

A cura di:

Antonella
CostantiniMaurizio
PetrozzielloEnrico
VaudanoEmilia
Garcia-Moruno

MONITORAGGIO IN CANTINA DELLA POPOLAZIONE DI BRETTANOMYCES E LA PRODUZIONE DI ETILFENOLI

La conoscenza in tempo reale del livello di contaminazione del vino consente la prevenzione degli effetti negativi dei *Brettanomyces* con l'utilizzo di comuni pratiche di vinificazione

Uno dei problemi principali per l'industria enologica è l'alterazione biologica e il deterioramento del vino dovuto all'attività di alcuni batteri e lieviti; in particolare il *Brettanomyces bruxellensis* (teleomorfo *Dekkera bruxellensis*) è considerato il più importante microrganismo alterante nell'industria del vino e rappresenta un problema di rilievo a livello mondiale. Le ricerche focalizzate su questi lieviti sono numerosissime, tuttavia ad oggi non è disponibile un trattamento completamente efficace per eradicare il problema e ogni nuova conoscenza può essere utile agli enologi e agli operatori di cantina per migliorarne il controllo nelle fasi di vinificazione e conservazione del vino. Il presente lavoro è stato condotto su vino Nebbiolo in una cantina operante in Piemonte. Durante le diverse fasi della

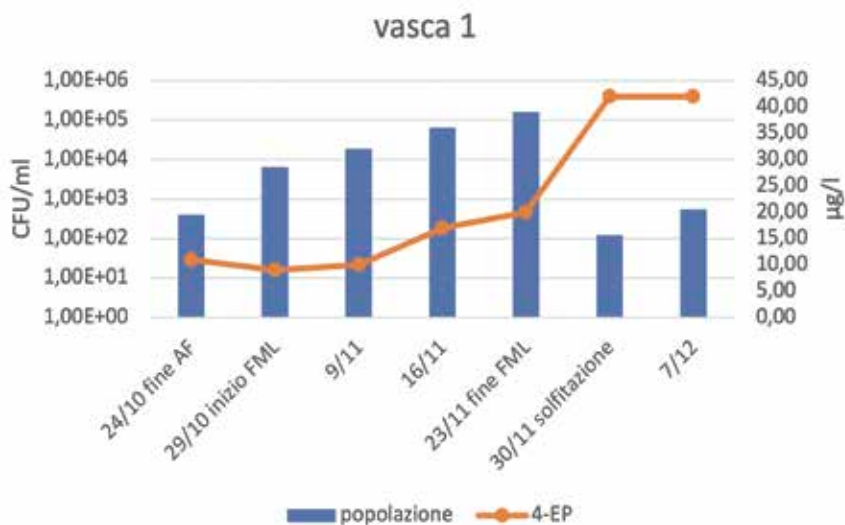
vinificazione sono stati prelevati dei campioni di vino, destinati all'analisi mediante PCR quantitativa (qPCR) per valutare la popolazione di *Brettanomyces bruxellensis* e gascromatografia per determinarne la concentrazione di etilfenoli.

I dati mostrano che la conoscenza in tempo reale del livello di contaminazione, consente la prevenzione degli effetti negativi dei *Brettanomyces* con l'utilizzo di comuni pratiche di vinificazione.

Le premesse

Il *Brettanomyces bruxellensis* è un lievito contaminante capace di produrre composti volatili che alterano il profilo organolettico del vino. Tra questi rivestono particolare importanza il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo, che, in concentrazioni superiori alla soglia di percezione, con-

Fig. 1 - Andamento della produzione di 4-etilfenolo e quantificazione della popolazione di *B. bruxellensis* nella vasca 1



feriscono al vino note olfattive sgradevoli che ricordano il sudore di cavallo, il cuoio, i medicinali, la stalla, l'aia, il cerotto e la plastica bruciata (Chatonnet *et al.*, 1992; Norris, 2004). L'insieme di questi odori è generalmente noto come "Brett-character". Bisogna inoltre aggiungere che le specie di *Brettanomyces/Dekkera* sono fortemente acidogene e possono produrre grandi quantità di acido acetico (Ciani e Ferraro, 1997).

Questi lieviti sono naturalmente presenti sulle bucce dell'uva (Renouf *et al.*, 2005) anche se il loro habitat classico è la cantina, in particolare le attrezzature e le botti utilizzate per l'invecchiamento dei vini rossi (Ibeas *et al.*, 1996). Tuttavia, *Brettanomyces/Dekkera* sono stati rilevati anche in vini ottenuti utilizzando solo serbatoi di acciaio inossidabile (Rodriguez *et al.*, 2001).

Il controllo di *Brettanomyces* in cantina richiede una pulizia accurata e attenta delle attrezzature e delle superfici, nonché l'uso razionale dell'anidride solforosa (SO₂), soprattutto in fase post-fermentativa quando il vino è più suscettibile alla contaminazione. Nonostante ciò, attualmente non esistono metodi per prevenire totalmente la contaminazione, quindi, è fondamentale effettuare un attento e costante monitoraggio dei vini e acquisire una conoscenza dettagliata degli effetti delle pratiche consolidate sulla crescita e sullo sviluppo di questo lievito contaminante.

La rilevazione analitica degli etilfenoli vino deve far supporre una situazione di massiccia contaminazione e bisogna ricorrere a misure correttive per salvare il vino. La soglia di percezione del 4-etilfenolo è stata identificata a 605 µg/L, (Chatonnet *et al.*, 1992; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003) e se la popolazione di *Brettanomyces* è in fase di crescita esponenziale questa concentrazione può essere raggiunta rapidamente.

Dal punto di vista microbiologico i metodi tradizionali utilizzano terreni selettivi per enumerare questi lieviti. Nella microbiologia alimentare, la prima applicazione di metodi molecolari coltura-indipendente a una matrice alimentare fermentata è stata descritta nel 1999 (Ampe *et al.*, 1999). Negli ultimi anni sono stati descritti metodi di successo coltura-indipendenti, come PCR-DGGE; questa tecnica che è una delle più utilizzate in enologia, ha riportato limiti di rilevazione tra 10² CFU/mL in colture pure e 10⁴ CFU/mL in campioni di vino o mosto (Andorrà *et al.*, 2008). Attualmente, i metodi molecolari basati sulla PCR, in particolare la qPCR, sono ampiamente utilizzati per rilevare, identificare e quantificare patogeni o microrganismi utili come i microbi in fermentazione o probiotici (Masco *et al.*, 2007; Phister & Mills, 2003). Anche per quanto riguarda *Brettanomyces*, lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare ha consentito la rilevazione di questi lieviti con metodi basati sulla

PCR che possono identificare e quantificare rapidamente i microorganismi in ecosistemi microbici complessi, come vino o mosti, senza ricorrere a un preliminare isolamento su terreni di coltura (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

Nel presente studio, è stata valutata la presenza di lieviti *Brettanomyces* in cantina ed è stato sviluppato un metodo qPCR per la loro rilevazione e quantificazione nel vino in tempi molto rapidi. In particolare, è stata monitorata la popolazione di *Brettanomyces* durante la vinificazione, in condizioni reali di cantina, per studiarne la crescita e le dinamiche e comprendere meglio l'influenza/efficienza delle diverse pratiche di vinificazione, quali travasi, fermentazione malolattica (FML) spontanea o con starter malolattici e solfitazione.

In questo lavoro sono state monitorate tre vinificazioni di uve Nebbiolo, dalla fermentazione alcolica fino alla fine della fermentazione malolattica. Gli stessi campioni analizzati con qPCR sono stati sottoposti ad analisi GC-FID per la quantificazione degli etilfenoli allo scopo di determinare una possibile correlazione tra la popolazione di Brett e il loro contenuto in questi vini.

Materiali e metodi

Vinificazione

I test sono stati eseguiti utilizzando vino Nebbiolo proveniente da una cantina piemontese con pregressi problemi di inquinamento da *Brettanomyces*. L'uva è stata raccolta a mano utilizzando cassette da 20 kg, pigiata e diraspata. Il pigiato è stato suddiviso in tre vasche da 75 hL di capacità, sono stati quindi aggiunti 40 mg/L di SO₂ (come metabisolfito di potassio), 20 g/hL di lievito secco attivo (LSA) e sali di ammonio (15 g/hL). Nei giorni successivi sono stati effettuati rimontaggi giornalieri e la temperatura delle vasche è stata monitorata, mantenendola a 28°C. Quattro giorni dopo la svinatura, i vini sono stati travasati. Al termine della FML, tutti i vini sono stati nuovamente travasati ed è stata aggiunta SO₂ (30 mg/L). Il vino è stato quindi sottoposto a controlli periodici al fine di verificare il contenuto di SO₂ libera.

Nella vasca 1 la FML è stata condotta

spontaneamente e il vino è stato solfitato al termine della stessa. Il serbatoio 2 è stato inoculato con lo starter malolattico commerciale MLV1B (Oliver Ogar, Italia), secondo le indicazioni del produttore; al termine della FML il vino è stato trattato con bentonite (30 g/hL) e successivamente solfitato.

Il serbatoio 3 è stato inoculato con lo starter malolattico Laffort PreAc (Laffort, Italia) e il vino è stato solfitato alla fine della FML senza trattamento con bentonite.

Campionamento di mosto e vino

Periodicamente sono stati prelevati campioni di vino dall'inizio della fermentazione alcolica fino alla fine della fermentazione malolattica. Sono stati inoltre prelevati campioni dopo ogni pratica di vinificazione quali: svinatura, aggiunta di bentonite (30 g/hL) e solfitazione (30 mg/L). Per ogni campione, il DNA è stato estratto e analizzato mediante qPCR e i 4-etilfenoli sono stati quantificati utilizzando GC-FID.

Determinazione della popolazione di *Brettanomyces* nel vino

I primer specifici per *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* sono stati disegnati allineando le sequenze ribosomiali di *D. bruxellensis*, *D. anomala* e *S. cerevisiae* e selezionando le regioni che presentano una diversa composizione nucleotidica tra le specie.

Per stabilire il limite di quantificazione è stato utilizzato come standard il ceppo *B. bruxellensis* ISE 371 appartenente alla collezione conservata presso il CREA-VE di Asti, inoculandolo nel vino a partire da una coltura contenente $1,0 \times 10^7$ CFU/mL che è stata diluita in serie dieci volte nel vino. Il DNA è stato estratto da ciascuna diluizione e analizzato mediante qPCR. La quantificazione è lineare nell'intervallo da 10^2 a 10^7 CFU/mL e il limite di rilevamento di 10^2 CFU/mL.

Determinazione dei 4-etilfenoli mediante GC-FID

Prodotti chimici e reagenti

Gli standard di 4-etilguaiacolo, 4-etilfenolo, 3,4-dimetilfenolo (usato come standard interno) e tutti i reagenti ausiliari utilizzati (acido tartarico, NaOH IM,

Na₂SO₄) sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Preparazione del campione

30 mL di vino sono stati diluiti con acqua ultrapura a 100 mL di volume allo scopo di ridurre il tenore alcolico che potrebbe interferire con l'estrazione degli analiti. Il campione è stato quindi aggiunto di una quantità nota di standard interno 3,4-dimetilfenolo e fatto passare attraverso una cartuccia SPE (Solid Phase Extraction) C18 EC, opportunamente attivata, ad un flusso di circa 2 mL/min (Gianotti e Di Stefano, 1991). La fase estraente è quindi lavata con pochi mL di acqua, asciugata e la frazione lipofila contenete gli analiti è estratta con diclorometano. Il campione è stato quindi anidrificato con Na₂SO₄ e concentrato ad un volume di circa 200 µL.

Condizioni cromatografiche e quantificazione

L'analisi GC è stata eseguita utilizzando un sistema Fisons HRGC Mega 2 Series (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e una colonna capillare di silice fusa Innowax (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). La temperatura dell'iniettore e del rivelatore sono state mantenute a 250 °C. Un µl di campione è stato iniettato in modalità split con un rapporto di 1:8. Il gas

di trasporto utilizzato era l'idrogeno e il flusso è stato impostato a 2 mL/min. La temperatura del forno è stata programmata come segue: 40 °C per 2 min, quindi aumentata a 60 °C con un incremento di 30 °C/min, e mantenuta a 60 °C per 2 min; aumentata a 210°C ad una velocità di 2° C/min e, infine mantenuta a tale temperatura per 10 min.

Le curve di calibrazione del 4-etilfenolo e del 4-etilguaiacolo sono state determinate utilizzando vino rosso privo di 4-etilfenoli. Sono stati utilizzati sei diversi punti di concentrazione nell'intervallo 0 - 2000 µg/L. Per ogni concentrazione, la loro analisi è stata eseguita in triplicato. Ciascuna soluzione è stata estratta su una cartuccia SPE come descritto in precedenza.

Risultati

In generale, i risultati ottenuti indicano che durante la fermentazione alcolica (FA), la popolazione di *Brettanomyces* si è mantenuta a un livello basso (inferiore a 10^3 CFU/mL).

Alla fine della FA la popolazione inizia a crescere, ciò potrebbe essere dovuto alla diminuzione di *S. cerevisiae* e, di conseguenza, ad una riduzione della competizione tra specie diverse. Inoltre, la presenza di *Brettanomyces* non ha influenzato l'evoluzione della fermentazione malolattica (sponta-

Fig. 2 - Andamento della produzione di 4-etilfenolo e quantificazione della popolazione di *B. bruxellensis* nella vasca 2

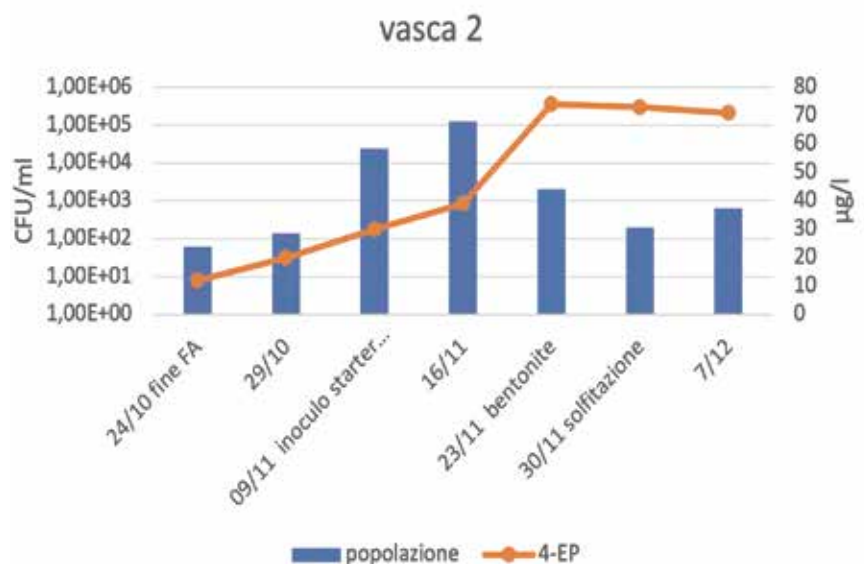
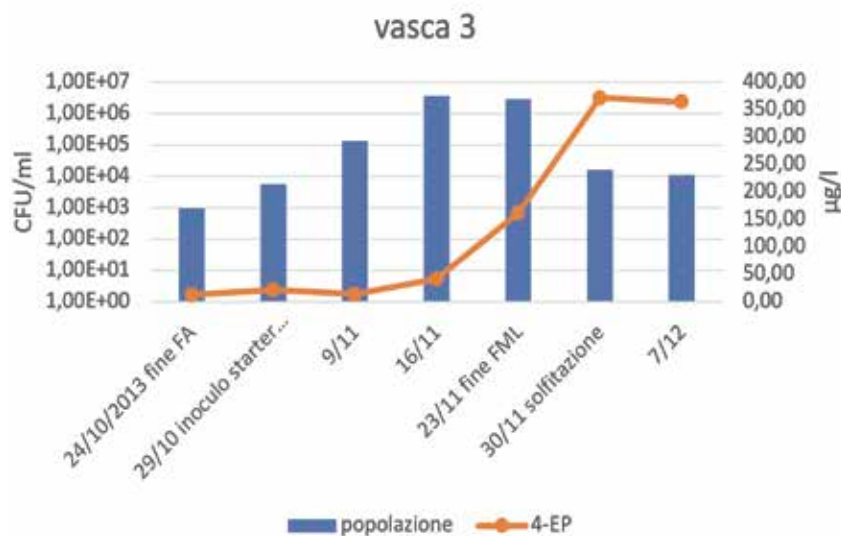


Fig.3 - Andamento della produzione di 4-etilfenolo e quantificazione della popolazione di *B. bruxellensis* nella vasca 3



nea o con starter commerciali) e allo stesso tempo la presenza di batteri malolattici non ha ridotto lo sviluppo di *Brettanomyces*, anzi, la crescita di *Brettanomyces* è favorita dai livelli ridotti di solfiti normalmente necessari per l'avvio della FML.

Nella vasca 1, la FML è stata condotta spontaneamente dopo la fermentazione alcolica. Come riportato nella Fig.1, durante la FML la popolazione di *Brettanomyces* è aumentata da 10^4 a 10^5 CFU/mL. Durante questo periodo, il livello di 4-etilfenolo è passato da 10 a 20 µg/L e al termine della FML è aumentato nuovamente da 20 a 40 µg/L. Questo serbatoio è stato tempestivamente solfitato e la popolazione è scesa a 10^2 CFU/mL. La solfitazione riduce la quantità microbica bloccandone la crescita e stabilizza il vino; infatti, la popolazione di *Brettanomyces* è rimasta invariata nel campione prelevato sette giorni dopo la solfitazione, questo ha evitato un accumulo di etilfenoli oltre la loro soglia di percezione.

Nella vasca 2, la FML è stata indotta da uno starter malolattico commerciale. Il vino a fine FA è stato tenuto in vasca per una settimana prima dell'inoculo dello starter; in questa fase latente, la popolazione di *Brettanomyces* è aumentata esponenzialmente raggiungendo 10^4 CFU/ml e durante la FML è stato raggiunto il valore di 10^5 CFU/mL. La produzione di 4-etilfenolo è aumentata contemporaneamente all'aumen-

to della popolazione, ma è rimasta sotto i 70 µg/L. Dopo la FML, è stato eseguito il trattamento con bentonite e si è osservata una significativa efficacia sulla riduzione della popolazione di *Brett* (100 volte). Infine, dopo la solfitazione, la popolazione è diminuita di dieci volte, e una settimana dopo il trattamento è rimasta invariata, così come il contenuto di 4-etilfenolo (Fig.2).

Nella vasca 3 (Fig.3), la FML è stata indotta con batteri starter. Come nel serbatoio 2, il vino è rimasto nel serbatoio per una settimana prima dell'inoculo, il che ha favorito la crescita di *Brett* da 10^2 a 10^5 CFU/mL in sette giorni; durante la FML, la popolazione di *Brett* è ancora aumentata a 10^6 CFU/ml. Durante questa fase è aumentato anche il contenuto di 4-etilfenolo, che alla fine della FML era di 150 µg/L; il suo livello è aumentato anche dopo la FML e dopo sette giorni ha raggiunto circa 400 µg/L. Il vino è stato immediatamente solfitato per ridurre la popolazione di *Brett* e stabilizzare il vino, in questo modo è stata bloccata anche la produzione di 4-etilfenolo.

Discussione

In generale, in tutte le vasche studiate, nel periodo di indagine, il contenuto di 4-etilfenolo è rimasto al di sotto delle soglie di percezione sensoriale (Fig.3). Ciò è probabilmente dovuto

alle misure tempestive eseguite sui serbatoi al fine di diminuire la popolazione di *Brett*; di conseguenza è stato impedito l'accumulo di queste molecole indesiderate.

I risultati hanno mostrato che durante la fermentazione alcolica, la popolazione di *Brettanomyces* ha mantenuto un livello basso, intendendo per basso una concentrazione di 10^3 CFU/mL.

Al termine della FA, i *Brettanomyces* hanno iniziato a crescere, probabilmente a causa di una ridotta competizione tra specie diverse, facilitato dal fatto di non essere esigente dal punto di vista nutrizionale (Uscanga et al., 2000) potendo crescere anche in mezzi con un basso contenuto di zuccheri e un alto livello di etanolo (Silva et al., 2004).

Dal punto di vista analitico, il chiaro vantaggio delle tecniche molecolari quali la PCR è che si possono applicare direttamente alla matrice e aggirano la necessità di coltivare su piastra, che necessita tempo e talvolta non dà risultati poiché ci sono specie non coltivabili; inoltre, rispetto ai metodi basati su colture, la PCR è più veloce, più sensibile e più specifica. Soprattutto la velocità di analisi risulta un fattore determinante per prevenire la produzione di etilfenoli. Come evidenziato nella sperimentazione, infatti, è proprio grazie alla rapidità di analisi che è stato possibile intervenire tempestivamente e precocemente inibendo la crescita dei microrganismi responsabili del difetto.

Questo lavoro si è anche concentrato sullo studio dell'effetto di diverse pratiche sulla quantità di cellule di *Brettanomyces* presenti nel vino. L'importanza della solfitazione in vinificazione è ampiamente nota, con trattamenti effettuati al termine della FML che portano alla stabilità microbiologica; infatti, questo studio ha mostrato una diminuzione delle cellule di *Brettanomyces* e la popolazione è rimasta invariata nei campioni prelevati sette giorni dopo la solfitazione (Fig.3).

Inoltre, la svinatura/travaso può portare ad una riduzione di questo lievito da 10 (vasca 3) a 100 volte (vasche 1, 2), come si può osservare nelle Fig. 1, 2, 3; l'efficacia di questa semplice pra-

tica nel ridurre la popolazione di lieviti può essere tenuta in conto quando non sia possibile impiegare SO₂ in una particolare fase di vinificazione. L'uso della bentonite ha dato un buon risultato. Dopo il suo utilizzo, è stata osservata una diminuzione significativa della popolazione di *Brettanomyces*. La bentonite è il coadiuvante più comunemente usato (Ribereau-Gayon, 2000) per la chiarificazione e il trattamento dell'instabilità proteica del vino. La bentonite è un composto argilloso che, una volta idratato, forma una sospensione colloidale; questa struttura multistrato è caricata negativamente ed è in grado di reagire con le componenti caricate positivamente del vino, (Marchal e Jeandet, 2009). Alcuni studi Santos *et al.* (2011) hanno dimostrato l'attività antimicrobica della bentonite, che trattata con Ag⁺ e acido esercita un effetto battericida su *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*. Nel presente lavoro è possibile che la riduzione della popolazione di *Brettanomyces* sia dovuta semplicemente all'effetto fisico della bentonite, poiché la bentonite enologica non viene trattata con sali d'argento. Confrontando i dati ottenuti dalla quantificazione qPCR e degli etilfenoli mediante GC-FID, si può osservare che se la popolazione di lievito rimane al di sotto di 10⁵ CFU/mL, è possibile controllare facilmente la contaminazione, che può essere ridotta con svinatura e /o solfitazione del vino. Infatti, la **Fig.1** mostra che quando la popolazione rimane al di sotto di 10⁴ CFU/mL, il contenuto di etilfenoli rimane molto basso (20-40 µg/L). Quando la popolazione supera 10⁶ CFU/mL, la produzione di 4-etilfenolo aumenta notevolmente e può facilmente superare i valori di soglia percettiva (**Fig.3**). Renouf *et al.* (2006) hanno mostrato che la quantità di etilfenoli prodotti in un vino è proporzionale non solo alla durata dell'attività dei lieviti, ma anche al loro numero; questo significa che se un vino è contaminato anche da quantità molto piccole di Brett ma per lunghi periodi o, viceversa, possono essere prodotti gli etilfenoli. Ciò è particolarmente evidente nella vasca 3 (**Fig.3**) dove la popolazione di Brett

ha superato il limite di 10⁶ CFU/mL, solo per una settimana, e il livello di etilfenoli ha quasi raggiunto il limite della soglia olfattiva.

Conclusioni

È evidente che l'unico metodo efficace per evitare i problemi legati al lievito contaminante *Brettanomyces* è la prevenzione. Per questo motivo l'approccio proposto, ovvero il monitoraggio della popolazione di lievito durante l'intero processo di vinificazione, che permette di intervenire per abbassarne la concentrazione prima che la crescita diventi eccessiva, abbinato ad un uso razionale della solforosa, può essere utile ai produttori per preservare la qualità del vino ed evitare il suo deprezzamento.

Bibliografia

- Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* 65:5464-5473.
- Andorrà I, Landi S, Mas A, Guillamon JM, Esteve-Zarzoso B (2008) Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol* 25:849-856.
- Chatonnet P, Dubourdieau D, Boidron J, Pons M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. *J Sci Food Agric* 60:165-178.
- Ciani M, Ferraro L (1997) Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J Sci Food Agric* 75:489-495.
- Gianotti S, Di Stefano R (1991) Metodo per la determinazione dei composti volatili di fermentazione. *L'Enotecnico*. Ottobre:61-64.
- Ibeas JI, Lozano I, Perdigonés F, Jimenez J (1996) Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl Environ Microbiol* 62:998-1003.
- Loureiro V, Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86:23-50.
- Marchal R, Jeandet P (2009) Use of enological additives for colloid and tartrate salt stabilization in white wines and for improvement of sparkling wine foaming properties. In: Moreno-Arribas

M.V. and Polo C. Wine chemistry and biochemistry. Springer ed., New York.

- Masco L, Vanhoutte T, Temmerman R, Swings J, Huys G (2007) Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *Int J Food Microbiol* 113:351-357.
- Norris L (2004) Unraveling the mystery of *Brettanomyces* flavor. *American Journal of Enology and Viticulture* 55:304A.
- Phister TG, Mills DA (2003) Real time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl Environ Microbiol* 69:7430-7434
- Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 4:865-77.
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2005) Numeration, identification and understanding of microbial biofilm on grape berry surface. *Aust J Grape Wine Res* 11:316-327.
- Renouf V, Falcou M, Miot-Sertier C, Perello MC, De Revel G, Lonvaud-Funel A (2006) Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J Appl Microbiol* 100:1208-19.
- Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dudourdieu D (2000) Clarification and stabilization treatments: fining wine. In: Ribereau-Gayon P, Glories, Maujean A, Dudourdieu D eds., *Handbook of Enology: Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. Wiley ed., Chichester, pp:271-299.
- Rodriguez 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*. *J Appl Microbiol* 90:588-599.
- Santos MF, Oliveira CM, Tachinski CT, Fernandes MP, Pich CT, Angioletto E, Riella HG, Fiori MA (2011) Bactericidal properties of bentonite treated with Ag⁺ and acid. *Int J Mineral processing* 100:51-53.
- Silva P, Cardoso H, Gerós H (2004) Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am J Enol Vitic* 55: 65-72.
- Uscanga MG, Delia ML, Strehaiano P (2000) Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch chemostat cultures. *Can J Microbiol* 46:1046-1050. ■