244	2321
Vino base nebbiolo	2000	14,02	28,4	2301	1,6	3,52	0,87	15	tracce	2037	288	2325
Vino base nebbiolo	2001	13,61	26,6	2707	1,9	3,49	0,63	83	11	2001	124	2125
Vino base barbera	2002	13,44	28,4	1778	2,7	3,63	0,45	43	3	1848	174	2022
Vino base nebbiolo	2000	13,90	28,2	2897	1,9	3,65	0,61	32	tracce	1528	186	1714
Vino base nebbiolo	1998	14,40	27,1	2477	2,5	3,40	0,56	67	7	1514	168	1682
Vino base barbera	2003	13,11	28,1	1844	2,4	3,61	0,56	54	9	1461	121	1582
Vino base barbera	2002	13,23	26,8	1447	1,6	3,60	0,60	16	tracce	1396	136	1532
Vino base nebbiolo	2000	14,17	27,6	2691	1,6	3,50	0,54	99	26	1280	103	1383
Vino base nebbiolo	1999	13,49	25,7	2621	1,2	3,46	0,80	48	3	1258	288	1546
Vino base barbera	2002	12,17	31,5	1944	2,9	3,62	0,51	48	5	1225	167	1392
Vino base nebbiolo	2000	14,29	30,0	3493	2,9	3,71	0,82	57	10	1218	157	1323
Vino base nebbiolo	1998	13,56	25,6	2296	2,1	3,37	0,63	99	14	1218	105	1375
Vino base nebbiolo	2000	14,11	28,3	2554	1,8	3,57	0,74	48	5	1214	153	1367
Vino base nebbiolo	1998	13,82	26,4	2917	1,9	3,32	0,50	45	3	1144	183	1327
Vino base nebbiolo	2000	14,61	29,4	3026	1,8	3,67	0,84	57	10	1141	98	1239
Vino base barbera	2001	14,40	28,3	2146	3,1	3,37	0,75	67	10	1129	73	1202
Vino base barbera	2002	13,00	30,5	2511	2,1	3,45	0,52	86	13	1110	138	1248
Vino base nebbiolo	2001	13,89	25,9	2523	2,1	3,41	0,63	44	4	1095	109	1204
Vino base nebbiolo	1999	14,49	26,7	2449	1,8	3,34	0,58	54	5	1061	171	1232
Vino base nebbiolo	2000	13,94	25,5	2201	1,4	3,28	0,46	38	tracce	1042	136	1178
Vino base barbera	2001	13,28	26,6	1658	2,3	3,42	0,58	32	2	1017	95	1112
Vino base barbera	2002	12,81	27,7	1917	2,2	3,42	0,97	50	6	958	119	1077
Vino base nebbiolo	2001	14,20	27,6	2706	2,0	3,65	0,62	54	5	948	104	1052
Vino base nebbiolo	1999	13,85	26,7	2909	1,6	3,38	0,53	61	3	928	128	1056
Vino base nebbiolo	2000	13,81	28,3	2471	1,6	3,55	0,74	57	14	892	125	1017
Vino base nebbiolo	2000	13,97	26,4	2382	2,4	3,31	0,52	74	7	888	144	1032
Vino base nebbiolo	1999	13,73	27,8	2481	2,0	3,33	0,52	70	5	840	158	998
Vino base nebbiolo	1999	13,92	25,0	2302	1,7	3,39	0,63	24	2	830	113	943
Vino base nebbiolo	1999	14,36	31,2	3728	2,8	3,55	0,70	19	tracce	786	142	928
Vino base barbera	2002	12,32	30,1	N.R.	2,7	3,32	0,53	45	3	769	103	872
Vino base nebbiolo	2001	13,80	24,2	2057	1,6	3,65	0,48	22	tracce	746	99	845
Vino base nebbiolo	2000	13,85	28,4	2905	4,4	3,42	0,69	92	6	728	109	837
Vino base nebbiolo	2000	14,82	27,7	2353	3,2	3,51	0,53	19	tracce	685	102	787
Vino base nebbiolo	1999	13,78	25,5	2820	1,3	3,55	0,58	19	tracce	619	81	700
Vino base nebbiolo	2001	13,67	27,1	2500	2,3	3,53	0,54	96	16	512	65	577
Vino base langhe	2001	14,61	30,3	2753	2,8	3,61	0,86	58	6	509	91	600
Vino base barbera	2002	13,19	28,0	1983	2,1	3,49	0,45	45	6	451	86	537
Vino base barbera	2002	12,80	27,2	1562	1,7	3,46	0,57	38	tracce	333	39	372
Vino base nebbiolo	1999	14,07	26,6	2107	2,0	3,29	0,70	45	3	294	50	344
Vino base nebbiolo	2000	13,81	28,5	2210	2,9	3,36	0,62	45	3	116	13	132
Vino base nebbiolo	2000	15,55	30,5	3038	3,5	3,49	0,99	67	7	116	16	129
Vino base nebbiolo	2000	14,48	31,1	3004	3,6	3,56	N.R.	26	tracce	91	8	99
Vino base nebbiolo	2002	13,60	27,0	2610	1,4	3,58	0,56	22	tracce	66	9	75
VALORE MAX.		15,55	31,5	3728	4,5	3,71	0,99	99	26	3290	358	3601
VALORE MIN.		12,17	24,2	1447	1,2	3,28	0,40	15	tracce	66	8	75
MEDIA		13,74	27,8	2422	2,3	3,49	0,62	49	5	1177	142	1317

Legenda: TAVE = Titolo alcolometrico volumico effettivo (% vol.), E.S.R. = Estratto secco ridotto (g/L), I. P.T. = Indice di polifenoli totali (mg/L (+) catechina), Z.R. = Zuccheri riduttori (g/L), A.V. = Acidità volatile (g/L acido acetico), SO₂ T. = Anidride solforosa totale (mg/L), SO₂ L. = Anidride solforosa libera (mg/L), EP = 4-etilfenolo (µg/L), EG = 4-etilguaiacolo (µg/L), Σ (EP, EG) = Sommatoria etilfenoli, N.R. = non rilevato.



Tab. 2 - Tipologie di vini e loro contenitori

Cod.	Vini	Annata	Contenitore
B01	Vino base nebbiolo	1998	Botti legno da 50 HI
B02	Vino base nebbiolo	2001	Vasca acciaio da 40 HI
B03	Vino base barbera	2001	Bottiglie
B04	Vino base nebbiolo	2001	Botte legno da 31 HI
B05	Vino base nebbiolo	2000	Botte legno da 30 HI
B06	Vino base nebbiolo	2000	Botte legno 43 HI
B07	Vino base barbera	2002	Vasca acciaio "semprepieno" 12 HI
B08	Vino base cabernet	2002	Barriques
B09	Vino base nebbiolo	2001	Botte da 50 HI
B10	Vino base barbera	2002	Vasca acciaio
B11	Vino base barbera	2001	Tonneau da 7 HI
B12	Vino base nebbiolo	2000	Botti legno da 40 HI
B13	Vino base nebbiolo	2001	Vasca in cemento da 100 HI
B14	Vino base nebbiolo	2001	Vasca acciaio da 30 HI
B15	Vino base barbera	2002	Vasca acciaio 60 HI
B16	Vino base nebbiolo	2001	Botte da 72 HI
B17	Vino base barbera	2001	Tre barriques

Il rapporto appare comunque caratterizzato da un certo grado di disomogeneità, e non risulta direttamente correlabile con le diverse variabili che entrano in gioco. Un approfondimento delle conoscenze delle ragioni di tale variabilità è auspicabile, considerata la notevole importanza sensoriale che riveste il rapporto fra etilfenolo ed etilguaiacolo, composti notoriamente caratterizzati da profili olfattivi profondamente diversi.

I vini oggetto di studio sono stati analizzati anche sotto il profilo compositivo generale, allo scopo di individuare ed evidenziare possibili correlazioni fra la presenza di etilfenoli ed alcuni parametri analitici in grado, singolarmente o in sinergia fra loro, di rivestire un ruolo importante nella comparsa del "carattere Brett". In particolare l'analisi delle correlazioni ha interessato i parametri del grado alcolico, del pH, dell'acidità volatile, dell'anidride solforosa libera.

In nessuno dei casi valutati sono emerse relazioni significative tra la presenza di 4-etilfenolo e il dato chimico, come mostrano i grafici a dispersione di seguito riportati.

Il tenore alcolico, indicato come fattore inibente lo svi-

luppo di *Brettanomyces* a concentrazioni elevate, non risulta costituire, nei campioni esaminati, un fattore limitante la comparsa degli etilfenoli (Fig. 6). La maggior parte dei vini analizzati infatti, pur presentando un gradazione alcolica elevata (> 13 gradi), ha sviluppato un "carattere Brett", evidenziando una notevole tolleranza all'alcol da parte dei lieviti *Brettanomyces*.

Il pH dei vini esaminati (Fig. 7) presenta mediamente un valore superiore a 3,40, che risulta assolutamente compatibile e favorevole alla crescita delle colture di *Brettanomyces*. Inoltre, un'elevata percentuale dei vini evidenzia valori di pH superiori a 3,50, che rappresenta una condizione assai favorevole allo sviluppo del lievito; anche perché la protezione antimicrobica esercitata dalla SO₂ molecolare si riduce drasticamente in presenza di pH elevati.

L'acidità volatile (Fig. 8) fa registrare un tenore medio intorno a 0,60 g/L, con un'escursione dei valori fra 0,40 e 0,99 g/L e non evidenzia una correlazione significativa con il contenuto in etilfenoli riscontrato. Ciò in accordo con quanto riportato in letteratura sull'attitudine di *Brettanomyces* a produrre quantità non partico-

larmente rilevanti di acido acetico in condizioni di anaerobiosi o di ossigenazione controllata; situazioni particolarmente ricorrenti nel corso della conservazione e dell'affinamento dei vini esaminati.

Il contenuto in anidride solforosa libera (Fig. 9) risulta particolarmente basso e compreso in un ristretto range di concentrazione fra 0 e 26 mg/L, con un valore medio intorno a 5 mg/L. A questi livelli di concentrazione, l'SO₂ libera non esercita alcuna azione antisettica nei confronti del *Brettanomyces*. Inoltre, in presenza di pH elevati (>3,50), la frazione attiva dell'SO₂ libera (SO₂ molecolare) in grado di esplicare un'efficace attività antimicrobica, è una percentuale molto ridotta della libera (<2%). In particolare, nessuno dei campioni esaminati ha presentato un livello di SO₂ molecolare intorno a 0,5 mg/L, concentrazione comunemente considerata in grado di inibire la crescita di *Brettanomyces*.

Sulla quasi totalità dei campioni esaminati va pertanto rimarcata la presenza del tutto inadeguata del contenuto in SO₂ libera, che risulta insufficiente ad assicurare una congrua protezione antisettica dei vini nel corso dell'affinamento.

Analisi microbiologica

L'analisi microbiologica (Tab. 3) è stata condotta su 17 campioni di vino di diversa denominazione ed annata, prelevati in altrettante aziende in cui si era segnalata, allo screening precedente, la presenza del "carattere Brett". I campioni, sottoposti anche all'analisi chimica, hanno presentato nel 79% dei casi, un valore in 4-etilfenolo superiore alla soglia di percezione, facendo registrare in oltre il 50% dei casi concentrazioni molto elevate, superiori a 1500 µg/L. All'analisi microbiologica nessun campione ha evidenziato la presenza di colonie di *Brettanomyces* (ad esclusione di un campione in cui è stata segnalata la presenza, del tutto irrilevante, di 3 UFC/mL), mettendo in luce una evidente mancanza di relazione fra la presenza di *Brettanomyces* ed il forte "carattere Brett" dei vini esaminati. In questi vini era infatti legittimo attendersi una presenza rilevante del lievito contaminante, considerata l'elevata concentrazione in etilfenoli riscontrata nella maggior parte dei campioni. Una spiegazione di questa apparente incoerenza di risultati potrebbe risiedere nel fatto che, al momento del prelievo e dell'analisi microbiologica, non vi fossero nei vini contaminazioni "in corso" da parte di *Brettanomyces*, ossia che il lievito avesse già in precedenza concluso la sua catena di trasformazioni biochimiche e fosse successivamente andato in lisi. I vini oggetto di indagine sono stati infatti sottoposti ad un più o meno prolungato periodo di affinamento, trattandosi delle annate 1998, 2000, 2001 e 2002. E' probabile quindi che *Brettanomyces* avesse già in periodi precedenti compiuto la sua nefasta azione e non sia stato possibile rilevarne la presenza al momento del prelievo. Va inoltre rimarcato il fatto che il prelievo dei campioni è



Tab. 3 - Contenuto in etilfenoli, valutazione di alcuni parametri analitici e ricerca *Brettanomyces* nei vini prelevati in azienda

Cod. Vini	Annata	Tave	E.S.R.	I.P.T.	Z.R.	pH	A.V.	SO ₂ T.	SO ₂ L.	EP	EG	Σ (EP, EG)	Brett. EG)	
B 01	Vino base nebbiolo	1998	14,72	25,7	2576	1,8	3,48	0,60	61	3	2095	291	2386	3
B 02	Vino base langhe	2001	13,64	26,3	2651	2,0	3,56	0,60	59	6	2196	135	2331	N.R.
B 03	Vino base barbera	2001	13,49	29,1	2516	2,8	3,40	0,88	74	3	446	104	550	N.R.
B 04	Vino base nebbiolo	2001	14,41	25,8	2403	1,3	3,33	0,67	32	2	1002	138	1140	N.R.
B 05	Vino base nebbiolo	2000	14,28	29,5	2548	2,2	3,57	0,80	77	6	1147	220	1367	N.R.
B 06	Vino base nebbiolo	2000	14,17	27,3	2633	1,6	3,54	0,53	93	18	1532	124	1656	N.R.
B 07	Vino base barbera	2002	13,38	26,9	1878	2,0	3,52	0,64	96	21	1756	237	1993	N.R.
B 08	Vino base cabernet	2002	13,21	27,9	2201	1,6	3,54	0,54	83	15	286	29	315	N.R.
B 09	Vino base nebbiolo	2001	14,18	30,0	3110	2,9	3,52	0,85	77	14	1477	199	1676	N.R.
B 10	Vino base barbera	2002	13,49	28,7	1927	2,9	3,57	0,72	26	2	1591	129	1720	N.R.
B 11	Vino base barbera	2001	14,19	25,7	1994	1,6	3,34	0,95	58	9	4858	399	5257	N.R.
B 12	Vino base nebbiolo	2000	14,07	26,1	2384	2,8	3,43	0,60	41	3	819	165	984	N.R.
B 13	Vino base nebbiolo	2001	13,90	27,5	3068	1,3	3,58	0,57	35	2	3662	272	3934	N.R.
B 14	Vino base nebbiolo	2001	15,01	32,4	3798	2,4	3,61	0,93	38	3	1477	199	1676	N.R.
B 15	Vino base barbera	2002	13,59	31,3	1851	2,9	3,73	0,60	83	8	1825	237	2062	N.R.
B 16	Vino base nebbiolo	2001	13,66	26,9	2362	2,1	3,47	0,47	58	6	193	25	218	N.R.
B 17	Vino base barbera	2001	14,17	26,6	2028	2,1	3,34	0,86	26	3	1880	281	2161	N.R.
	VALORE MAX.		15,01	32,4	3798	2,9	3,33	0,95	96	21	4858	399	5257	3
	VALORE MIN.		13,21	25,7	1851	1,3	3,73	0,47	26	2	193	25	218	N.R.
	MEDIA		13,97	27,9	2466	2,1	3,50	0,69	60	7	1661	187	1849	N.R.

Legenda: TAVE = Titolo alcolometrico volumico effettivo (% vol.), E.S.R. = Estratto secco ridotto (g/L), I. P.T. = Indice di polifenoli totali (mg/L (+) catechina), Z.R. = Zuccheri riduttori (g/L), A.V. = Acidità volatile (g/L acido acetico), SO₂ T. = Anidride solforosa totale (mg/L), SO₂ L. = Anidride solforosa libera (mg/L), EP = 4-etilfenolo (µg/L), EG = 4-etilguaiacolo (µg/L), Σ (EP, EG) = Sommatoria etilfenoli, Brett. = colonie di *Brettanomyces* (UFC/mL), N.R. = non rilevato.

stato effettuato verso il termine del periodo invernale, periodo in cui notoriamente il *Brettanomyces* non trova ancora le condizioni di temperatura favorevoli alla sua crescita.

E' opportuno evidenziare, infine, che anche sui dati di questi campioni non sono state rilevate correlazioni significative tra il contenuto di 4-etilfenolo e i parametri analitici misurati.

Considerazioni conclusive

Lo scopo del lavoro è stato quello di effettuare un monitoraggio sui vini della zona albesa, relativamente alla presenza e all'estensione del "problema fenoli volatili".

La ricerca è stata attuata in due fasi. In un primo momento sono stati analizzati cinquanta vini (selezionati durante la normale attività di laboratorio) dal punto di vista sensoriale (per valutare

l'esistenza e l'intensità dei difetti tipicamente riconducibili ai fenoli) e chimico (mediante la ricerca di 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo). Successivamente sono state scelte diciassette aziende tra quelle produttrici di alcuni dei vini testati precedentemente e, presso ciascuna di esse, è stato effettuato il prelievo di un campione di vino. I diciassette campioni sono poi stati sottoposti ad analisi sensoriale, chimica e microbiologica.

Dall'esito delle analisi eseguite sui cinquanta campioni di partenza è risultato che l'80% dei vini analizzati ha presentato un quantitativo di 4-etilfenolo superiore al valore soglia citato in letteratura (620 µg/L) e, per un vino su cinque si è riscontrato una concentrazione superiore a 1700 µg/L. L'analisi sensoriale ha anticipato il risultato ottenuto dalle analisi chimiche, rilevando nei campioni con un maggior livello della sostanza, una più ele-

vata intensità degli odori di "stalla", "cavallo", "cerotto". Sui campioni sono state eseguite anche altre determinazioni analitiche, potenzialmente in grado di rivestire un ruolo collaterale importante, come fattori inibenti o stimolanti nella comparsa del "carattere Brett". In particolare è stata ricercata l'esistenza di correlazione tra 4-etilfenolo e alcol, anidride solforosa libera, pH e acidità volatile. In nessuno dei casi valutati sono emerse relazioni significative tra la presenza di 4-etilfenolo ed i parametri chimici presi in considerazione.

Relativamente alle analisi microbiologiche, dei 17 campioni analizzati solo uno ha presentato tracce di colonie di *Brettanomyces*, pur in presenza di un marcato "carattere Brett" nella maggior parte dei vini esaminati. L'assenza di un riscontro evidente di *Brettanomyces* è probabilmente da ascrivere al fatto che, trattandosi di vi-



ni affinati per lunghi periodi, il lievito abbia svolto e concluso la sua attività già in precedenza rispetto al momento del controllo microbiologico.

Gli esiti raggiunti dalle ricerche svolte, pongono in evidenza come sia importante attribuire al problema *Brettanomyces* la giusta rilevanza, in considerazione sia dei difetti organolettici che la sua presenza implica per i vini, sia per il più sottile e subdolo mascheramento della loro espressione varietale e dei caratteri di tipicità propri del "terroir" di origine.

Le motivazioni elencate conducono ad evidenziare l'importanza del monitoraggio continuo sui vini potenzialmente a rischio, mediante controlli da effettuare in modo sistematico e puntuale, volti alla prevenzione in primo luogo e, in caso di avvenuta contaminazione, ad un intervento di contenimento dei danni tempestivo ed efficace.

Bibliografia

1. Bertrand A., 2002, Uso del legno nella produzione e nella conservazione dei vini rossi. Atti del convegno "La gestione razionale dell'elevage dei vini", Ospedaletto di Pescantina, Verona, 19 aprile 2002.

2. Chatonnet P., Dubordieu D., Boidron J.N., 1989, Incidence de certains facteurs sur la decarboxylation des acides phenols par la levure. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 23, 59-62.

3. Chatonnet P., Dubordieu D., Boidron J.N., 1992, Le caractère phénolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyen de lutte. *Revue Française d'Oenologie* 138, 21-24.

4. Chatonnet P., Dubordieu D., Boidron J.N., PONS M., 1992, The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 165-178.

5. Chatonnet P., 1993, Fenoli volatili: influenze organolettiche e metodi di prevenzione. *Vignevini*, 20 (7-

8), 26-34.

6. Chatonnet P., 2000, La contamination des vins par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage: incidence, détection et moyen de lutte. *Revue des œnologues* n. 96, juillet 2000, 23-26.

7. Chatonnet P., 2002, La contaminazione dei vini da parte di *Brettanomyces* durante la vinificazione e l'affinamento. Parte I: Incidenza e analisi del problema. *OICCE Times - anno III numero 1 - Primavera 2002*.

8. Chatonnet P., 2002, La contaminazione dei vini da parte di *Brettanomyces* durante la vinificazione e l'affinamento. Parte II: I sistemi di lotta. *OICCE Times - anno III numero 2 - Estate 2002*.

9. 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.

10. Cravero M.C., Di Stefano R., 1990, I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, Conegliano, 43 (1), 33-44.

11. Cravero M.C., Di Stefano R., 1992, Composizione fenolica di alcune varietà di vite coltivate in Piemonte. *Vignevini*, 19 (5), 47-54.

12. 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 enology. *Food Microbiology* 20 (4), 377-384.

13. Di Stefano R., 1985, Gli etil fenoli nei vini. *Vignevini*, 12 (5), 35-38.

14. Di Stefano R., Cravero M. C., Gentilini N., 1989, Metodi per lo studio dei polifenoli nei vini. *L'Enotecnico* 25, 83-89.

15. Di Stefano R., Cravero M.C., Guidoni S., 1990, I composti fenolici dell'uva. *Vini d'Italia*, 32 (1), 15-22.

16. Di Stefano R., Maggiorotto G., 1995, Antociani, acidi idrossicinnamici e flavonoli del frutto, delle foglie, dei raspi e dei tralci della vi-

te. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, Conegliano, 48 (2), 51-65.

17. Domizio P., Rosi I., 2003, Controllo della presenza di lieviti *Brettanomyces*/Dekkera durante il processo di vinificazione e affinamento del vino. *Vignevini* 30 (7-8), 69-72.

18. Gerbaux V., Vincent B., 2001, Influence des phénols volatils sur les qualités sensorielles de vins rouges de différents cépages. *Revue des œnologues* n.99, avril 2001, 15-18.

19. Gerbaux V., Vincent B., Bertrand A., 2002, Influence of Maceration Temperature and Enzymes on the Content of Volatile Phenols in Pinot noir Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (2), 131-137.

20. Gerbaux V., Etude des phenols volatils dans les vins de Bourgogne. <http://www.u-bourgogne.fr/IUVV/Gerbaux/Gerbaux.html>.

21. Gilis J.F., Cabri C., Ducurnau P., Etude de contamination des vins rouges par la levure *Brettanomyces*. <http://www.oenodev.com/Recherche/brett/>.

22. Lanati D., Marchi D., 2003, Contaminazione da *Brettanomyces*: comparsa di fenoli volatili. *Vitenda*, 2003.

23. Licker J.L., Acree T.E., Henick-Kling T., 1998, What is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor? *Chemistry of Wine Flavor*. A. L. Waterhouse and S. E. Ebeler, eds., ACS symposium series, 714, 96-115.

24. Garde Cerdan T., Rodriguez Mozaz S., Ancin Azpilicueta C., 2002, Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Research International*, 35 (7), 603-610.

25. Malfeito Ferriera M., 2002, *Brettanomyces*/Dekkera nei vini: identificazione, controllo, significato qualitativo. Atti del convegno "La gestione razionale dell'elevage dei vini", Ospedaletto di Pescantina, Verona, 19 aprile 2002.

26. Marenghi M., 2003, L'impiego ragionato degli enzimi. *Vignevini* 30 (6), 53-55.

27. Monje M.C., Privat C.,

Gastine V., Nepveu F., 2001, Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionisation detection. *Analytica Chimica Acta* 458, 111-117.

28. Martorell N., Marti M.P., Mestres M., Busto O., Guasch J., 2002, Determination of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol in red wines using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 975, 349-354.

29. Pollnitz A.P., Pardon K.H., Sefton M.A., 2000, Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *Journal of Chromatography A*, 874, 101-109.

30. Pollnitz A.P., Pardon K.H., Sefton M.A., 2000, 4-Ethylphenol, 4-ethylguaiacol and oak lactones in Australian red wines. *Australian Grapegrower and Winemaker* (438) 45, 47-50.

31. Rapp A., Versini G., 1996, Volatile phenolic compounds in wine. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92 (2) 42-48.

32. Regolamento CEE 2676/90. *Gazzetta Ufficiale CEE*, L 272 03/10/1990.

33. Rodrigues N., Goncalves G., Pereira-Da-Silva S., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V., 2001, Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera "Dekkera-*Brettanomyces*". *Journal of Applied Microbiology* 90 (4), 588-599.

34. Rossini R., 2003, Contaminazione da *Brettanomyces*: lo stato dell'arte. *Enologica Vason S.r.l. Divisione Ricerca e Sviluppo Biotecnologie*.

35. Serra D., 2003, Indagine sulla presenza di 4-etilfenolo come indicatore della contaminazione da *Brettanomyces* in vini Barbera. Università degli studi di Torino - Facoltà di Agraria. Tesi di laurea, a.a. 2002/2003.

36. Zambonelli C., 1998, *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole, Bologna.

