



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



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

GRUPPO OPERATIVO

# NOBrett

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

## Sommario

<b>3.</b>	<b>RISULTATI E PROTOCOLLI .....</b>	<b>5</b>
3.1	Protocollo di lavaggio standard per attrezzature, superfici e serbatoi in acciaio e cemento .....	5
3.2	Protocollo di lavaggio dei serbatoi in legno .....	6
3.3	Sanificazione con ozono gassoso dei serbatoi in legno .....	6
3.4	Sanificazione con acqua ozonizzata dei serbatoi in legno .....	7
3.5	Sanificazione con vapore dei serbatoi in legno .....	7
3.6	Campionamento dei vini in affinamento .....	8
3.7	Monitoraggio vino in affinamento .....	9
3.8	Contenimento e riduzione di <i>B.bruxellensis</i> nell'aria dei locali di cantina, nel vino in affinamento e in pre-imbottigliamento .....	10

## PREMESSE

### **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 Fears 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.

### 3. RISULTATI E PROTOCOLLI

#### 3.1 Protocollo di lavaggio standard per attrezzature, superfici e serbatoi in acciaio e cemento

Le superfici e le attrezzature impiegate nei processi di vinificazione e affinamento rappresentano un potenziale rischio per la contaminazione dei mosti/vini da parte di microrganismi indesiderati. Le fasi di lavaggio devono necessariamente comprendere la detersione, ovvero la rimozione dello sporco, e la sanificazione, per la rimozione di microrganismi, tra cui batteri, lieviti, muffe e virus. I due termini sono spesso confusi tra loro, tuttavia rappresentano due fasi inequivocabilmente distinte.

##### DETERSIONE:

1. Effettuare un controllo dell'acqua utilizzata in cantina con verifica dei parametri chimici e microbiologici secondo la normativa vigente;
2. Utilizzare un detergente specifico per ogni superficie e attrezzatura considerata, avendo cura di verificare le schede tecniche dei prodotti utilizzati ed eventualmente di ogni attrezzatura interessata;
3. Applicare la soluzione detergente avendo cura di eliminare lo sporco e le incrostazioni. In caso di persistenza dei corpi estranei, ripetere nuovamente il lavaggio;
4. In caso di utilizzo di detersivi fortemente basici (es. soda caustica) risciacquare utilizzando una soluzione complessante specifica a pH leggermente acido (es. acido citrico);
5. Risciacquare con acqua corrente avendo cura di aver rimosso i residui dei prodotti detersivi.

##### SANIFICAZIONE:

1. Utilizzare prodotti specifici sanificanti specifici per ogni attrezzatura/superficie, avendo cura di verificare la compatibilità con i materiali interessati. Si consiglia di visionare le relative schede tecniche. Preferibilmente, utilizzare prodotti a base di perossido di idrogeno. L'utilizzo di ipoclorito di sodio è sconsigliabile a causa della

possibile formazione di Tricloroanisolo da parte di muffe potenzialmente presenti in cantina;

2. Diluire il prodotto sanificante in acqua secondo le indicazioni della rispettiva scheda tecnica;
3. Risciacquare con acqua corrente;
4. Ripetere la procedura prima di ogni utilizzo delle attrezzature e in caso di incrostazioni e sporco di varia natura detergere prima dell'applicazione di sanificante.

### 3.2 Protocollo di lavaggio dei serbatoi in legno

1. Sciacquare il serbatoio con acqua corrente mediante l'impiego di una lava-barrique, o di un ugello lavaserbatoi in caso di serbatoi con dimensioni maggiori di una barrique o tonneaux;
2. Lavare a ciclo chiuso con 50 L di una soluzione di bicarbonato di potassio al 5%;
3. 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;
4. Lavare con lava-barrique o ugello lavaserbatoi alimentati con pompe e/o idropulitrice impostata alla temperatura di 60 °C per 15 min con acqua (senza trattamento preventivo con metabisolfito);
5. Preparare una soluzione di lavaggio costituita da 60 L di acqua e 140 g di metabisolfito di potassio;
6. 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;
7. Risciacquare con acqua corrente e lasciare sgrondare per 24 ore.

### 3.3 Sanificazione con ozono gassoso dei serbatoi in legno

1. La sanificazione deve essere preceduta da un'accurata fase di lavaggio al fine di rimuovere lo sporco e le incrostazioni, in ogni parte del serbatoio;
2. Successivamente, applicare ozono gassoso con macchinario apposito, verificando preventivamente la scheda tecnica dello strumento e prendendo le opportune precauzioni di sicurezza per gli operatori. Si consiglia di effettuare l'operazione

all'aperto per evitare l'effetto tossico dell'ozono gassoso. Insufflare il gas ermeticamente all'interno del serbatoio, mantenendo la concentrazione di ozono gassoso all'interno del serbatoio a 15 ppm per 40 minuti;

3. Nel caso in cui il serbatoio rimanga scolmo, bruciare un dischetto di zolfo specifico ogni 200 L circa di capienza del serbatoio;
4. In caso di riempimento con vino attendere almeno 24 ore prima di travasare il vino.

#### 3.4 Sanificazione con acqua ozonizzata dei serbatoi in legno

1. La sanificazione deve essere preceduta da un'accurata fase di lavaggio al fine di rimuovere lo sporco e le incrostazioni, in ogni parte del serbatoio;
2. Successivamente, applicare acqua ozonizzata con macchinario apposito, verificando preventivamente la scheda tecnica dello strumento e prendendo le opportune precauzioni di sicurezza per gli operatori.
3. Su barrique, applicare acqua ozonizzata alla concentrazione di 10 ppm per almeno 8 minuti. Aumentare proporzionalmente i tempi di applicazione in caso di serbatoi più grandi;
4. Lasciare sgrondare e asciugare per 24 ore;
5. Nel caso in cui il serbatoio rimanga scolmo, bruciare un dischetto di zolfo specifico per ogni 200 L circa di capienza del serbatoio.

#### 3.5 Sanificazione con vapore dei serbatoi in legno

1. La sanificazione deve essere preceduta da un'accurata fase di lavaggio al fine di rimuovere lo sporco e le incrostazioni, in ogni parte del serbatoio;
2. Verificare la scheda tecnica del macchinario vaporizzatore utilizzato, unitamente alle procedure di sicurezza per garantire l'incolumità degli operatori.
3. Per le barriques applicare il vapore per almeno 15 minuti all'interno del serbatoio, aumentando proporzionalmente le tempistiche di esposizione in caso di dimensioni più grandi;
4. Lasciare sgrondare fino ad asciugare per almeno 24 ore;
6. Nel caso in cui il serbatoio rimanga scolmo, bruciare un dischetto di zolfo specifico per ogni 200 L circa di capienza del serbatoio.

### 3.6 Campionamento dei vini in affinamento

La presente procedura ha lo scopo di dettagliare il metodo di campionamento per la conta di *Brettanomyces* spp. mediante tecnica di coltura in piastra e conta di *Brettanomyces bruxellensis* in qPCR.

#### ATTREZZATURE ED APPARECCHIATURE:

- Bottiglie in vetro sterile da 250-500 ml.
- Falcon sterili da 50 ml o contenitori sterili da 100 ml.
- Asta in acciaio inox per batonnage.
- Alzavino (“ladro”).
- Soluzione di metabisolfito di potassio (5 g/l).
- Flambatore.
- Recipiente graduato da 1 L.

La modalità di prelievo dell’aliquota di vino destinata all’analisi microbiologica di *Brettanomyces* spp. o *Brettanomyces bruxellensis*, deve poter essere riferibile all’intera massa dalla quale è stata prelevata. Pertanto, durante il prelievo devono essere osservate le seguenti indicazioni.

#### PRELIEVO IN VASCA:

- Rimescolare la massa di vino al fine di renderla omogenea (rimontaggio). Si consiglia di movimentare almeno 1/3 della massa da campionare attaccando la pompa alla valvola di scarico totale e reimmettendo il vino nella vasca dal boccaporto;
- il prelievo in vasca può essere effettuato dal rubinetto prelevatore (assaggia vino), pertanto, flambare per alcuni secondi il rubinetto. Nel caso in cui non sia possibile flambare il rubinetto effettuare una disinfezione mediante l’utilizzo di una soluzione di metabisolfito di potassio;
- far scorrere per alcuni secondi il vino;



- prelevare 250-500 ml di vino per la conta *Brettanomyces* spp. mediante tecnica di coltura in piastra o da 50 a 100 ml per la conta di *Brettanomyces bruxellensis* in qPCR.

#### PRELIEVO IN BARRIQUE/TONNEAUX

- Rimescolare la massa di vino al fine di renderla omogenea mediante l'impiego di asta in acciaio inox per batonnage;
- mediante alzavino ("ladro") prelevare 250-500 ml di vino per la conta *Brettanomyces* spp. mediante tecnica di coltura in piastra o da 50 a 100 ml per la conta di *Brettanomyces bruxellensis* in qPCR.

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

### 3.7 Monitoraggio vino in affinamento

In base ai risultati ottenuti dal P.I.F. GRAPE e dal PS-GO NOBrett, il presente lavoro conferma l'importanza della fase di monitoraggio analitico al fine di limitare lo sviluppo di *B. bruxellensis* e dei fenoli volatili. Le analisi chimiche dei mosti e dei vini devono comprendere, oltre alla determinazione del 4-etilfenolo e del 4-etilguaiacolo che evidenziano la presenza del lievito, la verifica dei parametri chimici necessari a valutare la stabilità microbiologica, tra cui:

- Titolo alcolometrico volumico effettivo;
- pH e acidità totale;
- Azoto prontamente assimilabile;
- acido malico;
- acido lattico;
- acidità volatile;
- zuccheri riduttori;
- anidride solforosa libera, totale e molecolare.

In base ai risultati ottenuti, a partire dalla svinatura, durante il corso dell'affinamento e prima dell'imbottigliamento è consigliabile verificare la presenza di *B. bruxellensis* tramite metodica

qPCR coltura indipendente, oltre ai marcatori chimici 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo. Le analisi dovrebbero essere ripetute in caso di travaso o assemblaggio con masse di vino provenienti da diversi serbatoi.

### 3.8 Contenimento e riduzione di *B.bruxellensis* nell'aria dei locali di cantina, nel vino in affinamento e in pre-imbottigliamento

In base ai risultati ottenuti dal P.I.F. GRAPE e dal PS-GO NOBrett, non è stata verificata la presenza di *B. bruxellensis* nell'aria dei locali di vinificazione. Pertanto, il monitoraggio analitico tramite campionamento diretto dell'aria è sconsigliabile a causa degli elevati costi e della dubbia efficacia. Tuttavia, i locali di vinificazione devono essere correttamente mantenuti sanificando attrezzature, serbatoi e superfici in modo da evitare la proliferazione di microrganismi indesiderati che potrebbero influenzare negativamente la qualità della produzione.

#### 3.8.1 Impiego di anidride solforosa

Le concentrazioni di anidride solforosa molecolare in grado di limitare la crescita di *B. bruxellensis* sono comprese tra 0,25 mg/l e 1,25 mg/l. I valori comuni di pH, etanolo e temperatura in alcuni vini, tuttavia, non consentono spesso di raggiungere la concentrazione minima di SO<sub>2</sub> molecolare necessaria a contrastare lo sviluppo di *B. bruxellensis*. Pertanto, l'impiego di anidride solforosa deve necessariamente abbinarsi al monitoraggio microbiologico del lievito unitamente alla determinazione dei fenoli volatili.

#### 3.8.2 Impiego di chitosano

Il chitosano è un polisaccaride composto dalla D-glucosamina e dalla N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami  $\beta(1-4)$ . Sono molto diffusi in natura e possono avere diverse applicazioni industriali. L'azione antimicrobica del chitosano è il risultato di meccanismi differenti, tra cui l'aggregazione delle cellule microbiche e la perdita dei costituenti cellulari. Il trattamento con chitosano consente pertanto la riduzione della presenza e della coltivabilità delle cellule di *B. bruxellensis* in vini contaminati. Tuttavia, le cellule di lievito possono svilupparsi nuovamente

in un successivo affinamento del vino in legno. A contaminazioni elevate di *B. bruxellensis*, il chitosano riesce a separare efficacemente le cellule, senza tuttavia avere una garanzia della loro completa inattivazione.

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

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

I prodotti in commercio sono differenti tra loro e la relativa efficacia dipende dalle diverse condizioni del vino. Si consiglia di valutare l'utilizzo di questo prodotto in base alla presenza di *B. bruxellensis* e valutando la relativa scheda tecnica con le modalità di impiego e i dosaggi. Il prodotto ha un'azione efficace se correttamente distribuito agitando l'intera massa da trattare.

### 3.8.3 Filtrazione

La filtrazione è un metodo fisico ampiamente utilizzato nell'industria enologica per la stabilizzazione dei vini. In particolare, la filtrazione su membrana è utilizzata nelle fasi di pre-imbottigliamento al fine di eliminare i microrganismi indesiderati che possono provocare anomalie e difetti, riducendo la shelf-life dei prodotti e causando il declassamento e il deprezzamento dei vini. Per quanto riguarda le metodologie di filtrazione non possiamo indicare un unico protocollo, in quanto dipende dai sistemi tecnologici presenti in Azienda. L'unica indicazione trasversale che si può consigliare, in base ai risultati ottenuti, è relativa alla porosità dei setti filtranti. Sia che i setti filtranti siano composti da cellulosa, polipropilene, nylon o polietersolfone la filtrazione più utilizzata per prevenire o per contrastare la presenza di *B. bruxellensis* prevede la filtrazione tramite membrana con porosità di 0,45 µm. Tra gli svantaggi di questa tecnica, vi sono la perdita di colore, la diminuzione della complessità aromatica e i costi elevati di materiali ed energia.



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**

