

## BATTERI LATTICI SELEZIONATI: CONTROLLO DI BRETTANOMYCES E PRECURSORI VARIETALI DEI FENOLI VOLATILI

Junio Francesco Lo Paro

### Formazione dei fenoli volatili

I lieviti *Brettanomyces/Dekkera* sono notoriamente dei microrganismi contaminanti che possono causare considerevoli danni alla qualità dei vini dovuti a intorbidamento, produzione di acido acetico e fenoli volatili responsabili dei ben noti difetti di medicinale, cerotto e sudore di cavallo (Fugelsang *et al.* 1993, Heresztyn 1986). Non è semplice controllare la proliferazione di questo lievito in cantina dal momento che è capace di svilupparsi in condizioni molto limitanti come alcol elevato, carenza di fattori nutritivi, elevata SO<sub>2</sub>, ecc.. Esso compare nel vino principalmente durante le fasi di invecchiamento, tuttavia è stato possibile isolare il Brett durante ogni tappa del processo di vinificazione e della conservazione in bottiglia.

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

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

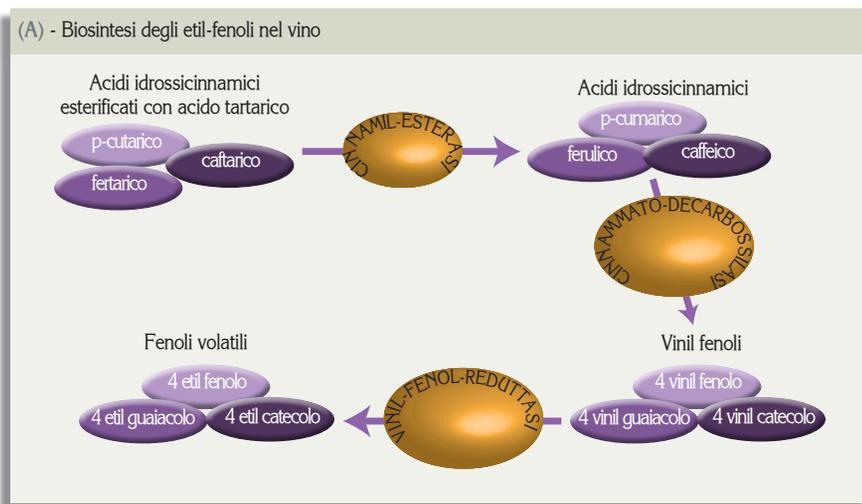
Questi nuovi studi confermano come il controllo della microflora batterica in cantina sia un fattore non trascurabile per la qualità del vino, anche in un'ottica di prevenzione dei fenoli volatili.

### Effetto inibitore

In linea teorica, minore è la concentrazione di precursori nel vino, più bassa è l'incidenza degli off-odours dovuti ai fenoli volatili nel prodotto finito. Partendo da questo presupposto, lo studio di Burns e Osborne (2013) ha indagato sulla capacità di degradare gli acidi idrossicinnamil tartarici da parte di alcuni ceppi di *Oenococcus* e *Lactobacillus*. In alcune prove svolte su Pinot Noir inoculati con differenti ceppi di batteri è stato preso come indice della presenza dell'attività cinnamil-esterasica il cambiamento di concentrazione degli acidi idrossicinnamici (liberi ed esterificati) rispetto ad un controllo con fermentazione malolattica (FML) bloccata.

I ricercatori hanno riscontrato che alcuni ceppi di batteri (risultati non mostrati) possiedono un'attività cinnamil-esterasica capace di incrementare in modo rilevante la concentrazione degli acidi p-cumarico e ferulico, precursori del 4 etil-fenolo e 4 etil-

(A) - Biosintesi degli etil-fenoli nel vino



Il primo passo per prevenire lo sviluppo del *Brettanomyces* è assicurare un rapido avvio della fermentazione alcolica (FA) attraverso un efficace **inoculo di lieviti** selezionati ed un corretto apporto nutrizionale. Un altro fattore che interagisce fortemente con lo sviluppo del Brett è la gestione della **fermentazione malolattica (FML)**: ciò influisce sulle tempistiche della solfitazione, sulla sua crescita e sull'eventuale liberazione di precursori dei fenoli volatili.

Le due tappe biosintetiche con cui il Brett trasforma gli acidi cinnamici in fenoli volatili coinvolgono due enzimi chiave quali la cinnamato-decarbossilasi e la vinil-fenol-reduttasi (A). Le forme esterificate degli acidi cinnamici (gli acidi p-cumarico, ferulico e caffeico) rappresentano quindi una riserva di precursori che, se convertiti nelle forme libere, possono aumentare la suscettibilità del vino nei confronti dei fenoli volatili.

È noto in letteratura che *Brettanomyces* non è il solo microrganismo

(B) - Concentrazione degli acidi idrossicinnamici (mg/L) in un vino Pinot Noir quattro settimane dopo l'inoculo con batteri selezionati in rapporto ad un controllo senza FML

Ceppo di batteri	Acido Malico	Acido Caftarico	Acido p-Cutarico	Acido Caffeico	Acido p-Cumarico	Acido Ferulico
(1) PN4	26,3 ± 2,3	23,2 ± 0,4	6,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2
(2) O-Mega	27,2 ± 6,8	24,1 ± 1,3	6,9 ± 0,4	3,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,3
(3) Beta	22,7 ± 12,2	25,0 ± 2,2	7,0 ± 0,6	2,6 ± 0,5	0,8 ± 0,3	4,2 ± 0,5
(4) V22	27,6 ± 10,5	25,8 ± 1,3	7,1 ± 0,3	2,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	3,8 ± 0,1
(5) Ceppo CE+	32,6 ± 22,6	14,9 ± 9,7	4,3 ± 2,7	11,5 ± 9,7	2,7 ± 1,6	4,1 ± 0,4
Controllo (no FML)	1061,4 ± 10,3	25,1 ± 1,1	6,8 ± 0,5	2,2 ± 0,2	0,9 ± 0,3	4,1 ± 0,3

guaiacolo. Ad esempio, su Pinot Noir ciò ha portato ad una concentrazione di 4-EG tripla rispetto al controllo e a un incremento del 4-EF da 263 a 1579 µg/L (Osborne *et al.*, 2013)

Alla luce di questa scoperta, Lallemand, in collaborazione con James P. Osborne dell'Oregon State University, ha esaminato nei propri ceppi selezionati di *O. oeni* e *Lactobacillus plantarum* la presenza o meno dell'attività cinnamil esterasica. I primi risultati ottenuti hanno dimostrato che i batteri enologici selezionati *O. oeni*, e *Lactobacillus plantarum* (indicati in tabella (B) con i numeri 1, 2, 3 e 4) non degradano gli acidi idrossicinnamil tartarici e pertanto non aumentano la quantità di precursori potenzialmente trasformabili in fenoli volatili. Successivamente anche altri ceppi si sono dimostrati esenti da questa attività.

### Antagonismo

Il primo passo per controllare il *Brettanomyces* è sicuramente l'attuazione delle buone pratiche di vinificazione e di igiene in cantina. Trattandosi di parametri strettamente interdipendenti, è importante prestare la massima attenzione alla qualità dell'uva, ai livelli

di anidride solforosa in funzione del pH, alla T° di conservazione del vino e all'ossigeno disciolto. Una buona igiene in cantina, combinata a un corretto dosaggio di SO<sub>2</sub>, riduce notevolmente il rischio di contaminazione microbica.

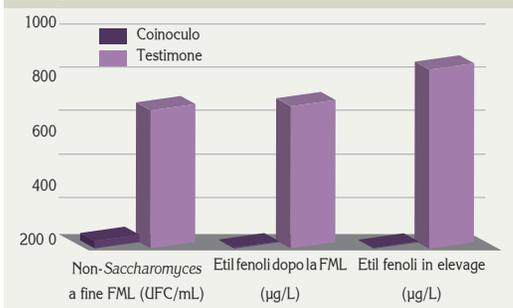
Tuttavia questo non è sempre sufficiente; ad esempio l'intervallo fra FA e FML è un momento ideale per lo sviluppo del *Brettanomyces*: il vino non è protetto da SO<sub>2</sub>, sono ancora presenti dei nutrienti residui della FA e non vi è praticamente alcuna competizione con altri microrganismi del vino, dal momento che i lieviti *Saccharomyces* stanno morendo ed i batteri devono ancora consolidare la loro presenza.

Un inoculo precoce di batteri selezionati subito dopo il termine della FA o in coincolo si è dimostrato efficace nella prevenzione del *Brettanomyces*, semplicemente perché porta ad un incremento di competizione nella stessa nicchia ecologica. In uno studio condotto da Pillet *et al.* (2011) è stato dimostrato che in un Cabernet Franc della Gironda (Francia) coincolato con *O. oeni* (ceppo 3 in tabella (B)) la FML si è svolta senza problemi e, cosa più importante, con

un livello di lieviti non-*Saccharomyces* (successivamente riconosciuti come *Brettanomyces*) e di etilfenoli significativamente più basso (C). In un test simile su Cabernet Franc del Languedoc-Roussillon sono stati ottenuti dei vini con livelli di etilfenoli notevolmente inferiori rispetto ai vini con FML spontanea. Nel vino coincolato il livello di 4-etilfenolo è risultato otto volte inferiore (200 contro 1670 µg/L), quello di 4-etilguaiacolo quattro volte più basso (80 contro 370 µg/L).

Oltre al coincolo, anche un inoculo con batteri selezionati subito dopo il termine della FA può prevenire la crescita dei microrganismi contaminanti. Gerbaux *et al.* (2009) su un Pinot Noir della Borgogna hanno dimostrato, con test in

(C) - Popolazione microbica ed etilfenoli in un Cabernet Franc (Francia) coincolato con batteri selezionati confrontato con una FML spontanea.



laboratorio ed in cantina, che un inoculo precoce di batteri a fine FA è stato efficace per il controllo del *Brettanomyces*. In particolare, i risultati presentati in (D) mettono in evidenza il ruolo della temperatura sulla crescita dei batteri e sulla durata della FML.

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

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

Junio Francesco Lo Paro  
Lallemand Italia  
flopardo@lallemand.com

(D) - Produzione di fenoli volatili in un Pinot Noir della Borgogna inoculato con batteri selezionati in post fermentazione alcolica rispetto ad una malolattica spontanea.

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