

DOCUMENTO
TECNICO* **Antonio Carlomagno**
** **Pasquale Tamborra*** *Enologo*** *CRA - Unità di ricerca per l'uva
da tavola e la vitivinicoltura in
ambiente mediterraneo.
Cantina Sperimentale
di Barletta (BA)*

A. Carlomagno

INCIDENZA DEGLI ETIL-FENOLI IN VINI AFFINATI IN LEGNO DELL'ITALIA MERIDIONALE

L'affinamento in legno ha positivi effetti sull'aroma quando il vino è protetto dalla SO₂ molecolare e la barrique è nuova. Altrimenti è facile assistere ad un peggioramento delle caratteristiche sensoriali anziché ad un loro miglioramento a causa della produzione di etil-fenoli da parte dei lieviti *Brettanomyces*.

Introduzione

L'affinamento dei vini in barrique è una tecnica che accompagna da sempre la produzione dei grandi vini in quanto sfrutta la capacità del legno di arricchire il vino in aromi donando quella particolare nota gusto-olfattiva che i francesi chiamano "gusto boisé", proprio a indicare il risultato sensoriale frutto di un intimo contatto fra legno e vino.

Se da una parte, però, l'affinamento in barrique è

in grado di produrre questa particolare armonia aromatica, dall'altra se mal gestito può portare alla formazione di molecole che mascherano questi sentori vanigliati e speziati. Si tratta degli etil-fenoli, i quali sono in grado di produrre deviazioni olfattive sgradevoli e deleterie per la qualità del vino, descritte come sudore di cavallo, sentori di stalla, cuoio, ecc. che vengono prodotti dai lieviti *Brettanomyces/Dekkera* (Chatonnet et al., 1992). La specie *Brettano-*

myces bruxellensis si sviluppa maggiormente in condizioni precarie di igiene e in barrique usate, dove è in grado di sintetizzare il 4-etilfenolo, il 4-etilguaiacolo (Fig. 1), il 4-etilcatecolo ed il 4-etilsiringolo a partire dagli acidi idrossicinnamici presenti nelle uve o nel legno di quercia. Dalle uve *Brettanomyces* contamina il mosto, dove si sviluppa preferibilmente nelle fasi iniziali di fermentazione, poi a causa della competizione con i lieviti vinari si blocca,

Parole chiave: vino, etilfenoli, barriques, Brettanomyces/Dekkera.

Tab. 1 - Risultati delle analisi effettuate sui vini affinati in legno

Campioni	SO ₂ libera mg/L	pH	4-etil-fenolo (µg/L)	4-etil-guaiacolo (µg/L)	whisky-lattone trans (µg/L)	whisky-lattone cis (µg/L)	vanillina (µg/L)
AV1td	6,4	3,45	65	10	23	46	75
CR2bt	12,4	3:54	119	7	90	120	224
PL1bp	0,9	3,57	120	tracce	29	87	134
PL1bp	7,3	3,66	174	nr	64	64	191
PL1bp	1,9	3,59	267	nr	100	150	206
BS1bg	4,1	3,69	298	23	Nr	23	201
PL1bp	1,9	3,57	346	101	36	54	113
PL1bp	1,6	3,52	400	85	Nr	64	112
BS3bg	1,6	3:22	404	114	Nr	48	415
BS1bg	3,2	3,67	422	63	22	132	109
PL1tp	1,6	3,61	478	309	163	218	122
AV1td	6,7	3,26	554	153	17	34	78
BS1bg	3,2	3:33	576	162	20	60	152
BS3bg	2,8	3:27	630	117	87	145	242
VC1bb	2,2	3:41	640	200	Nr	nr	49
VC1bb	0,9	3:52	641	235	15	105	100
VC1bb	2,8	3:52	723	251	21	84	161
BS2bg	3,2	3:45	733	159	46	69	72
VC1bb	1,6	3:52	752	241	69	138	84
VC1bb	3,2	3:50	757	264	23	92	71
VC1bb	2,5	3:52	790	516	Nr	58	117
VC1bb	0,9	3:40	829	280	44	110	172
VC1bb	2,8	3:51	830	261	Nr	148	95
VC1bb	2,8	3:52	846	264	26	nr	143
VC1bb	2,5	3:50	875	299	66	154	265
VC1bb	2,2	3:52	895	289	50	125	248
VC1bb	0,3	3:37	1018	257	29	116	164
CR2bt	10,2	3:59	1024	63	120	180	231
VC1bb	2,8	3:53	1062	294	tracce	140	301
CR2tt	13,1	3:53	1146	70	57	114	100
CR2tt	19,8	3:53	1259	46	72	144	100
CR2tt	16,3	3,62	1427	46	46	138	116
CR2bt	14	3,63	1459	60	40	160	312
CR2bt	9,6	3,62	1532	27	47	94	316
VC1bb	3,5	3:43	1644	456	76	95	175
CR2tt	20,1	3:57	1775	75	Nr	92	271
CR2tt	13,7	3,6	1783	133	50	150	100
CR3bt	3,2	3:52	1806	114	165	302	193
CR2tt	14,4	3,61	1860	130	72	144	156
PO2bf	7	3,6	2178	151	168	140	222
PO3bf	1,2	3,12	2332	108	165	330	228

ma non muore. *Brettanomyces* può produrre fermentazioni miste con *Saccharomyces spp.* durante la fermentazione alcolica, ma non riesce mai a prendere il sopravvento. Inoltre è nota la sua capacità di causare arresti fermentativi dovuti alla sintesi di acidi grassi (da C₈ a C₁₄) che provocano la morte di *Saccharomyces* perché si ac-

cumulano nel suo citoplasma o si legano alla sua membrana plasmatica.

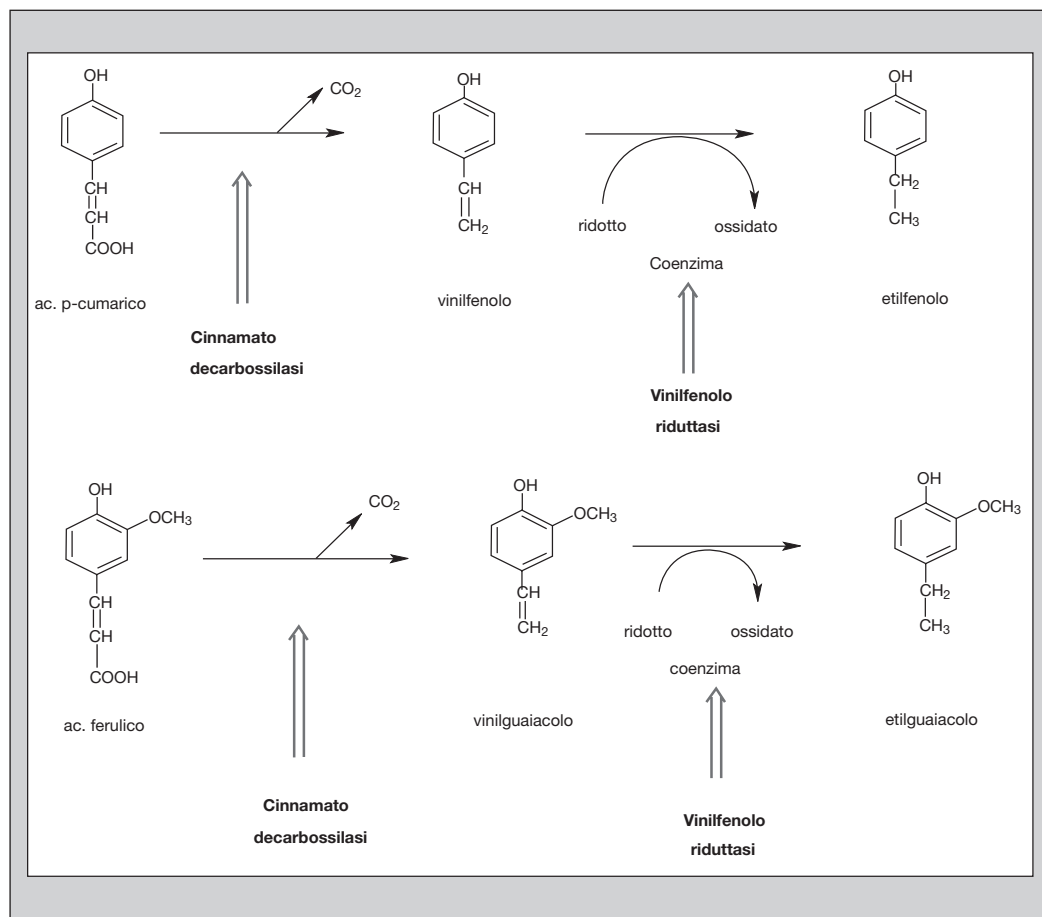
Una volta che il vino viene messo in barrique, *Brettanomyces* si localizza sulle parti interne a livello di crepe o fessure, dove rimane attivo e protetto dai sanificanti. Inoltre, la sua presenza non è facilmente identificabile durante il processo di

invecchiamento dei vini poiché si sviluppa lentamente e non produce il caratteristico film superficiale o l'anidride carbonica, di conseguenza risulta essenziale, per evitare problemi, il continuo monitoraggio delle popolazioni microbiche presenti nel vino in affinamento.

Brettanomyces è un lievito che non ha particolari esi-

genze nutrizionali, e molto probabilmente in ciò sta la ragione del suo sviluppo nel vino.

In un recente lavoro (Tamborra e Carlomagno 2008) è stata ancora una volta dimostrata l'importanza di una adeguata quantità di SO₂ molecolare (superiore a 0,7 mg/L) nell'ostacolare l'azione dei microrganismi respon-

Fig. 1 - Sintesi degli etil fenoli ad opera dei *Brettanomyces*

sabili di alterazioni olfattive quali i *Brettanomyces/Dekkera* soprattutto nei vini rossi invecchiati in legno.

Scopo del lavoro è stato di valutare l'incidenza degli etil-fenoli nelle produzioni di vini affinati in barrique dell'Italia Meridionale, tenendo conto che la maggioranza delle cantine utilizza fusti in legno usati; oltre a ciò, quindi, è stata valutata anche l'efficacia dell'utilizzo delle botti usate nell'arricchimento aromatico del vino ed il ruolo che sul piano sensoriale giocano gli etil-fenoli, considerando che in molti dei vini analizzati le concentrazioni sono davvero preoccupanti. Il tutto è stato condotto nell'ottica di dare un contributo al miglioramento della produzione enologica del Mezzogiorno d'Italia. Le cantine da cui sono stati prelevati i campioni sono rappresentative delle produzioni enologiche delle regioni da cui provengono, nello specifico le zone coin-

volte sono sia quelle a DOC: Aglianico del Vulture (Basilicata), Rosso di Cerignola (Puglia), Pollino (Calabria) che a IGT: Basilicata (Basilicata), Palizzi (Calabria) e Valle del Crati (Calabria).

Materiali e metodi

Sono state individuate, come già detto, Cantine rappresentative delle produzioni d'eccellenza dell'Italia Meridionale, e da queste è stato prelevato un numero rappresentativo di campioni contenuti in barriques usate, dalle quali è stato asportato un volume di vino pari a 100 mL riposto in appositi contenitori sterili in materiale plastico. I vini sottoposti ad indagine si trovavano in barriques da un periodo compreso fra gli otto mesi e i tre anni di affinamento. Per ciascun campione è stato previsto anche la determinazione di altri parametri che posso-

no essere correlati con il tenore in etilfenoli, quali la determinazione della solforosa libera e quella del pH. La valutazione di questi parametri ci ha permesso di fare altre considerazioni sulla gestione della solfitazione dei vini in affinamento, fase anche questa da ottimizzare se non si vuole deturpare la serbevolezza del prodotto. I composti che sono stati indagati sono: 4-etilfenolo, 4-etilguaiacolo, vanillina e whisky-lattone (isomeri trans e cis).

La valutazione delle varie molecole del vino è stata effettuata applicando il seguente protocollo di analisi. Con l'ausilio di una pipetta tarata di classe A si pipettano 10 mL di vino e si versano in un matraccio tarato da 50 mL a cui vanno aggiunti 5 mL di cloruro di metilene (CH_2Cl_2), ed 1 mL dello standard interno 1-decanolo (concentrazione pari a 1665 $\mu\text{g/L}$).

La soluzione così prepara-

ta viene tappata e posta per 10 min. in bagno ad ultrasuoni, che ha il compito di estrarre i composti lipofili, compresi gli etilfenoli. Trascorso il suddetto tempo si versa la soluzione contenuta nel matraccio in una provetta da centrifuga di giuste dimensioni, al cui interno si nota la separazione tra il vino (sopra) e l'estratto diclorometilenico (si tratta di un'estrazione liquido-liquido) di colore bianco (sotto). Dopo centrifugazione a 4000 g/min per 15' l'estratto metilenico viene prelevato con una pipetta e versato in una beuta.

All'interno della beuta si versa del sodio solfato anidro (Na_2SO_4), il quale ha il compito di trattenere l'acqua, e così l'estratto disidratato viene concentrato mediante flusso di azoto, fino a quando raggiunge un volume prossimo ai 200 μL ; a questo punto l'estratto è pronto per essere iniettato al gas-cromatografo. Il gas-cromatografo utilizzato è della Agilent HP 6890 N, munito di spettrometro di massa HP 5973. Come gas-carrier è stato utilizzato l'elio con flusso di 1 mL/min., la colonna era una Innovax da 25 metri e le condizioni operative sono state: Temperatura iniziale di 100 °C per 6 minuti; velocità pari a 6 °C/min. fino a 200 °C, quindi aumento di 20°C/minuto fino a 240°C per 20 minuti; temperatura della sorgente di 280°C, e temperatura del quadrupolo a 180°C.

La determinazione quantitativa delle diverse molecole è stata fatta tenendo conto dell'area corrispondente ai diversi composti chimici. Analizzando i diversi cromatogrammi si è in grado di individuare le molecole in base allo spettro di massa ed al diverso tempo di ritenzione. Quest'ultimo è tipico per ogni molecola, ma naturalmente varia al variare delle condizioni operative; pertanto nelle nostre condizioni a 14.7 min. si troverà il picco dell'isomero trans del whisky-lattone, a 16.0 min.

quello dell'isomero cis, a 17.3 min. il picco del 4-etil-guaiacolo, a 19.7 min. il 4-etilfenolo ed a 24.8 min. la vanillina.

Recentemente è stata messa a punto la determinazione del contenuto in fenoli volatili mediante HPLC (Nicolini et al., 2008), che in 3-15 minuti permette di rilevare la presenza di 4-etil-fenolo, 4-etil-guaiacolo, 4-etil-catecolo, 4-vinil-fenolo e 4-vinil-guaiacolo senza preventiva preparazione del campione.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti (Tab. 1) evidenziano che gli etil-fenoli rappresentano una reale insidia sul piano sensoriale per le prestigiose produzioni del Mezzogiorno in quanto ben 28 campioni su 43 hanno un contenuto in 4-etil-fenolo superiore alla soglia olfattiva di 620 µg/L (Chatonnet et al., 1995), con pregiudizio dell'aroma del vino. Nel caso del 4-etil-guaiacolo la situazione è meno preoccupante, anche perché questa molecola a concentrazioni inferiori alla propria soglia olfattiva, che si attesta intorno ai 140 µg/L, sembra addirittura incrementare la nota speziata del vino, mentre in dosi maggiori apporta uno sgradevole sentore di affumicato. In tutti i vini studiati si è rilevata una concentrazione veramente bassa di SO₂ libera, non idonea a proteggere il vino dalle contaminazioni di origine microbica, per cui anche nei vini che si trovano da poco tempo in barriques, si può supporre un rafforzamento della contaminazione da *Brettanomyces/Dekkera*, soprattutto per via dell'utilizzo di barriques usate che agevolano la proliferazione dei lieviti alteranti, specie in condizioni di scarsa igiene e protezione antisettica.

I campioni di vino che detengono tenori preoccupanti di 4-etil-fenolo, al contrario, si trovano in affi-

namento da un periodo variabile da un anno a tre anni. Anche in questi vini la concentrazione di solforosa libera è veramente bassa, ad eccezione dei campioni contrassegnati con l'acronimo "CR", i quali sono stati solfitati pochi giorni prima del prelievo. Da questi risultati emerge che la gestione inappropriata del bottame e del processo di affinamento anziché incrementare la complessità aromatica dei vini può addirittura deprimerla, se al vino stesso non vengono garantiti un ambiente igienicamente sano in cui sostare ed evolversi e giusti livelli di antisettici atti a preservare il vino da qualsiasi involuzione di natura microbiologica.

Date le elevate concentrazioni di 4-etil-fenolo riscontrate in quasi tutti i campioni, all'analisi sensoriale potrebbe percepirsi la nota sgradevole di "sudore di cavallo"; pur tuttavia alcuni recenti studi (Tamborra et al., 2007) hanno dimostrato che questa deviazione olfattiva è più o meno percepibile a seconda delle concentrazioni della forma cis del whisky-lattone e della vanillina.

Allo scopo di evidenziare i vini che hanno tratto giovamento dall'affinamento in legno i campioni sono stati ordinati in funzione del valore crescente di 4-etil fenolo, riportando inoltre i contenuti del cis whisky-lattone e della vanillina (Graf. 1).

In questo modo, si possono distinguere sulla sinistra i vini migliori, caratterizzati dal sentore di legno franco, pulito in quanto il 4-etil fenolo risulta irrilevante, mentre i contenuti del cis whisky-lattone e della vanillina sono consistenti. Al centro, invece, avremo i vini che, malgrado i valori di 4-etil fenolo tendano a superare la soglia olfattiva, sono comunque "protetti" dalla presenza del cis whisky-lattone e della vanillina. Spostandoci infine verso la destra incontreremo i vini peggiori, ovvero quelli in cui probabilmente sarà ancora possi-

bile avvertire la nota di legno dovuta ai cospicui tenori del cis whisky-lattone e della vanillina, ma la nota boisè risulterà "contaminata" da una sensazione olfattiva sgradevole dovuta alla rilevante presenza del 4-etil fenolo.

Risulta evidente che le concentrazioni del cis whisky-lattone e della vanillina si mantengono basse soprattutto nel corso della permanenza dei vini in barriques usate, per cui solo in modo marginale possono contribuire a mascherare il "Brett character" a fronte anche di elevate concentrazioni di 4-etil-fenolo.

Da ciò si deduce che le barriques usate favoriscono maggiormente l'insorgenza del "Brett character", poiché oltre ad ospitare con maggiore facilità il lievito *Brettanomyces/Dekkera* non sono neanche in grado di cedere quelle molecole che potrebbero mascherare il sentore di stalla. Sotto questo aspetto l'utilizzo di una stessa barrique per più cicli di affinamento è sconsigliato, in quanto il legno usato esaurisce le molecole che provocano la nota boisè annullando i vantaggi dell'affinamento, e probabilmente può contribuire anche a cedere questa indesiderata molecola (Garde-Cerdà et al., 2004).

Considerazioni conclusive

L'intento del presente lavoro è stato quello di delineare la situazione dei vini prodotti in ambiente caldo-arido meridionale in merito alla questione dell'incidenza degli etil-fenoli, dal quale è chiaramente emerso la gravità del problema che impedisce a questi vini di esibire appieno il loro livello qualitativo al momento della degustazione da parte del consumatore.

Dunque, per garantire a questa particolare tipologia di prodotti la congruenza a precisi standard qualitativi è fondamentale razionalizzare

il processo di affinamento il quale, come si è visto, gioca un ruolo determinante nell'imprimere al vino un particolare insieme di sfumature aromatiche e nell'evitare la formazione di molecole indesiderate.

Con la presente indagine, quindi, è stato possibile individuare in tutte le cantine testate le barriques che potenzialmente hanno potuto contaminare i vini, e mettere a punto per queste una valida strategia di sanificazione che si compone delle seguenti fasi:

1 - garantire al vino in affinamento sempre un'idonea copertura antisettica mediante opportune solfitazioni per cercare di contenere il rischio di sviluppo di *Brettanomyces/Dekkera*, soprattutto nel periodo primaverile-estivo, in cui l'aumento delle temperature, del pH e dell'ossigenazione dovuta ai travasi, possono incrementare la presenza di cellule del lievito alterante. Quando si utilizzano, invece, barriques usate, come nel caso dei campioni analizzati, prima di riempirle è necessaria una solfitazione mediante la bruciatura di dischetti di zolfo, in ragione di 7 g di dischetto per barrique, o comunque è conveniente assicurarsi nel vino una solforosa molecolare superiore a 0,5-0,7 mg/L (Tamborra et al., 2008);

2 - corretto lavaggio seguendo i criteri dettati da una tecnica proposta di recente (Fontanot et al., 2006), la quale consente l'eradicazione dei *Brettanomyces* mediante: a) lavaggio delle botti con acqua calda; b) sterilizzazione con vapore a 128-130 °C per la durata di mezz'ora per le barrique e di due ore per le botti da 20 hL; c) saturazione con SO₂ in bombole. Dopo alcune settimane le botti così trattate, sono pronte per ricevere il vino da affinare;

3 - trattamento dei vini affetti dal "Brett character" a mezzo di un prodotto messo a punto di recente (Tamborra et al., 2007). Prove condotte dagli stessi Autori

