

Aloanisoli e barrique nuove: dimostrazione del ruolo delle muffe

>>> L'affinamento del vino in barrique di rovere sta riscuotendo un rinnovato interesse grazie ai progressi dell'enologia moderna e con la messa in evidenza dell'importanza nell'espressione dei grandi vini. Con una capacità standard di 225 L, potenzialmente 300 bottiglie da 75 cL, qualsiasi incidente che coinvolga la barrique può essere molto dannoso per il produttore. Per questo motivo, la prevenzione della presenza accidentale di 2,4,6-TriCloroAnisoli (TCA) nelle barrique è stata per diversi anni un grave problema tecnico ed economico per il settore della fabbricazione delle botti. <<<

Molto coinvolto in questo settore, dal 2012, il laboratorio LEC offre un sistema di controllo degli aloanisoli nelle barrique nuove basato sul principio del campionamento dinamico dei Composti Organici Volatili (COV)¹. Nel 2015 negli Stati Uniti, un vino invecchiato in una barrique francese aveva una concentrazione di 11 ng/L di TCA (2,4,6-tricloroanisolo), mentre era stata giudicata negativa al controllo dopo la sua produzione. Il vino conteneva anche 82 ng/L di TCP (2,4,6-triclorofenolo), precursore del TCA. Questa concentrazione molto insolita ha suggerito una possibile conversione naturale del TCP in TCA durante la vinificazione o durante il trasporto in container. I test di fermentazione malolattica in presenza di alofenoli non hanno confermato la loro trasformazione nei rispettivi aloanisoli durante la fermentazione. È stata dunque considerata l'esistenza di muffe che potrebbero svilupparsi all'interno delle barrique nuove. Questo fenomeno è stato ben documentato in ambienti dotati di elementi di costruzione in legno trattati con prodotti a base di pentaclorofenolo che, nel tempo e sotto l'azione di muffe, contaminano l'atmosfera con aloanisoli^{2, 3, 4, 5}.



- N°2: Aggiunta di 10 ml di acqua ultrapura per mantenere un ambiente favorevole allo sviluppo di microrganismi.
- N°3: Aggiunta di 10 ml di acqua ultrapura e 100 mg di farina di grano: questo alimento ausiliario viene utilizzato dai fabbricanti di barrique per creare una pasta impermeabile per unire i fondi.

Ogni modalità è stata ripetuta tre volte. I flaconi sono state chiusi ermeticamente e conservati in ambiente termoregolato a 20 °C e analizzati da un sistema di desorbimento termico per la concentrazione e l'iniezione dei COVs: un gascromatografo in fase gassosa dotato di una colonna adatta alla loro separazione, un sistema di rivelazione a ionizzazione di Fiamma (FID) e uno Spettrometro di Massa (MS).

■ Risultati della prima fase

Dopo 3 settimane, il legno delle 3 ripetizioni di ciascuna modalità è stato recuperato, essiccato una notte all'aria aperta e analizzato secondo un metodo interno accreditato COFRAC. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati delle analisi del legno espressi in µg/kg. * N.D.: Non dosabile, cioè inferiore al limite di rilevabilità del metodo.

	Modalità N°1			Modalità N°2			Modalità N°3		
	test 1/3	Test 2/3	Test 3/3	Test 1/3	Test 2/3	Test 3/3	Test 1/3	Test 2/3	Test 3/3
TeCA	N.D.*	N.D.	N.D.	0,8	0,9	0,6	2,2	1,7	2,2
TeCP	17,9	18,5	17,1	13,1	12,8	13,5	9,7	7,7	8,2
TCA	N.D.	N.D.	N.D.	2,2	2,6	1,8	3,7	2,6	1,8
TCP	10,2	10,5	9,5	5,7	4,6	6,5	2,7	2,5	3,2
PCA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<0,3	<0,3
PCP	15,9	16,5	15,6	11,7	11,8	12,8	11,0	10,0	9,6
TBA	N.D.	N.D.	N.D.	1,8	2,3	1,4	4,3	3,3	2,9
TBP	14,5	14,6	13,9	10,4	9,8	10,9	6,1	5,1	6,2

Scopo dello studio

Valutare la capacità dei funghi di convertire gli alofenoli in aloanisoli nelle barrique nuove. Le osservazioni hanno portato il laboratorio LEC a sviluppare il suo sistema di controllo delle botti per trovare la presenza di questi composti.

■ Prima fase di studio

Una miscela costituita al 20 % da granulati di legno di rovere non tostati e al 80 % di legno a tostatura media è stata contaminata per macerazione in una soluzione di etanolo contenente i principali alofenoli (TeCP, TCP, PCP, TBP). La macerazione è durata 24 ore in una soluzione che conteneva 5 µg/L di ciascun composto con un rapporto di 100 g di legno per litro di soluzione.

Dopo un'essiccazione di 12 ore, 10 g di granulati così contaminati sono stati inseriti in flaconi di 100 ml secondo le 3 modalità:

- N°1: Controllo.

Vi è una significativa riduzione delle concentrazioni di alofenoli nel legno inumidito rispetto al controllo, tra l'altro questi legni presentano anche concentrazioni sostanziali di aloanisoli e tali osservazioni sono più alte in presenza di farina.

Rivelazione della presenza di funghi comuni ben conosciuti

L'identificazione dei microrganismi presenti nel legno umido da un laboratorio esperto, ha permesso di rilevare la presenza di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus oryzae*, dei funghi comuni ben conosciuti dall'industria agroalimentare⁶ (Figura 2). Ci è sembrato pertinente verificare che questo fenomeno potesse verificarsi anche in barrique in condizioni di esportazione.

■ Seconda fase dello studio

Tre piccole barrique nuove da 28 litri sono state idratate secondo il seguente protocollo: 200 ml di acqua ultrapura, lasciando riposare per 1 h su ciascun fondo e su ciascun lato. In seguito, le botti, sono state sgocciolate per una notte con il foro del tappo verso il basso. Sono state eseguite tre modalità con le seguenti caratteristiche:

→ N°1: Acqua di risciacquo ultrapura, aggiunta di 1g di farina dopo la sgocciolatura.

→ N°2: acqua di risciacquo, aggiunta di alofenoli.

→ N°3: Acqua di risciacquo, aggiunta di alofenoli e aggiunta di 1g di farina dopo la sgocciolatura.

In seguito le barrique sono state imballate con una pellicola trasparente e mantenute in piedi per 4 settimane in una stanza temperata (da 10 a 15 °C, umidità relativa del 40 %).

■ Risultati della seconda fase

Le prime osservazioni sono state le seguenti:

→ Il monitoraggio continuo dell'interno di una delle botti ha permesso di determinare che il tasso di igrometria rimane stabile intorno al 90 % (nel caso di un controllo di 6 mesi su una barrique standard di 225 L precedentemente sciacquata e sgocciolata, il tasso di igrometria interno non è mai diminuito al di sotto del 80 %).

→ Dopo due settimane è stata osservata la presenza di aloanisoli nell'atmosfera interna delle botti 2 e 3.

→ Dopo 4 settimane, dei punti di muffa erano perfettamente visibili nella parte inferiore della barrique n°2 (Figura 1). È stato quindi necessario smontare le botti 2 e 3 per l'osservazione e l'analisi del legno.

Nella barrique n°3 (Figura 2), le muffe hanno completamente colonizzato il fondo inferiore su cui era stata depositata la farina.



Figura 1. Macchie di muffa nella parte inferiore della barrique n°2.



Figura 2. Condizioni del fondo delle botti 2 e 3 dopo essere state smontate.

I campioni di legno sono stati prelevati dal fondo superiore e inferiore e dalle doghe. I risultati sono riassunti nella Tabella 2.

Tabella 2. Risultati delle analisi del legno di rovere espressi in µg/kg.

	BARRIQUE n°2 (+ ALOFENOLI)			BARRIQUE N°3 (+ ALOFENOLI & FARINA)		
	Fondo Sup.	Fondo Inf.	Doghe	Fondo Sup.	Fondo Inf.	Doghe
TeCA	<0,3	0,5	0,8	1,7	26,1	2,3
TeCP	2,5	9,7	5,1	2,7	12,9	1,7
TCA	<0,3	<0,3	0,5	0,0	6,6	1,0
TCP	0,8	2,2	2,0	0,9	3,1	0,5
PCA	N.D.	0,6	<0,3	0,3	N.D.	0,6
PCP	3,3	21,7	9,4	3,4	79,6	3,4
TBA	0,5	0,8	1,4	1,9	41,0	3,1
TBP	2,9	7,9	7,7	1,9	4,7	0,7

■ Conclusioni

→ Il legno di rovere umido costituisce un potenziale substrato per le muffe, favorito dalla presenza di residui di farina utilizzata per unire i fondi della barrique.

→ In questo studio è stata dimostrata la capacità di questi microrganismi di convertire in qualche giorno i precursori di alofenoli in aloanisoli odorosi.

→ Per questo motivo, si raccomanda vivamente di verificare l'assenza di questi precursori nelle barrique, in particolare in quelle destinate all'esportazione. ■

Bertrand Léauté

Laboratoire Expertises et Conseils (LEC), 130 Rue Jules Brisson, Cognac, France.

1 Elenco di aloanisoli/fenoli analizzati in routine: TCA (2,4,6-tricloroanisolo), TCP (2,4,6-triclorofenolo), TBA (2,4,6-tribromoanisolo), TBP (2,4,6-tribromofenolo), TeCA (2,3,4,6-tetracloroanisolo), TeCP (2,3,4,6-tetraclorofenolo), PCA (pentacloroanisolo), PCP (pentaclorofenolo).

2 McAllister, K.A., Lee, H. & Trevors, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* <https://doi.org/10.1007/BF00056556>

3 Allard, A. S., Remberger, M., & Neilson, A. H. (1987). Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and environmental microbiology*, 53(4), 839-845.

4 Chatonnet, P., Fleury, A., and Boutou, S. (2010). Identification of a New Source of Contamination of *Quercus* sp. Oak Wood by 2,4,6-Trichloroanisole and Its Impact on the Contamination of Barrel-Aged Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (19), pp 10528-10538. <https://doi.org/10.1021/jf102571v>

5 McNally, K.J., and Harper, D.B. (1991). Methylation of phenol by chloromethane in the fungus *Phellinus pomaceus*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-5-1029>

6 Tindale, C. R., Whitfield, F. B., Levingston, S. D. and Nguyen, TH. (1989). Fungi isolated from packaging materials: Their role in the production of 2, 4, 6-trichloroanisole. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 437-447. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490406>