



noBRETT

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

Progetto *NO BRETT*

Il **Gruppo Operativo noBRETT** - *Riduzione dei difetti da *Brettanomyces bruxellensis* nei vini toscani di qualità* (finanziato con le misure 16.2, 1.1, 1.2 e 1.3 del Piano di Sviluppo Rurale 2014-2020 della Regione Toscana) mira a **ridurre il problema dello sviluppo di *B. bruxellensis* nei vini**, un lievito contaminante che può provocare gravi difetti organolettici e causare notevoli perdite economiche per i produttori.

Microorganismi alteranti

- Lieviti
- Muffe
- Batteri Lattici (LAB)
- Batteri acetici



LIEVITI

- lieviti sono un gruppo di funghi, formati da un unico tipo di cellula eucariotica, che possono avere forma ellittica o sferica. Sono state catalogate più di mille specie di lieviti.
- Alcune specie sono comunemente usate per lievitare il pane e far fermentare le bevande alcoliche. La maggior parte dei lieviti appartiene al gruppo degli **Ascomiceti**.

LIEVITI ENOLOGICI

INDIGENI

Le famiglie di lieviti indigeni si possono suddividere in diverse tipologie ma, principalmente, si individuano quelle che predominano sui grappoli immaturi (*Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) e quelle che si concentrano sui grappoli maturi (come i lieviti apiculati a metabolismo ossidativo *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, assieme ai generi *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*). Il principale agente della fermentazione, *Saccharomyces cerevisiae*, viene spesso rilevato a bassissime concentrazioni sul grappolo.

SELEZIONATI

- Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è scarsamente presente nell'ambiente e, generalmente, anche all'interno dei mosti, dove avviene una lotta per la sopravvivenza tra le varie famiglie di lieviti.
- L'industria ha così sviluppato molti prodotti che si adattano alla tipologia di vino che si vuole produrre: vini bianchi, frizzanti, spumanti, vini rossi giovani o da invecchiamento... Vengono aggiunti solfiti al mosto prima della fermentazione, così da eliminare a priori alcune famiglie di lieviti non resistenti, evitare l'ossidazione e lo sviluppo di batteri.

Colture starter



Le fermentazioni guidate o definite **controllate** sono quelle svolte mediante l'impiego di colture di lieviti selezionati. La selezione viene eseguita generalmente nell'ambito della specie ***S. cerevisiae*** perché rappresenta il lievito che possiede i migliori requisiti enologici, tra cui l'alto potere fermentativo, l'alto potere alcoligeno, la produzione equilibrata di composti secondari.

Colture starter

- I caratteri convenzionali (**caratteri tecnologici**) sono quelli correlati ai parametri che influenzano l'andamento del processo fermentativo
- I caratteri non convenzionali (**caratteri di qualità**) sono invece quelli fondamentalmente riconducibili all'attività metabolica del lievito e comprendono quelle caratteristiche che dipendono dall'attività metabolica del lievito, che porta alla produzione di composti che influenzano la qualità organolettica e salutistica del vino

Colture starter

Caratteri tecnologici

Potere fermentativo (alcol -tolleranza)

Vigore fermentativo

Resistenza alla SO₂

Modalità di sviluppo:

- pulverulento (a cellule disperse)
- a catene cellulari (aggregati)
- flocculento
- con potere schiumogeno
- con potere filmogeno (flor)

Sviluppo a basse temperature

Sviluppo ad alte temperature

Carattere Killer

Resistenza all'essiccazione

Caratteri di qualità

Produzione di prodotti secondari:

- glicerolo
- acido succinico
- acido acetico
- aldeide acetica
- n-Propanolo
- isobutanolo
- alcool amilico attivo
- alcool isoamilico
- β -Feniletanolo

Produzione di composti solforati:

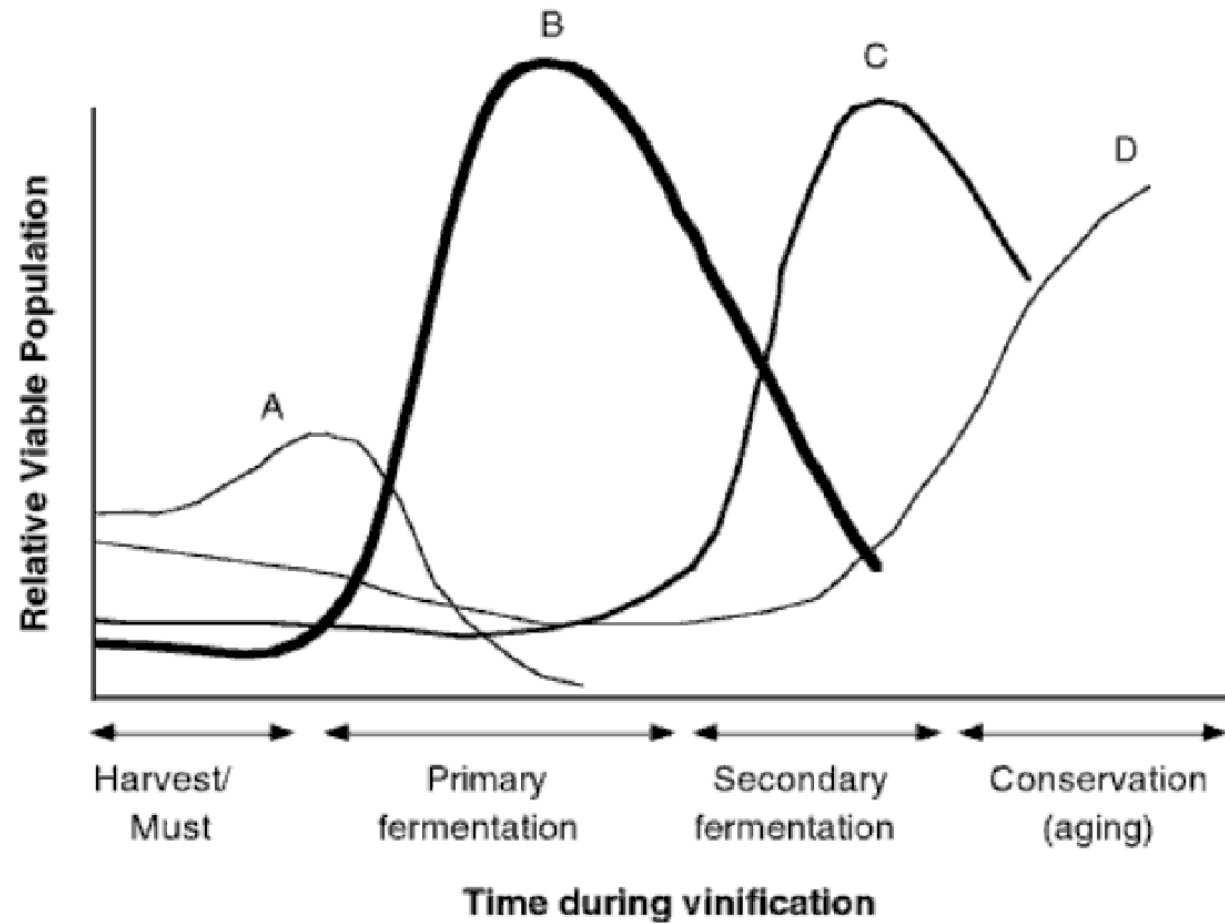
- idrogeno solforato
- anidride solforosa

Azione sull'acido malico

Attività enzimatiche:

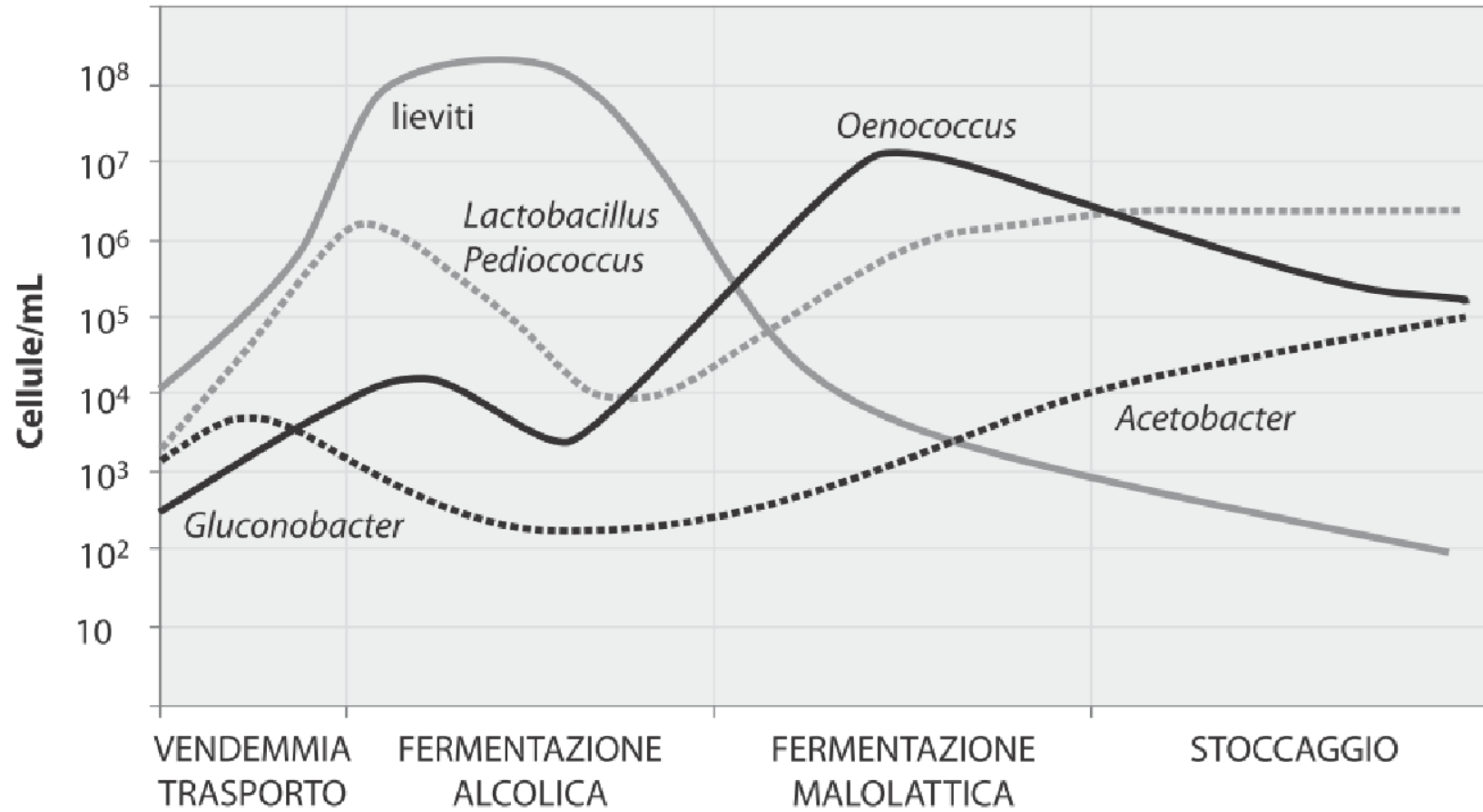
- attività β -glicosidasica
- attività esterasica
- attività proteolitica
- capacità autolitica

Fermentazione spontanea

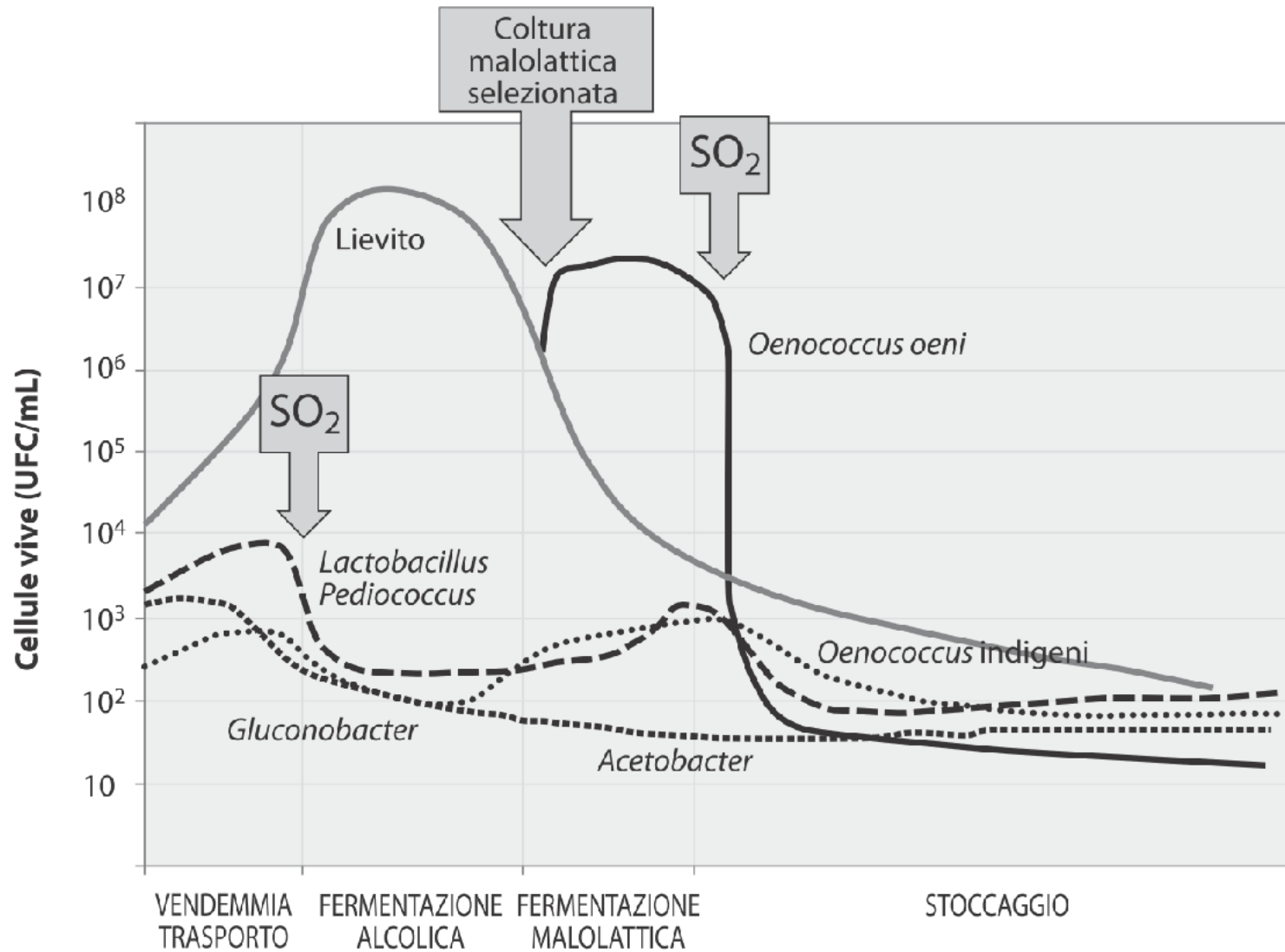


(A) Lieviti non-Saccharomyces; (B) *Saccharomyces*; (C) *Oenococcus oeni*; (D) Lieviti e/o batteri alteranti

Fermentazione spontanea

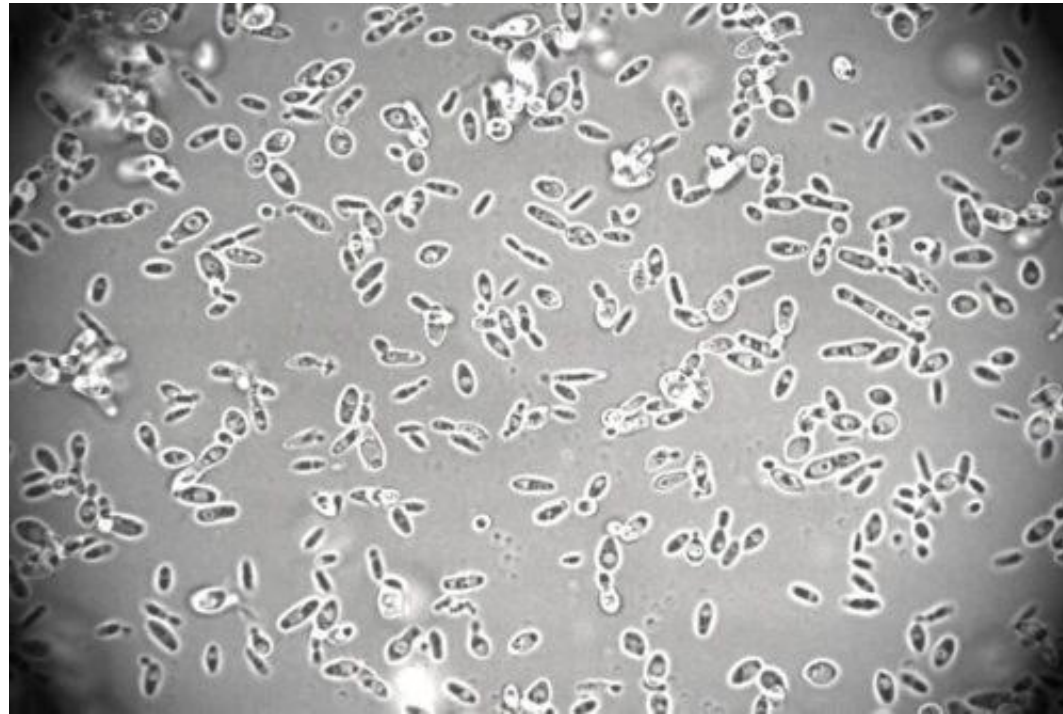


Fermentazione malolattica indotta



Genere *Brettanomyces*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordine	<i>Saccharomycetales</i>
Famiglia	<i>Pichiaceae</i>
Genere	<i>Brettanomyces</i>



Il primo riferimento storico relativo al genere *Brettanomyces* risale al **1904** quando **Claussen** riuscì ad isolare un ceppo di lievito da una lenta fermentazione secondaria avvenuta in una **birra inglese**, cosicché il lievito assunse il nome di *Brettanomyces* che significa 'fungo britannico'.

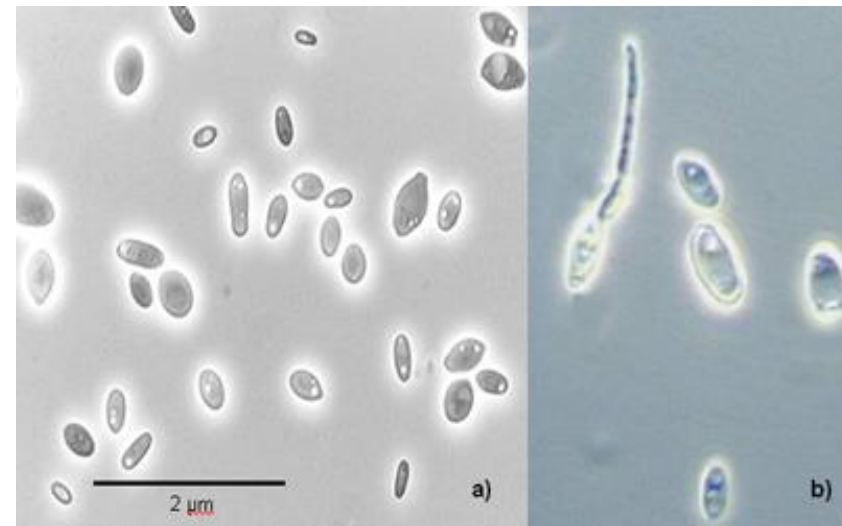
Genere *Brettanomyces*

Venti anni dopo, **Van der Walt** attraverso osservazione microscopica riconobbe che alcune cellule erano in grado di differenziarsi in aschi, dimostrando la possibilità da parte di talune colture di condurre un ciclo sessuale.

La classificazione del genere venne dunque rivista conducendo alla seguente suddivisione:

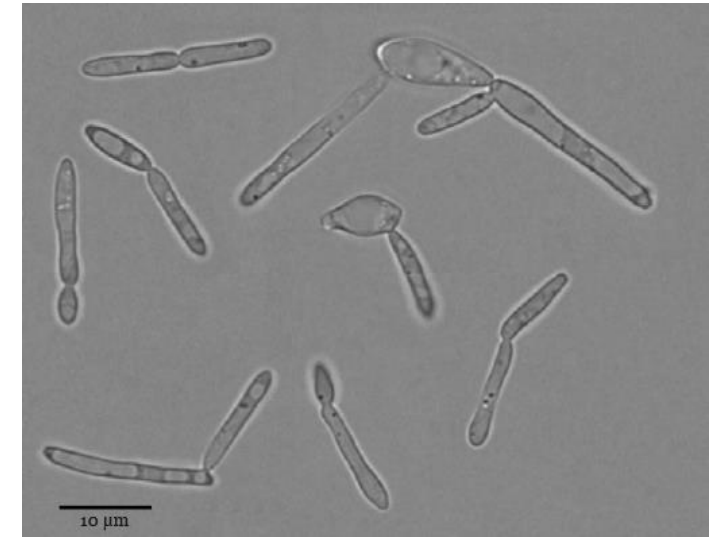
i ceppi capaci di **formare spore** all'interno di un asco vennero raggruppati nel genere *Dekkera*,
mentre quelli di cui **non si riconosceva la forma sessuata** rimasero a costituire il genere *Brettanomyces*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordine	<i>Saccharomycetales</i>
Famiglia	<i>Pichiaceae</i>
Genere	<i>Brettanomyces</i>



Genere *Brettanomyces*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordine	<i>Saccharomycetales</i>
Famiglia	<i>Pichiaceae</i>
Genere	<i>Brettanomyces</i>



Nel contesto prettamente enologico la separazione tra *Brettanomyces* e *Dekkera* è insignificante poiché le tecniche colturali e molecolari usuali non consentono di discriminare tra i due generi e non vi sono evidenze sperimentali di differenze nella manifestazione del fenomeno alterativo

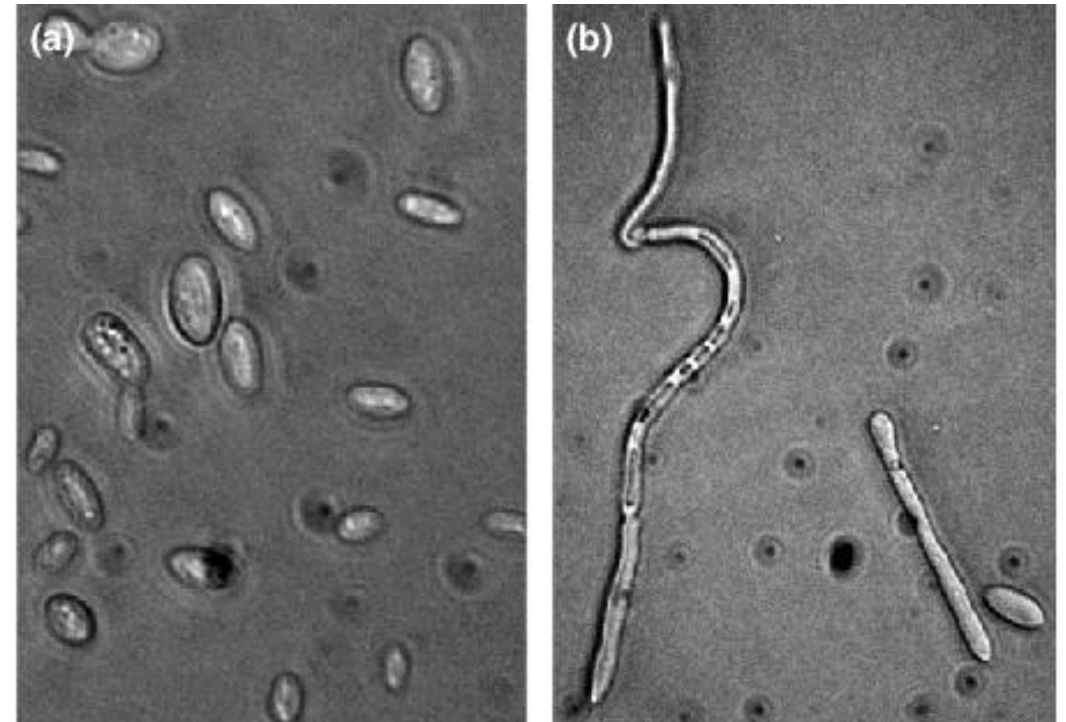
(Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

- Attualmente il genere *Brettanomyces* comprende cinque specie differenti:
- *B. custersianus*,
- *B. naardenensis*,
- *B. nanus*,
- *B. anomalus*,
- ***B. bruxellensis***.

Specie *B. bruxellensis*

Al microscopio le cellule anche appartenenti alla stessa colonia, mostrano un **elevato polimorfismo**, alternando forme ellissoidali o ogivali di dimensioni **2 - 5 μm** , con altre cilindriche, talora molto allungate, di dimensioni **5 - 25 μm** . La gemmazione può essere bipolare o multilaterale.

Le cellule si presentano singole, in coppia, in corte catenelle o a grappoli. In colture vecchie o in condizioni stressanti possono formare pseudomicelio Settato.

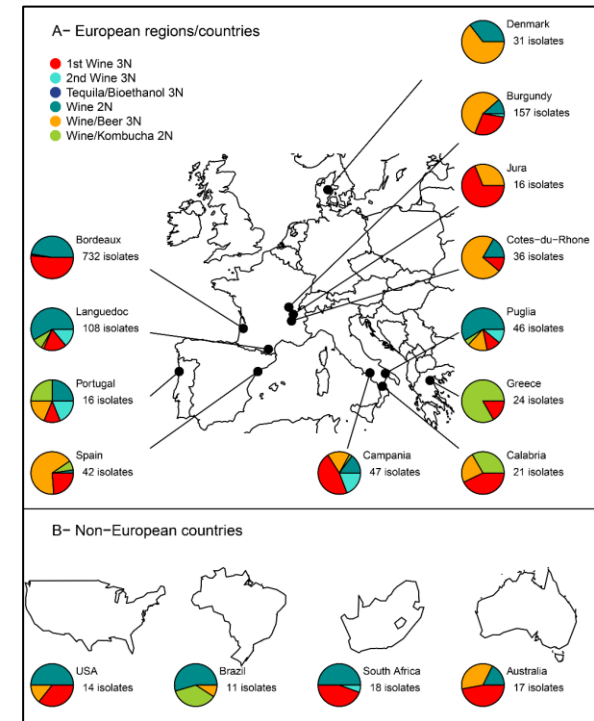


Specie *B. bruxellensis*

Al *B. bruxellensis* è dedicata una vasta bibliografia, con oltre **3.500 articoli** pubblicati negli ultimi vent'anni. 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**.

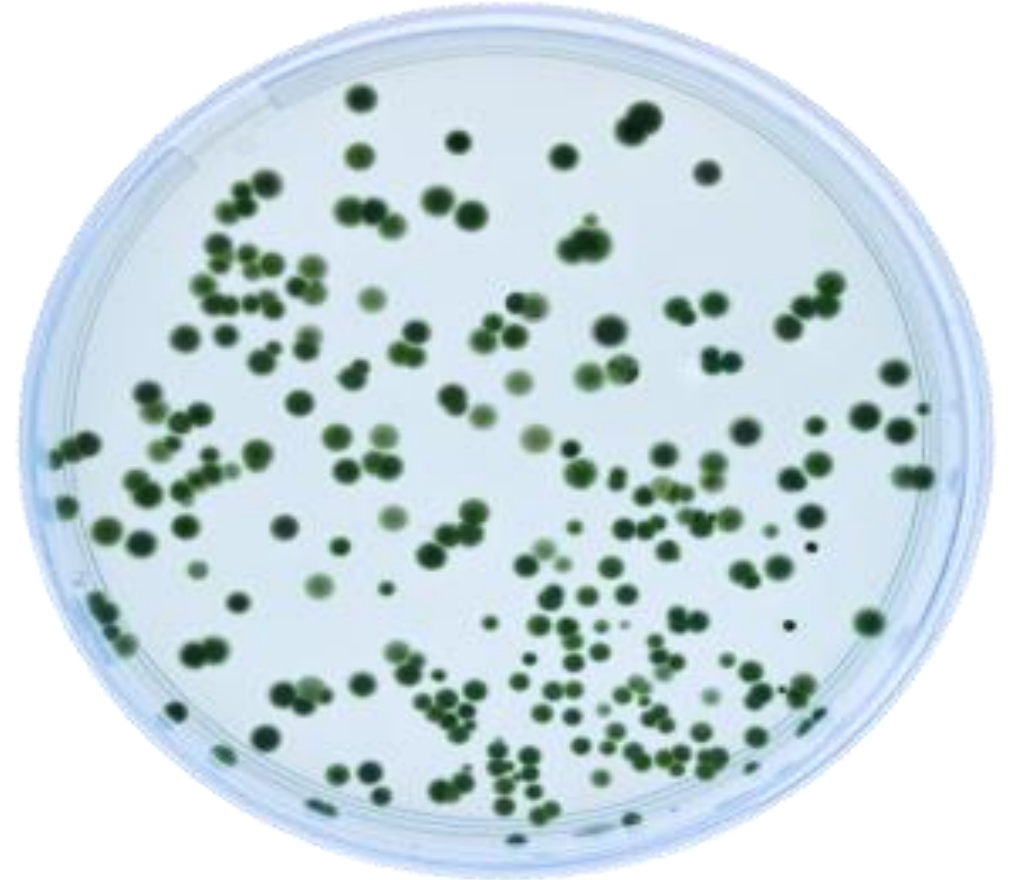
La differenza più importante consiste nell'elevata tolleranza e resistenza dei ceppi triploidi nei confronti dell'anidride solforosa.

L'utilizzo sempre più **massivo dell'anidride solforosa** nell'industria enologica sembrerebbe aver **favorito la selezione dei ceppi triploidi** tolleranti e resistenti.



Specie *B. bruxellensis*

Durante una carenza nutrizionale molto prolungata, le cellule di *Brettanomyces* possono entrare in uno stato definito **Vitale ma Non Coltivabile (VNC)** e cioè non sono più in grado di formare direttamente colonie in piastra, ma necessitano una fase di arricchimento in brodo per riprendere una crescita normale (*Millet e Lonvaud, 2000*).



Nel genere *Dekkera* le cellule vegetative diploidi si trasformano direttamente in aschi contenenti da 1 a 4 meiospore aploidi.

Specie *B. bruxellensis*

VITALITA' - COLTIVABILITA' = VBNC



0,4 mg/L SO₂ in SWM (Agnolucci et al., 2010)

0,8 mg/L SO₂ in SWM (Serpaggi et al., 2012)

0,25 mg/L SO₂ in vino (Du Toit et al., 2005)

1,4 mg/L SO₂ in vino (Agnolucci et al., 2013)

Secondo le normali pratiche enologiche i tenori di anidride solforosa libera consigliati per la conservazione dei vini variano da 20 a 30 mg/l. (Ribereau Gayon et al., 2003)

pH = 3.5

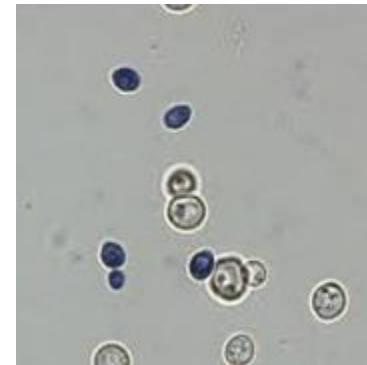
13% etanolo (v/v)

T = 19°C



0.67-1 mg/l

SO₂ molecolare



Specie *B. bruxellensis*

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*.

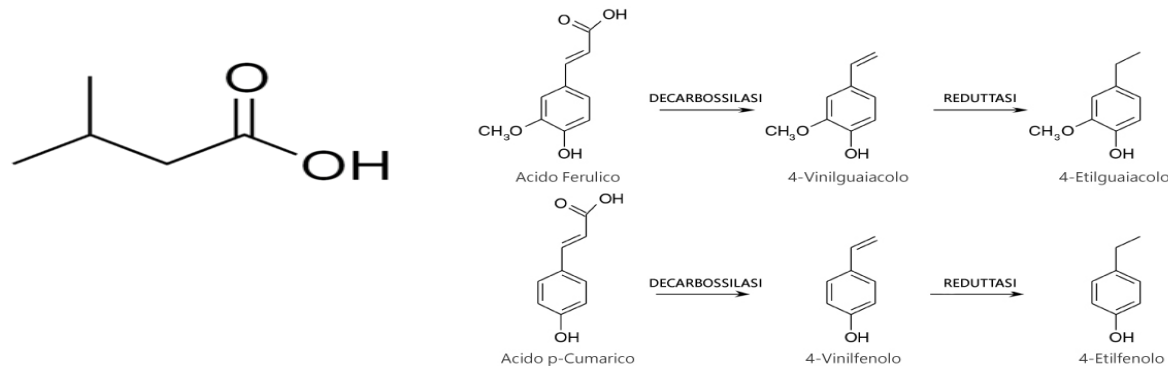


O

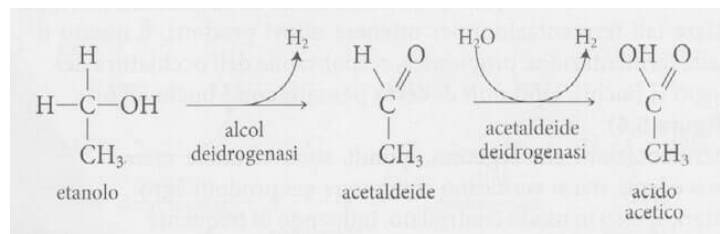


Metabolismo e resistenza

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

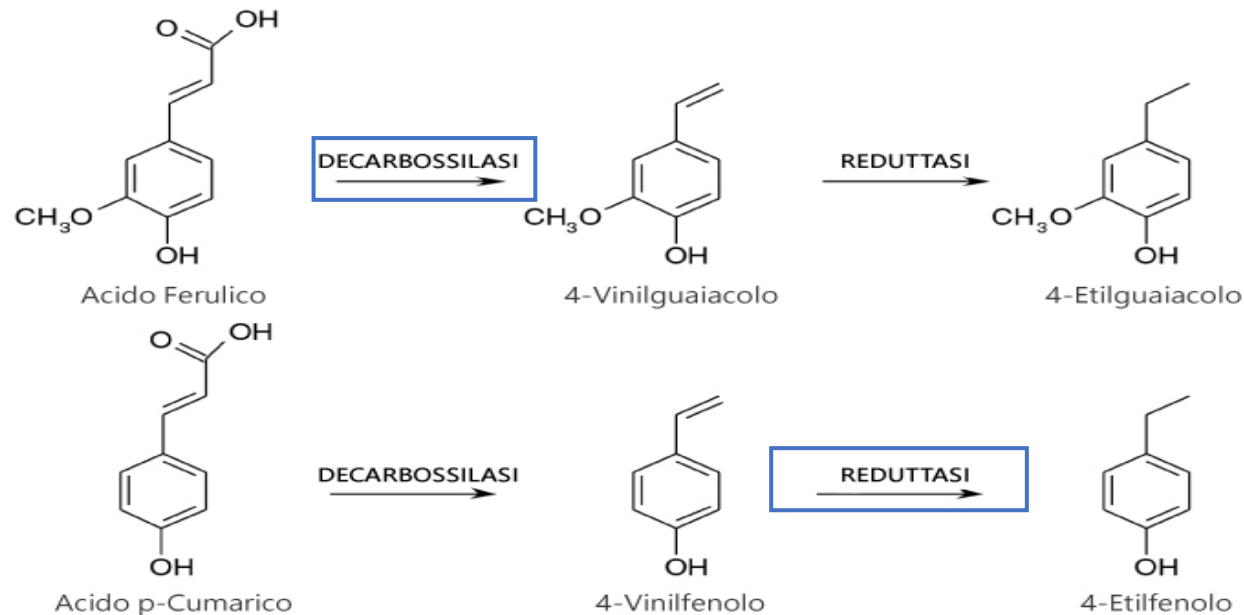


- Fenoli volatili
- Acido acetico
- Acidi grassi volatili
- Ammine biogene
- Tetraidropiridine

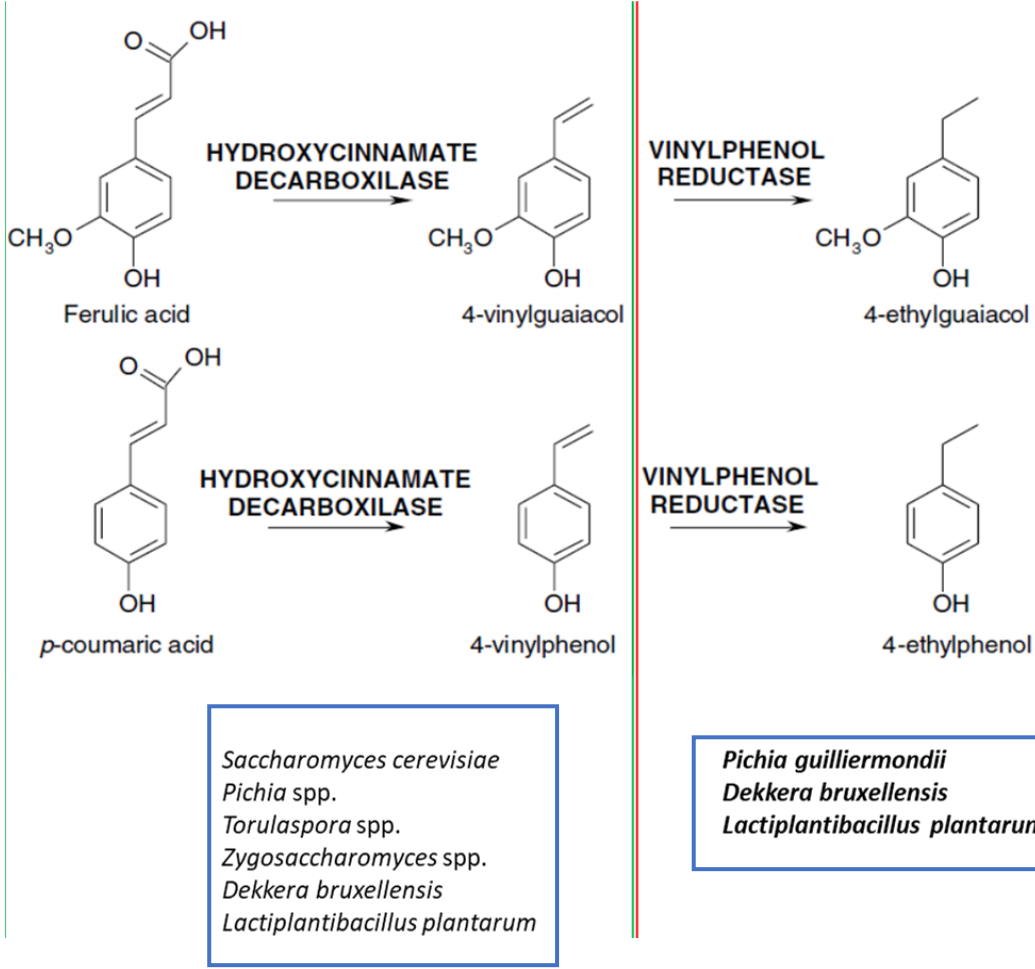


Fenoli volatili

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.



Fenoli volatili



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**. 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 reductasi* (Dias et al., 2003).

Deviazioni organolettiche di tipo “fenolico”

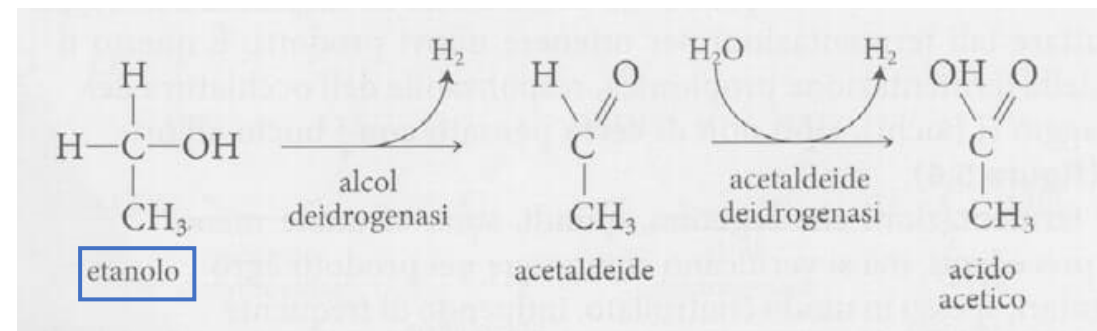
Quando il vino è conservato per molto tempo in determinate condizioni si possono sviluppare alcune specie di batteri e lieviti che possono rilasciare metaboliti talvolta causa di gravi alterazioni organolettiche.

MOLECOLA	SOGLIA DI IDENTIFICAZIONE	DESCRITTORI
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	

Acido acetico

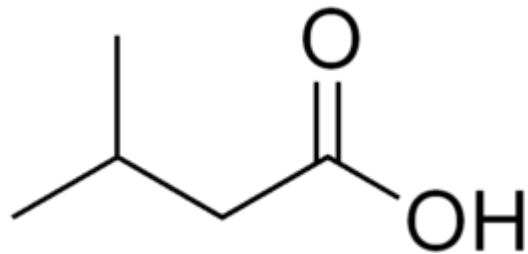
La formazione di acidità volatile da parte di lieviti e batteri può influenzare negativamente la qualità organolettica dei vini. Circa il 90% dell'acidità volatile nei vini è costituita dall'acido acetico, presente solitamente in **concentrazioni variabili di 0,2 – 0,8 g/L** a seconda della tipologia di vino prodotto.

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⁺ dipendente.



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.

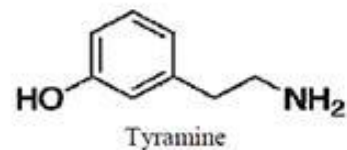
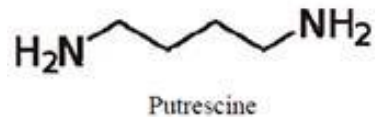
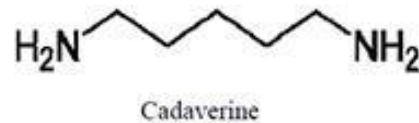
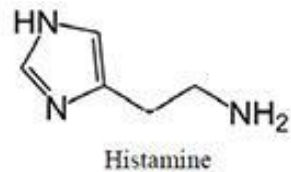


La formazione di questi composti avviene in seguito alla degradazione di alcuni amminoacidi quali la **valina**, la **leucina** e l'**isoleucina**.

Ammine biogene

La formazione di questi composti avviene per decarbossilazione degli **amminoacidi** ed è dovuta all'azione di un complesso enzimatico noto come amminoacido decarbossilasi, in presenza del coenzima piridossalfosfato.

B. bruxellensis può riuscire a produrre nel vino fino a **15 g/L di ammine biogene**.

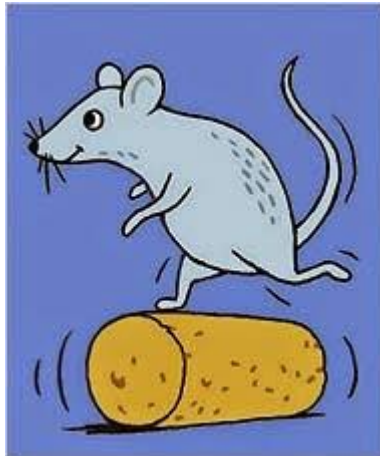


- metilammina,
- etanolammina,
- cadaverina,
- putrescina,
- triptamina,
- istamina,
- Agmatina,
- 2-fenilettilammina

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*.

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.

Prevenzione e controllo

- Metodo coltura dipendente
- Metodo coltura indipendente



Metodo coltura dipendente

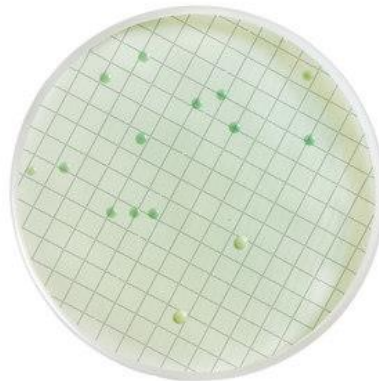
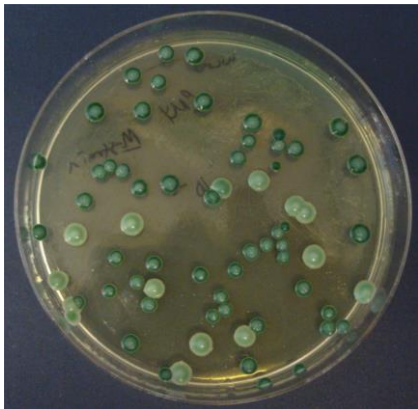
- Il primo approccio, di tipo coltura-dipendente, prevede l'utilizzo di terreni solidi selettivi che possono essere impiegati mediante tecniche di semina del campione o per filtrazione del campione stesso su membrane che successivamente vengono posizionate sul terreno di coltura.
- Poiché le tecniche coltura-dipendenti per la conta di *Brettanomyces spp.* possono richiedere fino a **8-10 giorni**, appare di notevole interesse l'applicazione di metodi rapidi che consentono di monitorare la presenza di *Brettanomyces* in modo da poter intervenire tempestivamente per il ripristino delle condizioni ottimali di processo.



- Recentemente, diversi autori hanno investigato circa la possibilità di contaminazione da parte di *Brettanomyces spp.* proveniente dall'aria.
- Seppur la maggior parte dei lieviti isolati appartengono al gruppo dei non-*Saccharomyces* come ad esempio specie appartenente al genere *Sporidiobolus* e *Cryptococcus*, alcuni ricercatori hanno evidenziato la presenza di *Brettanomyces/Dekkera* in alcune aree predisposte alla vinificazione, dimostrando che anche l'aria può essere veicolo di contaminazione.

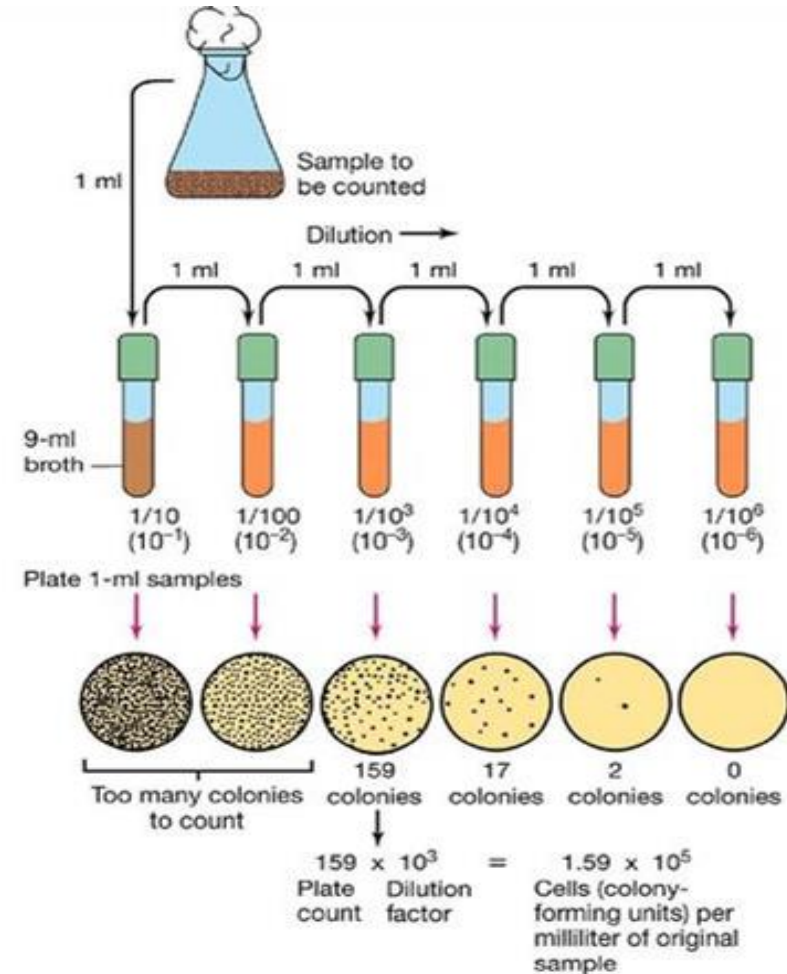
Tecniche coltura dipendenti

- Terreni di coltura selettivi
 - ✓ *WL + Cicloesimide*
 - ✓ *DBDM*
- Terreni di arricchimento
 - ✓ *EBB medium*



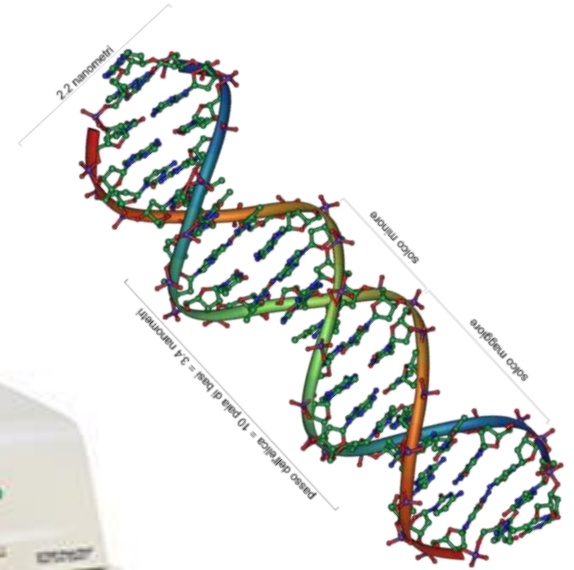
Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*

N. Rodrigues, G. Gonçalves, S. Pereira-da-Silva, M. Malfeito-Ferreira and V. Loureiro
Laboratório de Microbiologia, Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal



Metodo coltura indipendente

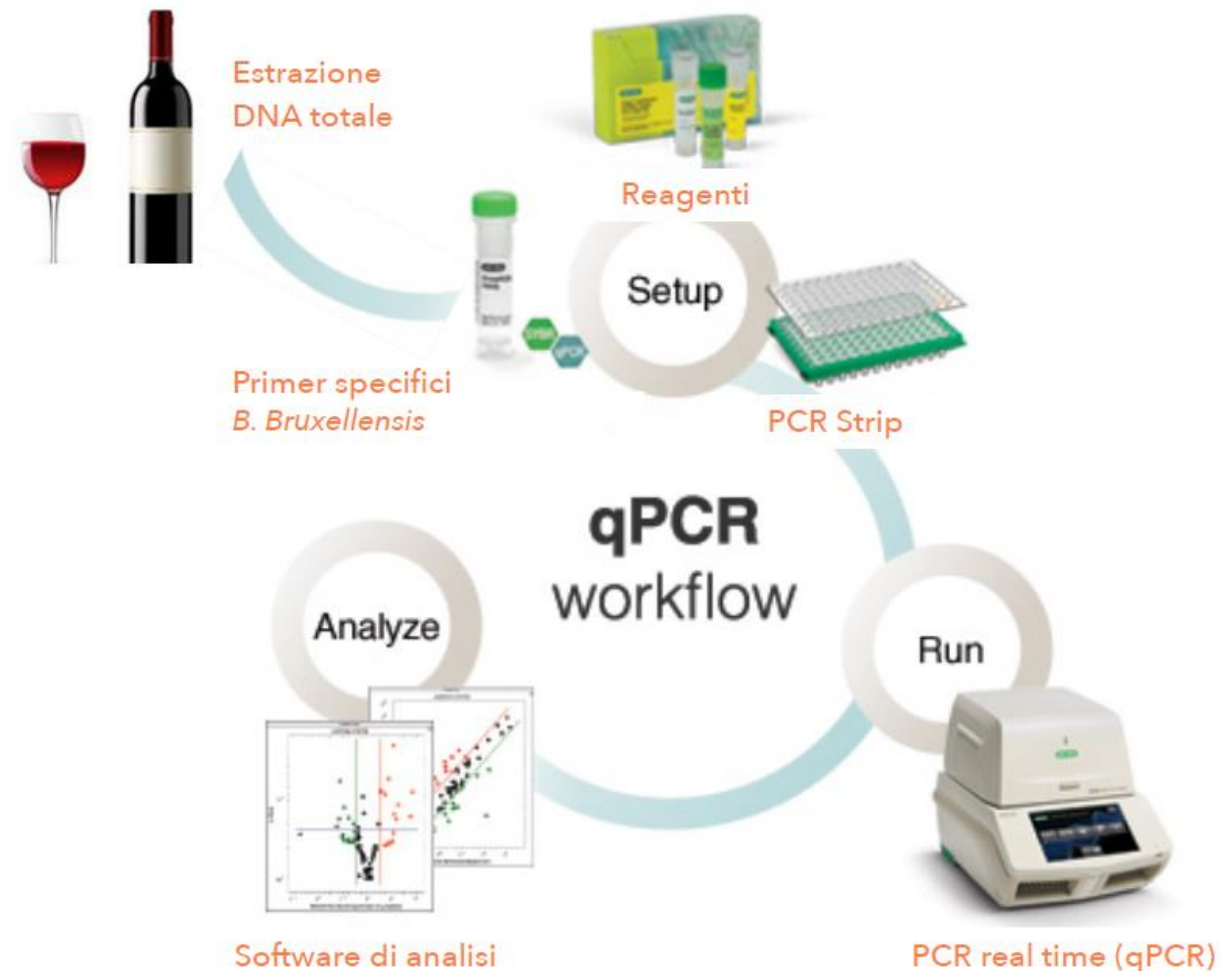
- Lo sviluppo di tecniche di PCR e l'incremento esponenziale in database di sequenze di DNA, che permettono di disegnare sonde sempre più specifiche, hanno guidato il perfezionamento di sistemi coltura-indipendenti per la quantificazione dei microrganismi. Per ottenere risultati attendibili da un processo basato su sistemi coltura-indipendenti è, senza dubbio, necessario disporre di un buon protocollo di estrazione del DNA.



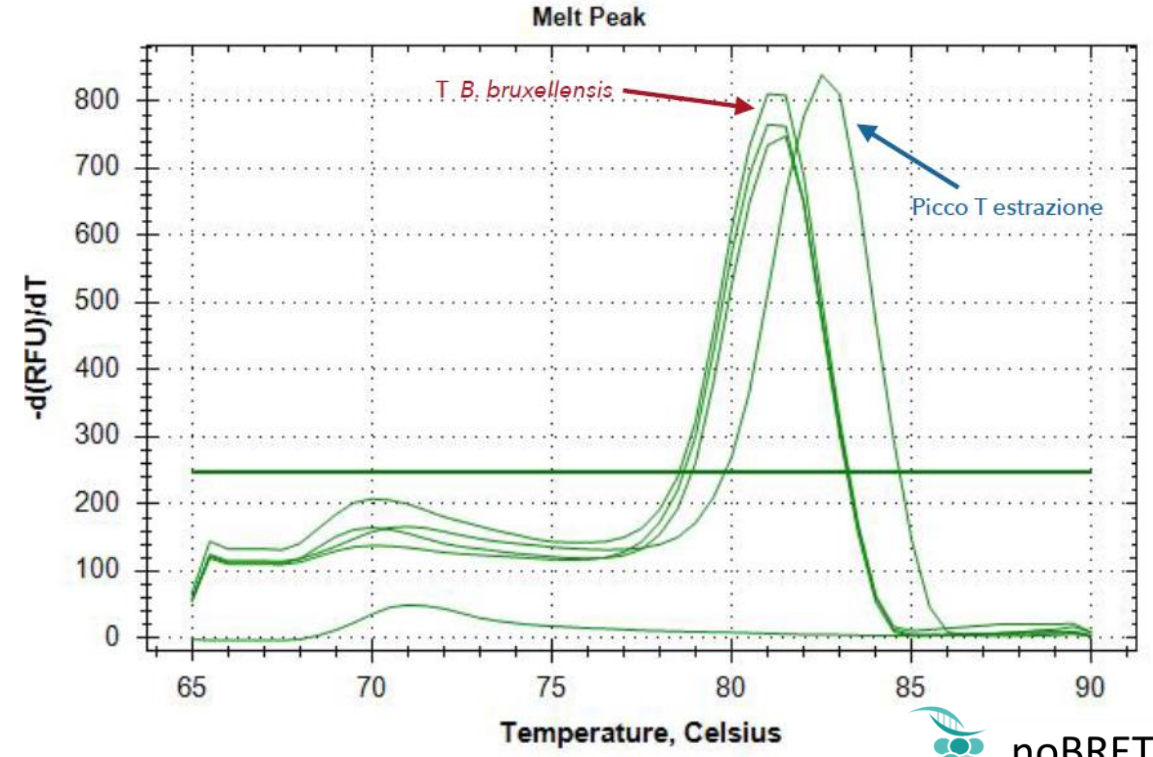
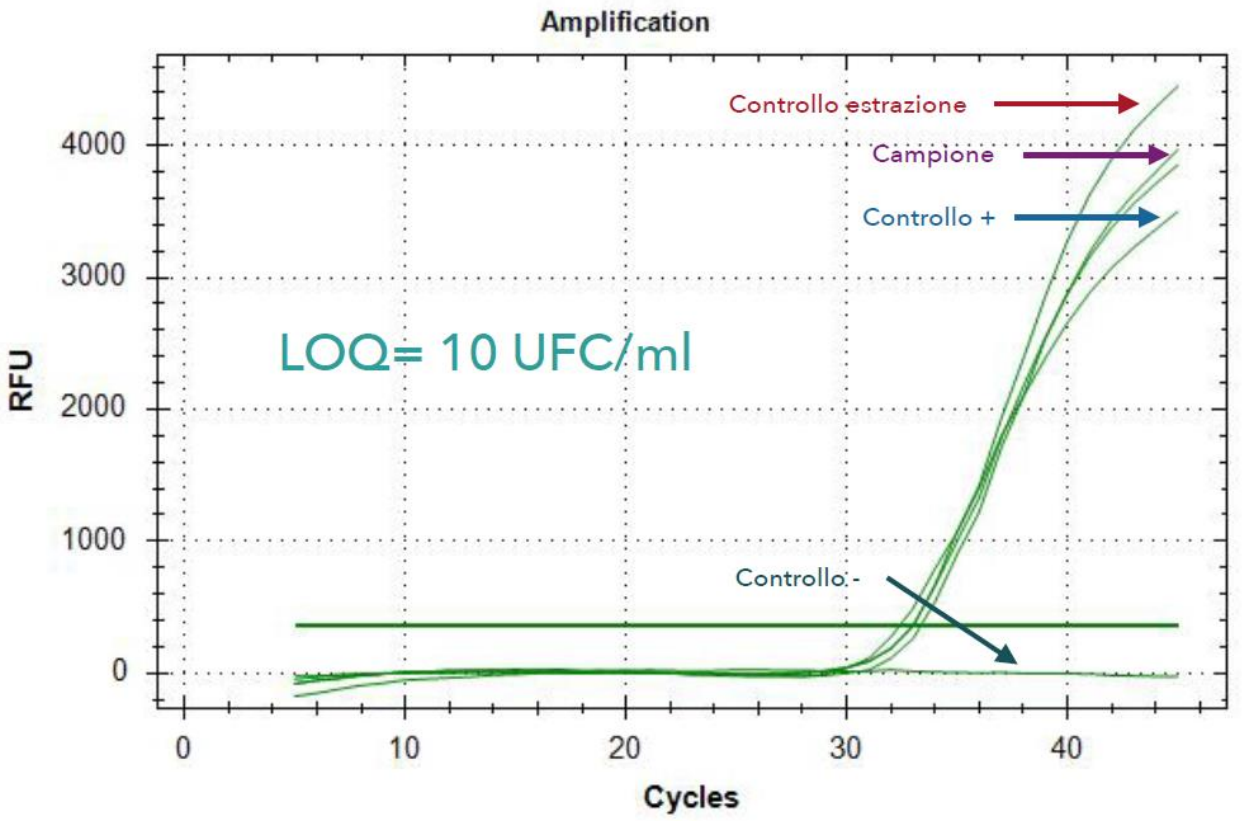
Risultato in
24H

Metodo coltura indipendente

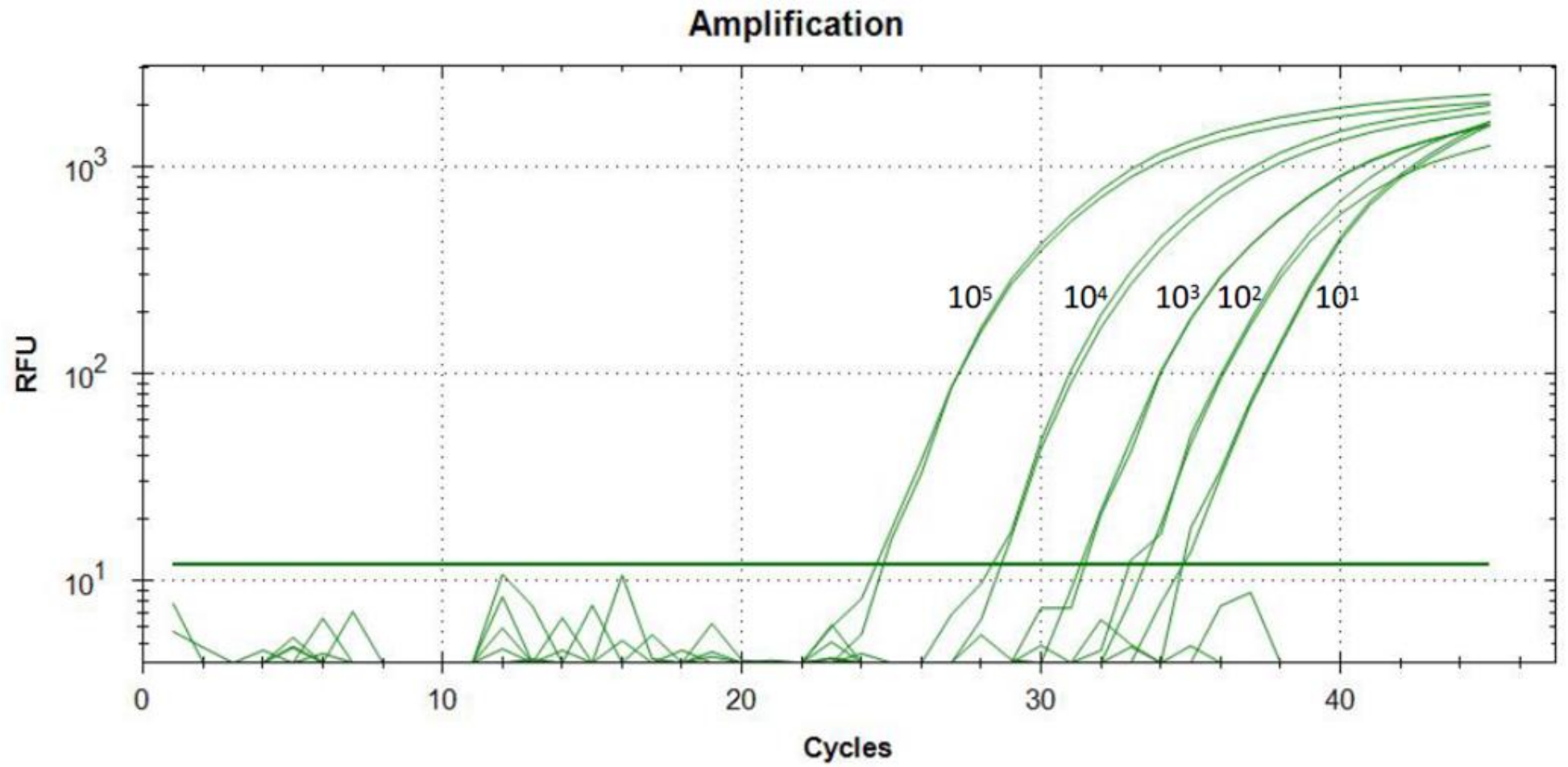
Tecniche basate sull'analisi del DNA estratto da uva, mosto, vino



Metodo coltura indipendente



Metodo coltura indipendente





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



GRUPPO OPERATIVO

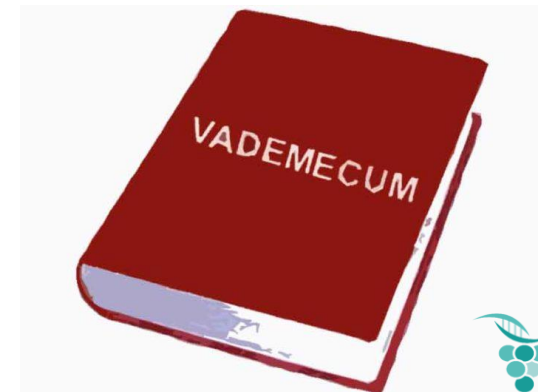
NOBrett



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

Risultati concreti attesi

1. Messa a punto di un protocollo per il monitoraggio e il contenimento dello sviluppo di *Brettanomyces bruxellensis* nella filiera vitivinicola.
2. Divulgazione delle informazioni al settore vitivinicolo regionale.
3. Abbattimento dei fenoli volatili nel vino attraverso strategie innovative e secondo i criteri della sostenibilità ambientale, utilizzando strategie di contenimento a ridotto impatto ambientale quali l'utilizzo dell'ozono e del chitosano.
4. Sviluppo di un protocollo per la riduzione dei fenoli volatili.
5. Miglioramento delle caratteristiche organolettiche e qualitative dei vini con la conseguente tutela delle Denominazioni di Origine e del patrimonio enologico e culturale.





noBRETT

Gli obiettivi del lavoro dovevano 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 le tecniche di monitoraggio di *Brettanomyces bruxellensis* sulle superfici delle attrezzature e dei vasi vinari in acciaio, delle vasche in cemento o dei legni ed agendo con tecnologie rivolte alla riduzione della carica microbica.
- Sul **vino** mediante monitoraggio da fine fermentazione e nel corso dell’affinamento fino all’imbottigliamento, per 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.



Analisi sensoriali dei vini

1. PANEL COMPOSTO DA 4 ENOLOGI SPECIALIZZATI (VALUTAZIONE TECNICA)

- Valutazione dei dati analitici
- Analisi sensoriale dei vini
- **VINO ROSSO 1**: semplice a livello olfattivo e gustativo, poco strutturato
- **VINO ROSSO 2**: > complessità e struttura



DEGUSTATORE:		ID. CAMPIONE:	VARIETA':									
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Esame visivo	Complessità											
	Tonalità											
	Intensità											
Esame olfattivo	Intensità											
	Franchessa											
	Finezza											
	Complettività											
	Florante											
	Fruitate											
	Vegetale											
	Minerale											
	Etereo											
	Speziato											
	Boato											
Difetto "Brett"	Fermentazione											
	Stallo											
	Sapore di cavallo											
	Carofino											
	Affermato											
Esame gustativo	Struttura											
	Morbidezza											
	Acidità											
	Seccità											
	Astringenza											
	Evoluzione Termica											
	Equilibrio											
	Finezza											
Perseveranza												
Note												

Analisi sensoriali del vini

2. PANEL COMPOSTO DA 2 GRUPPI DI 8 SOMMELIER (RAPPRESENTANTI DEI CONSUMATORI)

Degustazione e questionario:

- I vini sono differenti tra loro?
- Il difetto è identificato?
- La presenza di fenoli volatili in tenori limitati (< soglia di identificazione) può partecipare alla complessità del vino o incide negativamente?
- La presenza di fenoli volatili rende in ogni caso i vini sconsigliabili?

Analisi sensoriali del vini

	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

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?

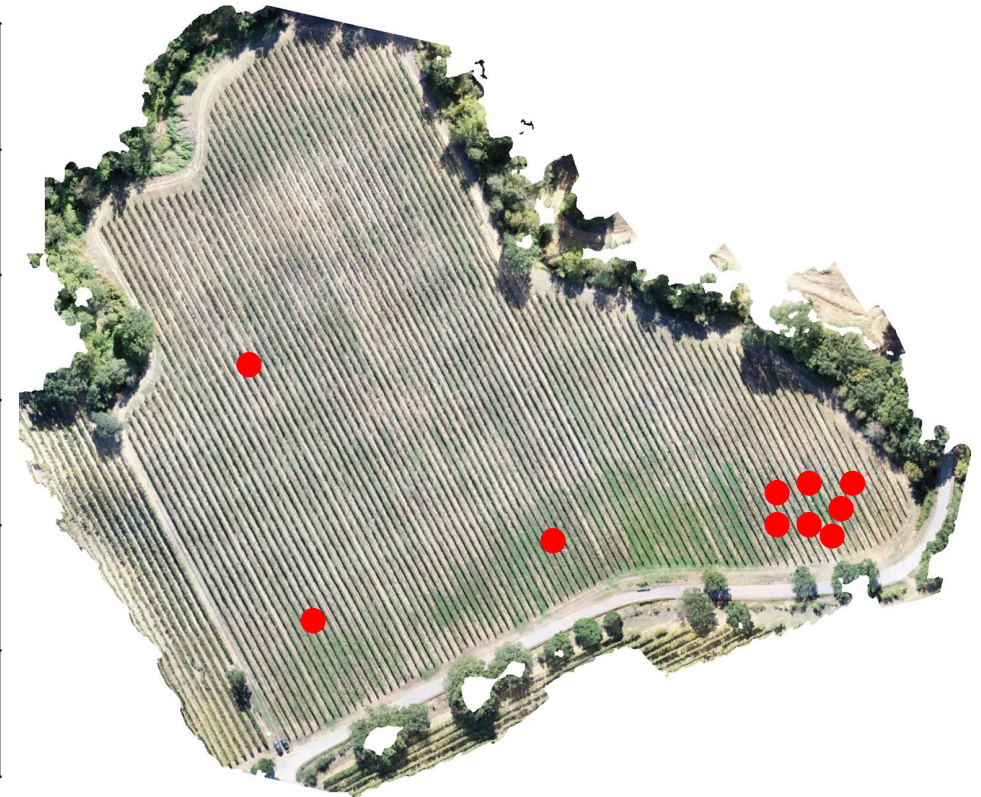
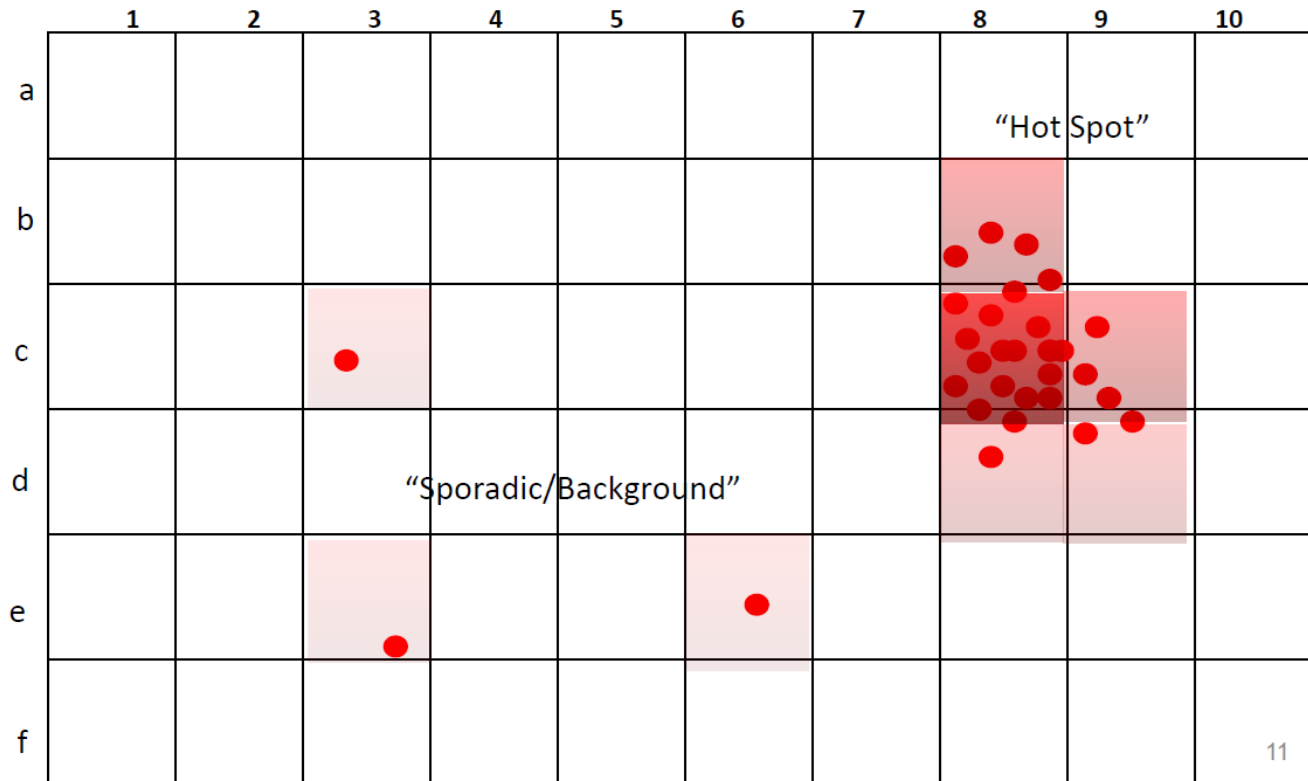
Analisi sensoriali del vini

	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

RISULTATI

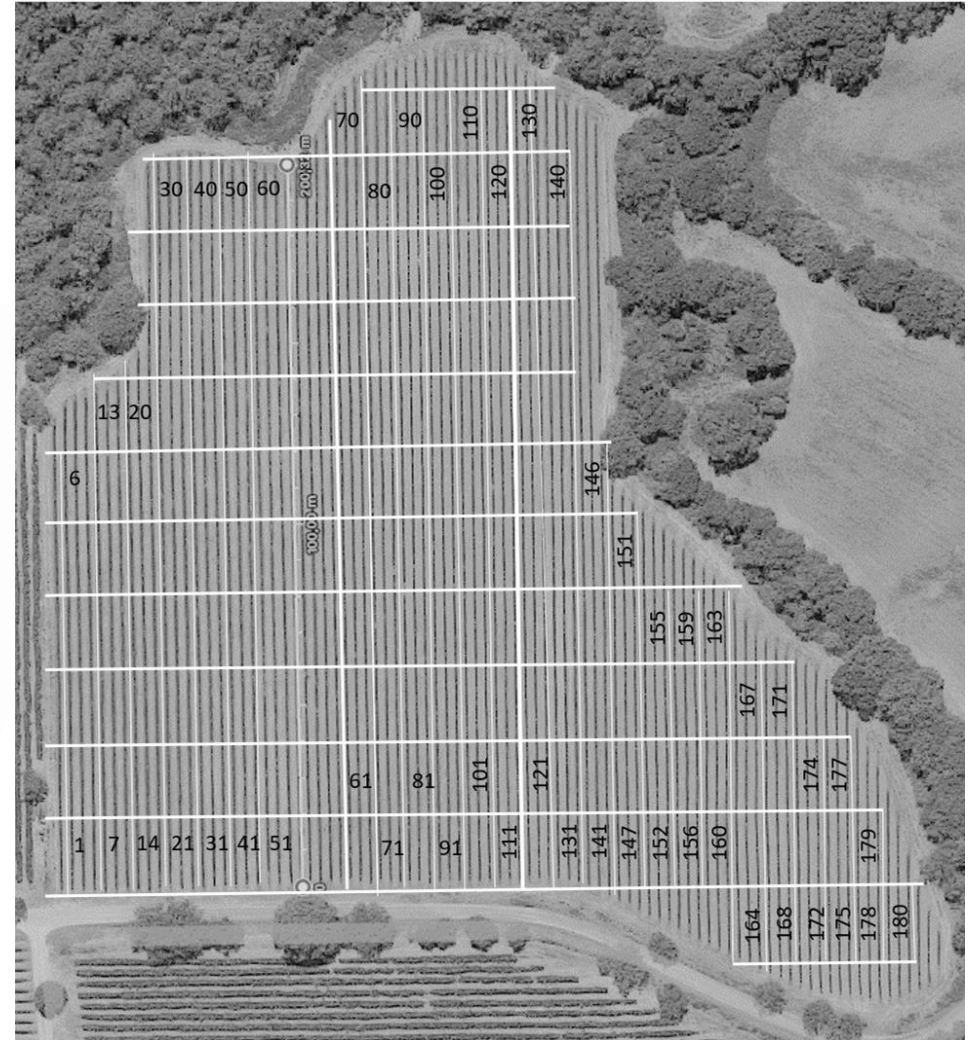
- La presenza di fenoli volati è negativa anche nei vini più complessi in cui il difetto potrebbe essere mascherato da più composti volatili
- La presenza di fenoli volatili, anche al di sotto della soglia di identificazione, influenza negativamente i vini

Distribuzione microrganismi inquinanti



I punti rossi mostrano la possibile distribuzione di un organismo patogeno su una superficie.

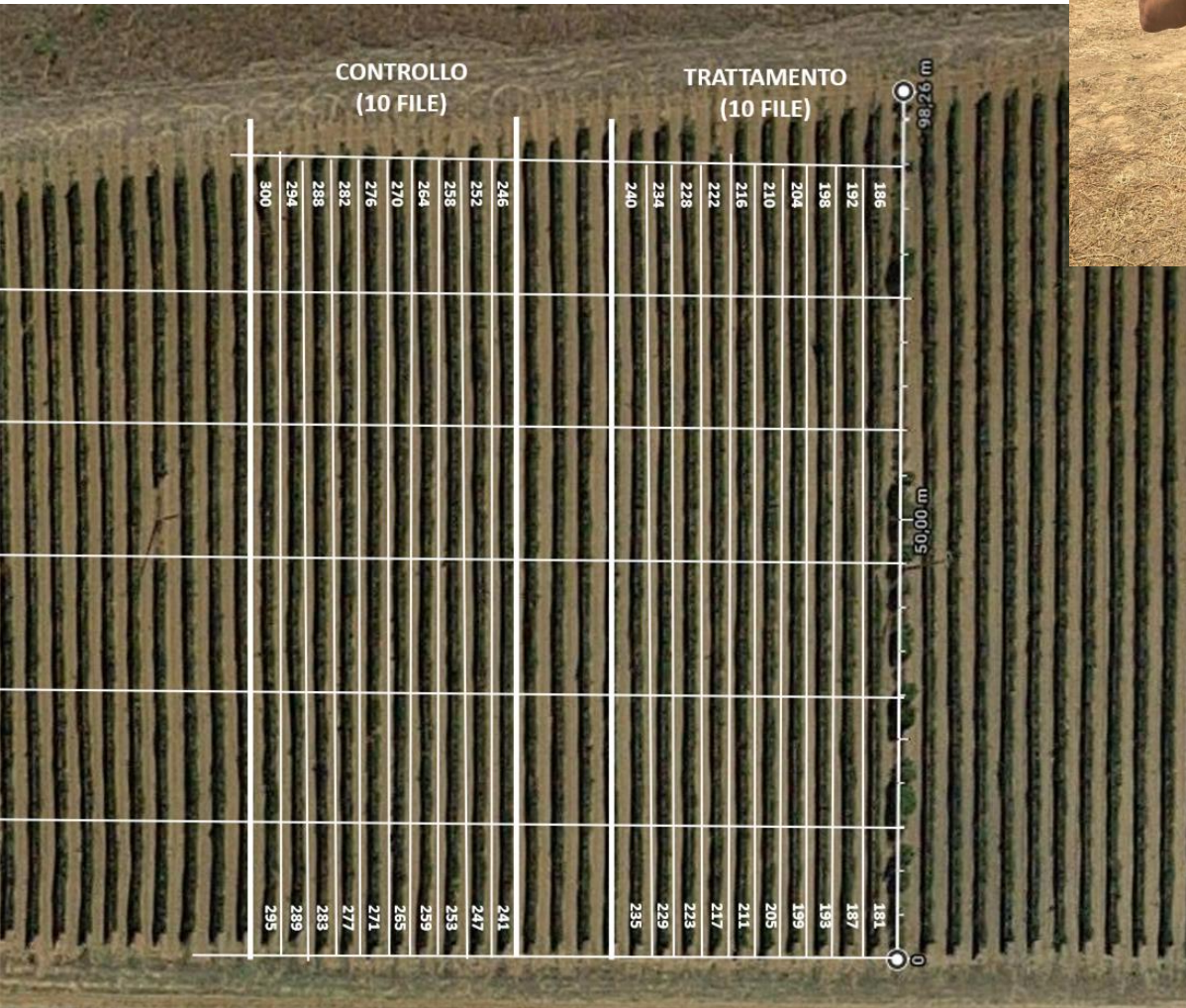
N=60



Campioni Rappresentativi Multipli sono la migliore opzione per rilevare contaminazioni occasionali

Consentono di ipotizzare con il 95% di certezza che non più del 5% dei campioni della stessa dimensione nell'intero lotto sono contaminati

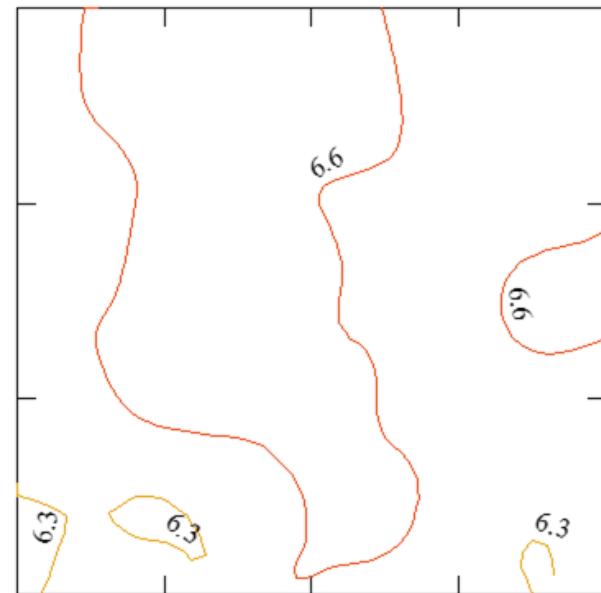
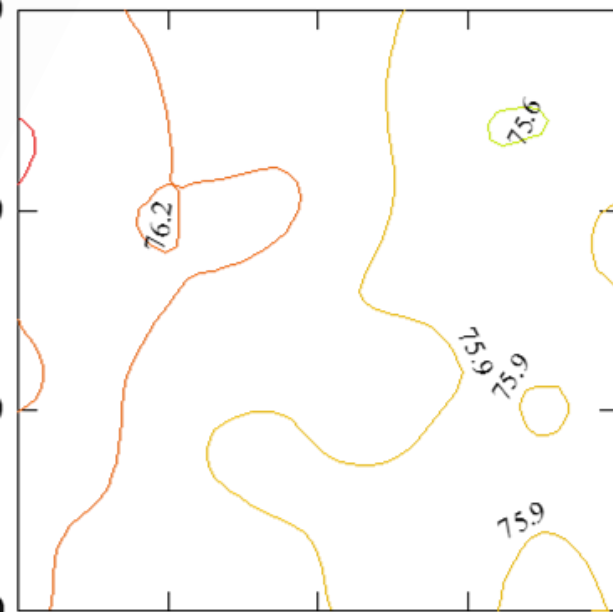
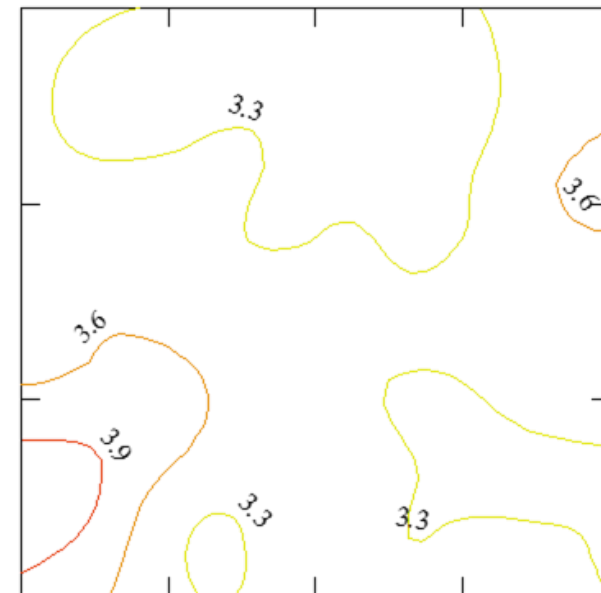
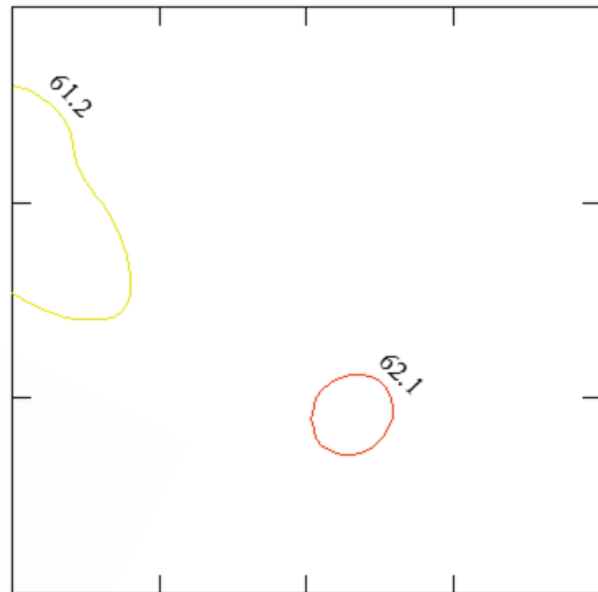
N=60



Analisi chimiche



Mappatura



Utilizzazione di droni



Altimetria

Digital Elevation Model

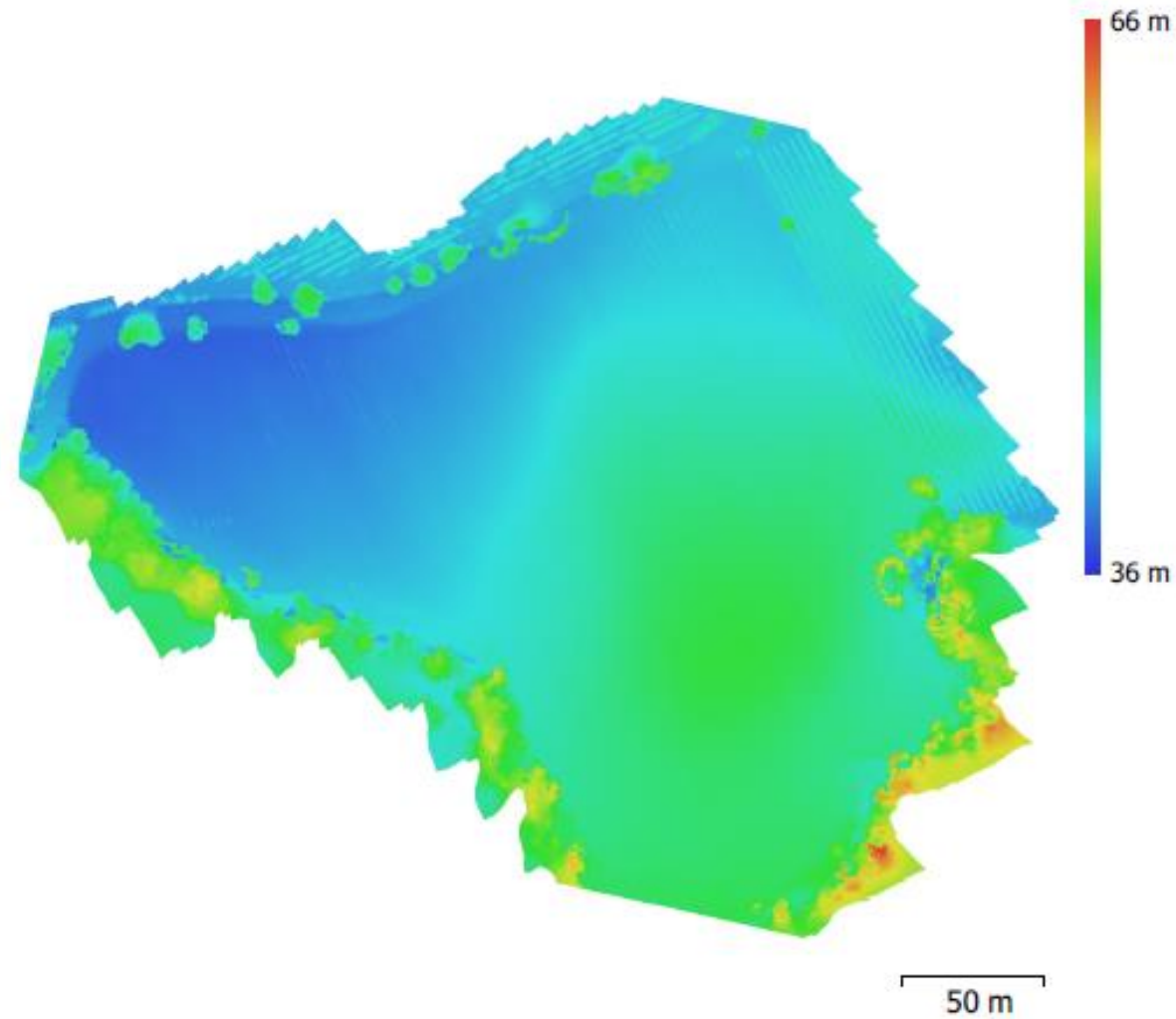


Fig. 4. Reconstructed digital elevation model.

Resolution: 4.47 cm/pix
Point density: 501 points/m²

Mappatura nel visibile



Mappatura nel R NIR



Monitoraggio di *B. bruxellensis* nel vigneto

Quantificazione di *B. bruxellensis* all'interno del vigneto delle aziende partner mediante tecnica qPCR.



2020	pH	Ac. tot (g/L)	G+F (g/L)	A. Alfa-ammi. (mg/L)	A. ammo (mg/L)	APA (mg/L)	B. bruxellensis (log cell/ml)
MAX	3,47	7,64	247,00	131,00	113,00	233,00	1,10
MIN	3,21	5,38	172,00	19,00	20,00	45,00	1,10

2021	pH	Ac. tot (g/L)	G+F (g/L)	A. Alfa-ammi. (mg/L)	A. ammo (mg/L)	APA (mg/L)	B. bruxellensis (log cell/ml)
MAX	3,60	8,67	264,42	122	111,00	225,00	1,20
MIN	2,27	5,21	169,47	25,00	3,00	47,00	1,10

Numero campioni eseguiti: **610**
In prossimità vendemmia

Descrizione campione	pH	Ac. tot (g/L)	G+F (g/L)	A. Alfa-ammi. (mg/L)	A. ammo (mg/L)	APA (mg/L)	B. bruxellensis. (log cell/ml)
2020-18	3,31	6,59	212	79	50	129	1,10
2020-229	3,32	6,73	178	93	85	178	1,2
2020-291	3,29	7,40	188	88	69	157	1,12
2021-134	3,2	7,74	218,93	88	55	143	1,2
2021-53	3,05	6,81	225,51	96	25	121	1,01



noBRETT

Gli obiettivi del lavoro dovevano 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.

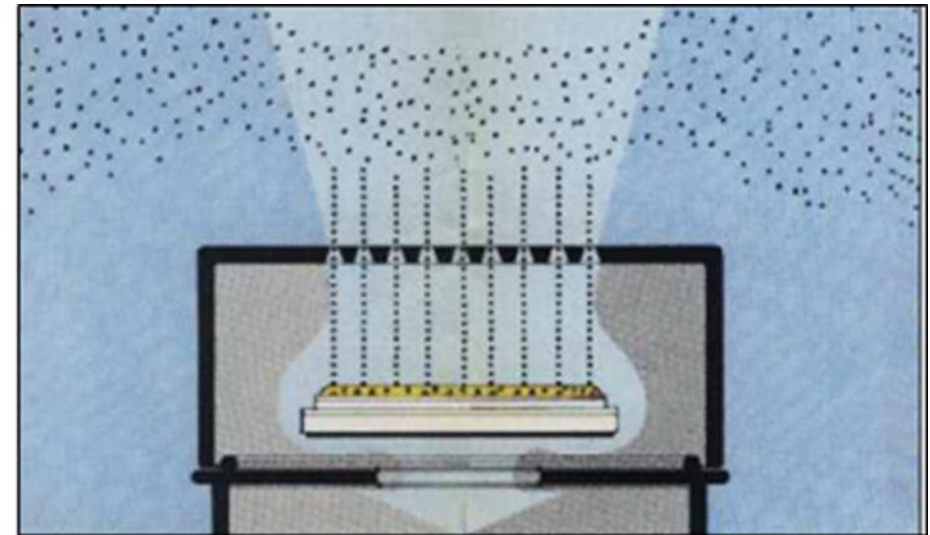
- Negli **impianti di vinificazione**, applicando le tecniche di monitoraggio di *Brettanomyces bruxellensis* sulle superfici delle attrezzature e dei vasi vinari in acciaio, delle vasche in cemento o dei legni ed agendo con tecnologie rivolte alla riduzione della carica microbica.

- Sul **vino** mediante monitoraggio da fine fermentazione e nel corso dell’affinamento fino all’imbottigliamento, per 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.

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 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 ogni punto di campionamento sono stati prelevati **1000 L** di aria su 5 piastre da 90 mm.



Risultati analisi Aria ambientale



Cantina A

Nome	Brett UFC/ml	Muffe UFC/ml
Barricaia centro	<10	51
Barricaia ingresso	<10	34
Travasò tank coperchio	<10	12
Travasò tank corridoio	<10	7
Centro cantina	<10	15

Cantina B

Nome	Brett UFC/ml	Muffe UFC/ml
Vasca cemento travaso Coperchio	<10	12
Vasca cemento travaso corridoio	<10	17
Corridoio	<10	65
Piano superiore	<10	31

Risultati analisi Tamponi superficiali



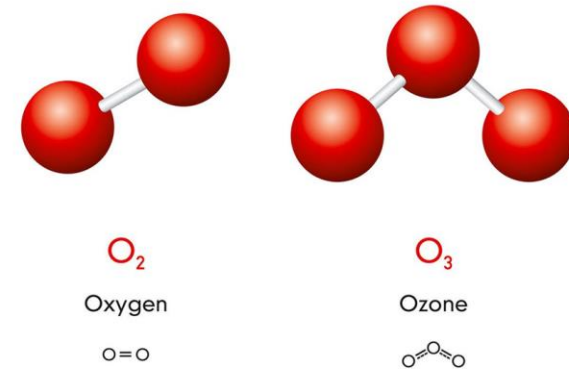
Tamponi pompa di trasferimento vino barrique

Nome	Brett UFC/ml
Travaso barrique 141	$1,5 \cdot 10^1$
Travaso barrique 141 sanificato	<10
Travaso barrique 142	$3,3 \cdot 10^2$
Travaso barrique 142 sanificato	<10
Travaso barrique 197	$3,0 \cdot 10^1$
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

Soluzione di metabisolfito di potassio (5 g/l).

Sanificazione attrezzature, superfici e serbatoi

- La sanificazione con **OZONO** e **VAPORE** viene applicata su quelle attrezzature che sono determinanti nella contaminazione da *Brett*. Queste sono le **pompe, raccordi e tubazioni**; i **legni** utilizzati per l'affinamento, le **vasche di cemento**, i **macchinari** utilizzati per la filtrazione e l'imbottigliamento.



In base ai risultati ottenuti, 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 saranno sanificati con l'utilizzo dell'Ozono gassoso, tre con Acqua Ozonizzata e tre con il vapore.



Barrique n°	<i>B. bruxellensis</i> (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

Protocollo di lavaggio PRE-trattamento

- 1) Travasare il vino contenuto all'interno delle barriques da sanificare;
- 2) Sciacquare a perdere con mediante l'impiego di una *lava-barrique*;
- 3) Lavare a ciclo chiuso con 50 L di una soluzione di bicarbonato di potassio al 5%;
- 4) Sciacquare a perdere e lavare nuovamente a ciclo chiuso con 50 L di una soluzione di acido citrico all'1%. Risciacquare con acqua a perdere;
- 5) Lavare il contenitore in legno con *lava-barrique* alimentata con idropulitrice impostata alla temperatura di 60 °C per 15 min con acqua (senza trattamento preventivo con metabisolfito);
- 6) Preparare una soluzione di lavaggio costituita da 60 L di acqua e 140 g di metabisolfito di potassio;
- 7) Introdurre la soluzione nella barrique e ruotarla, con soste di 30 min, al fine di consentire il contatto della soluzione con tutta la parete interna;
- 8) Eliminare la soluzione di lavaggio lasciando sgrondare per 24 ore.



Trattamento con Vapore

SERBATOI N°: **197, 201, 199**

- 1) Capovolgere la barrique con il cocchiere rivolto verso il basso;
- 2) Introdurre il tubo del vaporizzatore mobile e trattare a **100 °C per 15 minuti**;
- 3) Lavaggio finale a perdere con acqua a temperatura ambiente;
- 4) Lasciare sgrondare fino ad asciugare;
- 5) Riempire con vino non contaminato;
- 6) Solfitare il vino fino al raggiungimento del valore 30 mg/l di anidride solforosa libera.

Trattamento con Ozono gassoso

Barrique N°: 192 ,200, 198

1. Trattare la barrique con ozono gassoso con macchinario *VINEXT*, mantenendo la concentrazione all'interno della barrique a 15 ppm per 40 minuti;
2. Lavaggio finale a perdere con acqua a temperatura ambiente;
3. Lasciare sgrondare fino a completa asciugatura;
4. Riempire con **VINO** non contaminato;
5. Solfitare il vino fino al raggiungimento del valore 30 mg/l di anidride solforosa libera.



Trattamento con acqua ozonizzata

Barrique N°: 141, 142, 143

- 1) Trattare la barrique con acqua ozonizzata alla concentrazione di 13 ppm/l per 8 minuti;
- 2) Lavaggio finale a perdere con acqua a temperatura ambiente;
- 3) Lasciare sgrondare fino ad asciugare;
- 4) Riempire con vino non contaminato;
- 5) Solfitare il vino fino al raggiungimento del valore 30 mg/l di anidride solforosa libera.



noBRETT

Gli obiettivi del lavoro dovevano 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 le tecniche di monitoraggio di *Brettanomyces bruxellensis* sulle superfici delle attrezzature e dei vasi vinari in acciaio, delle vasche in cemento o dei legni ed agendo con tecnologie rivolte alla riduzione della carica microbica.
- Sul **vino** mediante monitoraggio da fine fermentazione e nel corso dell’affinamento fino all’imbottigliamento, per 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.

Monitoraggio di *B. bruxellensis* e dei fenoli volatili nel vino in affinamento

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

ATTREZZATURE ED APPARECCHIATURE

- Contenitori sterili da 500 ml.
- Asta in acciaio inox per batonnage.
- Alzavino (“ladro”).
- Soluzione di metabisolfito di potassio (5 g/l).
- Flambatore.



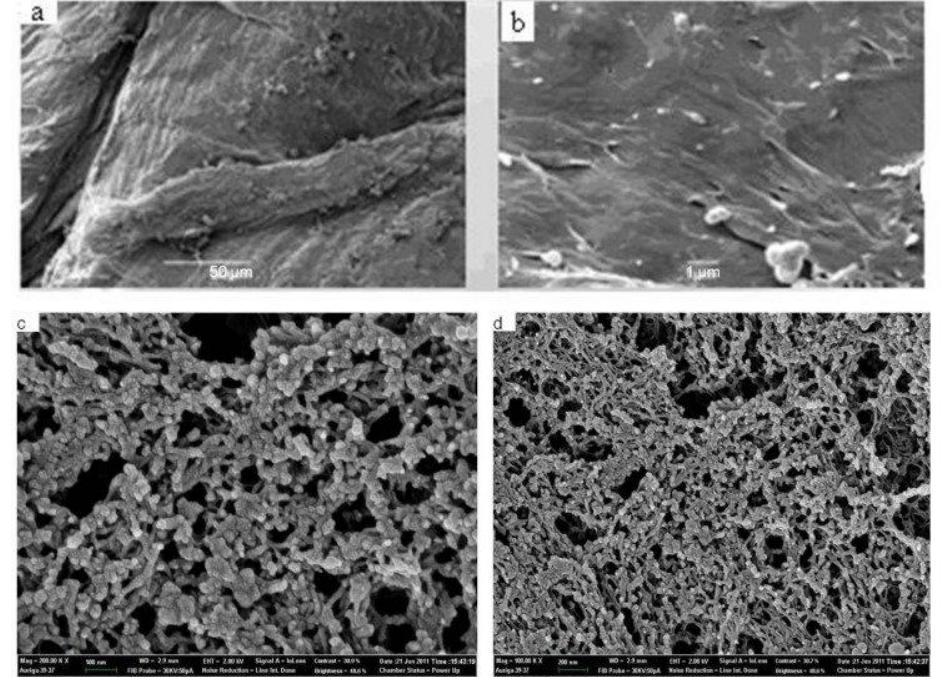
PRELIEVO DA BARRIQUE:

- Rimescolare la massa di vino al fine di renderla omogenea mediante l'impiego di asta in acciaio inox per batonnage;
- mediante alzapino ("ladro") prelievo di 500 ml di vino in contenitore sterile.

Prima delle fasi di mescolamento/prelievo e nel caso del prelievo di più campioni, è opportuno pulire le attrezzature impiegate mediante l'utilizzo di una soluzione di metabisolfito di potassio e successivamente risciacquare abbondantemente con acqua.

Interventi di contenimento e contrasto

- Trattamento con chitosano
- Filtrazione



Interventi di contenimento e contrasto

Protocollo:

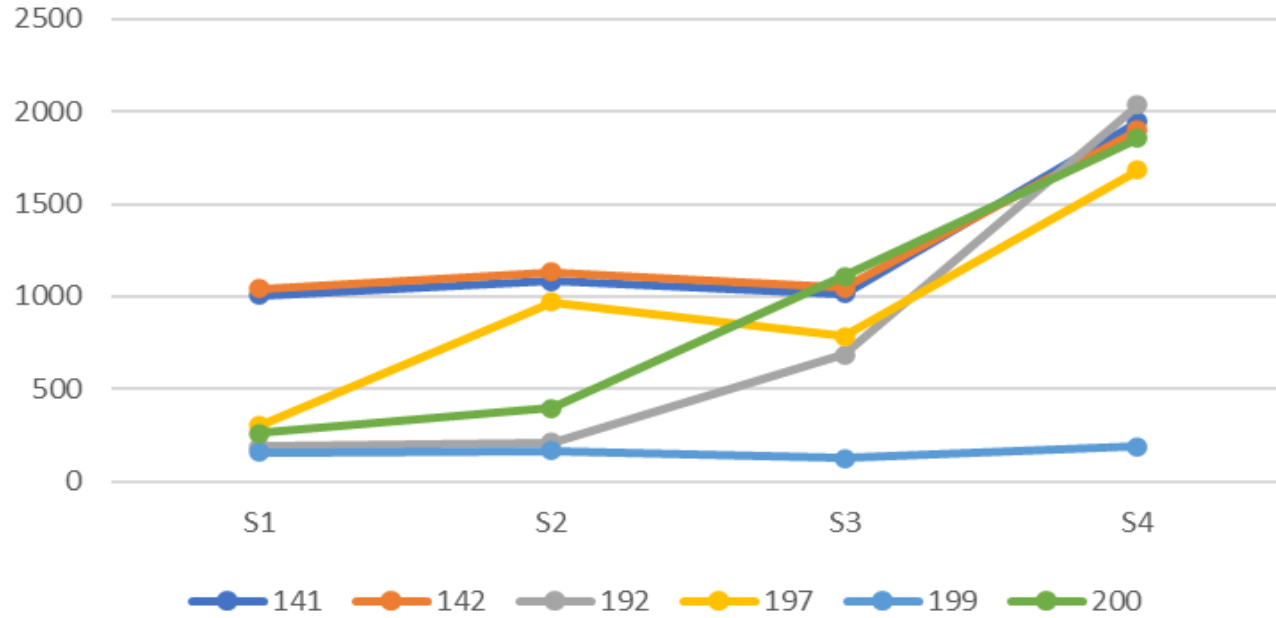
Distinte le 6 barrique sono stati prelevati 15 L da ognuna e divisi in 4 Bag in Box:

- 5L filtrato
- 5L filtrato + chitosano 5g/HL
- 2.5 L chitosano 5g/HL
- 2.5 L controllo

Nel caso in cui l'azione del chitosano non sia sufficiente si procede all'aggiunta di ulteriori 5 g/HL arrivando così al limite massimo di legge.

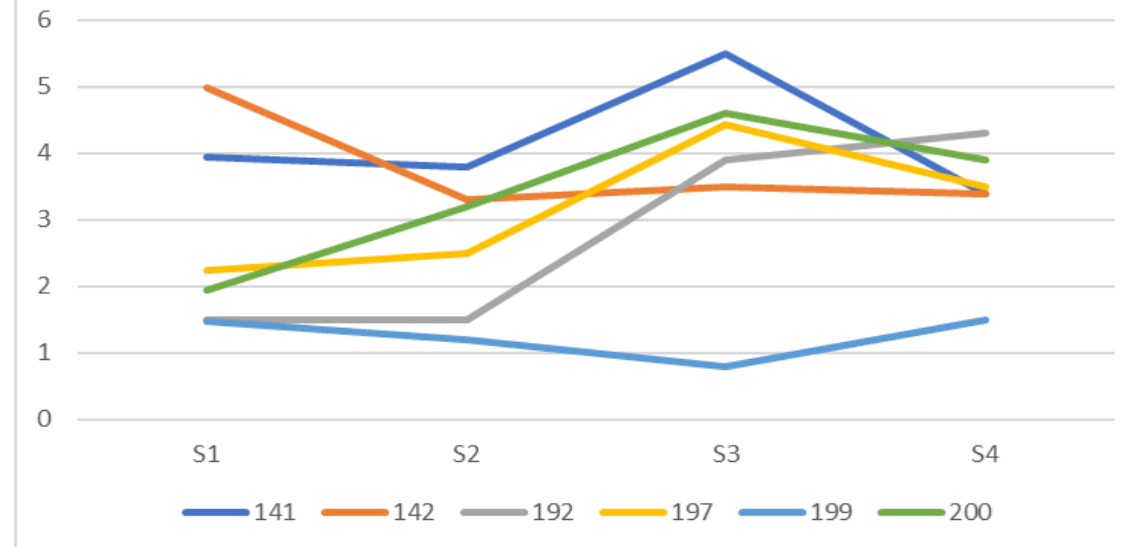
Descrizione campione	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-Etil-F (µg/L)	4-Etil-G (µg/L)
141	3,95	1007	132
142	4,98	1040	132
197	2,25	300	37
192	1,5	188	24
199	1,48	156	20
200	1,94	259	34

Incremento 4-Etil-F ($\mu\text{g/L}$) Controllo

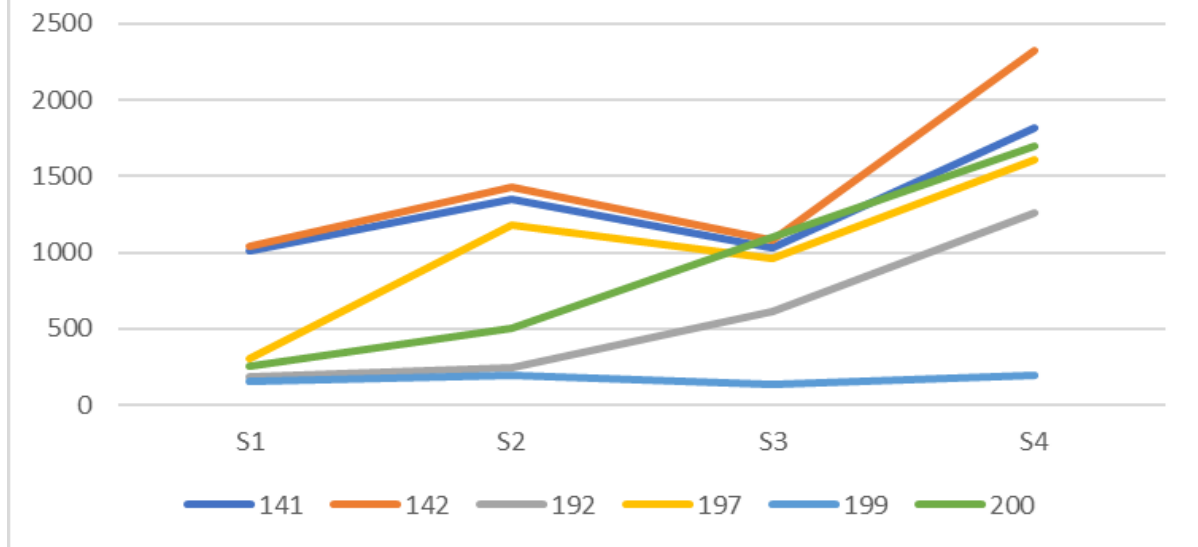


Si è riscontrato un progressivo aumento dei fenoli volatili in tutte le barriques trattate conseguente all'aumento del microrganismo in oggetto.

Incremento *B. bruxellensis* log UFC/ml Controllo

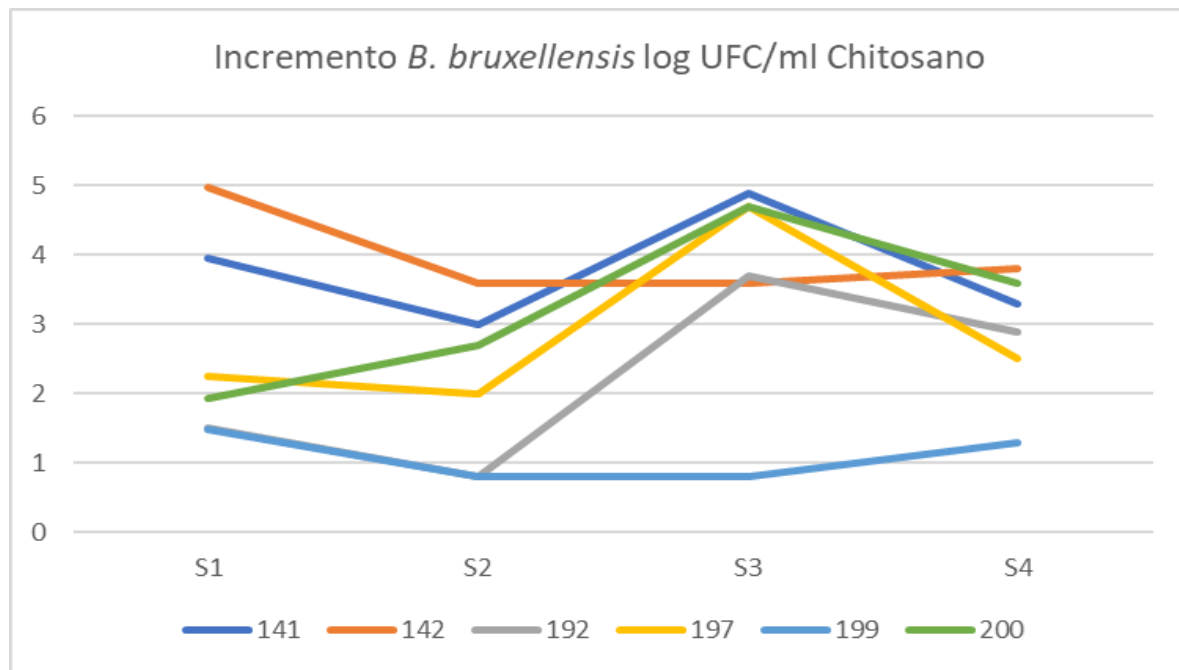


Incremento 4-Etil-F ($\mu\text{g/L}$) Chitosano

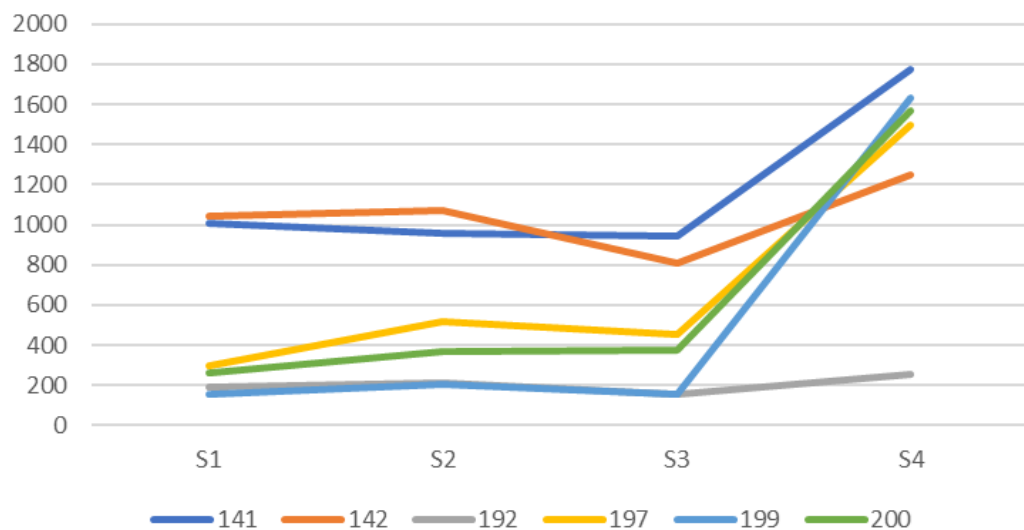


Ai campioni è stata aggiunta una concentrazione di 5 g/hL per le prime due sessioni distanti circa venti giorni una dall'altra, avendo ottenuto un effetto non significativo nella riduzione del microrganismo e dei fenoli volatili sono stati aggiunti ulteriori 5 g/hL portando così i campioni alla concentrazione massima consentita per legge.

Incremento *B. bruxellensis* log UFC/ml Chitosano

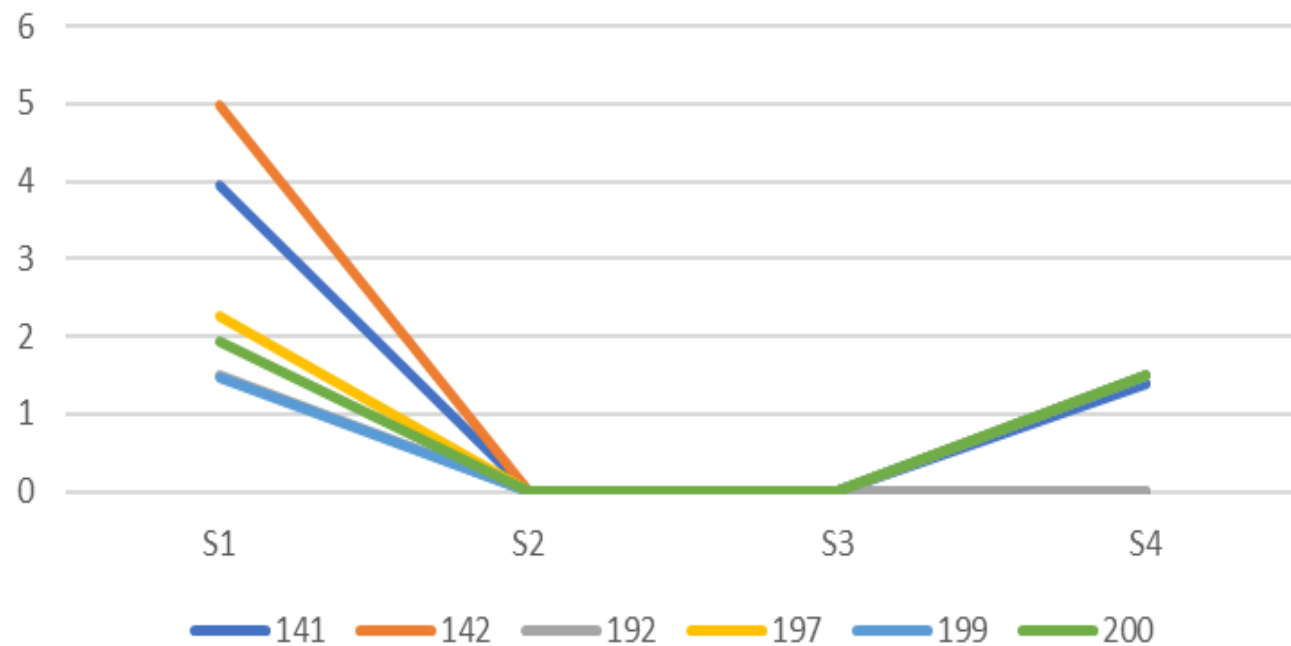


Incremento 4-Etil-F (µg/L) Filtrato

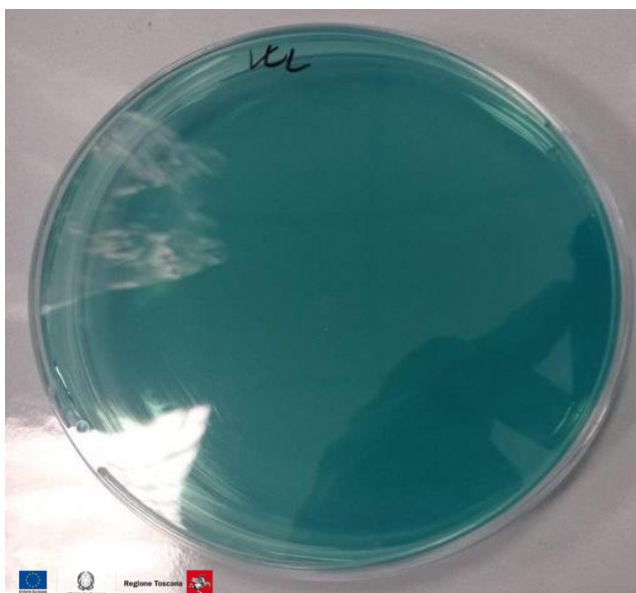


In ultimo i campioni sottoposti a filtrazione hanno evidenziato un abbattimento totale del microrganismo di studio. Essendo la tecnica applicata una colturale indipendente sono stati rilevati dei risultati positivi nell'intorno di 10^1 .

Incremento B. bruxellensis log UFC/ml Filtrato



Questi sono stati confermati con tecnica colturale risultando non vitali.

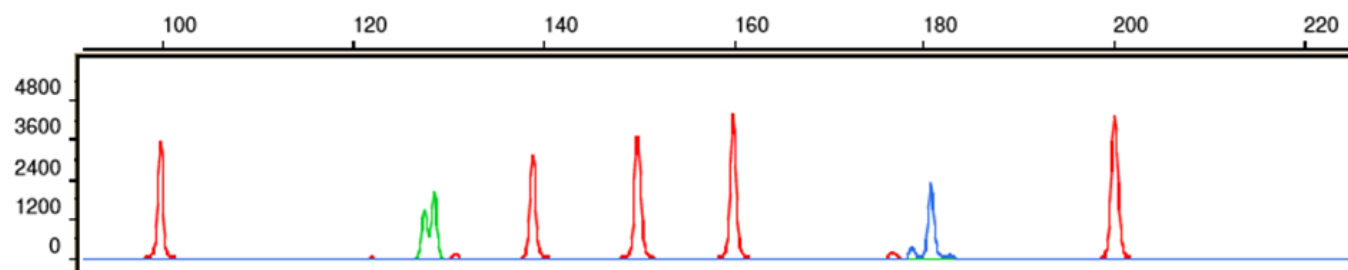


Microsatellite name	Motif	Primers	Dye	Allele Size
B101	GAA/GAT	F CACGCAAAAGAAGATGA : GGA R TGCCATTCTTATCCAAG : TTG	HEX	140-146
B122	ATC	F TCTTCCTCCGATCCTTTAT : CA R TTGCACGATTTGTCAGA : ATCC	6FAM	281-356
B135	CAA	F AGCAGTTACGGAGGCAG : CAAT R TTTGTTTCTGGGGTTGGT : GT	HEX	194-224
B174	GAT	F TGGTGCTTAGAGCAGAT : GATG R GCAACTGTTCCAATGAA : TTCC	6FAM	195-207
B22	ATG	F TTAGGTGGTTATCCGGA : GGAG R TATCCTCGTCAGCTTCTG : CTT	6FAM	186-271
B224	GTT/GCT	F TGCAAGTTCTGCAGCGT : T R ACCAACAACAGCAAAGA : CACG	6FAM	106-127
B273	TTA	F CTGCAAGAAGATGAATT : GGAA R ACCTTTGGATTGGCCCTT : T	HEX	153-156
B301	TTG/CTG	F GTATGCTTGCGGGACTT : GATT R GCGACTTCAACAGCAGC : TTAA	HEX	143-174

OBIETTIVO DEL LAVORO:

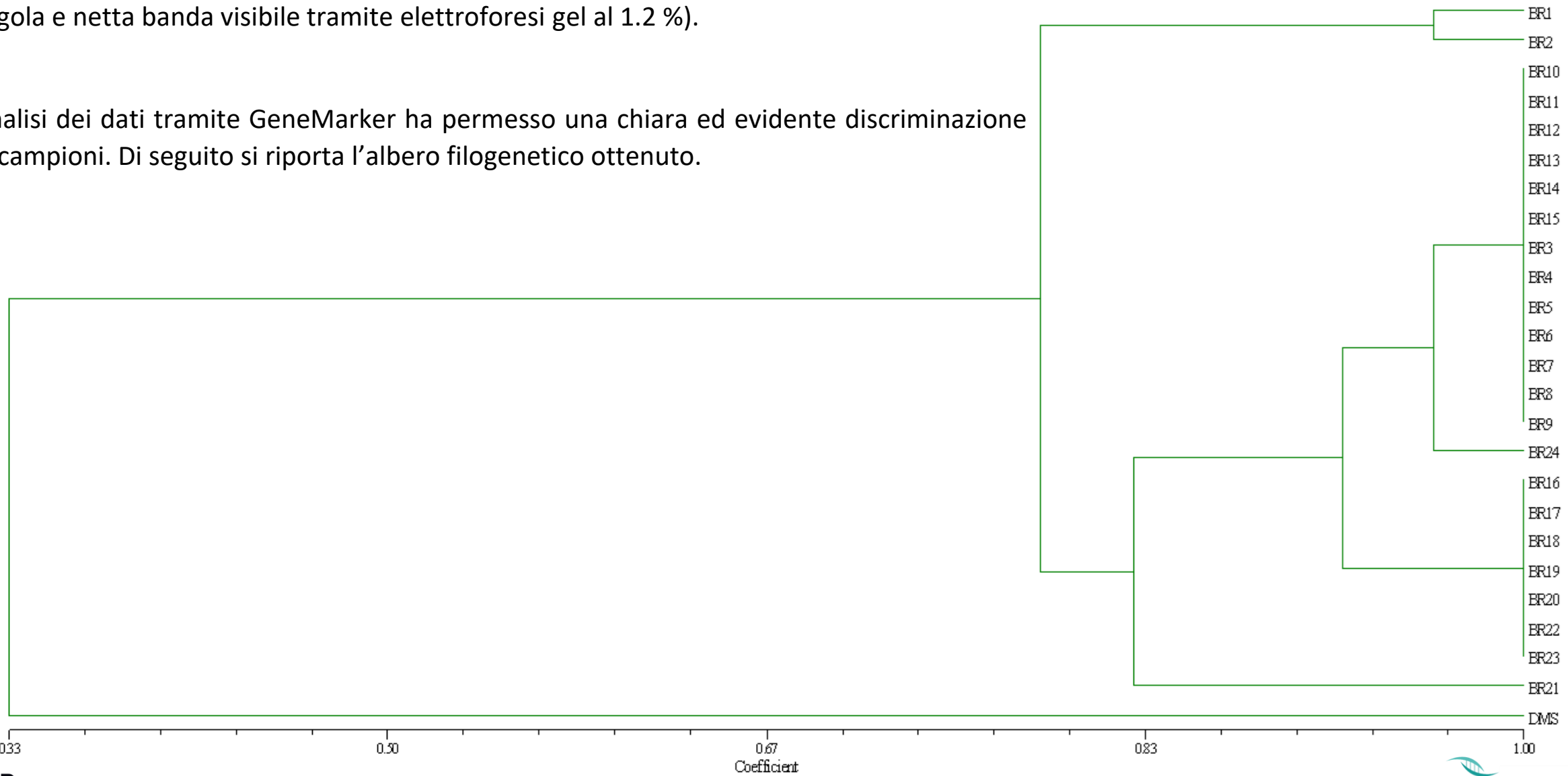
focus del progetto è stata la **messa a punto e l'utilizzo di marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeat)** al fine di discriminare geneticamente i ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* presenti in diversi vigneti e nelle attrezzature di cantina utilizzate per lo stoccaggio e la produzione del vino.

Amplificati sequenziati tramite sequenziatore ABI310 di cui si mostra sotto un tipico elettroferogramma.



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 netta banda visibile tramite elettroforesi gel al 1.2 %).

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



Conclusioni

✓ VIGNETO:

- presenza sporadica e disomogenea del *B. bruxellensis*
- trattamenti fitosanitari utilizzati apparentemente ininfluenti

✓ LOCALI E ATTREZZATURE:

- Monitoraggio significativo ma non necessario
- Porre attenzione alla sanificazione delle attrezzature
- Azione positiva della sanificazione con acqua ozonizzata delle attrezzature

Conclusioni

✓ MOSTI IN FERMENTAZIONE:

- Sviluppo di *B. bruxellensis* a partire dalla svinatura

✓ VINI IN AFFINAMENTO:

- Azione del chitosano apparentemente non risolutiva
- Azione della filtrazione apparentemente risolutiva
- Azione positiva della sanificazione dei legni con acqua ozonizzata, vapore e ozono gassoso nel breve periodo



noBRETT



Consiglio Nazionale
delle Ricerche



UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240



A Tentamus Company

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

GRAZIE PER L'ATTENZIONE