



2014-2020

# PSR

## Programma di Sviluppo Rurale

REGIONE TOSCANA



Unione Europea

Fondo europeo agricolo  
per lo sviluppo rurale:  
l'Europa investe nelle zone rurali



Repubblica Italiana

REGIONE  
TOSCANA



Consiglio Nazionale  
delle Ricerche



IMPRESA VERDE®  
GROSSETO SRL



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240



CANTINA  
'I VINI DI  
MAREMMA'



FATTORIA  
MANTELLASSI

Partenariato Europeo per l'Innovazione  
in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura

GRUPPO OPERATIVO

# NOBrett

Riduzione dei difetti da  
*Brettanomyces bruxellensis*  
nei vini toscani di qualità

## Sommario

<b>PREMESSA .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 I difetti organolettici nei vini.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1 I fenoli volatili e le deviazioni organolettiche di tipo “fenolico”.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2 I meccanismi enzimatici di formazione dei fenoli volatili nei vini.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Brettanomyces /Dekkera spp.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1 Storia .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2 Tassonomia .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.3 Morfologia .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.4 Fisiologia.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.5 Fattori che ne influenzano lo sviluppo.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.6 B. bruxellensis: influenza sulle caratteristiche organolettiche .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.7 B. bruxellensis: dispersione geografica e persistenza in cantina.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.8 B. bruxellensis: vitalità e coltivabilità .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Tecniche microbiologiche per la ricerca di Brettanomyces spp. ....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.1 Tecniche coltura-dipendenti .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2 Tecniche coltura-indipendenti .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Strategie di controllo dello sviluppo di Brettanomyces spp. ....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.1 Impiego di anidride solforosa .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.2 Impiego di ozono .....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.3 Impiego di chitosano.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.4 Filtrazione .....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.5 Altre tecnologie emergenti o sperimentate.....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA .....</b>	<b>33</b>

## PREMESSA

### **Piani strategici dei Gruppi operativi (Ps-Go)**

Un Gruppo Operativo (GO) del Partenariato Europeo per l'Innovazione in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura (PEI AGRI) - istituito con Comunicazione della Commissione COM (2012)79 - è uno strumento per la diffusione delle innovazioni nel settore agroalimentare e forestale che ha per obiettivo l'individuazione di soluzioni innovative a specifici problemi o la promozione di opportunità per le imprese agricole.

La creazione dei GO è stata sostenuta finanziariamente dal Programma di sviluppo rurale (Psr Feasr 2014-2022). In Toscana si è attuata con un bando multimisura che prevedeva l'imputazione di quote parte del costo del progetto a diverse misure/sottomisure, in base alla pertinenza delle attività individuate con il Piano Strategico: il collaudo dell'innovazione e la gestione del progetto alla sottomisura 16.2, il trasferimento di conoscenze e la divulgazione alla Misura 1.

Nei progetti dei GO, gli attori della filiera dell'innovazione - imprese agricole, forestali, agroalimentari, centri di ricerca, università, organizzazioni di consulenza, ecc. - agiscono insieme per testare e diffondere una o più innovazioni in un dato contesto, coinvolgendo anche altre imprese del territorio.

L'area tematica di interesse del GO NOBrett era quello del *“Miglioramento quali-quantitativo e valorizzazione delle produzioni agricole e forestali, nuove varietà, razze e tipologie di prodotto, multifunzionalità dell'azienda agricola e diversificazione delle attività”* ed ha visto la costituzione di un partenariato formato da: C.A.I.M. Group - Tentamus, in funzione di capofila con le aziende vinicole "I Vini di Maremma" Società Agr. Coop. e Fattoria Mantellassi S.s.a. Il supporto scientifico al progetto è stato fornito dall'Istituto per la Bioeconomia del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBE-CNR) e dal Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli studi di Siena (DSV UNISI). Impresa Verde Grosseto è stata la responsabile delle fasi di diffusione e divulgazione.

### **Obiettivi operativi**

Il progetto aveva come obiettivo l'incremento della competitività delle aziende vitivinicole toscane agendo sia sulla PLV che sulla crescita della fiducia e fidelizzazione del consumatore introducendo per la prima volta in Italia un modello di controllo di filiera innovativo.

Gli obiettivi intendevano essere raggiunti mediante una serie di azioni:

- In vigneto, effettuando una mappatura degli impianti, monitorando la presenza del microrganismo ed agendo agronomicamente mediante interventi di “precisione” e mettendo a punto protocolli di difesa antiparassitaria e antifungina applicabili alle diverse situazioni produttive con attenzione alla sostenibilità ambientale.
- Negli impianti di vinificazione, applicando varie tecniche di monitoraggio della presenza del *Brettanomyces bruxellensis* sulle superfici delle attrezzature, dei vasi vinari in acciaio, delle vasche in cemento o dei legni ed agendo con tecnologie rivolte alla riduzione della carica microbica.

- Sui vini, mediante monitoraggi da compiere da fine fermentazione all'affinamento fino all'imbottigliamento, con lo scopo di determinare il livello di contaminazione realmente presente da parte del lievito ed il contenuto dei fenoli volatili per misurare l'incidenza del difetto rilevabile a livello organolettico.

### **Risultati concreti attesi**

Il progetto aveva come obiettivi concreti:

- ✓ La messa a punto di un protocollo per il monitoraggio e il contenimento dello sviluppo di *Brettanomyces bruxellensis* nelle diverse tipologie di filiera vitivinicola.
- ✓ La divulgazione delle informazioni al settore vitivinicolo regionale. Attraverso la diffusione delle conoscenze acquisite vi sarà una maggiore consapevolezza delle possibili azioni correttive adottabili per contrastare lo sviluppo di *B. bruxellensis* mediante strategie attuabili lungo tutta la filiera produttiva.
- ✓ Abbattimento dei fenoli volatili nel vino attraverso strategie innovative e secondo i criteri della sostenibilità ambientale. Il Piano di Azione Nazionale previsto dal decreto interministeriale del 22/01/2014 entrato in vigore in Italia detta le regole per l'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari (2009/128/Ce). Alla luce di tali principi il protocollo intende ridurre l'uso di fitofarmaci di sintesi ad elevato impatto ambientale. Con i medesimi criteri di sostenibilità ambientale, anche negli ambienti di cantina prevedeva strategie di contenimento a ridotto impatto ambientale quali l'utilizzo di ozono e di chitosano.
- ✓ Sviluppo di un protocollo per la riduzione dei fenoli volatili nei vini difettati.
- ✓ Miglioramento delle caratteristiche organolettiche e qualitative dei vini con la conseguente tutela delle Denominazioni di Origine e del patrimonio enologico e culturale. Attraverso l'utilizzo del protocollo messo a punto si intendeva garantire una efficace attività di prevenzione e contrasto nei confronti dei difetti organolettici dovuti a tale microrganismo, con la conseguente salvaguardia della qualità richiesta dai disciplinari di produzione e del valore di mercato dei vini.

## 1. INTRODUZIONE

Il vino rappresenta la terza bevanda alcolica più bevuta al mondo (Fonte UIV, 2017), dopo la birra e i superalcolici. Secondo il report 2022 presentato dall'*International Organization of Vine and Wine* (OIV) la produzione mondiale di vino nel 2021 ha raggiunto la soglia di 260 milioni di ettolitri, circa l'1% in meno rispetto al 2020. Rappresentando il 19% della produzione di vino mondiale totale nel 2021, l'Italia si afferma nuovamente come il maggior produttore, seguita da Francia e Spagna.

I dati relativi al 2020 evidenziano che i primi cinque Paesi per consumo di vino rappresentano quasi la metà del totale mondiale: gli Stati Uniti detengono il primato con il 14 % del consumo complessivo, seguiti da Francia, Italia, Germania e Regno Unito (Figura 1). La panoramica europea ha inoltre indicato un consumo di 114 milioni di ettolitri nel 2021 (+3% rispetto al 2020).

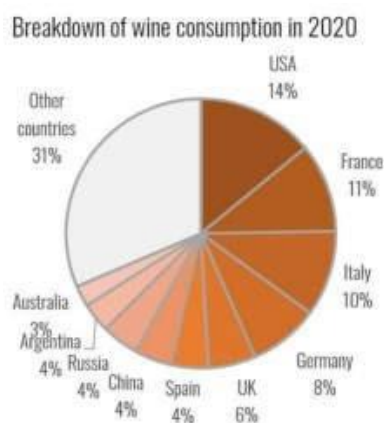


Figura 1: Suddivisione dei principali Paesi per consumo di vino nel 2020 (modificato da [www.oiv.int](http://www.oiv.int))

In tale contesto il mercato del vino italiano ha subito uno sviluppo considerevole, scaturito sia dai notevoli progressi tecnologici nel settore vitivinicolo che da una maggiore attenzione dei produttori e dei consumatori verso prodotti tipici di elevata qualità. Nel corso degli anni le politiche agricole europee hanno orientato la legislazione verso la tutela dei prodotti tipici attraverso la Denominazione di Origine Protetta (D.O.P.) e l'Indicazione Geografica Protetta (I.G.P), garantendone la qualità e la salubrità attraverso norme specifiche molto restrittive.

Il fenomeno del riscaldamento globale ha ulteriormente influenzato gli Stati membri a intervenire sulla normativa comunitaria affinché si ripensasse il concetto di produzione agricola non solo in termini economici ma anche secondo i criteri di sostenibilità ambientale. Il vino è un alimento edonistico nel quale l'apprezzamento e il consumo sono fortemente influenzati dalle caratteristiche sensoriali (Piombino et al., 2021; Chironi et al., 2013; Vecchio et al., 2019).

Con il termine *bouquet* viene indicato l'insieme delle sensazioni olfattive di un vino distinte in tre gruppi di profumi classificati a seconda della loro origine:

- **Primari o varietali:** sostanze presenti nelle uve che conferiscono al vino l'impronta aromatica del vitigno;
- **Secondari o fermentativi:** sostanze che si originano dal metabolismo dei lieviti e dei batteri che conducono le fermentazioni alcolica e malolattica;
- **Terziari o da affinamento:** sostanze derivate da reazioni chimiche post-fermentative che intervengono nel corso dell'evoluzione e dell'affinamento del vino.

Il *flavour* rappresenta l'insieme delle sensazioni percepite dai recettori situati nella cavità orale e nasale comprendenti le sensazioni olfattive, ortonasali e retronasali, le sensazioni gustative e le altre sensazioni orali di natura tattile e trigeminale (Piombino et al., 2021; Prescott, 2012; Small & Prescott, 2005).

La percezione del *flavour* del vino è perciò condizionata dall'interazione dei diversi stimoli sensoriali percepiti durante l'analisi organolettica o degustazione (Piombino et al., 2021; Noble, 1996).

L'obiettivo comune del produttore, dell'agronomo e dell'enologo che seguono ogni tappa del processo produttivo è il conseguimento di un vino di massima qualità. Per definire il concetto di qualità di un alimento è necessario comprendere i meccanismi coinvolti nel processo decisionale che influenzano il consumatore all'acquisto di un determinato prodotto (Marin & Durham, 2007). Generalmente la valutazione della qualità si basa su un giudizio del grado di eccellenza o superiorità (Zeithaml, 1988). Una semplice definizione è stata suggerita da Émile Peynaud, celebre enologo e ricercatore francese considerato tra i padri dell'enologia moderna: "la qualità di un vino è l'insieme delle sue caratteristiche, vale a dire delle proprietà che lo rendono accettabile o desiderabile".

A garanzia della qualità dei prodotti vitivinicoli e al fine di tutelare i consumatori, la legislazione europea ha introdotto una normativa specifica e complessa.

Il Regolamento (UE) n. 1308/2013 definisce l'organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli, mentre il Regolamento delegato (UE) 2019/33 stabilisce le regole per le denominazioni di origine protette, le indicazioni geografiche e le menzioni tradizionali nonché per l'etichettatura e la presentazione nel settore vitivinicolo.

Attualmente in Italia sono presenti 76 vini a Denominazione di Origine Controllata e Garantita, 330 vini a Denominazione di Origine Controllata e 118 vini a Indicazione Geografica Tipica (Federdoc 2022). Secondo il D.M. del 12 marzo 2019 che disciplina gli esami analitici e organolettici per i prodotti DOP, i vini a Denominazione di Origine devono essere sottoposti a esami analitici di tipo chimico-fisico da parte di un laboratorio accreditato secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e a esame organolettico da parte di una commissione di degustatori nominata dalla Camera di Commercio territoriale. Spesso, la presenza di difetti olfattivi di varia natura, rilevati in sede di degustazione, comporta una non conformità del vino e un conseguente declassamento, causando una notevole perdita economica da parte del produttore.

### 1.1 I difetti organolettici nei vini

I progressi tecnologici nel campo viticolo ed enologico hanno permesso un notevole miglioramento della qualità dei vini, valorizzando la specificità delle diverse varietà d'uva in relazione alle condizioni dell'ambiente caratteristico di ciascun vigneto (Ribereau-Gayon & Pascal, 2007). Per questo motivo i più significativi difetti organolettici frequenti nel passato sono diventati oggi assai inconsueti.

La vinificazione comprende processi biochimici dovuti alla fermentazione alcolica e malolattica: il metabolismo dei microrganismi implicati esercita un contributo rilevante nel successo della vinificazione (Berbegal et al., 2018; Grangeteau et al., 2017; Liu et al., 2017) e sulla qualità finale del prodotto (Palacios et al., 2006). Tuttavia, vi sono numerose specie microbiche che possono influenzare negativamente le caratteristiche organolettiche dei vini, fino a causarne un declassamento e un deprezzamento (Berbegal et al., 2018; Suárez et al., 2007). Oltre alla natura biologica, presenza di batteri lattici, batteri acetici, lieviti, muffe ecc., le anomalie sensoriali possono avere origine anche da processi chimici e fisici comprendenti i

fenomeni di ossidazione, riduzione, contatto con determinati materiali, alterazione degli equilibri colloidali, ecc.

Gli stimoli sensoriali sono estremamente soggettivi: esiste infatti una notevole variabilità interindividuale in relazione alle soglie di percezione (Boni et al., 2021). È attualmente noto, ad esempio, che variazioni genetiche nei geni codificanti per i recettori gustativi sono responsabili di differenze individuali nella percezione del gusto dolce, amaro e umami (Robino et al., 2014).

L'assaggiatore può essere inoltre influenzato dall'ambiente di degustazione, soprattutto dalla temperatura, dalle condizioni psicofisiche e suggestionato da impressioni provenienti dall'esterno. Ogni degustazione è inoltre condizionata dalle sensazioni che la precedono (Peynaud & Blouin, 2007).

Al fine di comprendere le proprietà della percezione olfattiva è necessario definire le nozioni di *soglia*:

- Di **percezione**: valutata in una soluzione idroalcolica modello, rappresenta il valore minimo dello stimolo sensoriale necessario a provocare una determinata sensazione. In questo caso si ha una percezione indefinita, ovvero viene colto uno stimolo ma non è riconosciuto.
- Di **identificazione** o di **riconoscimento**: valutata nel vino, esprime il valore minimo dello stimolo sensoriale capace di consentire l'identificazione o il riconoscimento di una determinata sensazione. In questo caso si ha una maggiore intensità rispetto alla soglia di percezione ed è possibile qualificare un difetto, ad esempio il sentore fenolico sgradevole.
- Di **preferenza**: esprime il valore minimo dello stimolo sensoriale in cui un determinato sentore appare sgradevole.

Nei vini sono stati caratterizzati circa un migliaio di composti volatili, con tenori che variano da qualche ng/l a diverse centinaia di mg/l (Li, 2006). Alcuni di questi sono direttamente coinvolti nel favorire la complessità aromatica (Guth, 1997), mentre altri possono condizionare negativamente le caratteristiche organolettiche. In alcuni casi un determinato composto può favorire la complessità del vino, se presente a basse concentrazioni, mentre può influenzarla negativamente se presente a elevate concentrazioni. La Figura 2 descrive il meccanismo secondo il quale quando una molecola odorifera è presente a una concentrazione inferiore alla soglia di preferenza, il degustatore ha una percezione gradevole, neutra o ininfluenza. Quando la concentrazione del composto è invece superiore rispetto alla soglia di



preferenza, la percezione appare sgradevole, generando disturbo e disgusto: in questo caso si parla di *difetto organolettico*.

Un *difetto* indica perciò una sensazione sgradevole che:

- è originata da un composto non ricercato;
- provoca una repulsione istintiva;
- evoca un alimento avariato (ammuffito, marcio, putrido...);
- rovina il piacere del degustatore;
- maschera la tipicità, l'armonia e la complessità del vino;
- influenza negativamente l'abbinamento con il cibo.

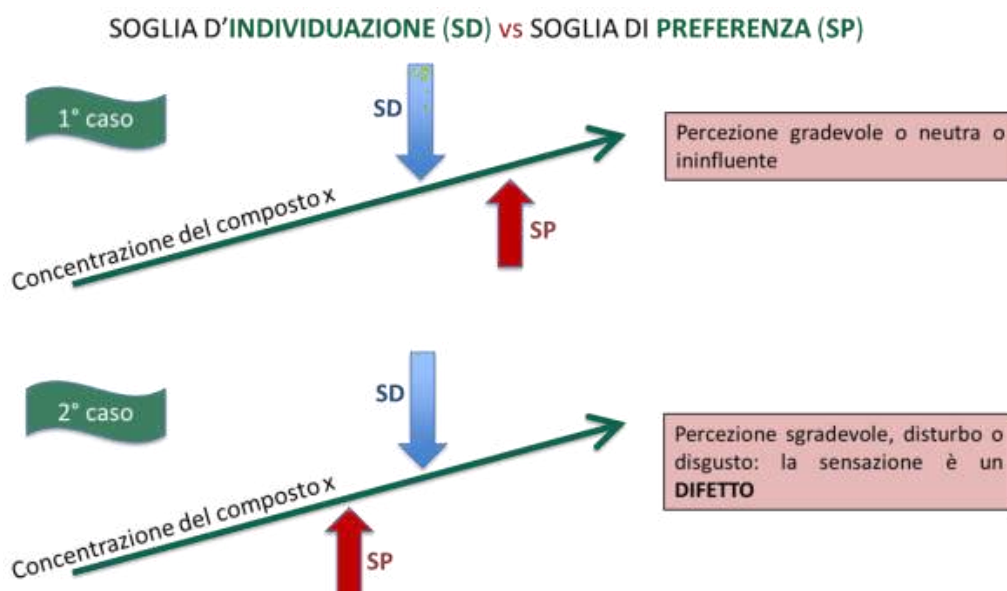


Figura 2: Percezione dei difetti organolettici in relazione alle soglie di individuazione e di preferenza (modificato da Boni, 2021)

### 1.1.1 I fenoli volatili e le deviazioni organolettiche di tipo "fenolico"

La maturazione e l'affinamento dei vini coinvolgono determinati processi di evoluzione nel tempo delle caratteristiche chimiche e organolettiche, con cui si definiscono la complessità e la finezza del prodotto finale.

Tuttavia, quando il vino è conservato per molto tempo in determinate condizioni si possono sviluppare alcune specie di batteri e lieviti che possono rilasciare metaboliti talvolta causa di gravi alterazioni organolettiche. Tra questi, i *fenoli volatili* sono tra i composti che possono maggiormente influenzare il profilo sensoriale del vino in maniera negativa. Le principali molecole appartenenti a questa classe di composti vi sono il *4-vinilfenolo*, il *4-vinilguaiacolo*,

il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo e la loro presenza è correlata ad alcuni descrittori olfattivi specifici, in particolare il sentore di “scuderia” e di “stalla” (Ribereau-Gayon et al, 2007).

Tra i fenoli volatili più maleodoranti vi sono il 4-vinilfenolo, caratterizzato dall’odore di vernice, farmaceutico e cerotto, con una soglia di identificazione di circa 770 µg/L e il 4-etilfenolo, dal tipico odore di sudore di cavallo, stalla e cuoio, con una soglia di identificazione di 620 µg/L (Chatonnet et al., 1992; Ribereau-Gayon et al, 2007). Considerando un rapporto 10/1 tra 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo, la soglia di identificazione degli etilfenoli è pari a 425 µg/l (Figura 3).

I vini rossi possono contenere tenori variabili di etilfenoli e ridotte concentrazioni di vinilfenoli. I vini bianchi prodotti senza lunghe macerazioni con le bucce e affinamenti prolungati sono abitualmente privi di etilfenoli, mentre contengono tenori variabili di vinilfenoli. Nei vini rosati la presenza di fenoli volatili è intermedia fra quella dei vini bianchi e quella dei vini rossi (Chatonnet et al., 1992; Chatonnet et al., 1993).

<b>MOLECOLA</b>	<b>SOGLIA DI IDENTIFICAZIONE</b>	<b>DESCRITTORI</b>
4-vinilfenolo	770 µg/L	vernice, farmaceutico, cerotto
4-vinilguaiacolo	440 µg/L	speziato, pepato
4-etilfenolo	620 µg/L	stalla, sudore di cavallo, cuoio
4-etilguaiacolo	140 µg/L	affumicato, speziato, farmaceutico
4-EF + 4EG (10/1)	425 µg/L	

Figura 3: Soglie di identificazione del 4-vinilfenolo, 4-vinilguaiacolo, 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo (Chatonnet et al., 1992; Ribereau-Gayon et al, 2007)

### 1.1.2 I meccanismi enzimatici di formazione dei fenoli volatili nei vini

La formazione dei fenoli volatili è associata all'azione sequenziale di due enzimi su un substrato formato da acidi idrossicinnamici, tra cui l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido p-cumarico (Figura 4). Il primo step consiste nella trasformazione degli acidi idrossicinnamici in 4-vinilguaiacolo, 4-vinilfenolo e 4-vinilcatecolo da parte dell'enzima *idrossicinnamato decarbossilasi* (Edlin et al., 1998).

Il secondo step comprende la riduzione dei composti ottenuti nei relativi derivati etilici da parte dell'enzima *vinilfenolo reduttasi* (Dias et al., 2003).

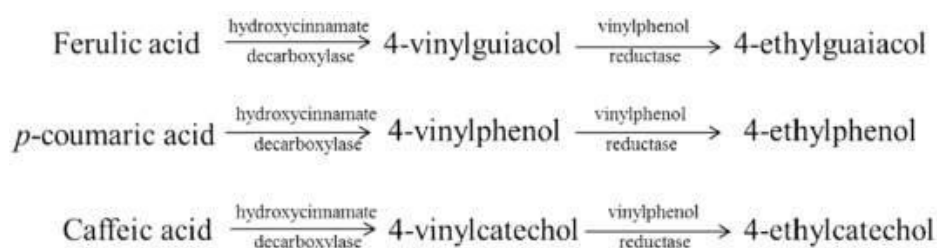


Figura 4: Formazione degli etilfenoli dai precursori acidi idrossicinnamici (modificato da Berbegal et al., 2018)

Gli enzimi coinvolti nei processi biochimici descritti sono presenti in alcuni lieviti, funghi e batteri lattici, di cui i più importanti dal punto di vista enologico sono descritti in Figura 5.

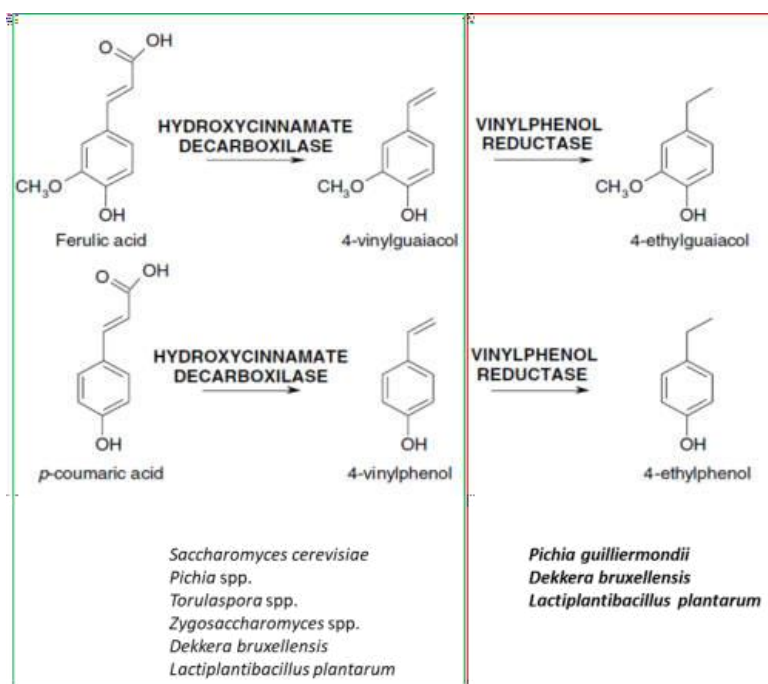


Figura 5: Formazione degli etilfenoli e microrganismi implicati (modificato da Suárez et al., 2007)

Tra i microrganismi che possiedono l'enzima vinilfenolo reduttasi, *B. bruxellensis* si distingue per le elevate concentrazioni di etilfenoli prodotti (Dias et al. 2003, Malfeito-Ferreira 2011) considerando che i tenori sviluppati dipendono dalla varietà di uva utilizzata, dalle condizioni di vinificazione e dai relativi processi (Wedral et al., 2010).

Gli acidi caffeico, ferulico e p-cumarico sono presenti naturalmente nel mosto d'uva, riscontrabili sotto forma di esteri dell'acido tartarico. Successivamente, durante la vinificazione, gli esteri dell'acido tartarico possono essere idrolizzati formando acidi idrossicinnamici in forma libera (Nagel and Wulf 1979), come descritto in Figura 6.

*B. bruxellensis* è in grado di metabolizzare unicamente le forme libere di questi acidi idrossicinnamici, ovvero l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido p-cumarico. Tuttavia, la conversione degli esteri dell'acido tartarico presenti nel mosto da parte di alcuni enzimi, come ad esempio in alcuni batteri lattici in cui l'enzima cinnamil esterasi libera acido p-cumarico a partire dall'acido cutarico, può contribuire all'incremento del tenore in etilfenoli (Schopp et al. 2013).

*B. bruxellensis* è inoltre in grado di produrre il 4-etilcatecolo a partire dal suo precursore, l'acido caffeico, e con il suo caratteristico sentore farmaceutico ha la soglia di identificazione più bassa rispetto agli altri fenoli volatili (Loureiro e Malfeito-Ferreira 2006).

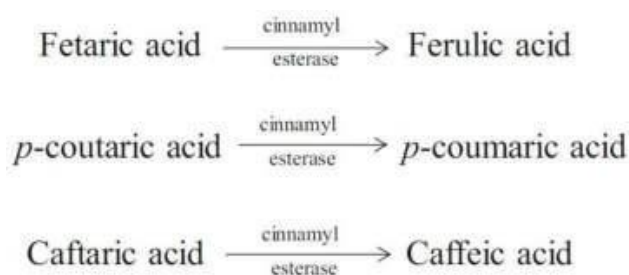


Figura 6: Formazione degli acidi idrossicinnamici liberi dagli esteri dell'acido tartarico (modificato da Berbegal et al., 2018)

## 1.2 *Brettanomyces /Dekkera* spp.

### 1.2.1 Storia

Nel 1904, N. Hjelte Claussen, Direttore presso il laboratorio del birrifico danese Carlsberg, pubblicò un articolo sul *Journal of the Institute of Brewing* in cui descrisse per la prima volta un lievito coinvolto nella fermentazione secondaria che conferiva particolari caratteristiche organolettiche alle pregiate birre “*stock ale*” inglesi, chiamandolo *Brettanomyces* (dal greco Brettano). Claussen isolò quindi questo lievito particolare e ottenne il primo microrganismo brevettato nella storia (brevetto UK GB190328184), suggerendo *Brettanomyces* spp. come lieviti da impiegare nella produzione di birre inglesi quali le ali, le stout e le porter.

*Brettanomyces* divenne ufficialmente un genere negli anni Venti del Novecento, in seguito all’isolamento di lieviti simili in alcune birre Lambic belghe (Kufferath and Van Laer 1921).

Il genere *Dekkera* fu istituito invece molto tempo dopo a causa di difficoltà tecniche nella sporulazione di questi lieviti (Henschke et al., 2007).

Studi più dettagliati effettuati da Mathieu Custers su alcuni isolati di birre inglesi e belghe portarono a proporre nel 1940 quattro specie di *Brettanomyces* (Custers, 1940). Tra i risultati ottenuti si notò che *Brettanomyces claussenii* fermentava il glucosio in maniera più efficiente in condizioni aerobiche rispetto a una condizione di anaerobiosi. Tale comportamento, fu inizialmente descritto come “effetto Pasteur negativo” (Custers 1940, Wiken, et al. 1961) e successivamente denominato “effetto Custer” da Scheffers nel 1966 come un tratto biochimico comune del genere *Brettanomyces* (Wiken, et al. 1961, Scheffers e Wiken 1969). Nonostante sia passato più di un secolo dalla scoperta, il ruolo dei *Brettanomyces* spp. nell’industria alimentare è ancora confuso e ambiguo (Steensels et al., 2015). Da sempre considerati microrganismi indesiderati nel vino, la loro presenza è ricorrente nelle fermentazioni spontanee della birra (Verachtert, 1992) e nella kombucha. Il potenziale utilizzo come colture starter nelle fermentazioni industriali è inoltre ampiamente riconosciuto, suscitando sempre più interesse negli ambienti accademici e nell’industria dei biocarburanti (Steensels et al., 2015). I lieviti *Brettanomyces /Dekkera* sono stati isolati nelle uve, nelle attrezzature per la vinificazione, nel vino e nella birra, negli sherry, nel lievito madre, nel sidro, nella kombucha, nelle olive, nei latticini (Curtin et al., 2015), nella tequila (Lachance 1995), nel tamarindo (Nassereddin e Yamani 2005).

### 1.2.2 Tassonomia

I lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* rappresentano le forme non sporigene cosiddette *anamorfe*, mentre *Dekkera* spp. comprendono le forme sporigene o *teleomorfe*. Attraverso le tecniche di analisi molecolari sono attualmente riconosciute cinque specie appartenenti al genere *Brettanomyces* : *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis*, and *B. nanus* (Kurtzman, et al. 2011). Recentemente è stata invece isolata dall'olio di oliva una nuova specie chiamata *B. acidodurans*, provvisoriamente assegnata al genere *Brettanomyces* (Péter, et al. 2017).

### 1.2.3 Morfologia

*Brettanomyces* spp. si moltiplicano per gemmazione multilaterale o, più raramente, bipolare (Agnolucci et al., 2017). Le cellule sono caratterizzate da un polimorfismo nella forma, apparendo ogivali, sferoidali, cilindriche o allungate (Figura 7). Le dimensioni possono variare da 2 a 7  $\mu\text{m}$  e possono spesso formare pseudomicelio (Kurtzman et al., 2011). Le caratteristiche del mezzo in cui le cellule di *Brettanomyces* si sviluppano possono influenzarne le dimensioni. Per questo motivo, in alcuni casi, le filtrazioni a 0,45  $\mu\text{m}$  durante le operazioni di pre-imbottigliamento dei vini possono risultare inefficaci per eliminarne la presenza (Millet & Lonvaud-Funel, 2000).

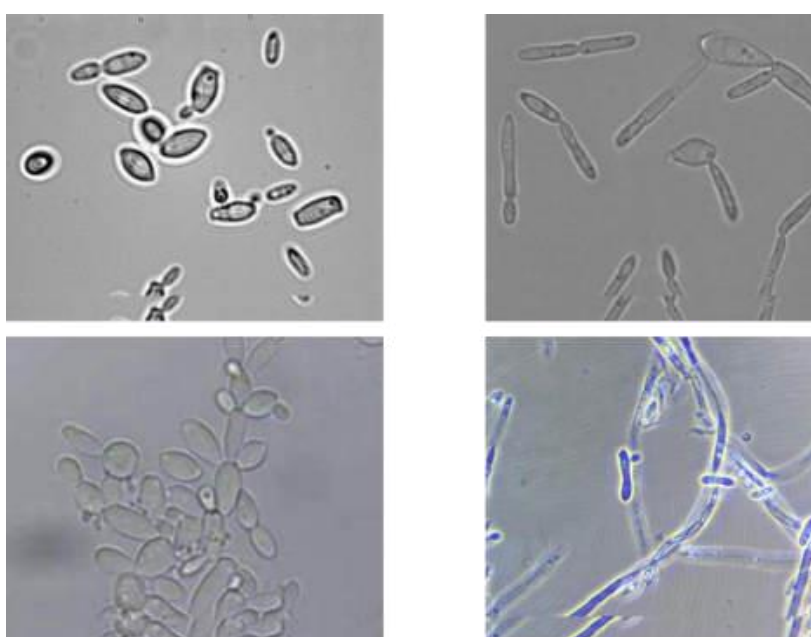


Figura 7: Cellule di *Brettanomyces* spp. osservate al microscopio (CAIM)

#### 1.2.4 Fisiologia

Nel 1940 Custers osservò come l'ossigeno stimoli la fermentazione, fenomeno che fu successivamente denominato effetto Custers. Studi successivi confermarono infatti che la condizione di aerobiosi stimola notevolmente la produzione di acido acetico ed etanolo da parte dei lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces /Dekkera*. In particolare, la presenza di ossigeno ne stimola lo sviluppo fino al conseguente effetto inibitorio dell'acido acetico (Agnolucci et al, 2017).

*Brettanomyces /Dekkera* spp., ad eccezione di *B. naardensis*, possono svilupparsi in condizioni di anaerobiosi e si considerano lieviti Crabtree positivi e anaerobici facoltativi come *Saccharomyces cerevisiae* (Rozpędowska et al, 2011).

Per quanto riguarda il settore enologico, *B. bruxellensis* rappresenta sicuramente la specie più importante a causa della sua elevata tolleranza agli stress ambientali e alle particolari condizioni del vino quali l'alta concentrazione di etanolo, il basso pH, la ridotta concentrazione di ossigeno, di zuccheri (minore di 0,3 g/l) e di azoto assimilabile (Curtin et al., 2015).

#### 1.2.5 Fattori che ne influenzano lo sviluppo

Le prime fasi della fermentazione alcolica sono caratterizzate dalla presenza di lieviti capaci di fermentare lo zucchero contenuto nel mosto. In questa fase, la presenza di *B. bruxellensis* è alquanto limitata a causa della presenza di altre specie dominanti, tra cui *Saccharomyces cerevisiae*. Nelle fasi finali della fermentazione si possono verificare le condizioni che favoriscono lo sviluppo di *B. bruxellensis*, tra cui la lisi cellulare dei lieviti dominanti e il conseguente rilascio di composti metabolizzabili, il tenore di etanolo elevato, la bassa concentrazione di zuccheri e ossigeno.

In tali condizioni limitanti i lieviti *Brettanomyces* spp. riescono a svilupparsi, mentre le altre specie di lievito che dominavano la fermentazione alcolica si riducono esponenzialmente a causa delle condizioni del mezzo. La temperatura di sviluppo ottimale è compresa tra 25-28°C. *B. bruxellensis* è in grado di metabolizzare diverse fonti di carbonio rispetto ad altre specie di lievito. Una concentrazione di zuccheri nel vino inferiore a 2 g/L è sufficiente a favorirne lo sviluppo causando la formazione di fenoli volatili. Questo lievito è in grado di fermentare il fruttosio e il maltosio, di metabolizzare la chitina e di fermentare zuccheri complessi come le destrine e il cellobiosio, quest'ultimo presente nel legno dei serbatoi di affinamento e

degradato dall'enzima  $\beta$ -glucosidasi prodotto dai *Brettanomyces* spp. anche in condizioni di carenza di ossigeno nel mezzo.

L'etanolo presente a fine fermentazione può essere utilizzato dal lievito come ulteriore fonte di carbonio necessaria allo sviluppo.

In merito alle fonti di azoto, *B. bruxellensis* è in grado di raggiungere una concentrazione di  $10^7$  cellule/mL con un tenore di azoto prontamente assimilabile di appena 6 mg/L. In condizioni di anaerobiosi, lo sviluppo di *B. bruxellensis* è facilitato dalla presenza di amminoacidi quali l'acido glutammico, la lisina, l'istidina, l'asparagina e l'arginina, mentre in condizioni di aerobiosi è in grado di utilizzare molte altre fonti di azoto, tra cui la prolina, i nitriti e i nitrati, non metabolizzabili da *S. cerevisiae*. *B. bruxellensis* necessita della maggior parte delle vitamine presenti durante la fermentazione, in particolare la biotina e la tiammina che solitamente vengono utilizzate da *S. cerevisiae*. L'integrazione vitaminica, pertanto, può favorire lo sviluppo di *B. bruxellensis*.

*B. bruxellensis* può svilupparsi in tutte le fasi della vinificazione, specialmente in concomitanza di fermentazioni alcoliche e malolattiche lente o arrestate. L'affinamento in barriques e tonneaux è tra i fattori di sviluppo più determinanti, a causa della natura porosa del legno che ne consente la penetrazione fino a 0,8 – 1,2 cm e rendendo la sanificazione complessa e spesso inefficace. La penetrazione dell'ossigeno nelle doghe del legno influisce inoltre la crescita di *B. bruxellensis* durante l'affinamento.

La contaminazione del mosto e del vino può derivare da molte cause, tra cui la presenza nelle uve e nelle superfici delle attrezzature e dei serbatoi di vinificazione e affinamento.

Le prime fasi della vinificazione sono determinanti per lo sviluppo di lieviti contaminanti, a causa delle pratiche enologiche quali la macerazione e l'utilizzo di enzimi enologici che possono incrementare i precursori degli acidi idrossicinnamici, con la conseguente produzione di elevate concentrazioni di fenoli volatili. Successivamente, la corretta gestione delle fermentazioni alcolica e malolattica è di fondamentale importanza per evitare lo sviluppo di alterazioni organolettiche.

Una solfitazione adeguata a seconda delle diverse fasi di vinificazione, unitamente al monitoraggio dei parametri chimici e alla verifica della concentrazione di *B. bruxellensis* da parte di laboratori specializzati, risulta di fondamentale importanza per evitare la presenza di difetti organolettici e il conseguente deprezzamento e declassamento dei vini.



### 1.2.6 *B. bruxellensis*: influenza sulle caratteristiche organolettiche

Lo sviluppo di *B. bruxellensis* è comunemente associato allo sviluppo di metaboliti che possono influenzare negativamente le caratteristiche organolettiche di alcune bevande.

Per quanto concerne il vino, tra i composti prodotti vi sono i fenoli volatili, comprendenti il 4-etilfenolo, il 4-etilguaiacolo e il 4-etilcatecolo, che conferiscono i caratteristici sentori di sudore di cavallo, stalla, farmaceutico e speziato (Chatonnet e Dubourdieu 1995, Chatonnet, et al. 1992), le molecole responsabili del sentore di topo (Grbin e Henschke 2000) e gli acidi 2-metilbutanoico e 3-metilbutanoico responsabili degli aromi di formaggio rancido (Curtin, et al. 2013, Fugelsang e Zoecklein 2003). L'impatto negativo sul profilo sensoriale dei vini fa del *B. bruxellensis* uno dei microrganismi più indesiderati e temuti da parte degli enologi e dei produttori di vino.

*B. bruxellensis* può svolgere invece un ruolo positivo sull'aroma di alcune birre a fermentazione spontanea quali le lambic belghe, in cui il rilascio di terpeni, esteri e fenoli volatili conferisce il caratteristico profilo floreale, fruttato e speziato (Crauwels, et al. 2017, Steensels, et al. 2015, Vanbeneden, et al. 2008).

Nel caso del vino e della birra, considerare *B. bruxellensis* come un microrganismo indesiderato o desiderato può essenzialmente dipendere dalla concentrazione relativa tra i diversi fenoli volatili, poiché il vino può contenere tenori più elevati di 4-etilfenolo, con sentori di sudore di cavallo, stalla e farmaceutico, mentre la birra una maggiore concentrazione di 4-etilguaiacolo, con sentori di speziato e chiodi di garofano (Crauwels, et al. 2017, Varela & Borneman, 2022).

*B. bruxellensis* e *B. anomalus* sono stati identificati come lieviti dominanti in alcune fermentazioni di tè verde e nero compresi i prodotti fermentati commerciali (Coton, et al. 2017, Harrison e Curtin 2021, Villarreal-Soto, et al. 2020, Yang, et al. 2022). Il contributo all'aroma della kombucha, una bevanda di origine asiatica ottenuta dalla fermentazione del tè, può essere correlato non soltanto alla produzione di fenoli volatili; l'influenza sul gusto può essere infatti direttamente correlato a fermentazioni con bassa concentrazione di *B. bruxellensis* in cui è stata evidenziata una diminuzione nel tenore di acidi organici (Villarreal-Soto, et al. 2020).

### **Fenoli volatili**

La causa principale dell'alterazione organolettica dei vini da parte di *B. bruxellensis* è la produzione dei fenoli volatili, ottenuti dalla metabolizzazione degli acidi idrossicinnamici, generalmente presenti nei mosti in tenori compresi tra 15 e 70 mg/L a seconda della varietà di uva e del relativo grado di maturazione. Le molecole responsabili dei difetti sensoriali associabili a sentori di stalla, sudore di cavallo, cerotto e farmaceutico sono il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo, di cui le caratteristiche e i meccanismi di formazione sono stati descritti nei paragrafi 1.1.1 e 1.1.2.

### **Acido acetico**

La formazione di acidità volatile da parte di lieviti e batteri può influenzare negativamente la qualità organolettica dei vini. Circa il 90% dell'acidità volatile nei vini è costituita dall'acido acetico, presente solitamente in concentrazioni variabili di 0,2 – 0,8 g/L a seconda della tipologia di vino prodotto. Secondo il Reg. Delegato (UE) 2019/934, il tenore di acidità volatile non deve superare i 18 meq/L per i mosti di uve parzialmente fermentati, 18 meq/L per i vini bianchi e rosati e 20 meq/L per i vini rossi, eccetto alcune deroghe su alcune tipologie di vino. Quando i valori raggiungono valori di 1,2 g/L di acido acetico i vini presentano il caratteristico sentore di aceto che denota il difetto definito *acescenza*. I lieviti *Brettanomyces /Dekkera* spp. sono in grado di produrre acido acetico a partire da etanolo o da glucosio grazie alla presenza di un enzima aldeide deidrogenasi NAD<sup>+</sup> dipendente.

La produzione di acido acetico può variare a seconda della specie e dal ceppo di *B. bruxellensis*, nonché dalle condizioni del mezzo.

### **Acidi grassi volatili**

Tra i composti minoritari prodotti da *B. bruxellensis* in grado provocare deviazioni organolettiche vi sono l'acido isovalerico o acido 3-metilbutanoico, l'acido isobutirrico e l'acido 2-metilbutirrico. Tra i tre acidi grassi, l'acido isovalerico è il composto volatile più dannoso dal punto di vista organolettico, conferendo ai vini l'odore di rancido e di formaggio putrefatto, amplificando inoltre la percezione di eventuali fenoli volatili presenti nel vino. La formazione di questi composti avviene in seguito alla degradazione di alcuni aminoacidi quali la valina, la leucina e l'isoleucina.

### **Ammine biogene**

Le ammine biogene sono dei composti prodotti da batteri lattici e da alcuni lieviti, tra cui *Brettanomyces* spp., potenzialmente pericolosi per la salute umana e in grado di alterare la qualità organolettica dei vini. La formazione di questi composti avviene per decarbossilazione degli aminoacidi ed è dovuta all'azione di un complesso enzimatico noto come aminoacido decarbossilasi, in presenza del coenzima piridossalfosfato. *B. bruxellensis* può riuscire a produrre nel vino fino a 15 g/L di ammine biogene, in particolare metilammina, etanolammina, cadaverina, putrescina, triptamina, istamina, agmatina e 2-fenilettilammina, quest'ultime prodotte in quantità maggiori rispetto alle altre.

### **Tetraidropiridine**

La presenza di *B. bruxellensis* e di alcuni batteri lattici può essere associata alla presenza di una serie di molecole che definiscono un difetto tipicamente definito come *sentore di topo*. In particolare, sono tre i composti responsabili della deviazione organolettica: la 2-acetiltetraidropiridina, la 2-etiltetraidropiridina e la 2-acetilpirrolina. I sentori associabili a tale spiacevole alterazione sono simili al biscotto e al cracker, percepibili inoltre come amaro e metallico con valori bassi di pH.

*B. bruxellensis* riesce a produrre solamente la 2-acetiltetraidropiridina a partire da etanolo, glucosio o fruttosio e lisina e la 2-etiltetraidropiridina, probabilmente come prodotto della riduzione della 2-acetiltetraidropiridina. Tra le tre molecole, la 2-acetiltetraidropiridina risulta essere la prevalente nel vino, con tenori spesso riscontrati compresi tra 4,8 e 106 µg/L, abbondantemente al di sopra della relativa soglia di identificazione pari a 1,6 µg/L.

### *1.2.7 B. bruxellensis: dispersione geografica e persistenza in cantina*

Al *B. bruxellensis* è dedicata una vasta bibliografia, con oltre 3.500 articoli pubblicati negli ultimi vent'anni (fonte Google Scholar). Attraverso le tecniche di biologia molecolare di ultima generazione è stata studiata la diversità genetica della specie, soprattutto in relazione all'industria enologica. Il sequenziamento del genoma di *B. bruxellensis* ha evidenziato la presenza di ceppi diploidi e triploidi. Cibrario et al. (2019) hanno dimostrato che oltre alle differenze genetiche, i ceppi studiati presentano anche differenti fenotipi. La differenza più importante consiste nell'elevata tolleranza e resistenza dei ceppi triploidi nei confronti dell'anidride solforosa. Questi ultimi sono stati inoltre trovati in tutti i 14 Regioni/Paesi sui 16 oggetto del lavoro di ricerca (Figura 8). L'utilizzo sempre più massivo dell'anidride solforosa nell'industria enologica sembrerebbe aver favorito la selezione dei ceppi triploidi tolleranti e resistenti. È stata inoltre osservata la persistenza dei ceppi in cantina per decenni nonostante le moderne pratiche di sanificazione e l'utilizzo di prodotti enologici. Pertanto, le condizioni degli ambienti di cantina possono aver esercitato delle pressioni selettive favorendo gli individui triploidi con la progressiva proliferazione negli ultimi decenni (Figura 9).

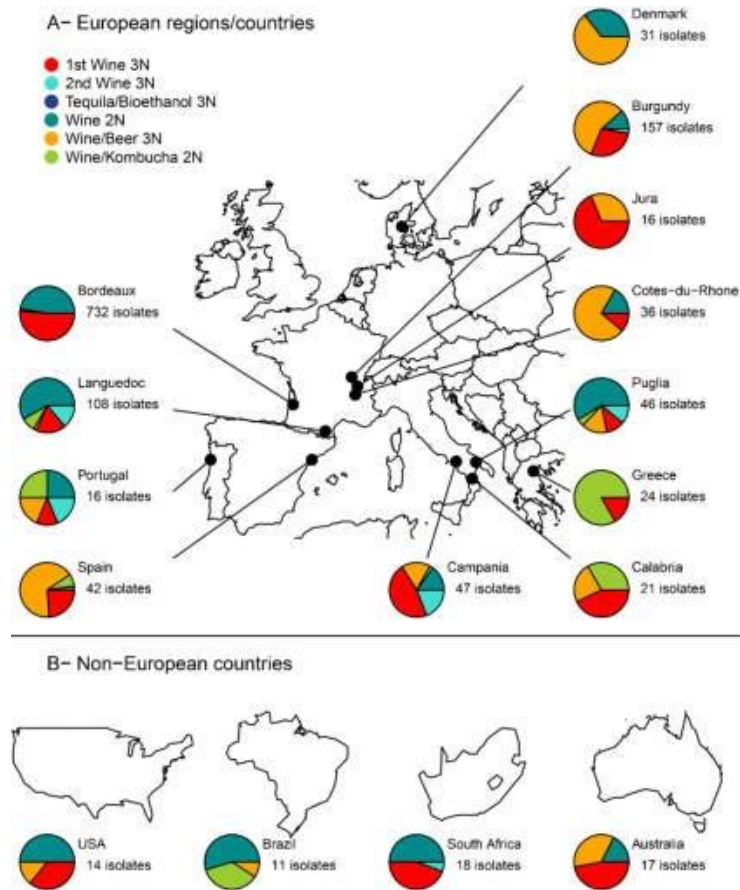


Figura 8 – Distribuzione geografica degli isolati di vino di *B. bruxellensis* nelle differenti Regioni o Paesi (modificato da Cibrario et al., 2019).

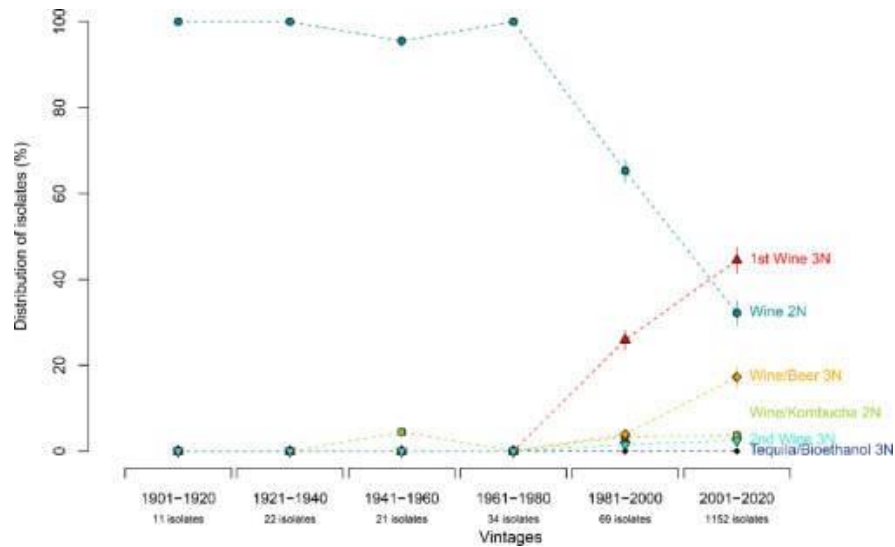


Figura 9 - Distribuzione degli isolati di vino di *B. bruxellensis* da diversi gruppi genetici nelle varie annate (modificato da Cibrario et al., 2019).

### 1.2.8 *B. bruxellensis*: vitalità e coltivabilità

Il monitoraggio dei parametri chimici e microbiologici durante i processi di vinificazione è un'azione fondamentale per garantire la qualità dei vini. Sebbene siano disponibili numerose tecniche colturali per la valutazione della presenza di microrganismi nei vini, durante i processi di vinificazione spesso non vengono rilevati *Brettanomyces* spp., nonostante alcuni vini presentino comunque fenoli volatili e anomalie sensoriali correlate alla presenza di questi lieviti. Questo fenomeno può essere dovuto alla capacità di *B. bruxellensis* di entrare uno stato vitale ma non coltivabile (Agnolucci et al., 2010; Laforgue e Lonvaud-Funel, 2012; Serpaggi et al., 2012; Capozzi et al., 2016), una condizione fisiologica caratterizzata dall'assenza di divisione cellulare su un terreno specifico per la ricerca di *B. bruxellensis* anche se le cellule sono vitali e mantengono le funzioni e il metabolismo cellulare (Agnolucci et al., 2010; Divol e Lonvaud-Funel, 2005; Du Toit et al., 2005).

Numerosi studi hanno evidenziato che lo stato VBNC di *B. bruxellensis* nel vino è causato dall'anidride solforosa, un composto con attività antimicrobiche e antiossidanti utilizzato sin dalle prime fasi della vinificazione (Du Toit et al., 2005; Agnolucci et al., 2010; Serpaggi et al., 2012; Zuehlke e Edwards, 2013; Agnolucci et al., 2014, Capozzi et al., 2016). Nel vino, la frazione più attiva nei confronti dei microrganismi è la forma non dissociata o molecolare ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) che rappresenta lo 0,6 – 6,0% della frazione totale. Lo stato VBNC fu osservato da Du Toit et al (2005) in vini contenenti 0,25 – 0,80 mg/l di anidride solforosa molecolare. Serpaggi et al. (2012) dimostrarono inoltre che le cellule di *B. bruxellensis* hanno la capacità di tornare allo stato coltivabile aumentando il pH e di conseguenza spostando l'equilibrio verso lo ione bisolfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), dotato di una capacità antimicrobica irrilevante nei confronti delle cellule di lievito. La sensibilità di *B. bruxellensis* nei confronti dell'anidride solforosa è variabile a seconda dei differenti ceppi. La riduzione della coltivabilità a seconda delle diverse concentrazioni di anidride solforosa molecolare (da 0,2 a 1 mg/l) in soluzione simil vino può variare dal 12% al 60,5% (Agnolucci et al., 2010). Secondo le pratiche enologiche comuni i tenori di anidride solforosa libera consigliati per la conservazione dei vini variano da 20 a 30 mg/l (Ribereau Gayon et al., 2007), corrispondenti a 0,67 - 1 mg/l di anidride solforosa molecolare in un vino avente un pH di 3,50 e un tenore di etanolo pari a 13,5% v/v a una temperatura di 19°C (Usseglio-Tomasset & Bosia, 1984).

Risulta pertanto opportuno valutare le caratteristiche chimiche del vino da sottoporre ad analisi microbiologica qualora sia eseguita attraverso le metodiche coltura dipendenti,

considerando che i tenori di anidride solforosa molecolare presente nei vini in affinamento possono influenzare l'analisi sottostimando o rendendo obsoleto il monitoraggio della presenza di *B. bruxellensis*.

### 1.3 Tecniche microbiologiche per la ricerca di *Brettanomyces* spp.

Le tecniche analitiche per le analisi microbiologiche degli alimenti si basano essenzialmente su due approcci: i metodi coltura-dipendenti e i metodi coltura-indipendenti. Vi è inoltre un'ulteriore importante distinzione tra tecniche quantitative e qualitative, in cui si indica rispettivamente la quantificazione del microrganismo e la presenza/assenza. Gli ultimi decenni sono stati caratterizzati da notevoli cambiamenti nelle tecniche di analisi microbiologica degli alimenti e con la messa a punto della PCR da parte di Mullis et al. nel 1986, la conoscenza e lo studio della microbiologia alimentare hanno subito un drastico miglioramento rispetto alle tecniche tradizionali basate sulla coltura dei microrganismi su appositi terreni sintetici. Nel caso dei metodi coltura dipendenti, infatti, lo stato fisiologico delle cellule microbiche può influire sull'analisi e le cellule stressate o danneggiate spesso non sono in grado di riprodursi sui terreni selettivi appositamente utilizzati per selezionare il rispettivo microrganismo. La condizione di VBNC di *B. bruxellensis* è rappresentativa di questo fenomeno, in cui l'anidride solforosa presente nel vino rende la cellula stressata e non coltivabile sui terreni specifici, rendendo i risultati spesso sottostimati. L'introduzione delle tecniche coltura indipendenti hanno consentito di comprendere i limiti delle tecniche tradizionali basati sulla coltura dei microrganismi. Nel 1998, Hugenholtz et al. pubblicarono un articolo in cui si asseriva che la conoscenza dell'estensione e della diversità del mondo microbiologico era stata limitata dallo studio dei microrganismi in coltura, stimando che circa il 99% dei microrganismi presenti in natura non sono coltivabili con le tecniche tradizionali. Il mondo della ricerca è stato così incoraggiato a studiare nuovi approcci basati su tecnologie innovative che superassero i limiti delle metodiche coltura-dipendenti.

#### 1.3.1 Tecniche coltura-dipendenti

Le analisi basate sulla coltura sfruttano essenzialmente la capacità di un microrganismo a svilupparsi in un mezzo sintetico determinato. Attraverso queste tecniche i microrganismi

vengono separati dalla matrice oggetto di studio quali uva, mosto, vino, attrezzature e serbatoi, ecc., e le cellule vengono fatte crescere in un mezzo sintetico specifico opportunamente formulato. Da un campione in cui sono presenti differenti specie microbiche è inoltre possibile selezionare determinati gruppi microbici in modo da consentirne lo studio, l'isolamento e la quantificazione. Lo sviluppo dei microrganismi è tuttavia influenzato dalla composizione del terreno di coltura e dalle condizioni di incubazione. Tra i principali limiti delle tecniche basate sulla coltura vi sono:

- possibili alterazioni degli equilibri tra le popolazioni microbiche da parte dei mezzi sintetici di coltura;
- impossibilità di sviluppo di alcune specie microbiche in determinati mezzi sintetici (VBNC);
- rottura di legami simbiotici tra i microrganismi;
- tempi di refertazione lunghi e spesso non corrispondenti alle esigenze tecniche.

L'isolamento dei microrganismi grazie a queste tecniche rappresenta invece un vantaggio in quanto consente il loro studio in condizioni di purezza. Il campionamento deve essere eseguito in maniera tale da ottenere la massima rappresentatività della massa da analizzare. Occorre inoltre operare in condizioni di laboratorio e con attrezzature sterili per evitare la contaminazione dei campioni. Tra le tecniche coltura-dipendenti più utilizzate in enologia vi sono la *conta su piastra Petri*, la *conta su piastra mediante filtrazione* e la *conta Most Probably Number*, una procedura di quantificazione mediante la semina su terreni di coltura liquidi.

### 1.3.2 Tecniche coltura-indipendenti

I metodi coltura-indipendenti offrono una serie di vantaggi rispetto alle tecniche coltura-dipendenti. I microrganismi non vengono quantificati o studiati in seguito allo sviluppo su appositi mezzi di coltura ma l'approccio è basato sull'analisi del DNA, dell'RNA e delle proteine specifiche di un determinato microrganismo. Lo stato fisiologico della cellula microbica inoltre non influisce sull'esito dell'analisi.

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è tra le più innovative tecniche di biologia molecolare che hanno rivoluzionato la ricerca biologica e lo studio dei microrganismi negli alimenti. La metodologia si basa essenzialmente sull'amplificazione altamente specifica di un frammento di acido nucleico: conoscendo le sequenze nucleotidiche iniziali e finali del frammento da amplificare è così possibile quantificare o verificare la presenza di un microrganismo specifico. La miscela di reazione della PCR comprende una serie di reagenti, ovvero:



- DNA da replicare
- Enzima Taq DNA polimerasi
- Tampone, specifico per ogni DNA polimerasi, per la stabilità del pH di reazione
- Ioni magnesio indispensabili per il funzionamento dell'enzima
- Primer specifici, rispettivamente forward e reverse
- Desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP)
- Acqua deionizzata sterile

Lo schema di funzionamento della PCR può essere così descritto:

1. Fase di *denaturazione*: la soluzione contenente DNA stampo da replicare, dNTP, ioni magnesio, *primer* e Taq DNA polimerasi viene portata a una temperatura di circa 94-95 °C. La doppia elica del DNA viene completamente scissa e i due filamenti di cui essa è composta si separano.
2. Fase di *appaiamento*: successivamente alla fase di denaturazione, la temperatura viene abbassata fino a circa 45-60 °C in modo da permettere il legame dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati.
3. Fase di *estensione*: la temperatura viene infine alzata fino al valore ottimale di 72 °C al fine di massimizzare l'azione della Taq polimerasi che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 40 volte in quanto a un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau*. Ciò può avvenire, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per decremento dei dNTP. Tra le variabili che influenzano la resa e la specificità delle reazioni di amplificazione vi sono la specificità e la qualità dei primer, la quantità e la qualità del DNA amplificato, la temperatura di appaiamento e il numero dei cicli di amplificazione. Un ulteriore sviluppo di questa metodica è la tecnica qPCR, conosciuta anche come PCR real-time, che si basa sull'amplificazione e la quantificazione simultanea degli acidi nucleici a ogni ciclo. La qPCR è tra le tecniche coltura-indipendenti più utilizzate dai laboratori di analisi operanti nel settore enologico e consente di quantificare in tempi molto brevi la presenza di determinati microrganismi, come ad esempio *Brettanomyces bruxellensis*.

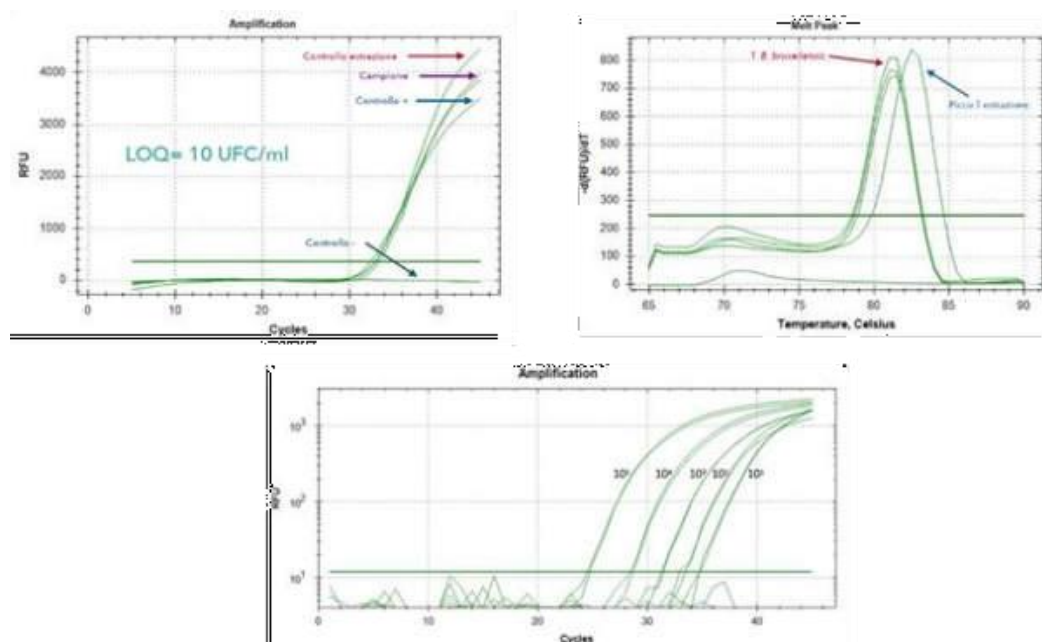


Figura 10: Schema descrittivo dei processi nella qPCR (CAIM)

La differenza sostanziale della qPCR rispetto alla PCR convenzionale è che l'accumulo del prodotto di amplificazione viene misurato in tempo reale con il progredire della reazione. Ciò è reso possibile dall'inclusione di una molecola reporter fluorescente addizionata alla soluzione di reazione che produce una crescente fluorescenza in concomitanza con la quantità di DNA amplificato. Le sostanze chimiche fluorescenti impiegate a questo scopo includono coloranti che legano il DNA e primer o sonde specifici per sequenza marcati in modo fluorescente.

Tra i vantaggi più importanti della qPCR vi sono la rapidità di esecuzione, i tempi di refertazione brevi e coincidenti con le reali esigenze tecniche di cantina e l'elevata sensibilità e specificità per determinati microrganismi. Gli svantaggi principali sono la necessità di personale specializzato e i costi di esecuzione.

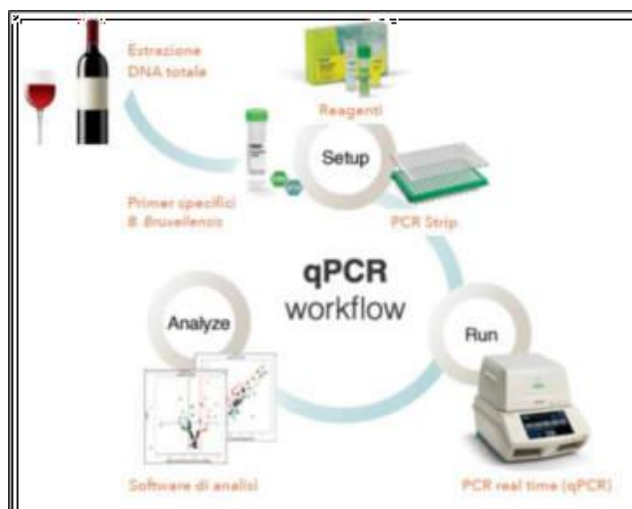


Figura 11: Schema descrittivo della qPCR (modificato da [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))

#### 1.4 Strategie di controllo dello sviluppo di *Brettanomyces* spp.

Al fine di garantire la qualità e la stabilità chimica e microbiologica è necessario un accurato monitoraggio analitico durante le varie fasi produttive. La produzione di etilfenoli da parte di *B. bruxellensis* avviene durante la sua fase di crescita esponenziale. Per questo motivo le indagini microbiologiche devono necessariamente comprendere anche la verifica dei relativi marcatori molecolari, rispettivamente il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo.

Numerosi studi hanno messo in evidenza una serie di strategie di contrasto in grado di limitare la crescita di *B. bruxellensis* e il relativo sviluppo di etilfenoli. La combinazione di diversi approcci risulta spesso determinante per la disattivazione delle cellule nel vino.

##### 1.4.1 Impiego di anidride solforosa

L'anidride solforosa è l'additivo chimico tra i più utilizzati nell'industria alimentare, grazie alle sue proprietà antiossidanti, antiossidasiche, antimicrobiche e chiarificanti. La  $\text{SO}_2$  si può trovare nel mosto o nel vino sotto differenti forme, tra cui la libera, la combinata e la molecolare. Le forme libere comprendono la frazione non dissociata molecolare ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ), la frazione semi dissociata con lo ione bisolfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e la frazione dissociata con lo ione solfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). L'equilibrio tra ognuna di queste forme dipende dal pH del vino, dalla temperatura e dal tenore in alcol etilico (Figura 12).

Le concentrazioni di anidride solforosa molecolare in grado di limitare la crescita di *B. bruxellensis* sono comprese tra 0,25 mg/l e 1,25 mg/l.

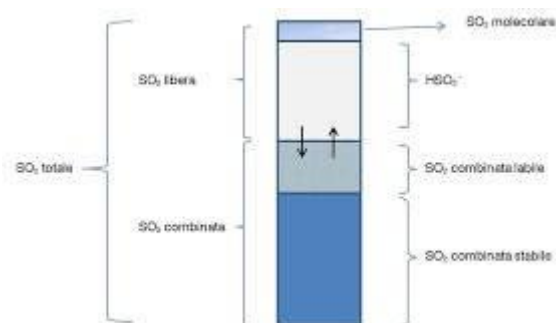


Figura 12: L'anidride solforosa nel vino (modificato da <http://goo.gl/bTWB0D>)

I valori di pH, etanolo e temperatura in alcuni vini, tuttavia, non consentono spesso di raggiungere la concentrazione minima di SO<sub>2</sub> molecolare per evitare la proliferazione di *B. bruxellensis*.

L'impiego massiccio di questo additivo nel settore enologico ha inoltre determinato una pressione selettiva costante che ha portato alla selezione di genotipi più resistenti, rendendo inefficaci le dosi comunemente utilizzate durante la vinificazione (Cibrario et al., 2019).

La valutazione negativa dei consumatori nei confronti della SO<sub>2</sub> ha infine reso necessario lo studio e l'applicazione di tecnologie innovative per il controllo dei microrganismi indesiderati nel vino.

#### 1.4.2 Impiego di ozono

L'ozono (O<sub>3</sub>) è una forma allotropica dell'ossigeno formata dall'addizione di un radicale libero dell'ossigeno alla forma molecolare O<sub>2</sub> e si trova sotto forma gassosa, incolore e con un forte odore pungente. È un potente agente ossidante con un potenziale di ossidazione di 2,07 mV, largamente impiegato, in forma gassosa o in fase acquosa, nel trattamento delle acque destinate al consumo umano e delle acque reflue, nella sanificazione degli alimenti e delle attrezzature impiegate nell'industria alimentare. Il tempo di dimezzamento dell'ozono in acqua distillata a 20°C è di 20-30 minuti, ed è influenzato dal pH, dalla temperatura e dalla sostanza organica presente in soluzione (Rice et al., 1981; Graham, 1997). L'ozono gassoso è invece più stabile, con circa 12 ore di permanenza in atmosfera (Graham, 1997). A causa della sua decomposizione più o meno veloce non può essere immagazzinato, ma deve essere prodotto in situ con una reazione endotermica che richiede molta energia.

L'azione microbica dell'ozono è data dalla forma molecolare ( $O_3$ ) e dai ROS formati dalla sua decomposizione, quali il radicale idrossile ( $\cdot OH$ ), il radicale idroperossido ( $HO_2\cdot$ ), l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ) e il radicale anione superossido ( $\cdot O_2^-$ ). Il meccanismo comprende la progressiva ossidazione dei costituenti cellulari, tra cui le membrane biologiche, gli acidi nucleici, gli amminoacidi, i gruppi sulfidrilici, gli enzimi e le proteine, con la conseguente lisi cellulare.

Il processo di azione dell'ozono risulta pertanto più veloce e potente rispetto ad altri agenti sanificanti che richiedono la penetrazione delle membrane cellulari prima di avere efficacia.

I microrganismi non possono inoltre sviluppare resistenza nei confronti dell'ozono.

L'ozono ha uno spettro d'azione molto ampio che comprende batteri, lieviti e funghi, anche nei confronti delle rispettive spore, virus e protozoi. La sensibilità è differente a seconda dei vari microrganismi considerati.

*B. bruxellensis* ha una bassa tolleranza nei confronti dell'ozono: una concentrazione di 5 mg/L in acqua ozonizzata porta a una completa inattivazione delle cellule anche ad alte concentrazioni (Guzzon et.al, 2013). Englezos et al. (2019) hanno dimostrato inoltre che l'esposizione a una concentrazione di 3,5 mg/L in acqua ozonizzata per 30 minuti è risultata efficace per l'inattivazione totale di cellule di *B. bruxellensis* che contaminano le tubazioni, le attrezzature e l'impianto di imbottigliamento.

#### 1.4.3 Impiego di chitosano

Il chitosano è un polisaccaride composto dalla D-glucosamina e dalla N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami  $\beta(1-4)$ . Sono molto diffusi in natura e possono avere diverse applicazioni industriali. L'utilizzo di questo composto in enologia come agente chiarificante e correttore di alcuni difetti è disciplinato dal Regolamento Delegato (UE) 2019/934, con un dosaggio massimo consentito di 10 g/hL per la riduzione di microrganismi indesiderati. Nello specifico, viene impiegato per contrastare il lievito *B. bruxellensis*, per ridurre la concentrazione di metalli pesanti, per la prevenzione della casse ferrica e rameica e per ridurre la presenza di contaminanti, tra cui l'ocratossina A.

L'azione antimicrobica del chitosano è il risultato di meccanismi differenti, tra cui l'aggregazione delle cellule microbiche e la perdita dei costituenti cellulari (Taillandier et al. 2015). In particolare, agisce modificando la permeabilità cellulare a causa dell'interazione tra

le cariche positive delle molecole di chitosano e le cariche negative delle membrane delle cellule microbiche.

Il trattamento con chitosano consente pertanto la riduzione della presenza e della coltivabilità delle cellule di *B. bruxellensis* in vini contaminati. Tuttavia, le cellule di lievito possono svilupparsi nuovamente in un successivo affinamento del vino in legno (Ferreira et al., 2013; Petrova et al., 2016; Taillandier et al., 2015). A contaminazioni elevate di *B. bruxellensis*, il chitosano riesce a separare efficacemente le cellule, senza tuttavia avere una garanzia della loro completa inattivazione.

A differenza dell'anidride solforosa, il chitosano non è influenzato dai valori di pH dei vini. Alla fine del trattamento può essere rimosso tramite travaso e/o filtrazione mentre circa il 5% può solubilizzarsi nel vino senza causare nessun danno per la salute umana.

I trattamenti con chitosano risultano efficaci in vini contaminati con concentrazioni di *B. bruxellensis* non particolarmente alte. Il monitoraggio tempestivo tramite analisi microbiologiche è di fondamentale importanza per definire la corretta strategia volta a contrastare lo sviluppo di questo lievito. In caso di concentrazioni elevate di *B. bruxellensis* è opportuno optare per una corretta filtrazione, in quanto il trattamento con chitosano potrebbe essere non risolutivo (Guzzon, 2020).

#### 1.4.4 Filtrazione

La filtrazione è un metodo fisico ampiamente utilizzato nell'industria enologica per la stabilizzazione dei vini. In particolare, la filtrazione su membrana è utilizzata nelle fasi di pre-imbottigliamento al fine di eliminare i microrganismi indesiderati che possono provocare anomalie e difetti, riducendo la *shelf-life* dei prodotti e causando il declassamento e il deprezzamento dei vini. Le tecnologie utilizzate si basano sull'impiego di apposite membrane filtranti caratterizzate da una porosità compresa tra 0,1 e 10 micrometri. I setti filtranti possono essere composti da cellulosa, polipropilene, nylon o polietersulfone. La filtrazione più utilizzata per prevenire o per contrastare la presenza di *B. bruxellensis* prevede la filtrazione tramite membrana con porosità di 0,45 µm. Tra gli svantaggi di questa tecnica, vi sono la perdita di colore, la diminuzione della complessità aromatica e i costi elevati di materiali ed energia.

#### 1.4.5 Altre tecnologie emergenti o sperimentate

Altri *metodi fisici* sono stati applicati per il controllo del *B. bruxellensis* nel vino tra questi può essere elencata l'*alta pressione idrostatica* che può essere applicata in fase di refrigerazione dei vini senza provocare danni ai parametri qualitativi. Tale tecnologia, sperimentata da autori diversi, induce risultati diversi in quanto influenzata dalla temperatura alla quale viene esercitata, dalla tipologia del vino, dal contenuto in alcool e dal pH. Con basso pH e basso alcool in genere sembrano funzionare meglio pressioni più alte. Sono state sperimentate varie combinazioni di come ad esempio 100 Mpa per 24 ore a 25°C oppure 400 MPa per 5 secondi. Le alte pressioni disattivano del tutto il lievito ma tendono nel tempo -dopo 6 mesi- a far abbassare il colore ed il contenuto in polifenoli totali. Al momento quindi le indicazioni migliori sono per pressioni più basse associate ad una leggera solfitazione. Altro metodo fisico adottato e riportato in letteratura è quello dell'applicazione di *Campi Elettrici Pulsati* (PEF l'acronimo in inglese). Questa tecnologia emergente in ambito agroalimentare può essere considerata come una pastorizzazione non termica perseguita attraverso l'uso di uno strumento che produce pulsazioni elettriche ad elevata energia. Esistono al momento pochi lavori eseguiti sul vino ed in alcuni casi gli effetti non sono stati ottimali con una ripresa dell'attività del microrganismo nel corso dell'invecchiamento del vino. Riportiamo solo per curiosità anche l'applicazione di *ultrasuoni, raggi UV e microonde*. Questo tipo di trattamenti nel caso degli ultrasuoni ha provocato la creazione aromi negativi per gli altri non sono pubblicate informazioni relative agli eventuali danni a carico delle proprietà organolettiche dei vini, pertanto, al momento vengono riportati qui non per il loro carattere applicativo in cantina ma al solo scopo di completa informazione riguardo le metodologie tentate e/o possibili. Oltre ai metodi fisici sono stati tentati vari *metodi biotecnologici* tentando tre diversi approcci legati all'uso di colture starter, l'aggiunta di composti antimicrobici e la riduzione delle sostanze che fanno da precursori dei fenoli volatili. Il controllo biologico è stato tentato sia con l'aggiunta di colture starter che mediante una strategia di riduzione dell'intervallo tra fermentazione alcolica e fermentazione malolattica. Non sembra al momento essere stata individuata una strategia vincente e suggeribile in cantina in quanto la combinazione di lieviti e batteri utilizzabili nelle diverse fasi della vinificazione deve essere modulata di volta in volta ed i risultati non sono stati sempre ottimali in alcuni casi riducendo la produzione del 4 etilfenolo ma non quella del 4 etil guaiacolo. L'uso di peptidi antimicrobici e tossine killer invece, tentato a livello sperimentale, si scontra al momento con l'elevato costo

di produzione delle tossine. Riguardo alla riduzione dei substrati attaccati dal *Brettanomyces bruxellensis* sono sottolineati in letteratura l'importanza di terminare accuratamente la fase di fermentazione in modo da esaurire gli zuccheri e quella dell'eliminazione dei residui del *S. cerevisiae* mentre sembra che la presenza di biotina promuova la crescita del *Brettanomyces bruxellensis*. Un vecchio lavoro del '75 suggeriva quindi di utilizzare l'avidina composto presente naturalmente nella chiara d'uovo per sequestrare la biotina e ridurre lo sviluppo del lievito indesiderato.



## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Agnolucci, M., Cristani, C., Maggini, S., Rea, F., Cossu, A., Tirelli, A., & Nuti, M. (2014). Impact of sulphur dioxide on the viability, culturability, and volatile phenol production of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Annals of Microbiology*, 64(2), 653-659.
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., & Nuti, M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International journal of food microbiology*, 143(1-2), 76-80.
- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., & Toffanin, A. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: Impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 1-6.
- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., & Capozzi, V. (2018). Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(2), 569-576.
- BIDAN, P. (1975). Avantages et Inconvénients des Levures employées en Vinification. In 4. Symposium d'Oenologie International: Mai, 26.-29. 1975, Valence, Espagne (p. 240). Société Internationale d'Oenologie et Gestion d'Enterprise.
- Boni, G. (2021) "Riconoscimento sensoriale dei difetti dei vini". Formazione Vinidea ([www.vinidea.it](http://www.vinidea.it); [www.infowine.com](http://www.infowine.com)).
- Capozzi, V., Di Toro, M. R., Grieco, F., Michelotti, V., Salma, M., Lamontanara, A., ... & Spano, G. (2016). Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiology*, 59, 196-204.
- Charters, Steve, and Simone Pettigrew. "The dimensions of wine quality." *Food quality and preference* 18.7 (2007): 997-1007.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. N., & Pons, M. (1992). "The origin of ethylphenols in wines". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., & Lavigne, V. (1993). "Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(2), 191-202.
- Chironi, Stefania, and Mazia Ingrassia. "Wine label design as a strategic tool to attract consumers. A marketing study on Sicilian wine positioning." *Rivista di Economia Agraria* (2013).

- Cibrario, A., Avramova, M., Dimopoulou, M., Magani, M., Miot-Sertier, C., Mas, A., ... & Dols-Lafargue, M. (2019). *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars. *PLoS One*, 14(12), e0222749.
- Cibrario, A., Avramova, M., Dimopoulou, M., Magani, M., Miot-Sertier, C., Mas, A., ... & Dols-Lafargue, M. (2019). *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars. *PLoS One*, 14(12), e0222749.
- Claussen, N. H. (1904). On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 10(4), 308-331.
- Conterno, L., Fondazione, E., & Henick-Kling, T. (2010). *Brettanomyces/Dekkera* off-flavours and other wine faults associated with microbial spoilage. In *Managing wine quality* (pp. 346-387). Woodhead Publishing.
- Cosme, F., Vilela, A., Filipe-Ribeiro, L., Inês, A., & Nunes, F. M. (2018). Wine microbial spoilage: Advances in defects remediation. In *Microbial contamination and food degradation* (pp. 271-314). Academic Press.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., ... & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS microbiology ecology*, 93(5).
- Crauwels, S., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Steensels, J., Verreth, C., Bosmans, L., ... & Lievens, B. (2017). Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Yeast Research*, 17(1), fow105.
- Cravero, F., Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Giacosa, S., Segade, S. R., ... & Cocolin, L. (2016). Ozone treatments of post harvested wine grapes: Impact on fermentative yeasts and wine chemical properties. *Food Research International*, 87, 134-141.
- Curtin, C. D., Langhans, G., Henschke, P. A., & Grbin, P. R. (2013). Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. *Food microbiology*, 36(2), 241-247.
- Curtin, C., Varela, C., & Borneman, A. (2015). Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 680-692.
- Custers, M. T. J. (1940). Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food microbiology*, 20(5), 567-574.

- Divol, B., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 85-93.
- Du Toit, W. D., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of applied microbiology*, 98(4), 862-871.
- Edlin, D. A., Narbad, A., Gasson, M. J., Dickinson, J. R., & Lloyd, D. (1998). Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(4), 232-239.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Giacosa, S., Segade, S. R., ... & Rolle, L. (2019). Minimizing the environmental impact of cleaning in winemaking industry by using ozone for cleaning-in-place (CIP) of wine bottling machine. *Journal of cleaner production*, 233, 582-589.
- Ferreira, D., Moreira, D., Costa, E. M., Silva, S., Pintado, M. M., & Couto, J. A. (2013). The antimicrobial action of chitosan against the wine spoilage yeast *Brettanomyces/Dekkera*. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 1(3), 240-245.
- Fugelsang, K. C., & Zoecklein, B. W. (2003). Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American journal of enology and viticulture*, 54(4), 294-300.
- Graham, D. M. (1997). Use of ozone for food processing. *Food Technology (Chicago)*, 51(6), 72-75.
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial biotechnology*, 10(2), 354-370.
- Grbin, P. R., & HENSCHKE, P. A. (2000). Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(3), 255-262.
- Greppi, A., Rantsiou, K., Padonou, W., Hounhouigan, J., Jespersen, L., Jakobsen, M., & Cocolin, L. (2013). Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and-independent methods. *International journal of food microbiology*, 165(2), 84-88.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3027-3032.
- Guzzon, R. (2020). Chitosani e ozono: consigli e modalità d'uso in cantina. Fondazione Edmund Mach di san Michele all'Adige.

- Guzzon, R., Nardin, T., Micheletti, O., Nicolini, G., & Larcher, R. (2013). Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(2), 180-188.
- Harju, S., Fedosyuk, H., and Peterson, R. (2004) Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology* 4, 8.
- Harrison, K., & Curtin, C. (2021). Microbial composition of SCOBY starter cultures used by commercial kombucha brewers in North America. *Microorganisms*, 9(5), 1060.
- Henschke, P., Curtin, C., & Grbin, P. (2007). Molecular characterisation of the wine spoilage yeast? *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Microbiology Australia*, 28(2), 76-78.
- <https://news.unioneitalianavini.it/alcolici-nel-mondo-fra-tre-anni-sara-cosi/>
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4765-4774.
- Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdignes, F., and Jimenez, J. (1996). Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998–1003.
- Kufferath, H., & Van Laer, M. (1921). Études sur les levures du Lambic. *Bull Soc Chim Belgique*, 30, 270-276.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The yeasts* (pp. 87-110). Elsevier.
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68(2), 151-160.
- Laforgue, R., & Lonvaud-Funel, A. (2012). Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: relationship with cell viability. *Food microbiology*, 32(2), 230-234.
- Li H. "Wine Tasting" 1st ed. Science Press; Beijing, China: 2006. The Taste and Aroma Balance; pp. 86–88.
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(4), 856-873.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Dekkera/Brettanomyces* spp (pp. 354-398). CRC Press: Boca Raton, FL.

- Malfeito-Ferreira, M. (2011). Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61(1), 95-102.
- Marin, A. B., & Durham, C. A. (2007). Effects of wine bottle closure type on consumer purchase intent and price expectation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(2), 192-201.
- Menoncin, M., & Bonatto, D. (2019). Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(4), 402-411.
- Millet, V., & Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in applied microbiology*, 30(2), 136-141.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nagel, C. W., & Wulf, L. W. (1979). Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(2), 111-116.
- Nassereddin, R. A., & Yamani, M. I. (2005). Microbiological quality of sous and tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. *Journal of food protection*, 68(4), 773-777.
- Noble, Ann C. "Taste-aroma interactions." *Trends in Food Science & Technology* 7.12 (1996): 439-444.
- Ocon E., Garijo P., Sanz S., Olarte C., Lopez R., Santamaria P., Gutierrez A.R. (2013). Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. *Food Control* 34:261-267.
- Palacios, Antonio, et al. "Percezione da parte di un consumatore ben informato dei difetti organolettici del vino provocati da una fermentazione malolattica non controllata." *VIGNEVINI-BOLOGNA*- 33.9 (2006): 79.
- Paulin, M., Miot-Sertier, C., Dutilh, L., Brasselet, C., Delattre, C., Pierre, G., ... & Dols-Lafargue, M. (2020). + *Brettanomyces bruxellensis* displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine. *Frontiers in microbiology*, 11, 571067.
- Péter, G., Dlačny, D., Tóbiás, A., Fülöp, L., Podgoršek, M., & Čadež, N. (2017). *Brettanomyces acidodurans* sp. nov., a new acetic acid producing yeast species from olive oil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(5), 657-664.
- Petrova, B., Cartwright, Z. M., & Edwards, C. G. (2016). Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *Oeno One*, 50(1), 49-56.
- Peynaud, Emile, and Jacques Blouin. "Degustare il vino". Edagricole, 2007.

- Peynaud, Emile, and Jacques Blouin. *The taste of wine: The art science of wine appreciation*. John Wiley & Sons, 1996.
- Phister TG, Mills DA. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl Environ Microbiol* 69:7430–4.
- Pinto, L., et al. "Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. in wine: Recent advances and future trends." *Trends in Food Science & Technology* 99 (2020): 88-100.
- Piombino, Paola, et al. "Effetti delle interazioni multisensoriali sulla percezione del vino rosso: studio attraverso la caratterizzazione sensoriale e chimica di vini rossi italiani." (2021): 1-18.
- Prescott, John. "Chemosensory learning and flavour: Perception, preference and intake." *Physiology & Behavior* 107.4 (2012): 553-559.
- Oro L, Canonico L, Marinelli V, Ciani M and Comitini F (2019) Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. *Front. Microbiol.* 10:415. doi: 10.3389/fmicb.2019.00415
- Renouf, V., and Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154–167.
- Ribereau-Gayon, Pascal. *Trattato di enologia: chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti*. Edagricole, 2007.
- Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W., & Hill, A. G. (1981). Uses of ozone in drinking water treatment. *Journal-American Water Works Association*, 73(1), 44-57.
- Robino, Antonietta, Nicola Pirastu, and Paolo Gasparini. "La genetica del gusto." *Prospettive in Pediatria* 44 (2014): 197-202.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces* sp. *J. Appl. Microbiol.* 90, 588–599.
- Romanazzi, G., Mancini, V., Foglia, R., Marcolini, D., Kavari, M., & Piancatelli, S. (2021). Use of chitosan and other natural compounds alone or in different strategies with copper hydroxide for control of grapevine downy mildew. *Plant Disease*, 105(10), 3261-3268.
- Romano, P., Ciani, M., Cocolin, L., (2022). *Microbiologia della vite e del vino*. Casa editrice ambrosiana.

- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., ... & Piškur, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature communications*, 2(1), 1-7.
- Sáenz-Navajas, María-Pilar, et al. "Understanding quality judgements of red wines by experts: Effect of evaluation condition." *Food Quality and Preference* 48 (2016): 216-227.
- Scheffers WA, Wiken TO. The Custers effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1969; 35: A31-A32.
- Scheffers, W. A. (1966). Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. *Nature*, 210(5035), 533-534.
- Schopp, L. M., Lee, J., Osborne, J. P., Chescheir, S. C., & Edwards, C. G. (2013). Metabolism of nonesterified and esterified hydroxycinnamic acids in red wines by *Brettanomyces bruxellensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(47), 11610–11617.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., & Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable”(VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food microbiology*, 30(2), 438-447.
- Small, Dana M., and John Prescott. "Odor/taste integration and the perception of flavor." *Experimental brain research* 166.3 (2005): 345-357.
- Stadler, E., & Fischer, U. (2020). Sanitization of Oak Barrels for Wine—A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(19), 5283-5295.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International journal of food microbiology*, 206, 24-38.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 102(1), 10-21.
- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J. B., Gautier, S., Siczkowski, N., Granes, D., & Brandam, C. (2015). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(1), 123-131.
- UK patent GB190328184 (1903): “Improvements in and connected with the Manufacture of English Beers or Malt Liquors and in the Production of Pure Yeast Cultures for use therein.”

- Uscanga, M. G. A., Delia, M. L., & Strehaiano, P. (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(11), 1046-1050.
- Usseglio-Tomasset, L., & Bosia, P. D. (1984). La prima costante di dissociazione dell'acido solforoso. *Vini d'Italia*, 26(5), 7-14.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food chemistry*, 107(1), 221-230.
- Varela, C., & Borneman, A. R. (2022). Molecular approaches improving our understanding of *Brettanomyces* physiology. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foac028.
- Vecchio, Riccardo, et al. "The role of production process and information on quality expectations and perceptions of sparkling wines." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99.1 (2019): 124-135.
- Verachtert, H. (1992). Lambic and gueuze brewing: mixed cultures in action. *COMETT Course on Microbial Contaminants*, Helsinki, 243-262.
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P. D., Souchard, J. P., ... & Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108778.
- Wedral, D., Shewfelt, R., & Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1474-1479.
- Wikén, T., Scheffers, W. A., & Verhaar, A. J. M. (1961). On the existence of a negative Pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie van Leeuwenhoek*, 27(1), 401-433.
- [www.federdoc.com/new/wp-content/uploads/2022/04/denominazione-dorigine-2022.pdf](http://www.federdoc.com/new/wp-content/uploads/2022/04/denominazione-dorigine-2022.pdf)
- [www.infowine.com/docs/protocollo\\_POL\\_TP.pdf](http://www.infowine.com/docs/protocollo_POL_TP.pdf) - "Protocollo di lavoro per la stima del potenziale fenolico dell'uva con il sistema wine cloud".
- [www.oiv.int/it/what-we-do/global-report?oiv](http://www.oiv.int/it/what-we-do/global-report?oiv)
- [www.patents.google.com/patent/GB190328184A/en?q=GB190328184](http://www.patents.google.com/patent/GB190328184A/en?q=GB190328184) – Claussen, N. H. - Improvements in and connected with the Manufacture of English Beers or Malt Liquors and in the Production of Pure Yeast Cultures for use therein.
- [www.unioneitalianavini.it/alcolici-nel-mondo-fra-tre-anni-sara-cosi/](http://www.unioneitalianavini.it/alcolici-nel-mondo-fra-tre-anni-sara-cosi/)



· Yang, J., Lagishetty, V., Kurnia, P., Henning, S. M., Ahdoot, A. I., & Jacobs, J. P. (2022). Microbial and chemical profiles of commercial Kombucha products. *Nutrients*, 14(3), 670.

· Zeithaml, Valarie A. "Consumer perceptions of price, quality, and value: a means-end model and synthesis of evidence." *Journal of marketing* 52.3 (1988): 2-22.

Zuehlke, J. M., & Edwards, C. G. (2013). Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Journal of food protection*,



2014-2020  
**PSR**  
**Programma di Sviluppo Rurale**  
REGIONE TOSCANA



**Unione Europea**

Fondo europeo agricolo  
per lo sviluppo rurale:  
l'Europa investe nelle zone rurali



Repubblica Italiana

**REGIONE  
TOSCANA**

