



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

PREMESSA	3
2. IL PROGETTO NOBrett	5
2.1 Gli interventi nei vigneti	5
2.2 Scelta degli impianti nei quali operare	5
2.3 Interventi con fitofarmaci come azioni di contrasto al <i>B. bruxellensis</i> nei vigneti	6
2.4 Metodo di campionamento delle uve in vigneto	9
2.5 Analisi chimiche sui campioni di uve	14
2.6 Raccolta dati da drone.....	19
2.7 Monitoraggio di <i>B. bruxellensis</i> nel vigneto.....	23
2.8 Sanificazione attrezzature, superfici e serbatoi	25
2.9 Monitoraggio di <i>B. bruxellensis</i> nell'aria nei locali di cantina	26
2.10 Monitoraggio di <i>B. bruxellensis</i> e dei fenoli volatili nel vino in affinamento e pre-imbottigliamento	28
2.11 Interventi di contenimento e contrasto in cantina	31
2.12 Genotipizzazione dei ceppi di <i>B. bruxellensis</i> isolati	33
2.13 Analisi sensoriale dei vini.....	36

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

2. IL PROGETTO NOBrett

2.1 Gli interventi nei vigneti

Brettanomyces bruxellensis è difficile da isolare nell'ambiente naturale in quanto risulta poco diffuso e presente in bassa concentrazione, ha una bassa capacità competitiva rispetto ad altri microorganismi, è caratterizzato da una lenta crescita e può essere presente in uno stato definito vitale ma non coltivabile (VBNC - *viable but not culturable*). Nonostante queste caratteristiche è stato rinvenuto sulla superficie degli acini ed è stato identificato dopo crescita fatta avvenire su un specifico substrato arricchito e selettivo. Lavori scientifici effettuati a livello genetico hanno dimostrato una stretta relazione tra le popolazioni di *Brettanomyces bruxellensis* rinvenute nel vigneto e quelle determinate nell'ambiente di cantina suggerendo che una prima sorgente di contaminazione potrebbe essere la vigna. Le uve, quindi, potrebbero rappresentare l'origine primaria degli inquinamenti della filiera riscontrabili poi soprattutto a livello di cantina (Oro et al, 2019).

2.2 Scelta degli impianti nei quali operare

Durante il primo anno del progetto sono stati eseguiti vari sopralluoghi per individuare i vigneti sui quali avviare le prove preliminari e proseguire con le successive indagini alla ricerca della presenza di *Brettanomyces bruxellensis* sulle uve. Sono stati quindi identificati e contrassegnati tre diversi impianti viticoli. I dati di riferimento e le coordinate dei vigneti interessati erano le seguenti:

- Azienda Mantellassi, Proprietà Mantellassi, Magliano in Toscana lat. 42.606851 long. 11.326191;
- Agriturismo Lucerna del Lago Prile Castiglione della Pescaia, proprietario Natalino Menoni lat. 42.475746 long. 10.555084;
- Agriturismo Carpine, Alberese, proprietario Edoardo Donato, lat. 42.285975 long. 11.084259.

Le ultime due aziende appartengono a soci della Cantina Vini di Maremma, partner del progetto.

2.3 Interventi con fitofarmaci come azioni di contrasto al *B. bruxellensis* nei vigneti

Per entrambe le aziende vitivinicole sono stati individuati un *vigneto testimone* e un *vigneto trattato*, operando su quest'ultimo con il seguente protocollo di trattamenti fitosanitari:

· *Vigneto trattato*: applicazione di 12 trattamenti, a partire da metà luglio con cadenza di 5 giorni tra un trattamento e l'altro come specificato di seguito:

1. AMILO-X (2 Kg/ha);
2. AMILO-X (2 Kg/ha) + AQ 10 WG 60 (g/ha);
3. AMILO-X (2 Kg/ha);
4. AMILO-X (2 Kg/ha) + AQ 10 WG 60 (g/ha);
5. AMILO-X (2 Kg/ha);
6. AMILO-X (2 Kg/ha) + AQ 10 WG 60 (g/ha);
7. AMILO-X (2 Kg/ha);
8. AMILO-X (2 Kg/ha) + AQ 10 WG 60 (g/ha);
9. AMILO-X (2 Kg/ha);
10. AMILO-X (2 Kg/ha) + AQ 10 WG 60 (g/ha);
11. AMILO-X (2 Kg/ha);
12. AMILO-X (2 Kg/ha) + AQ 10 WG 60 (g/ha) + CHITOSANO (3 L/ha)

Ogni trattamento è stato distribuito dosando 200 litri di acqua per ettaro con irroratore a basso volume, entrando in ogni filare e bagnando solo la fascia grappolo. I trattamenti sono stati eseguiti nelle ore più fresche della giornata.

I prodotti fitosanitari sono descritti di seguito:

· **Amylo-X®**

Fungicida e battericida microbiologico a base di *Bacillus amyloliquefaciens*, ceppo D747. L'azione del formulato si esplica attraverso le spore di *B. amyloliquefaciens* che, una volta miscelate in acqua, iniziano i processi germinativi che si concludono sulla superficie della coltura da proteggere. Si producono così cellule vegetative che avviano una competizione con gli altri microrganismi per le fonti nutritive e lo spazio vitale. Vengono inoltre prodotti lipopeptidi in grado di inibire la crescita e lo sviluppo dei patogeni. Il ceppo D747 di *B. amyloliquefaciens* è infine in grado di attivare meccanismi di induzione di resistenza nella pianta oggetto del trattamento. Amylo-X è un fungicida e battericida ad ampio spettro d'azione che può essere usato da solo o in strategia con fungicidi convenzionali, compresi i prodotti rameici. Può svolgere un ruolo fondamentale nella riduzione dello sviluppo di popolazioni resistenti ai fungicidi di sintesi. Grazie al complesso modo di azione tipico dei formulati microbiologici presenta infatti un ridotto rischio di resistenza. Il fungicida non lascia residui sulle derrate e non interferisce con i processi fermentativi dell'uva.

COMPOSIZIONE:

100 g di prodotto contengono:

- *Bacillus amyloliquefaciens*, subspecie *plantarum*, ceppo D747: g 25;
- Coformulanti q.b.a: g 100;

Il prodotto formulato contiene circa 5×10^{10} UFC/g;

Formulazione: granuli idrodispersibili;

Tempo di carenza: 0 giorni;

Registrazione del Ministero della Salute: n. 15302 del 07.02.2012.

· **AQ 10® WG**

Fungicida antioidico a base di *Ampelomyces quisqualis*

AQ 10 WG è un fungicida microbiologico a base del fungo antagonista *Ampelomyces quisqualis*, ceppo M10, che agisce contro i microrganismi agenti dell'Oidio. Si tratta di un formulato commerciale in granuli idrodispersibili nel quale sono contenute le spore di *Ampelomyces quisqualis*, ceppo M10.

COMPOSIZIONE:

100 grammi di prodotto contengono:

- *Ampelomyces quisqualis* (isolato M-10): g 58;
- Coformulanti q.b. a g 100;

Il prodotto formulato contiene circa 5×10^2 spore/g;

Formulazione: granuli idrodispersibili;

Tempo di carenza: 0 giorni;

Registrazione del Ministero della Salute: n. 11786 del 22.01.2004.

· **Chitosano BIOREND**

Elicitore dei meccanismi di autodifesa della pianta a base di chitosano, un polimero organico derivato dalla chitina, componente dello scheletro di insetti e crostacei oltre che delle pareti cellulari dei funghi. L'applicazione del chitosano su alcune colture, tra cui la vite, stimola una reazione difensiva endogena attraverso una protezione fisica consistente nell'ispessimento di tessuti e pareti cellulari per bloccare la penetrazione e la diffusione dei patogeni. Un'ulteriore

protezione biochimica è data inoltre dalla stimolazione alla produzione di composti ad azione antifungina e antibatterica come le fitoalessine ed enzimi idrolitici.

COMPOSIZIONE:

- Chitosano a basso peso molecolare in soluzione acquosa al 1,9%

Formulazione: liquida;

Tempo di carenza: 0 giorni;

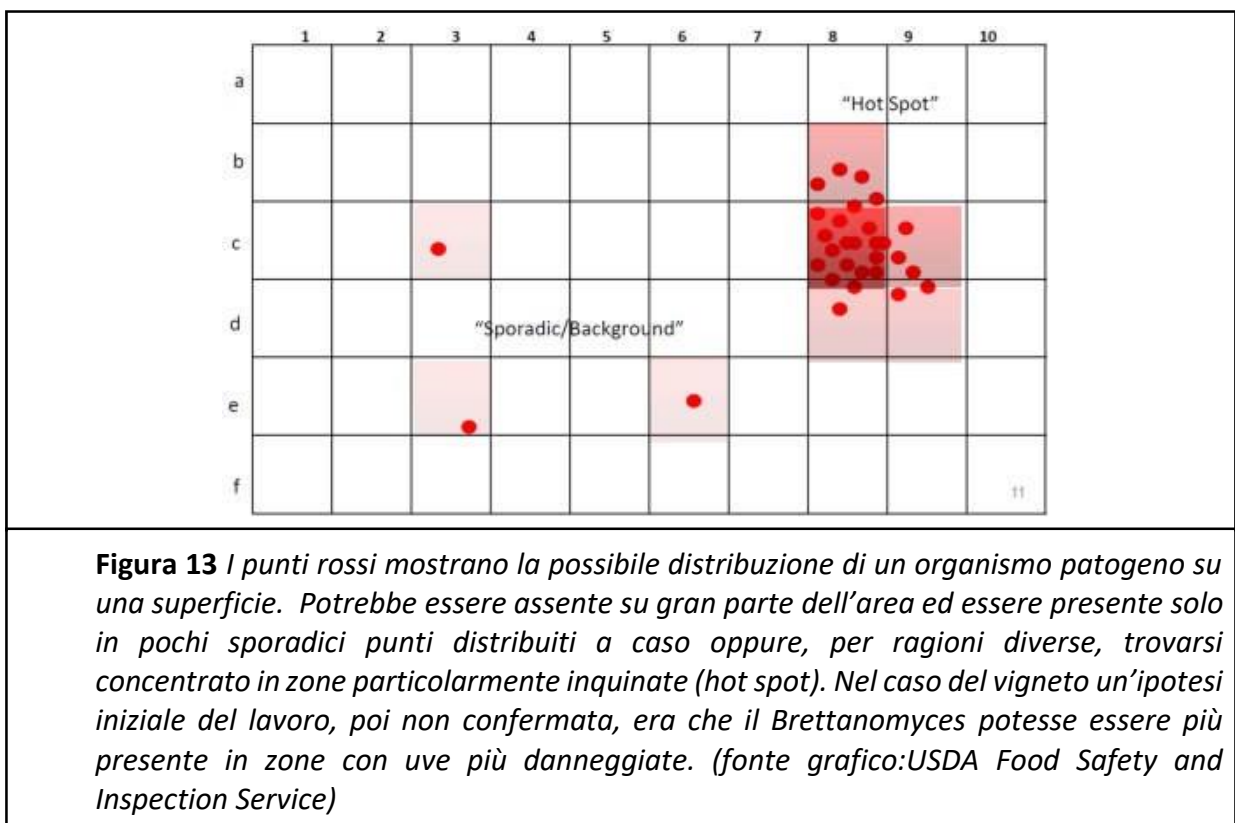
2.4 Metodo di campionamento delle uve in vigneto

Precedenti analisi eseguite dal nostro gruppo di lavoro hanno dimostrato che *B. bruxellensis* può essere presente sulle uve, sia quelle in ottime condizioni che su quelle danneggiate da botrite, in maniera molto sporadica. I metodi di campionamento delle uve utilizzati per l'analisi della maturazione non sembrano essere adatti in quanto messi a punto per analizzare parametri chimici, quali acidità o zuccheri, distribuiti normalmente all'interno di un vigneto. I microrganismi presenti nel vigneto invece non si trovano disposti in modo omogeneo su un'area di un corpo da analizzare. Si è reso quindi necessario a questo scopo individuare una metodologia di campionamento diversa da quella normalmente adottata nei vigneti. Uno scambio di informazioni con il ricercatore dell'ISPA CNR Giancarlo Perrone aveva portato una serie di informazioni che al momento del contatto non erano ancora state pubblicate su una eventuale strategia perseguibile. Si riportano di seguito le informazioni fornite a tal proposito del Perrone:

*“La nostra esperienza di campionamento relativo alla presenza di *Aspergillus carbonarius* ed ocratossina ha evidenziato i seguenti accorgimenti su parcelle di vigneto da 1 ha: indipendentemente dalla metodica di campionamento applicata, quali il prelevamento di grappoli da 5 gruppi di 10 piante posti sulle diagonali del vigneto, lungo i filari o lungo percorsi a W, non sono state osservate differenze apprezzabili né in termini di incidenza dei marciumi secondari da *Aspergillus* sp. né in termini di concentrazione di propaguli di *A. carbonarius* e relativa contaminazione da OTA dei mosti derivati. Quindi, vista la modesta influenza della modalità di campionatura, l'attività di validazione è stata eseguita adottando il percorso lungo i filari perché di più agevole applicazione in tutti i vigneti,*

indipendentemente dal sistema di allevamento. Decisamente più marcata è stata l'influenza della dimensione del campione. Frazioni di grappolo di piccole dimensioni (2-2,5 kg); infatti, seppure più omogenei nella variabilità fra le repliche, hanno portato costantemente a sottostimare il livello di contaminazione rispetto alla reale situazione di campo. Un'elevata variabilità fra i campioni è stata invece osservata quando il campione era costituito da circa 10 kg; Campioni di grappoli di 20-50 kg hanno migliorato la replicabilità e la attendibilità dei risultati. Pertanto, come indicazione finale abbiamo adottato il campionamento da 5 gruppi di 10 piante poste sui filari o diagonali del vigneto per un campione totale di circa 25 kg per vigneto."

Tale strategia poteva essere valida per i microrganismi indicati ma a livello teorico si presentava poco adatta ad un microrganismo non ubiquitario e più complicato da individuare come il *B. bruxellensis*. Un campione molto grande in peso di uve rischiava poi di diluire troppo la concentrazione richiesta per la determinazione.



Nelle strategie di campionamento per la presenza di microrganismi spicca una metodologia che viene utilizzata per individuare la presenza di inquinanti sulla superficie di una carcassa di animale. Questo metodo definito N=60 è stato messo a punto in quanto prelevando un

numero elevato di campioni (60) da sottoporre ad analisi esiste una buona probabilità di determinare la presenza di un inquinante presente in modo casuale solo su alcune zone. Dal punto di vista matematico l'indagine consente di essere sicuri al 95% che l'eventuale contaminazione interessi non più del 5% del totale dei punti esaminati. La chiave del successo di questa strategia è che il campione di uva rappresenti il più possibile ciascuno dei 60 lotti individuati.

A questo punto quindi i tre vigneti con diversa superficie sono stati comunque divisi ciascuno in 60 lotti. Un operatore ha prelevato da quanti più grappoli possibile e nelle diverse posizioni sia del filare che del grappolo pochi acini fino a formare un campione di almeno 500 g di uve. I campioni sono stati portati nello stesso giorno in laboratorio e processati per le analisi eseguite dal laboratorio CAIM.



Figura 14 Particolare della suddivisione del vigneto di proprietà Mantellassi in lotti lunghi 20 m con all'interno 3 filari. il prelievo è stato fatto sui grappoli di tutti e tre i filari per l'intera lunghezza di ciascun lotto. Questo vigneto ha previsto il prelievo su 60 lotti nella zona controllo, 60 nella zona sottoposta a trattamenti sanitari di campo e ulteriori 60 per coprire l'intera superficie del vigneto, di circa 6 ettari, includendo la parte in basso a destra che era quella con maggiore presenza di umidità e maggior vigore vegetativo.

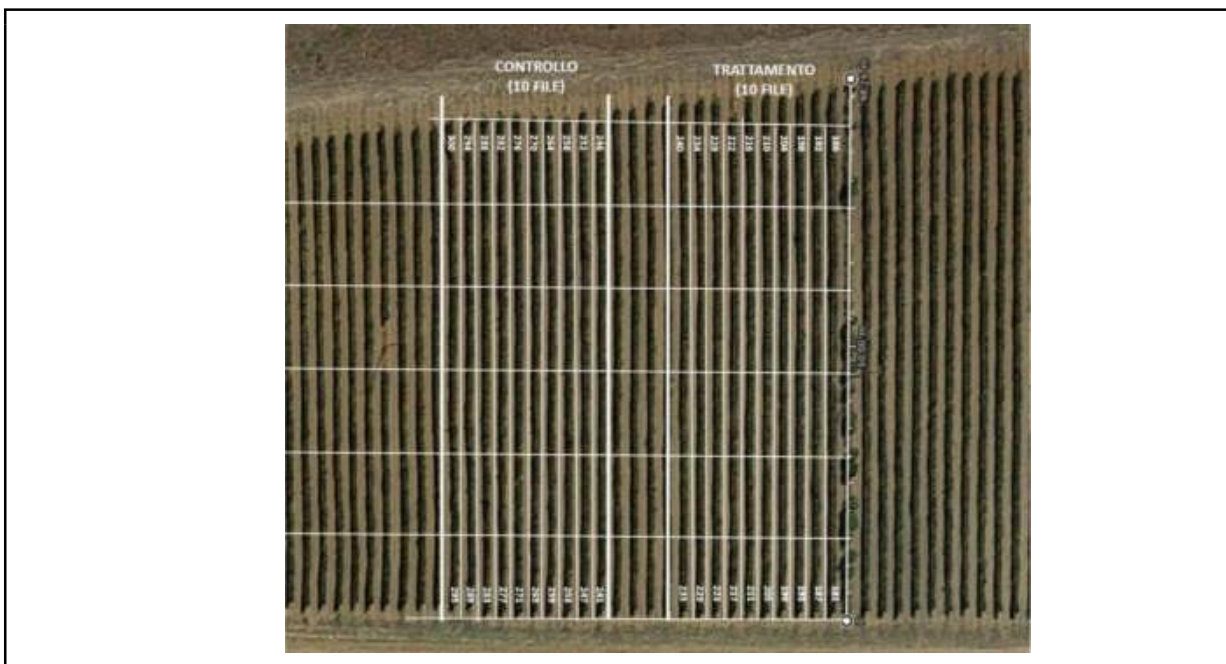


Figura 15 Particolare della suddivisione del vigneto dell'agriturismo carpine di Alberese. In questo caso i lotti sono molto più piccoli: lunghi 15m hanno all'interno solo 1 filare. Anche in questo vigneto il prelievo è stato effettuato su 60 lotti nella zona controllo e 60 nella zona sottoposta a trattamenti sanitari di campo. Il livello di rilevazione del patogeno doveva in questo caso essere ancora più accurato rispetto al vigneto precedente essendo il campione di uve dello stesso peso ma proveniente da un numero di grappoli inferiore.



Figura 16 *Sopra a sinistra: i sacchetti contenenti i campioni di uve prelevati nel vigneto sono pronti per essere trasportati al laboratorio di prima preparazione. Sopra a destra: stanza di preparazione e chiarificazione dei mosti ottenuti dalle uve necessaria per procedere con le analisi chimiche e microbiologiche. Sotto a sinistra: ammostamento delle uve e a sotto a sinistra particolare del processo di preparazione dei mosti da inviare al laboratorio analitico.*

2.5 Analisi chimiche sui campioni di uve

Di seguito si riportano i dati originali dei valori dei contenuti di vari composti analizzati per ciascuno dei 180 lotti (media di due anni) del vigneto di proprietà Mantellassi.

Lotto	pH	Acidità (g/L)	Glucosio + Fruttosio (g/L)	Azoto Alfa- amminico (mg/L)	Azoto ammoniacale (mg/L)	APA (mg/L)
1	3,3	6,8	219	79	71	149
2	3,4	6,7	219	87	67	154
3	3,4	6,8	222	73	61	134
4	3,4	6,7	226	73	63	135
5	3,4	6,5	221	70	49	118
6	3,4	6,4	226	71	51	122
7	3,4	6,6	221	90	68	158
8	3,4	6,5	230	77	47	124
9	3,3	6,7	227	79	51	130
10	3,4	6,5	224	55	44	95
11	3,3	6,5	219	81	49	130
12	3,3	6,1	221	70	28	97
13	3,3	6,4	225	59	40	98
14	3,3	6,6	207	88	21	109
15	3,4	6,6	223	78	44	122
16	3,4	7,0	212	95	71	165
17	3,2	7,0	214	72	60	132
18	3,3	7,0	225	74	62	135
19	3,3	6,8	218	55	50	105
20	3,3	6,1	232	60	27	87
21	3,4	6,5	221	71	52	122
22	3,4	6,4	221	67	34	101
23	3,3	6,8	215	67	47	114
24	3,4	6,4	226	71	49	119
25	3,4	6,2	227	61	61	122
26	3,3	6,6	229	67	47	114
27	3,3	6,4	230	59	57	116
28	3,3	6,2	229	54	32	86
29	3,3	6,4	228	53	34	87
30	3,3	6,4	214	71	50	120
31	3,4	6,8	215	78	60	138
32	3,3	6,9	215	66	74	140
33	3,3	6,9	222	71	57	128
34	3,3	7,3	210	74	52	125
35	3,3	6,9	212	61	59	120
36	3,3	6,6	221	60	52	112
37	3,3	6,4	234	50	50	100
38	3,4	5,8	242	28	31	59
39	3,4	5,7	236	41	29	70
40	3,3	6,1	223	75	31	106
41	3,3	6,9	196	62	55	117
42	3,3	6,4	226	62	40	101
43	3,3	6,8	216	53	42	95
44	3,3	6,7	217	65	55	120
45	3,2	7,0	218	69	50	119
46	3,3	6,3	224	64	36	100
47	3,3	6,2	234	56	32	88
48	3,3	6,3	230	54	33	87
49	3,4	5,7	235	33	34	67
50	3,4	6,1	225	52	57	108
51	3,4	6,5	220	74	67	141
52	3,3	7,1	225	67	63	130
53	3,2	6,8	215	79	46	124
54	3,3	6,3	224	74	49	122
55	3,4	6,4	229	61	59	120
56	3,2	7,1	224	71	73	144
57	3,3	6,8	232	68	65	133
58	3,2	6,7	229	58	56	111
59	3,4	5,7	234	36	31	67
60	3,4	6,0	221	55	57	112

Lotto	pH	Addità (g/L)	Glucosio + Fruttosio (g/L)	Azoto Alfa- amminico (mg/L)	Azoto ammoniacale (mg/L)	APA (mg/L)
61	3,4	6,3	218	80	33	113
62	3,5	6,5	218	89	60	149
63	3,4	6,4	218	69	53	122
64	3,5	6,0	241	52	42	93
65	3,4	6,3	254	59	48	107
66	3,4	5,9	243	45	33	78
67	3,4	6,0	247	36	22	58
68	3,4	5,9	236	54	44	98
69	3,3	6,7	191	80	84	164
70	3,3	6,5	192	84	83	167
71	3,4	6,6	217	75	75	150
72	3,5	6,2	214	94	61	155
73	3,4	6,0	230	58	43	101
74	3,4	6,2	221	66	50	116
75	3,5	5,9	229	62	50	112
76	3,4	6,2	229	55	40	94
77	3,4	5,8	241	48	35	83
78	3,4	5,6	244	39	20	59
79	3,4	5,7	256	30	19	48
80	3,4	5,7	250	27	19	46
81	3,4	6,7	218	65	53	118
82	3,4	6,5	222	79	63	142
83	3,4	6,4	216	68	47	114
84	3,4	6,4	216	54	43	96
85	3,4	6,4	231	46	39	85
86	3,4	5,9	238	48	34	82
87	3,4	5,8	245	47	33	80
88	3,3	6,1	249	42	28	69
89	3,3	6,7	216	56	69	124
90	3,3	6,7	191	82	76	158
91	3,3	6,7	204	93	64	157
92	3,3	6,9	212	94	72	165
93	3,3	6,6	213	72	52	124
94	3,2	6,9	204	76	66	142
95	3,3	6,7	203	79	73	152
96	3,3	6,6	203	67	56	123
97	3,3	6,4	215	75	63	137
98	3,3	6,0	210	76	43	119
99	3,3	6,4	216	72	52	124
100	3,3	6,5	216	80	71	151
101	3,2	7,1	215	80	55	135
102	3,3	7,2	210	104	77	180
103	3,2	7,1	215	84	81	165
104	3,2	7,6	201	105	82	187
105	3,3	7,4	204	94	70	163
106	3,3	7,2	209	90	61	151
107	3,2	7,1	216	75	72	147
108	3,2	7,5	200	85	79	164
109	3,2	7,1	194	77	68	145
110	3,4	6,7	221	83	76	159
111	3,2	7,1	201	100	78	178
112	3,3	7,0	202	95	82	177
113	3,3	6,9	217	86	70	156
114	3,3	7,1	204	101	85	186
115	3,3	7,2	208	104	83	187
116	3,3	7,0	211	106	81	187
117	3,3	6,7	211	100	77	177
118	3,3	5,9	214	57	56	113
119	3,4	5,9	214	82	74	156
120	3,3	6,7	223	69	59	128

Lotto	pH	Acidità (g/L)	Glucosio + Fruttosio (g/L)	Azoto Alfa- amminico (mg/L)	Azoto ammoniacale (mg/L)	APA (mg/L)
121	3,2	7,3	194	104	84	188
122	3,3	6,9	201	102	78	180
123	3,3	7,1	195	96	77	171
124	3,3	7,6	201	90	89	179
125	3,3	7,1	206	96	85	181
126	3,2	7,1	201	94	73	166
127	3,2	6,6	211	72	69	141
128	3,1	7,0	203	91	53	144
129	3,2	6,6	208	69	66	134
130	3,3	6,9	202	72	87	159
131	3,5	7,1	201	105	107	212
132	3,2	7,3	196	105	93	198
133	3,3	7,3	194	124	102	225
134	3,2	7,9	197	115	100	214
135	3,3	7,3	199	104	76	180
136	3,3	7,2	202	99	75	174
137	3,3	6,9	199	88	81	169
138	3,3	7,2	198	85	83	168
139	3,2	7,2	199	69	69	138
140	3,3	6,9	196	71	78	150
141	3,3	6,6	197	91	72	163
142	3,2	7,1	195	85	73	158
143	3,2	8,1	184	95	95	189
144	3,3	7,2	192	86	80	166
145	3,3	7,4	193	117	97	213
146	3,3	6,8	198	92	77	169
147	3,3	7,2	195	91	84	175
148	3,3	6,9	203	89	75	164
149	3,2	7,6	189	83	83	165
150	3,2	7,1	200	92	73	165
151	3,2	7,3	198	73	63	135
152	3,3	7,4	194	86	96	182
153	3,3	7,2	198	90	90	179
154	3,2	7,0	190	71	45	118
155	3,3	7,1	196	91	87	178
156	3,3	7,3	202	115	103	217
157	3,3	7,4	197	98	86	183
158	3,3	7,0	197	84	71	155
159	3,2	7,3	188	116	59	174
160	3,3	6,8	205	105	78	183
161	3,3	6,9	207	83	54	137
162	3,3	7,3	193	92	74	166
163	3,3	7,1	194	104	67	171
164	3,3	7,3	199	93	89	161
165	3,2	6,4	207	70	53	123
166	3,3	7,5	201	98	73	171
167	3,3	6,9	199	103	77	179
168	3,3	6,6	202	93	54	157
169	3,5	7,0	215	75	70	145
170	3,3	7,3	194	89	81	170
171	3,3	6,7	205	84	87	171
172	3,3	7,0	215	79	69	147
173	3,3	7,0	206	75	73	147
174	3,3	6,6	198	101	94	195
175	3,3	7,1	205	86	77	163
176	3,2	7,0	212	84	77	161
177	3,3	6,8	209	81	80	161
178	3,3	6,7	205	93	79	172
179	3,2	6,5	214	72	57	128
180	3,3	6,7	191	79	92	171

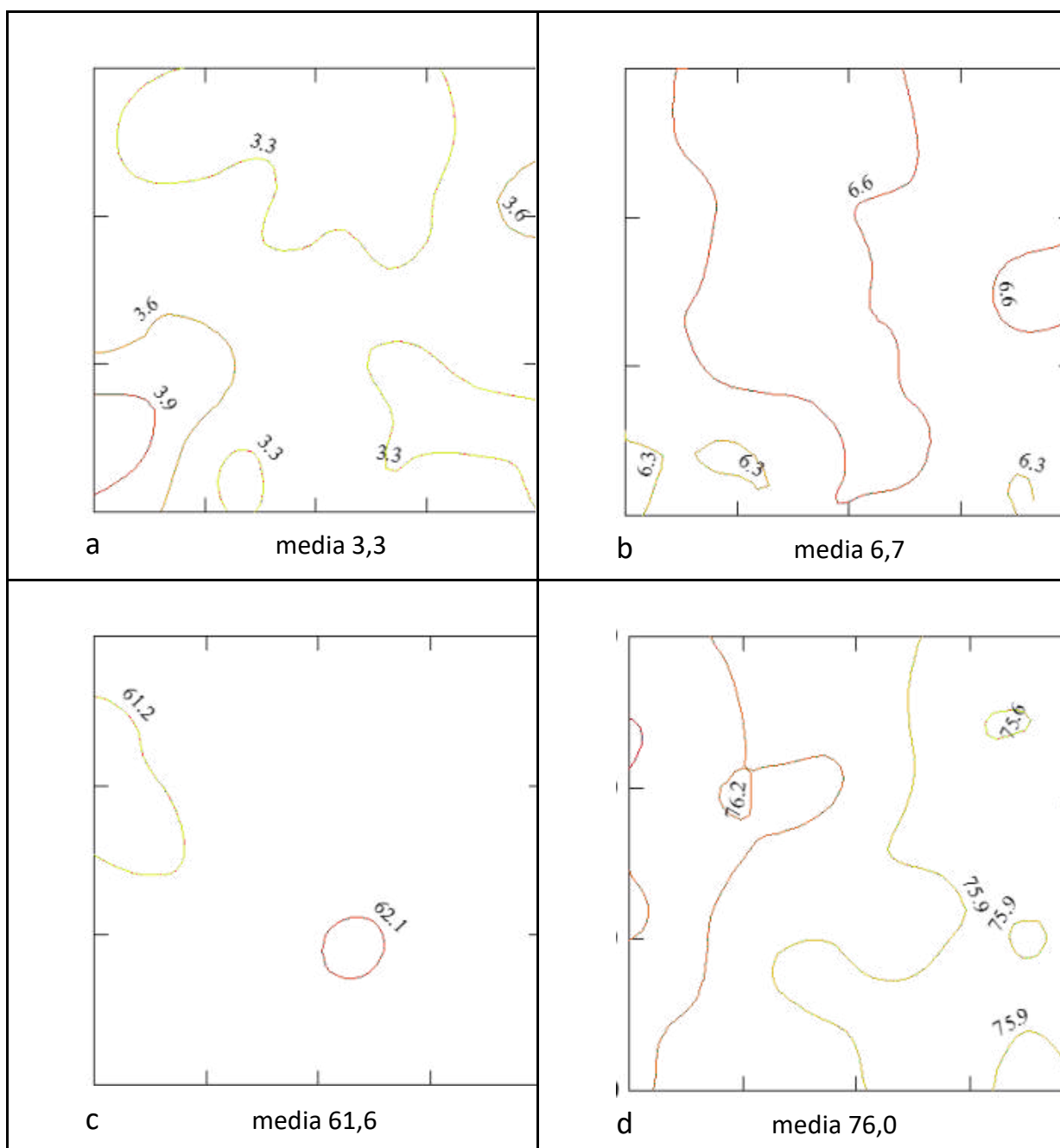


Figura 17 Analisi statistico-spaziale dei parametri chimici pH (a) Acidità (b) Glucosio + Fruttosio (c) e Azoto Alfa Amminico (d) come rilevati all'interno del vigneto. E' possibile georeferenziare e quindi individuare i punti dove sono presenti variazioni di ciascun parametro studiato rispetto alla media determinata sull'intero vigneto.

L'elaborazione statistica dei dati chimici mostrati nelle pagine precedenti permette, mediante la georeferenziazione del punto centrale di ciascuna parcella, di realizzare delle mappe che mostrano visivamente gli andamenti di ciascun parametro analizzato all'interno del vigneto. La figura 17 mostra alcune delle mappe realizzate dove è possibile vedere come possano

essere presenti alcune differenze a livello del vigneto in funzione delle variabili fornite da terreno e pianta. Queste mappe potevano essere messe in relazione con i risultati della presenza più o meno accentuate del microrganismo sulle uve. Dato che i risultati delle analisi microbiologiche dei 180 campioni prelevati sul vigneto hanno consentito di determinare la presenza solo su pochissime parcelle questo lavoro è rimasto inutilizzato dal punto di vista del controllo del patogeno ma potrebbe essere utilizzato, insieme ai risultati relativi alla crescita delle piante, per modulare in maniera ottimale gli input agronomici quali la concimazione la potatura in verde ed i trattamenti antiparassitari.

2.6 Raccolta dati da drone

Nel corso degli anni 2021 e 2022 sul vigneto individuato presso l'azienda Mantellassi di Magliano in Toscana sono stati effettuati dei rilievi mediante passaggio con drone sul quale era stata montata una camera iperspettrale. I voli sono stati eseguiti in due tempi diversi per verificare in due diverse annate la mappatura ed il calcolo di indici di vegetazione (NDVI index).



Figura 18 A sinistra: consolle di controllo con piano di volo del drone. A destra Foto dell'operatore mentre fa alzare in volo il drone per le riprese.

Anche in questo caso, come successo per i parametri chimici, i dati calcolati relativi alla crescita e sviluppo vegetativo delle piante non sono stati messi in correlazione con i dati microbiologici per il basso numero di campioni di uve risultati inquinati.



Figura 19 Ortofoto del vigneto Mantellassi interessato dalla sperimentazione. Questa immagine, ricostruita a partire da tutti i fotogrammi ripresi - acquisiti sullo spettro del visibile è utile come base di lavoro per la fotointerpretazione e per la visione di insieme

Digital Elevation Model

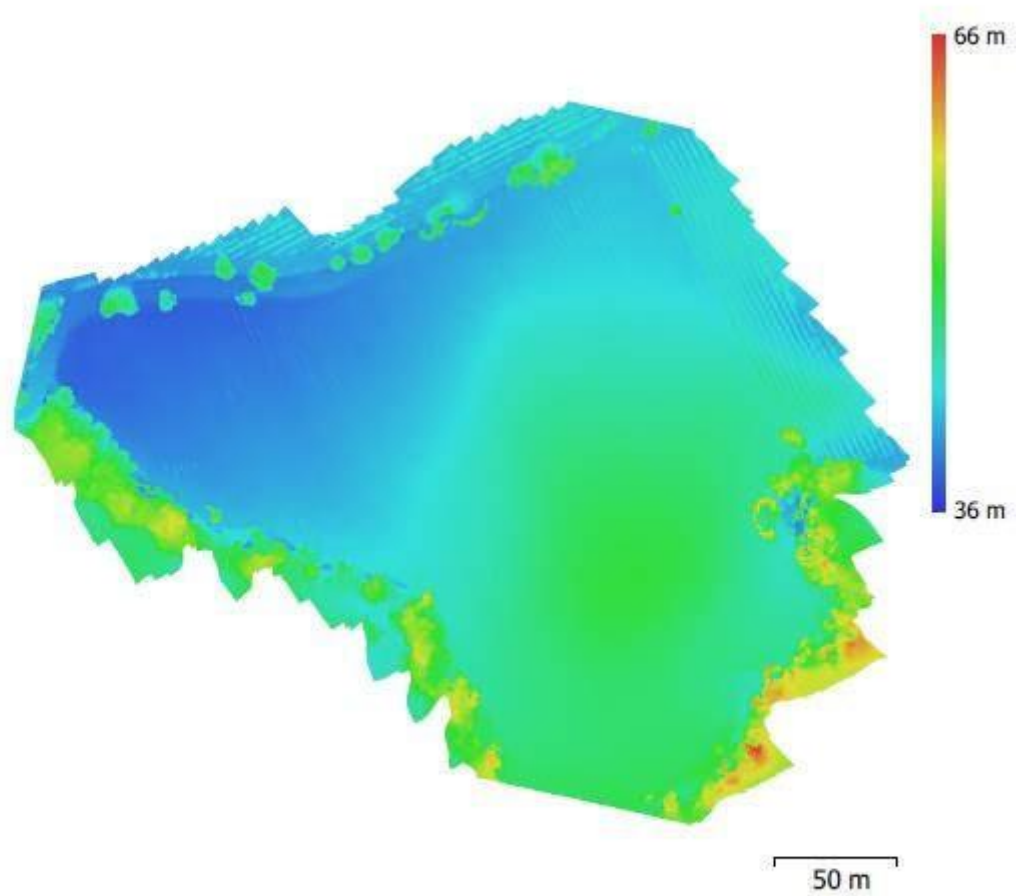


Fig. 4. Reconstructed digital elevation model.

Figura 20 Modello digitale dell'altitudine del vigneto Mantellassi interessato dalla sperimentazione come calcolato in base alle riprese da drone. Si può notare come la parte in azzurro sia quella posta più in basso dove era maggiormente presente umidità del suolo e dove nel corso dei campionamenti sono stati rilevati maggiori danni ai grappoli da parte di attacchi fungini nel corso dell'anno 2020.

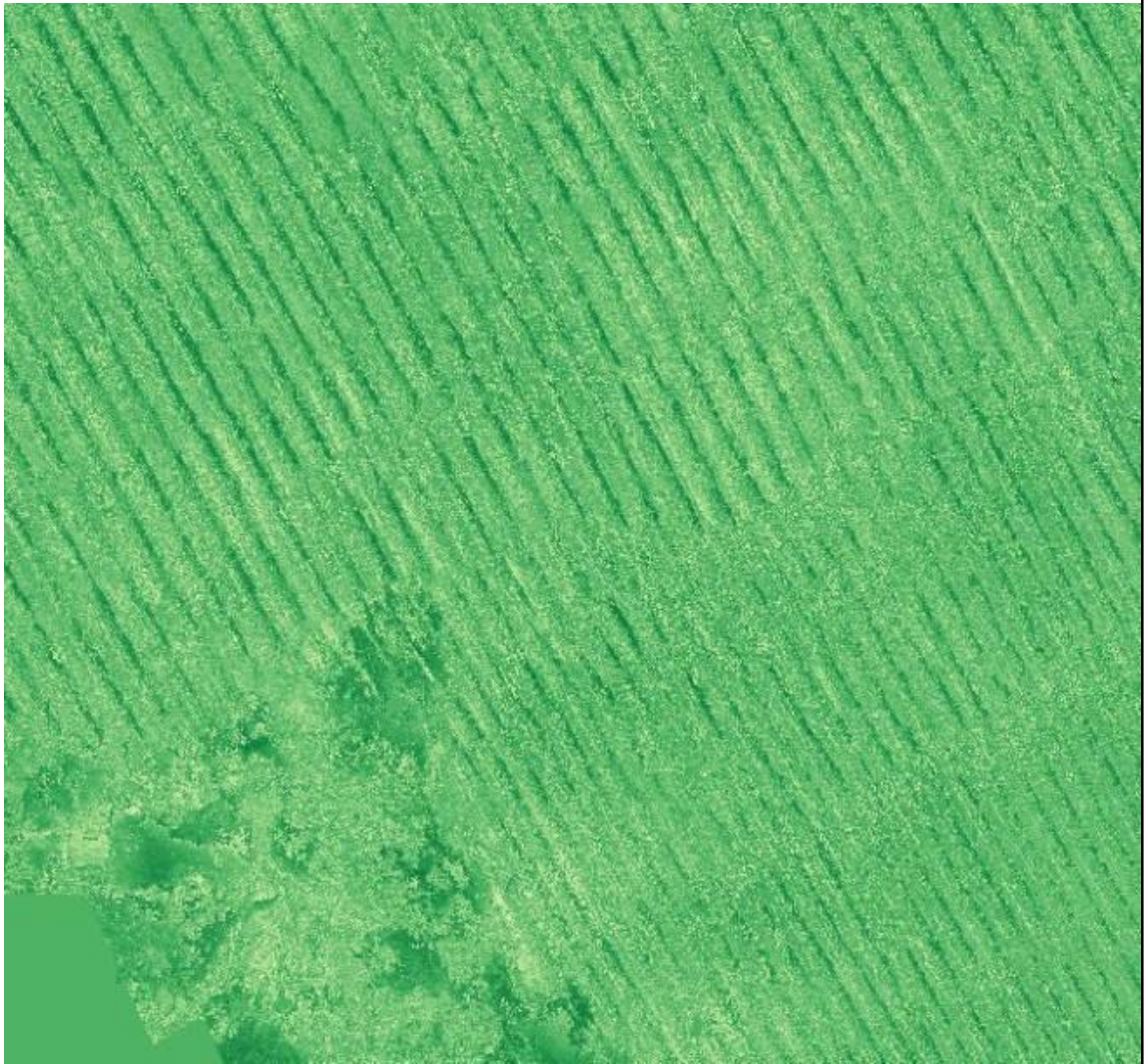


Figura 21 Particolare di un'immagine NDVI. Questa è una porzione dell'ortomosaico ricostruito dai fotogrammi acquisiti con lo spettro multispettrale. Include le bande del vicino infrarosso (NIR). Combinando le bande Rosse e il NIR otteniamo questo indice che mostra l'intensità di verde delle foglie legata al contenuto di clorofilla e correlabile alla capacità fotosintetica ed alla conseguente vigoria delle piante.

2.7 Monitoraggio di *B. bruxellensis* nel vigneto

La quantificazione di *B. bruxellensis* all'interno del vigneto delle aziende partner è stata effettuata mediante tecnica *qPCR*. In totale sono stati prelevati 610 campioni uva provenienti da entrambe le aziende partner, in prossimità della vendemmia (Fig.22).

Per ogni campione sono stati determinati pH, acidità totale, glucosio e fruttosio, azoto prontamente assimilabile (APA) e conta di *B. bruxellensis*.

	pH	Ac. tot (g/L)	G+ F (g/L)	A. Alf a-ammi. (mg/L)	A. ammo (mg/L)	AP A (mg/L)	B. bruxellensis (log cell/ml)
20 20							
M AX	3,4 7	7,6 4	24 7,0 0	13 1,0 0	11 3,0 0	23 3,0 0	1,10
MI N	3,2 1	5,3 8	17 2,0 0	19, 00	20, 00	45, 00	1,10

	pH	Ac. tot (g/L)	G+ F (g/L)	A. Alf a-ammi. (mg/L)	A. ammo (mg/L)	AP A (mg/L)	B. bruxellensis (log cell/ml)
20 21							
M AX	3,6 0	8,6 7	26 4,4 2	12 2	11 1,0 0	22 5,0 0	1,20
MI N	2,2 7	5,2 1	16 9,4 7	25, 00	3,0 0	47, 00	1,10

Figura 22 Risultati analitici in vigneto espressi come massimi e minimi di entrambi gli anni di campionamento.

L'analisi microbiologica (Fig.23) ha rilevato che di tutti i campioni analizzati solo lo 0.8% è risultato positivo alla tecnica eseguita. Durante la prima vendemmia (anno 2020) sono stati

ottenuti tre risultati positivi e durante la seconda due positivi. Tutti i campioni presentano concentrazione nell'ordine di 10^1 UFC/ml. La scarsità di risultati positivi è in linea con la letteratura scientifica odierna che definisce la difficoltà con cui il microrganismo di studio, per quanto sia presente sulle uve, occorra a bassa concentrazione.

Descrizione campione	pH	Ac. tot (g/L)	G+F (g/L)	A. Alfa-ammi. (mg/L)	A. ammo (mg/L)	APA (mg/L)	B. bruxelensis. (log cell/ml)
202 0-18	3,3 1	6,59	212	79	50	129	1,10
202 0-229	3,3 2	6,73	178	93	85	178	1,2
202 0-291	3,2 9	7,40	188	88	69	157	1,1 2
202 1-134	3,2	7,74	218,9 3	88	55	143	1,2
202 1-53	3,0 5	6,81	225,5 1	96	25	121	1,01

Figura 23 Risultati positivi ottenuti dal monitoraggio dei vigneti

2.8 Sanificazione attrezzature, superfici e serbatoi

La sanificazione con ozono è stata applicata sulle superfici e le attrezzature che sono determinanti nella contaminazione da *B. bruxellensis*, tra cui le pompe, le tubazioni e i raccordi, i legni utilizzati per l'affinamento, le vasche di acciaio e cemento e i macchinari utilizzati per la filtrazione e l'imbottigliamento.

La detersione dei materiali di cui sopra, ad esclusione dei serbatoi in legno è stata eseguita attraverso un primo passaggio di soda caustica, un secondo passaggio con acido citrico e un risciacquo finale con acqua corrente. La detersione dei serbatoi in legno è stata invece operata attraverso l'uso di acqua calda (70-85°C) a pressione. La sanificazione di tutte le attrezzature, dei serbatoi (acciaio, cemento e legno) e delle superfici è stata effettuata attraverso l'utilizzo di acqua ozonizzata attraverso un generatore a 10 mg/L con portata di 23 L al minuto. In particolare, sono stati sanificate valvole, raccordi, tubazioni, pompe e filtri (a cartoni e a cartuccia) utilizzati per il travaso delle barriques 141, 142, 197, 200, 199 e 192.

Per verificare la corretta sanificazione è stato eseguito il controllo analitico prima e dopo la sanificazione mediante l'utilizzo di spugne (Fig.24).

Passaggio	B. bruxellensis. (UFC/ml)
Travaso barrique 141	1,5*10 ¹
Travaso barrique 141 sanificato	<10
Travaso barrique 142	3,3*10 ²
Travaso barrique 142 sanificato	<10
Travaso barrique 197	3,0*10 ¹
Travaso barrique 197 sanificato	<10
Travaso barrique 200	<10
Travaso barrique 200 sanificato	<10
Travaso barrique 199	<10
Travaso barrique 199 sanificato	<10
Travaso barrique 192	<10
Travaso barrique 192 sanificato	<10

Figura 24 Risultati analitici spugne ambientali

2.9 Monitoraggio di *B. bruxellensis* nell'aria nei locali di cantina

Il monitoraggio di *B. bruxellensis* nell'aria è eseguito mediante tecniche coltura-dipendenti in associazione a tecniche molecolari. Il campionamento dell'aria è stato eseguito attraverso l'uso della tecnologia S.A.S. "Surface Air System" in grado di campionare attivamente volumi noti di aria che vengono inviati direttamente sulla superficie di un filtro di recupero posto su opportuno *resuscitation medium* per permettere la riattivazione delle eventuali cellule VBNC. I filtri, dopo la fase di riattivazione, sono stati trasferiti su terreno DBDM per permettere la crescita di *Brettanomyces* spp.

Per ogni punto di campionamento sono stati prelevati 250 L di aria su piastre da 90 mm contenenti il terreno MR (come descritto da *Ocon et al.*, 2013). Per ogni punto è stato ripetuto il campionamento per sei volte al fine di ottenere un volume totale di aria campionata pari a 1500 Litri.

Sono stati considerati nove punti di campionamento:

Cantina A

- Barricaia centro
- Barricaia ingresso
- Travaso tank coperchio
- Travaso tank corridoio
- Centro cantina

Cantina B

- Vasca cemento travaso Coperchio
- Vasca cemento travaso corridoio
- Corridoio
- Piano superiore

Seguendo il protocollo di campionamento e analitico abbiamo ottenuto che sul 100% dei campioni analizzati non è stato rilevato il microrganismo di interesse ma su tutti i prelievi abbiamo rilevato la presenza di muffe in concentrazione normale per l'ambiente considerato (Fig.25).

Nome	<i>B. bruxellensis.</i> (log cell/LI)	Muffe UFC/L
Barricaia centro	<10	51
Barricaia ingresso	<10	34
Travasato tank coperchio	<10	12
Travasato tank corridoio	<10	7
Centro cantina	<10	15
Vasca cemento travaso Coperchio	<10	12
Vasca cemento travaso corridoio	<10	17
Corridoio	<10	65
Piano superiore	<10	31

Figura 25 Risultati monitoraggio aria ambientale.

2.10 Monitoraggio di *B. bruxellensis* e dei fenoli volatili nel vino in affinamento e pre-imbottigliamento

Il monitoraggio di *B. bruxellensis* e dei fenoli volatili è stato eseguito durante il corso dell'affinamento, a partire dalla fine della fermentazione malolattica fino alle operazioni di pre-imbottigliamento.

Nel corso dell'affinamento, infatti, il vino è soggetto ad operazioni di travaso, di cambio di serbatoio, unitamente a fasi di assemblaggio con altri vini ed altre operazioni tecniche in cui si aumenta la probabilità di contaminazione da parte di *B. bruxellensis*.

Sessantuno campioni di vino e acque di processo estratti da *barriques/tonneaux* sono stati sottoposti a *screening* per la ricerca di fenoli volatili al fine di individuare “legni” contaminati dal genere *Brettanomyces* da sottoporre a sanificazione.

In base ai risultati ottenuti (Figura 26) sono stati individuati nove tonneaux che presentano un’alta concentrazione di fenoli volatili e la presenza di *B. bruxellensis* è stata confermata sia mediante analisi molecolare in *qPCR* che tecnica colturale; di questi tre sono stati sanificati con l’utilizzo dell’Ozono gassoso, tre con Acqua Ozonizzata e tre con il vapore.

Barrique n°	B. bruxellensis (Log cell/mL)	4-etil-fenolo (µg/L)	4-etil-guaiacolo (µg/L)
192	1,56	990	144
200	2,10	904	116
198	2,77	1247	162
197	2,87	1034	133
201	2,35	1081	2014
199	2,11	903	116
141	1,8	1020	172
142	2,26	1169	191
143	2,36	1237	180

Figura 26 Screening per la ricerca di fenoli volatili e *B.bruxellensis* dei vini in affinamento.

La modalità di prelievo dell'aliquota di vino da sottoporre ad analisi deve poter essere riferibile all'intera massa dalla quale è stata prelevata; pertanto, durante il prelievo sono state osservate le seguenti indicazioni:

- Rimescolare la massa di vino al fine di renderla omogenea mediante l'impiego di asta in acciaio inox per *batonnage*;
- mediante alzapino ("ladro") prelevare da 50 a 100 ml di vino.
- Dopo ogni singolo prelievo gli strumenti utilizzati sono stati sanificati con una soluzione di metabisolfito di potassio a 5 g/L e un abbondante risciacquo in acqua corrente.

È stato eseguito un prelievo a settimana di 50 ml di vino per la quantificazione di *B. bruxellensis* ed etilfenoli e 100 ml due volte al mese per il controllo dell'anidride solforosa libera e totale.

Da luglio 2021 a Novembre 2021 sono stati monitorati i parametri chimici e *B. bruxellensis* è stato quantificato tramite *qPCR* (Fig.27).

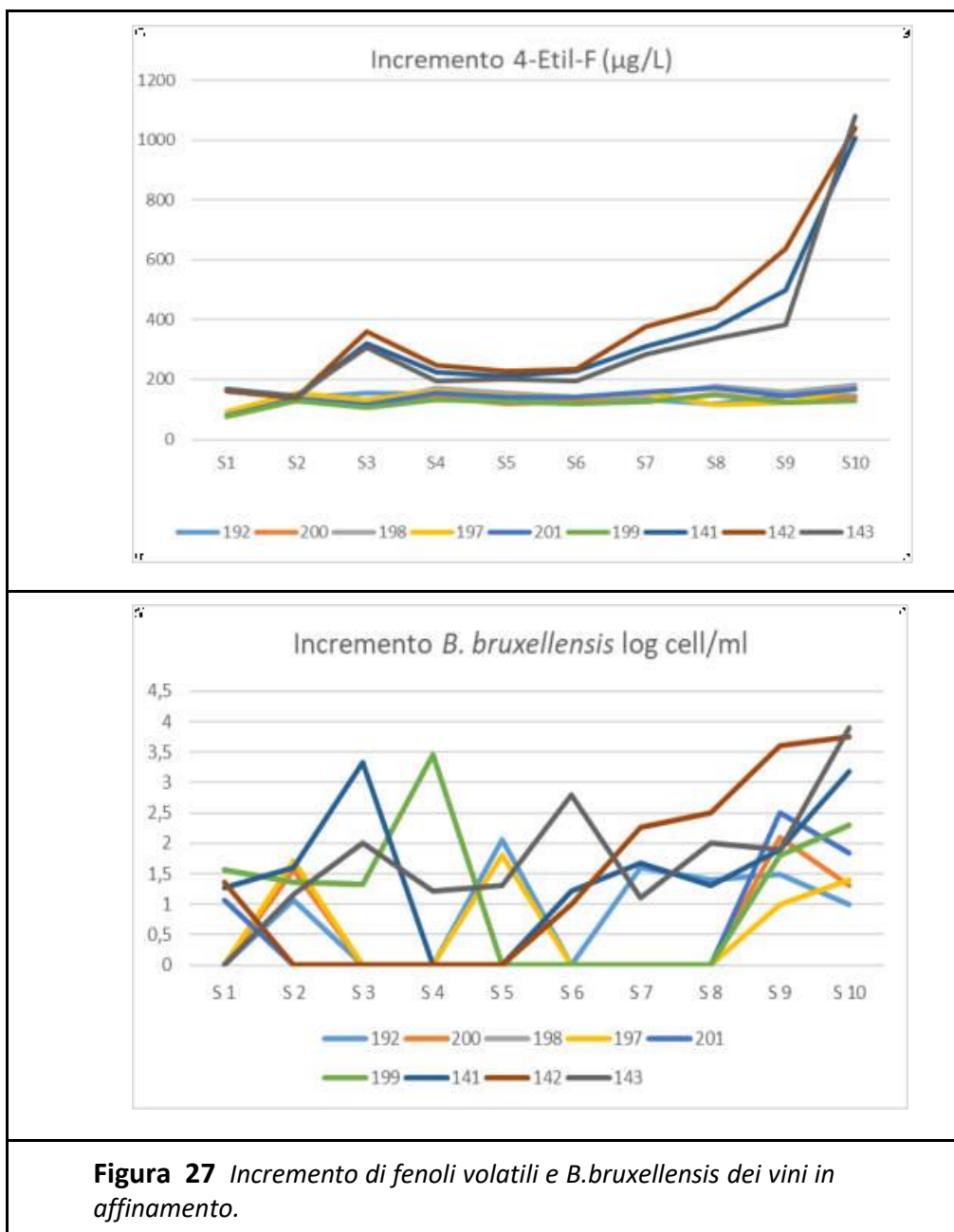


Figura 27 Incremento di fenoli volatili e *B.bruxellensis* dei vini in affinamento.

Si è riscontrato un progressivo aumento dei fenoli volatili in tutte le barriques trattate, conseguente all'aumento del microrganismo in oggetto. I trattamenti a cui sono stati sottoposti i serbatoi in legno sono stati efficaci nel breve periodo ritardando lo sviluppo del *B. bruxellensis*.

2.11 Interventi di contenimento e contrasto in cantina

La presenza di *B. bruxellensis* nel vino durante la fase di affinamento è stata contrastata attraverso l'utilizzo di una preparazione a base di chitosano e di enzimi, specificatamente formulata per la lotta contro i lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces*. Il chitosano è un polisaccaride naturale di origine fungina, non classificato come allergene alimentare. In particolare, mediante l'associazione specifica di questo polisaccaride naturale e degli enzimi pectinasi e glucanasi è possibile accentuare il processo di lisi e di conseguente morte cellulare. Nelle fasi precedenti l'imbottigliamento, il contrasto di *B. bruxellensis* è stato effettuato attraverso la filtrazione caratterizzata da setti filtranti specifici per l'eliminazione di microrganismi indesiderati.

Dall'analisi dei dati delle sessioni analitiche delle barriques sono state scelte un gruppo di sei legni distinti per concentrazione di *B. bruxellensis*.

Sono stati prelevati 15 L da ogni barrique e divisi in 4 Bag in Box.

- Campione 1: trattato per filtrazione 0.45 μm
- Campione 2: trattato per filtrazione + chitosano 5g/Hl
- Campione 3: trattato con chitosano 5g/Hl
- Campione 4: non trattato (controllo)

L'evoluzione dei trattamenti è stata verificata tramite analisi chimiche e microbiologiche.

I campioni controllo hanno dimostrato un normale incremento sia dei fenoli volatili che di *B. bruxellensis* (Fig.28).

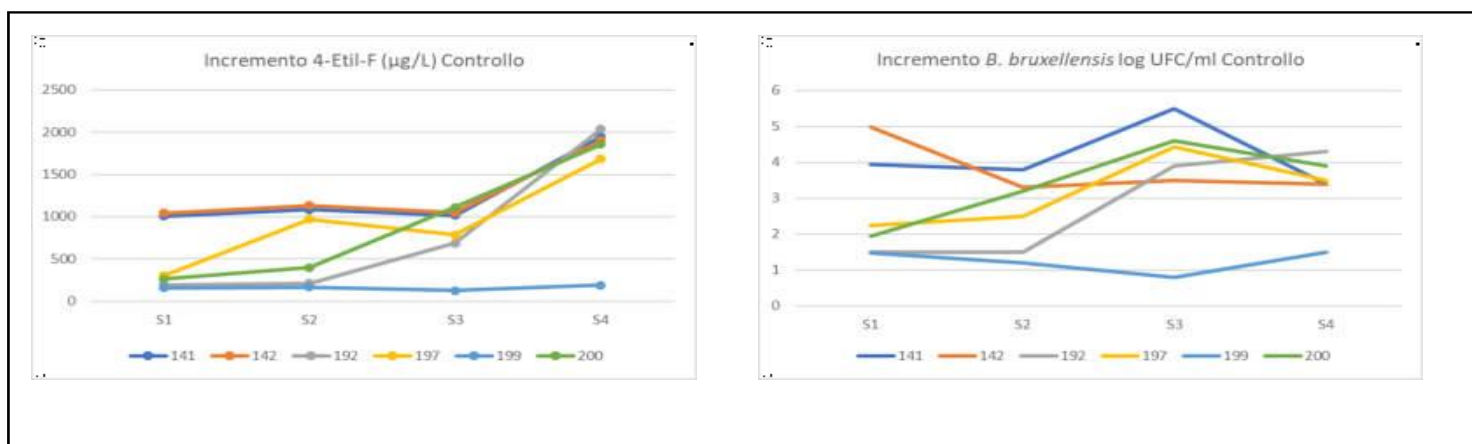


Figura 28 Incremento di fenoli volatili e *B.bruxellensis* nel campione controllo.

Ai campioni è stata aggiunta una concentrazione di 5 g/hL per le prime due sessioni distanti circa venti giorni una dall'altra, avendo ottenuto un effetto non significativo nella riduzione del microrganismo e dei fenoli volatili sono stati aggiunti ulteriori 5 g/hL portando così i campioni alla concentrazione massima consentita per legge. Nelle ultime due sessioni di controllo abbiamo assistito alla parziale riduzione della concentrazione del *B.bruxellensis*, ottenendo quindi risultati coerenti con la letteratura odierna (Fig.29).

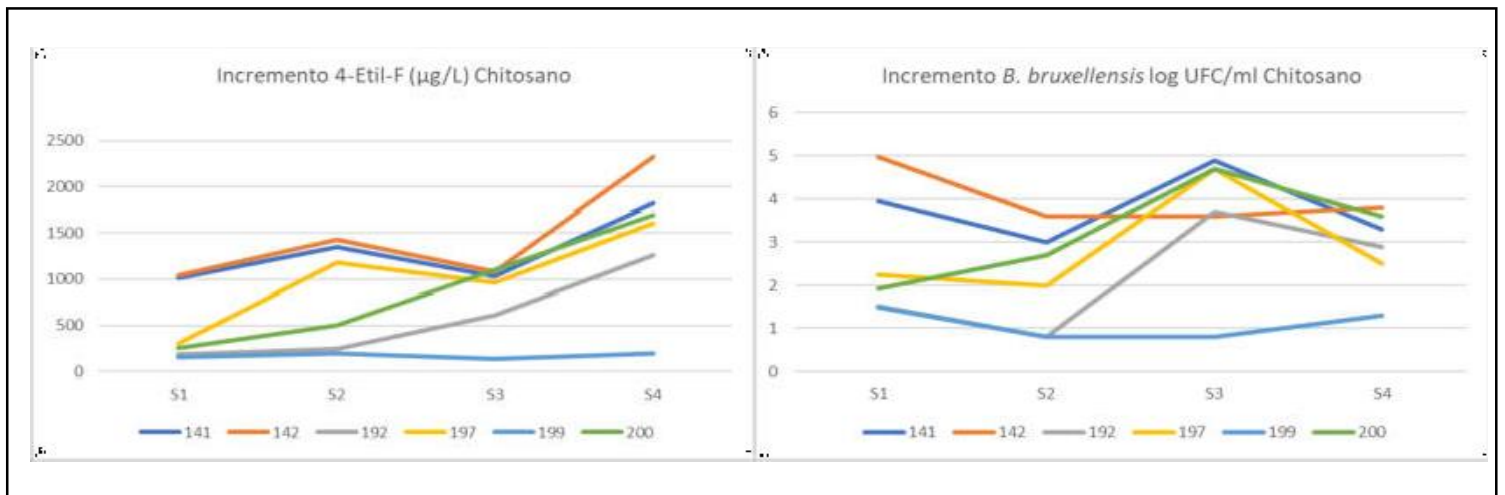


Figura 29 Incremento di fenoli volatili e *B.bruxellensis* nel campione trattato con chitosano.

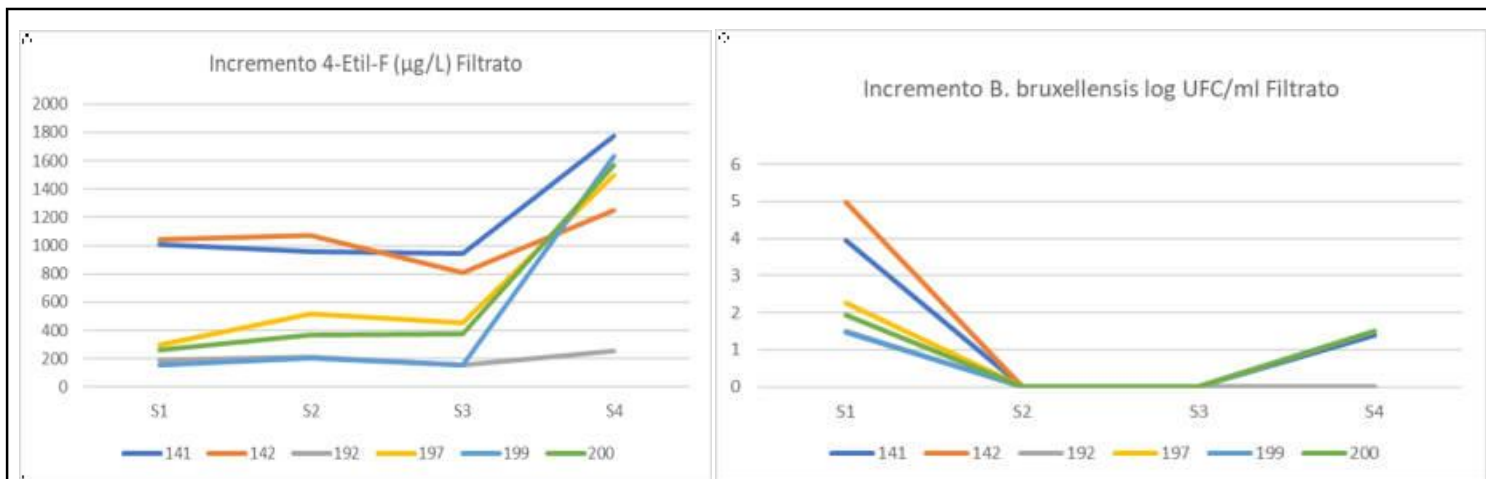


Figura 30 Incremento di fenoli volatili e *B. bruxellensis* nel campione filtrato.

In ultimo i campioni sottoposti a filtrazione hanno evidenziato un abbattimento totale del microrganismo di studio (Fig.30). Essendo la tecnica applicata un metodo coltura indipendente basato sull'estrazione del DNA totale del campione, sono stati rilevati dei risultati positivi nell'intorno di 10^1 UFC/ml. Questi sono stati confermati con tecnica colturale risultando non vitali e quindi falsi positivi.

2.12 Genotipizzazione dei ceppi di *B. bruxellensis* isolati

È stata innanzitutto eseguita una dettagliata ricerca bibliografica al fine di identificare la tipologia di marcatori molecolari da utilizzare. Possibili candidati sono stati: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*). Tra le varie opzioni è stato scelto l'utilizzo dei marcatori SSR in quanto ampiamente distribuiti nel genoma, codominanti e di facile interpretazione. Quindi, tra gli SSR disponibili in letteratura ne è stato selezionato un set sulla base del PIC value (*Polymorphism Information Content*) (Fig.31).

Microsatellite name	Motif	Primers	Dye	Allele Size
B101	GAA/GAT	F: CACGCAAAAGAAGATGAGGA R: TGCCATTCCTTATCCAAGTTG	HEX	140-146
B122	ATC	F: TCTTCTCCGATCCTTTATCA R: TTGCACGATTTGTCAGAATCC	6FAM	281-356
B135	CAA	F: AGCAGTTACGGAGGCAGCAAT R: TTTGTTTCTGGGGTTGGTGT	HEX	194-224
B174	GAT	F: TGGTGCTTAGAGCAGATGATG R: GCAACTGTTCCAATGAATTCC	6FAM	195-207
B22	ATG	F: TTAGGTGGTTATCCGGAGGAG R: TATCCTCGTCAGCTTCTGCTT	6FAM	186-271
B224	GTT/GCT	F: TGCAAGTTCTGCAGCGTT R: ACCAACAACAGCAAAGACACG	6FAM	106-127
B273	TTA	F: CTGCAAGAAGATGAATTGGAA R: ACCTTTGGATTGGCCCTTT	HEX	153-156
B301	TTG/CTG	F: GTATGCTTGCGGGACTTGATT R: GCGACTTCAACAGCAGCTTAA	HEX	143-174

Figura 31 Marcatori molecolari utilizzati nel processo di genotipizzazione.

Prima di procedere alla messa a punto dei protocolli è stata saggiata la quantità di *DNA* estratto e la sua qualità in termini di purezza da contaminazioni (260/230 e 280/20 ratio) tramite Biophotometer (Eppendorf). Si è quindi passati all'ottimizzazione del protocollo di amplificazione eseguendo varie prove per selezionare la migliore temperatura di annealing di ciascun primer (le temperature testate sono state: 50,0°; 50,2°C; 50,8°C; 51,7°C; 52,8°C; 54,1°C; 55,4°C; 56,7°C; 57,9°C; 58,8°C; 59,4°C; 59,9°C; termociclatore: Eppendorf Mastercycler EP Gradient). Successivamente, sono stati effettuati l'amplificazione (termociclatore utilizzato: Eppendorf Mastercycler) e il sequenziamento dei frammenti (sequenziatore utilizzato: ABI310). In ultimo, i risultati ottenuti sono stati analizzati tramite GeneMarker Software (Softgenetics) (Fig.32).

Componenti Mix PCR	Concentrazione iniziale	Volume
Dream Taq Buffer	10 X	2,5 μ L
dNTPs	10 mM	0,2 μ L
Primer Fw	10 μ M	1 μ L
Primer Rv	10 μ M	1 μ L
Dream Taq	5U/ μ L	0,2 μ L
H ₂ O	-	18,1 μ L
DNA	20 ng/ μ L	2 μ L

	Denaturazione	Amplificazione (25 cicli)			Estensione finale
Temperatura	95°	95°	58°	72°	72°
Tempo	5 min	30 sec	30 sec	45 sec	7 min

Figura 32 Protocolli di amplificazione utilizzati.

Per quanto riguarda il DNA estratto, la concentrazione variava da 20 a 500 ng/ μ L e i rapporti 260/230 e 280/230 risultavano adeguati al successivo utilizzo di amplificazione.

Tra le varie temperature testate quella di 58 °C è stata selezionata come migliore in quanto per tutti i primer analizzati gli amplificati risultavano della taglia attesa e privi di aspecificità (singola e nella banda visibile tramite elettroforesi gel al 1.2 %). Tali amplificati sono stati sequenziati tramite sequenziatore ABI310 (Fig.33).

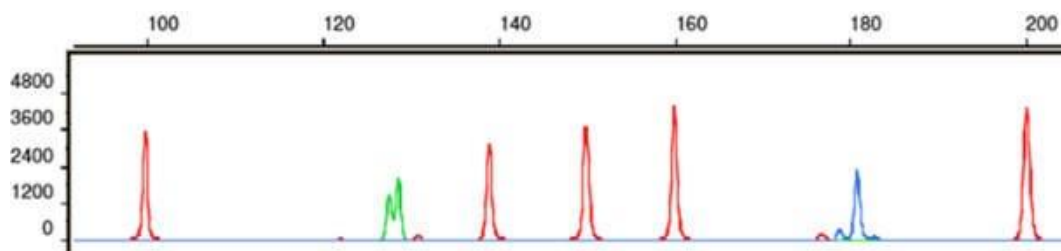


Figura 33 Elettroferogramma ABI310 .

L'analisi dei dati tramite GeneMarker ha permesso una chiara ed evidente discriminazione dei campioni (Fig.34). Di seguito si riporta l'albero filogenetico ottenuto.

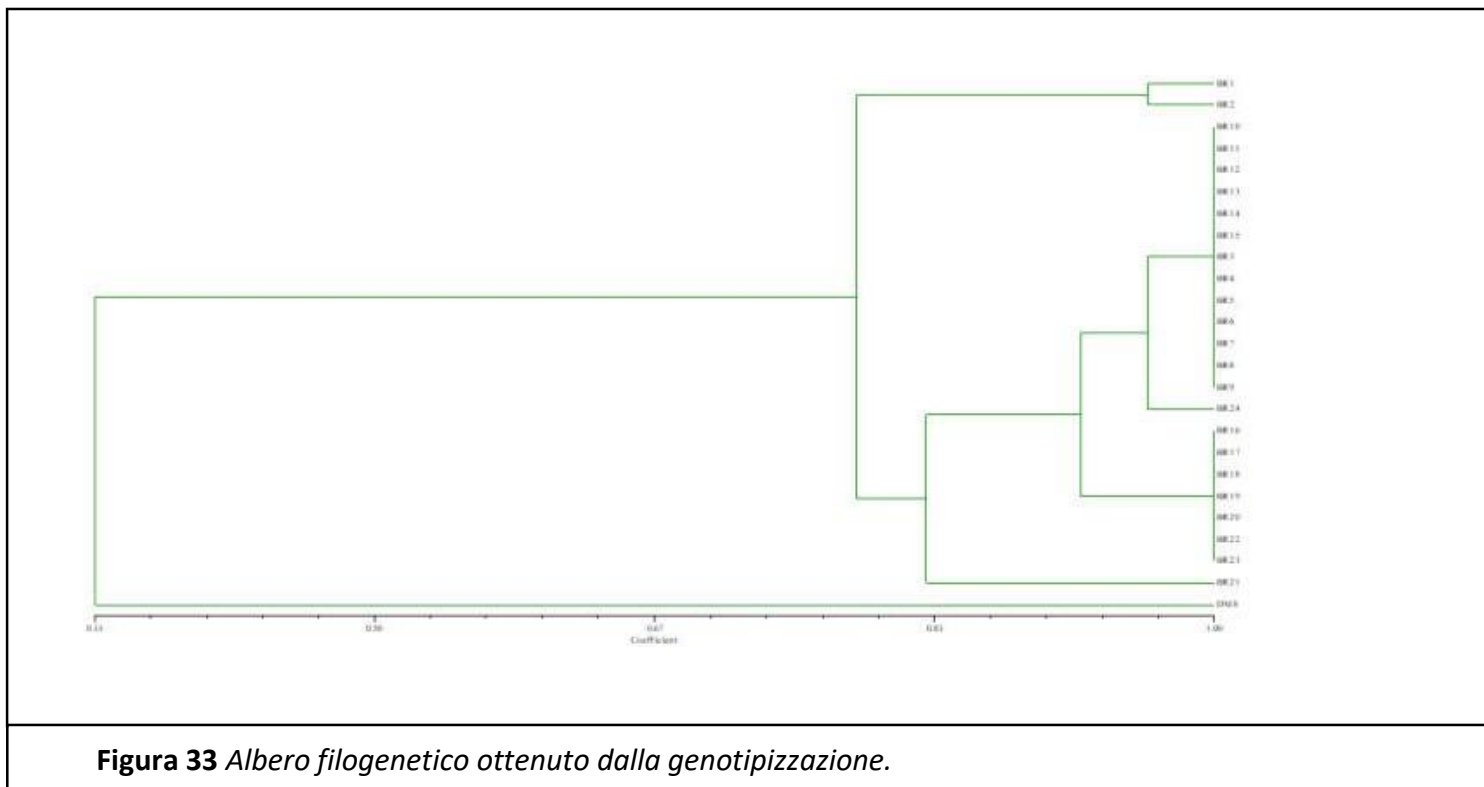


Figura 33 Albero filogenetico ottenuto dalla genotipizzazione.

2.13 Analisi sensoriale dei vini

La percezione ed il giudizio dei vini alterati da *B. bruxellensis* da parte dei consumatori dipendono da vari fattori, inclusi le preferenze individuali e le abitudini alimentari (Schumaker, Chandra, Malfeito-Ferreira, & Ross, 2017; Wedral et al., 2010). In generale, la gran parte degli studi che sono stati fatti al riguardo sottolineano come i consumatori non gradiscano vini nei quali riescono a riconoscere la presenza di sentori di farmaceutico o di stalla correlati alla presenza di fenoli volatili (Curtin et al., 2008; Lattey et al., 2010). Ci sono naturalmente differenze significative tra chi è esperto di vini e chi ha poca esperienza (Lattey et al., 2010; Sáenz-Navajas et al., 2015). Nella valutazione della capacità di discriminare i fenoli volatili, la qualificazione e la professione degli assaggiatori è fondamentale. Ad esempio, i produttori di vino ed i possessori di qualificazioni accademiche nella degustazione hanno una capacità superiore di individuare i difetti correlati alla presenza di etilfenolo ed etilguaiacolo (Tempère et al., 2014). I consumatori ordinari che possiedono una qualche esperienza nel settore enologico, ad esempio, hanno dimostrato di gradire meno vini con presenza di fenoli volatili

rispetto a quelli senza alcuna esperienza. La valutazione delle differenze presenti nella percezione dei difetti tra i consumatori è di grande interesse per assistere i produttori a sviluppare i propri vini (Lattey et al., 2010).

La percezione dei metaboliti prodotti da *B. bruxellensis* viene comunque influenzata dalla composizione dei vini stessi. La presenza dei sentori conferiti dai serbatoi in legno tende inoltre a ridurre nei consumatori il riconoscimento della presenza dei fenoli volatili (Schumaker et al., 2019).

Tuttavia, la presenza di sentori di sudore di cavallo, stalla, cuoio e farmaceutico correlati alla presenza di fenoli volatili, in alcuni casi è attribuita da alcuni consumatori e operatori del settore enologico come contributo ai parametri olfattivi che denotano la complessità aromatica dei vini.

Per questo motivo, nella fase di analisi organolettica dei vini effettuata nel Progetto NOBrett sono state distinte varie vasi operate da enologi specializzati e sommelier secondo lo schema riportato di seguito.

● **Composizione dei panel**

○ 4 enologi per la FASE 2

○ 8 sommelier SCUOLA EUROPEA SOMMELIER per la FASE 3

○ 8 sommelier FISAR per la FASE 3

● **FASE 1:** creazione di campioni di vino rosso con diverse intensità di 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo attraverso il seguente schema:

VINO ROSSO 1	Vino rosso semplice a livello olfattivo e gustativo, con un estratto secco non riduttore basso
VINO ROSSO 2	Vino rosso complesso a livello olfattivo e gustativo, con un estratto secco non riduttore alto

Per entrambi i campioni sono state create delle aliquote di vino con diverse concentrazioni di 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo relativamente al seguente schema:

	CAMPIONE A0	CAMPIONE A1	CAMPIONE A2	CAMPIONE A3
VINO ROSSO 1	Vino tal quale senza aggiunte	Aggiunta di 4-EF e 4-EG sotto soglia di identificazione	Aggiunta di 4-EF e 4-EG con concentrazione = soglia di identificazione	Aggiunta di 4-EF e 4-EG superiore alla soglia di identificazione
	CAMPIONE B0	CAMPIONE B1	CAMPIONE B2	CAMPIONE B3
VINO ROSSO 2	Vino tal quale senza aggiunte	Aggiunta di 4-EF e 4-EG sotto soglia di identificazione	Aggiunta di 4-EF e 4-EG con concentrazione = soglia di identificazione	Aggiunta di 4-EF e 4-EG superiore alla soglia di identificazione

- **FASE 2:** solamente il campione A0 e B0, rispettivamente i due vini tal quali, sono stati valutati e caratterizzati a livello organolettico attraverso la scheda di degustazione seguente da una commissione composta da 4 enologi esperti.

DEGUSTATORE:		ID. CAMPIONE:	VARIETÀ:								
Esame visivo	Limpidezza	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Tonalità										
	Intensità										
Esame olfattivo	Intensità	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Franchezza										
	Finezza										
	Complessità										
	Floreale										
	Fruttato										
	Vegetale										
	Minerale										
	Balsamico										
	Speziato										
Boisé											
Difetto "Brett "	Farmaceutico	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Stalla										
	Sudore di cavallo										
	Carotto										
	Affumicato										
Esame gustativo	Struttura	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Morbidezza										
	Acidità										
	Sapidità										
	Astringenza										
	Evoluzione Tannini										
	Equilibrio										
	Finezza										
Persistenza											
Note											

- **FASE 3:** tutti i campioni sono stati valutati da due commissioni composte da 8 sommelier ciascuna. Rispetto al Progetto GRAPE, in cui l'analisi sensoriale è stata operata solamente da enologi, nella valutazione dei vini difettati effettuata del Progetto NOBrett sono stati coinvolti i sommelier in quanto rappresentanti dei consumatori e delle loro reali percezioni prive di un approccio tecnico prettamente enologico.

COMMISSIONE 1	COMMISSIONE 2
Associazione Sommelier Fisar di Livorno	Associazione Europea Sommelier di Grosseto

I degustatori hanno valutato prima la sessione dei 4 campioni relativi al gruppo A, dopodiché i restanti 4 del gruppo B, rispondendo in seguito alla degustazione di ciascun gruppo ai seguenti quesiti:

1. Ci sono dei campioni identici di vino in questi 4 bicchieri? (SI o NO) Se è stato indicato sì scrivere i due codici dei bicchieri contenenti vini identici;
2. Adesso ordina i campioni per livello di gradimento dal più gradevole al meno gradevole e scrivi in questo ordine i codici dei singoli bicchieri o delle coppie individuate
3. Se ci sono dei campioni che non hai gradito potresti indicare quale e se è dovuto alla eventuale presenza dei seguenti odori:
 - a. Stalla, sudore di cavallo, cerotto;
 - b. Affumicato, speziato;
 - c. Altro
4. Tra questi vini ce ne è uno o più di uno di cui sconsigliaresti l'acquisto a dei tuoi conoscenti o ad un esercizio commerciale?

- **FASE 4:** elaborazione dei dati e dei risultati.

Gli obiettivi dell'analisi sensoriale impostata secondo il suddetto schema sono stati i seguenti:

- Percezione delle differenze nei campioni a seconda delle varie concentrazioni di fenoli volatili e alle differenze di struttura e complessità dei vini base impiegati;
- Identificazione dei difetti sensoriali nei campioni a seconda delle varie concentrazioni di fenoli volatili e alle differenze di struttura e complessità dei vini base impiegati;
- Valori di fenoli volatili che rendono sconsigliabile l'acquisto dei vini;
- Conferma della possibile influenza positiva dei fenoli volatili (in tenori inferiori alla soglia di identificazione umana) nei confronti della complessità aromatica dei vini.

RISULTATI OTTENUTI:

In base ai dati ottenuti, la presenza di fenoli volatili in concentrazioni inferiori alla soglia di identificazione umana, rispetto al medesimo vino privo di fenoli volatili, influenza negativamente la qualità dei vini indipendentemente dalla loro struttura e dalla loro complessità aromatica. Pertanto, i fenoli volatili possono essere considerati come un difettosensoriale in ogni caso.



2014-2020
PSR

Programma di Sviluppo Rurale



Unione Europea

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



Repubblica Italiana

**REGIONE
TOSCANA**



www.caim-nobrett.it