

DOCUMENTO
TECNICO

Manuela Cersosimo
Vincenzo Del Prete
Adolfo Pagliara
Emilia Garcia Moruno

C.R.A. - Istituto Sperimentale per
 l'Enologia - Asti



Da sinistra:
 M. Cersosimo,
 E.G. Moruno,
 A. Pagliara,
 V. Del Prete.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON OZONO SULLA CONTAMINAZIONE DA BRETTANOMYCES IN BARRIQUE

In questo lavoro si è voluto verificare l'effetto del trattamento con acqua ozonata su barrique contenenti vino inoculato con *Brettanomyces bruxellensis*, in maniera da ottenere differenti gradi di contaminazione. I risultati dimostrano che un tale trattamento di sanitizzazione riduce la contaminazione senza eliminarla completamente.

Introduzione

Agli inizi del novecento il genere *Dekkera/Brettanomyces* fu riscontrato per la prima volta nella rifermentazione delle birre inglesi e solo negli anni cinquanta un ceppo di tali lieviti fu isolato da uno spumante tedesco (Claussen, 1903; Larue *et al.*, 1991; Licker *et al.*, 1998).

In bibliografia (Chatonnet *et al.*, 1995; Gerbaux *et al.*, 2000; Cocolin *et al.*, 2004) sono presenti numerosi lavori riguardanti il problema

della contaminazione da *Brettanomyces* in vini e mosti prodotti in tutto il mondo (Francia, Italia, Spagna, Australia e Usa) a testimonianza di quanto la presenza di questo microrganismo in ambito enologico sia una problematica di attualità.

Nell'attuale classificazione il genere *Brettanomyces*, forma anamorfa e asporigena del genere *Dekkera*, include 5 specie e tra queste il *Brettanomyces bruxellensis* è quella maggiormente riscontrata nel vino (Kurtzman e

Fell, 1998; Henick - Kling *et al.*, 2000).

Tali lieviti sono estremamente adattabili e ubiquitari, infatti sono riscontrabili nei prodotti caseari, nella linfa degli alberi (essudati), nelle birre, nei mosti e nei vini (rossi, bianchi e spumanti), nel terreno, nell'acqua e nell'aria. In cantina i *Brettanomyces* sono stati isolati nelle attrezzature, sulle pareti, sui pavimenti e nelle botti di rovere. La contaminazione da parte di tali lieviti si manifesta solitamente a fermen-



Tab. 1 - Risultati nelle barrique ad un mese dal primo trattamento

Posizione prelievo	Barrique 1 trattata (UFC/dm ²)	Barrique 2 non trattata (UFC/dm ²)	Barrique 3 testimone (UFC/dm ²)
A	78000	480000	0
B	18000	600000	0
C	680000	1550000	0

Barrique piuttosto contaminata

Tab. 2 - Risultati nel vino ad un mese dal primo trattamento

	Barrique 1 trattata	Barrique 2 non trattata	Barrique 3 testimone
Carica di <i>Brettanomyces</i> (cell/mL)	40	1010	0

Barrique piuttosto contaminata

Tab. 3 - Risultati del secondo trattamento

Posizione prelievo	Barrique 1 prima trattamento (UFC/dm ²)	Barrique 1 dopo trattamento (UFC/dm ²)	Barrique 4 prima trattamento (UFC/dm ²)	Barrique 4 dopo trattamento (UFC/dm ²)
A	78000	850	8200	60
B	18000	380	3400	10
C	680000	10300	12000	420

Barrique mediamente contaminata

tazione alcolica e malolattica ultimate per lo più durante l'invecchiamento in barrique (Chatonnet *et al.*, 1993; Chatonnet P., 2000).

I *Brettanomyces* crescono piuttosto lentamente (da alcune settimane a diversi anni) con temperatura ottimale di crescita compresa tra i 13 °C e i 30 °C e manifestano buona tolleranza all'acidità, alla solforosa molecolare e all'alcol (Gerós *et al.*, 2000; Lanati e Marchi, 2003; Silva *et al.*, 2004).

Dal punto di vista organolettico lo sviluppo di questi microrganismi contribuisce alla comparsa nel vino di particolari odori, per lo più sgradevoli, come il sudore di cavallo, l'odore di cerotto o di plastica bruciata capaci di distruggere gli aromi fruttati e floreali del vino. Queste note animali sono correlate alla degradazione degli acidi idrossicinnamici dell'uva in composti maleodoranti, come il 4-etil fenolo e il 4-etil guaiacolo (Boidron *et al.*,

1988; Chatonnet *et al.*, 1992; Licker *et al.*, 1998).

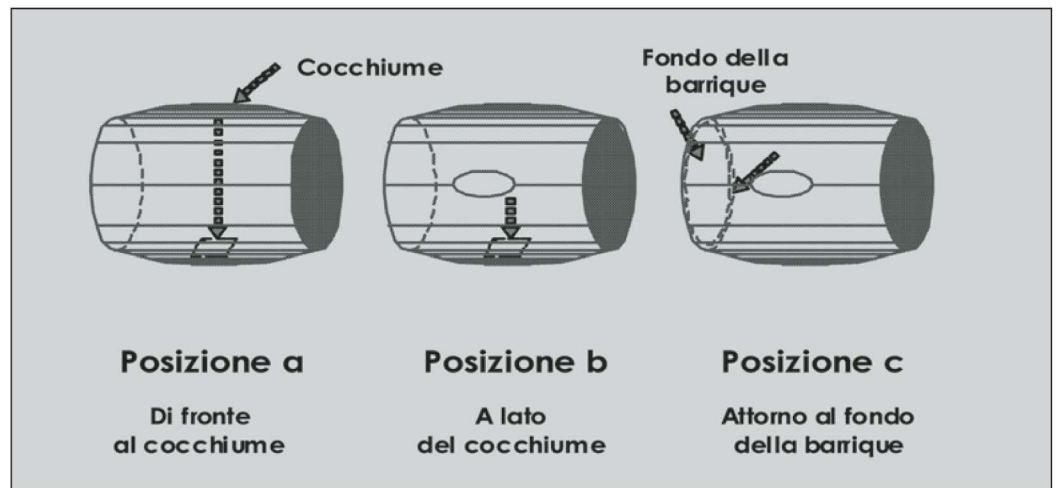
La ricerca non ha ancora individuato uno strumento efficace di controllo per combattere o limitare l'azione di questo lievito: alcuni studiosi sostengono che un modo per limitarne l'azione sui vini rossi invecchiati in botti di rovere sia quella di mantenere il pH sotto i 3,5 e una buona concentrazione di SO₂ durante la fermentazione e l'invecchiamento. Tuttavia il *Brettanomyces* resiste anche ad alte concentrazioni di solforosa annidandosi nei frammenti porosi del legno e in quiescenza, si può raggrinzire ed assumere dimensioni tali da oltrepassare i setti filtranti (Henick - Kling *et al.*, 2000; Lanati e Marchi, 2003). Uno dei metodi di sanificazione in cantina può essere il trattamento delle botti o delle barrique con acqua ozonata. Sulla base di tali considerazioni la sezione di Microbiologia dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia

di Asti ha svolto uno studio riguardante il trattamento con acqua ozonata di barrique riempite con vino inoculato con un ceppo di *Brettanomyces bruxellensis* (ceppo ISE 372) appartenente alla collezione di lieviti e batteri enologici presente in Istituto. Per effettuare il lavoro è stato utilizzato un sistema mobile di sanificazione.

Materiali e metodi

Inoculo del vino con *Brettanomyces*. Durante la prima parte della sperimentazione sono stati effettuati dei prelievi in tre barrique vuote per assicurarsi che non fossero contaminate da *Brettanomyces*. Successivamente le barrique n.1 e n.2 sono state inoculate aggiungendo vino contenente 2×10^5 cell/mL di *Brettanomyces bruxellensis* (ceppo ISE 372) mentre la barrique n.3 (testimone) è stata riempita con lo



Fig. 1 - Posizioni dei prelievi effettuati in barrique

stesso vino ma non contaminato.

Il vino utilizzato aveva le seguenti caratteristiche: densità: 0,9957; alcol %: 10,46; estratto totale: 25,3 g/L; estratto secco: 24,3 g/L; acidità volatile: 0,45 g/L; acidità totale: 4,87 g/L; pH: 3,55; solforosa libera: 8,32 mg/L; solforosa totale: 28,8 mg/L; acido malico: 0 g/L e acido lattico: 1,38 g/L. Al vino è stato aggiunto dello zucchero in modo da ottenere una concentrazione zuccherina di 2 g/L. In nessun caso il vino è stato addizionato di altra SO_2 o di altre sostanze ad azione antisettica.

Prelievi e piastratura. I prelievi sono stati effettuati all'interno di ogni barrique in tre posizioni differenti (Fig. 1) su una superficie di 1 dm^2 mediante tampone sterile. I prelievi sono stati raccolti in soluzione fisiologica 0,9% NaCl. Quindi 1 ml della sospensione cellulare è stato piastrato in YEPGA (estratto di lievito 1%; peptone 1%; glucosio anidro 2% e agar purificato 1,5%) con 2% CaCO_3 in presenza di acidione (0,01%) e ampicillina (0,01%). Una tale concentrazione di acidione rende selettivo il mezzo per i *Brettanomyces* eliminando la maggior parte degli altri lieviti (Kurtzman e Fell, 1998), mentre l'ampicillina inibisce la crescita dei batteri. Le piastre sono state incubate a

25 °C per 14 giorni. È stato quindi effettuato il conteggio delle colonie su piastra.

Primo trattamento con acqua ozonata. Dopo una settimana dall'inoculo le barrique sono state svuotate ed il vino trasferito in altre barrique non contaminate. A questo punto la barrique n.1 è stata lavata con acqua, riempita con acqua ozonata e lasciata a bagno per 30 minuti. Le barrique n.2 e n.3 sono state soltanto lavate con acqua. Prima e dopo il trattamento sono stati effettuati i prelievi all'interno delle barrique. Alle barrique n. 1, 2 e 3 è stato quindi aggiunto dell'altro vino non contaminato. Il trattamento con acqua ozonata è avvenuto mediante il sistema mobile di sanificazione delle superfici con ozono le cui caratteristiche tecniche sono le seguenti: produzione di ozono: 8-10 g O_3/h ; portata di acqua ozonata: 2,5 m^3/h ; 1,5-2,5 ppm di ozono residuo.

Secondo trattamento con acqua ozonata. Le barrique trattate in questa fase della sperimentazione sono state la n.1 (secondo trattamento) e la n.4, contaminata utilizzando vino con carica $1,2 \times 10^5$ cell/mL di *Brettanomyces*. Il secondo trattamento è stato effettuato per 30 minuti utilizzando lo stesso sistema mobile con l'aggiunta di una lancia rotante posizionata all'interno della barrique. I

prelievi sono stati eseguiti prima e dopo il trattamento e solamente la barrique n.4 è stata riempita con vino nuovo non contaminato.

Prelievo vini. Sono stati effettuati prelievi di vino nelle barrique trattate e non trattate a 30 giorni dal primo trattamento e a 60 giorni dal secondo trattamento. Tali prelievi sono stati piastrati per vedere la differenza tra il grado di contaminazione acquisito dal vino nuovo, non contaminato, messo nella barrique trattata e non trattata.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti dopo il primo trattamento, in condizioni di maggior contaminazione (carica 2×10^5 cell/mL) delle barrique si possono vedere nella Tab. 1 e nella Tab. 2, dove si presentano sia i dati relativi ai prelievi nelle tre posizioni diverse delle barrique trattata, non trattata e testimone, sia i dati relativi al contenuto di cellule di *Brettanomyces* nel vino dopo 1 mese dal trattamento.

Dai risultati ottenuti in questa prima prova si può vedere, confrontando i dati relativi alla barrique trattata con quelli della barrique non trattata, che il trattamento con ozono ha fatto diminuire in maniera importante la contaminazione di *Brettanomyces*. Tuttavia non è stato possibile

eliminare completamente questi lieviti, in accordo con i dati della letteratura (Henick-Kling *et al.*, 2000) che indicano la difficoltà a debellare i *Brettanomyces*, una volta che questi si siano insediati in una barrique.

Siccome questa prova è stata realizzata utilizzando una barrique molto contaminata, si è voluto ripetere il trattamento utilizzando delle barrique con un grado di contaminazione minore.

I risultati del secondo trattamento sono rappresentati nella Tab. 3.

I risultati ottenuti in questa seconda prova confermano quelli ottenuti nella prima, vale a dire l'efficacia del trattamento con acqua ozonata nella riduzione della popolazione di *Brettanomyces*, senza riuscire però ad eliminare totalmente i lieviti contaminanti. Inoltre si può vedere come un minore grado iniziale di contaminazione porti ad una maggiore efficacia del trattamento.

La barrique n. 4, trattata, è stata riempita con del vino nuovo, non contaminato, e questo analizzato dopo 2 mesi. Il numero di cellule di *Brettanomyces* trovato è stato di $2,6 \times 10^5$ cell/mL. Questo alto grado di contaminazione del vino, dopo due mesi di conservazione in una barrique poco contaminata sta ad indicare la grande importanza dell'effetto della temperatura sulla crescita dei *Brettanomyces*, infatti tale sperimentazione è stata condotta nei mesi di marzo-maggio, in locali a temperatura ambiente, mentre la prima prova è stata condotta nei mesi di gennaio-febbraio. Inoltre i risultati ottenuti pongono in evidenza il pericolo della sola presenza di poche cellule di *Brettanomyces* all'interno della barrique.

Considerazioni conclusive

Si può quindi concludere che i trattamenti di sanitizzazione delle barrique, tipo il trattamento con ozono, sono auspicabili per ridurre

la popolazione di contaminanti, ma, nel caso dei *Brettanomyces*, non sono sufficienti ad impedire la crescita di questi lieviti nel vino, senza altri mezzi di protezione da tale microrganismo.

E' quindi consigliabile in primo luogo la prevenzione; soprattutto quando si acquistano delle barrique usate. Nel caso non fosse possibile accertarsi dell'assenza di cellule di *Brettanomyces*, bisognerebbe effettuare un trattamento preventivo di sanitizzazione delle barrique.

E' anche importante fare molta attenzione alla temperatura di conservazione del vino, fattore determinante nello sviluppo di tale lievito. ■

Bibliografia

1. Boidron, J.N., Chatonnet P., Pons M., 1988, Influence du bois sur certains substances odorantes des vins. *Conn. Vigne Vin*, 22, 275-294.
2. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G., 2004, Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (3), 1347-1355.
3. Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., 1992, Le caractère phénolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev. Fr. Oenol.*, 138, 21-24.
4. Chatonnet P., Boidron J.N., Dubourdieu D., 1993, Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et éthyl-phénols. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 27, 277-298.
5. Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., 1995, The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 463-468.
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 œnologie* n. 96, juillet 2000, 23-26.

7. Claussen N.H., 1903, Improvements in and connected with the manufacture of English beers or malt liquors and in the production of pure yeasts cultures for use therein. *Eng. Pat.*, 28, 184; Dec. 22, 1903; 204.

8. Gerbaux V., Jeudy S., Monamy C., 2000, Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Borgogne. *Bulletin de l'OIV* 835-836: 582-599.

9. Gerós, H., Cássio F., Leão C., 2000, Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food Prot.* 63, 96-101.

10. Henick-Kling T., Egli C., Licker J., Mittrakul C., Acree T.E., 2000, *Brettanomyces* in Wine. In: *Atti Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Oenology*, 16-20 January 2000, Melbourne, Australia.

11. Kurtzman C.P., Fell J.W., 1998, *The Yeasts a taxonomic study*. 4th Edition, 1998, Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.

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

13. Larue F., Rozes N., Froudiere I., Couty C., Perreira G.P., 1991, Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les mouts et les vins. *J. Int. Sciences vigne vin.*, 25, 149-155.

14. 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.

15. Silva P., Cardoso H., Gerós H., 2004, Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 65-72.

