



## RISOLUZIONE OIV-OENO 462-2014

CODICE DI BUONE PRATICHE VITIVINICOLE PER EVITARE O LIMITARE LA CONTAMINAZIONE DA *BRETTANOMYCES* spp.

L'ASSEMBLEA GENERALE,

Considerate le azioni del Piano strategico OIV 2009-2012 e, in particolare, la necessità di fornire dei mezzi per individuare e limitare le contaminazioni,

Considerato che la gestione dei *Brettanomyces* rappresenta una delle questioni importanti nella vinificazione, dal momento che i *Brettanomyces* sono noti per essere coinvolti nell'alterazione del vino attraverso la produzione di difetti di odore (*off-flavours*),

Considerato che i *Brettanomyces* sono presenti sull'uva e sui mezzi di vinificazione e che i mosti d'uva possono essere contaminati velocemente, ma che tali lieviti proliferano in genere a seguito della fermentazione alcolica e/o malolattica, durante l'affinamento del vino e dopo l'imbottigliamento,

Raccomanda, sulla base dei risultati ottenuti negli ultimi anni a seguito di studi e ricerche effettuati sulla contaminazione da *Brettanomyces*, di fornire alcune pratiche al fine di ridurre la contaminazione mediante pratiche viticole ed enologiche.

Visti i lavori del Gruppo di esperti "Microbiologia",

DECIDE di adottare il Codice di buone pratiche vitivinicole per evitare o limitare la contaminazione da *Brettanomyces*. Il presente codice determina le azioni da intraprendere nei vigneti e nelle cantine al fine di contribuire a ridurre i rischi legati alla presenza dei *Brettanomyces*.

*Esemplare certificato conforme  
Mendoza, il 14 novembre 2014  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Secretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*

## CODICE DI BUONE PRATICHE VITIVINICOLE PER EVITARE O LIMITARE LA CONTAMINAZIONE DA *BRETTANOMYCES spp.*

### PREMESSA

- Tra i processi che alterano la qualità del vino, la produzione di fenoli volatili da parte delle specie di lievito appartenenti al genere *Brettanomyces* è ampiamente diffusa e sempre più problematica. Tali composti sono caratterizzati soprattutto da odori di inchiostro o colla, sudore di cavallo, sentori di cuoio o di stalla.
- I fenoli volatili, principalmente il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo, sono prodotti rispettivamente dall'acido *p*-cumarico e dall'acido ferulico dopo decarbossilazione enzimatica (cinnamato decarbossilasi, PAD) e riduzione enzimatica (vinilfenolo-reduttasi, VPR). Questi precursori sono naturalmente presenti nei mosti d'uva. Lo step della decarbossilazione, provocata dall'attività della cinnamato decarbossilasi, è stato descritto in molte specie di batteri, funghi e lieviti, mentre lo step relativo alla riduzione, causata dall'attività delle vinilfenolo-reduttasi (o VPR) è più specifica per le specie dei generi *Brettanomyces/Dekkera*.
- Considerata la presenza dei *Brettanomyces* sull'uva e sui mezzi di vinificazione, i mosti d'uva possono essere contaminati velocemente. Tuttavia, questi lieviti proliferano in genere a seguito della fermentazione alcolica e/o malolattica, durante l'affinamento del vino o dopo il condizionamento.

### INTERVENTI NEL VIGNETO

**Non applicabile** (a nostra conoscenza, nessuno studio disponibile). Tuttavia, lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* sono stati rilevati sulle bucce dell'uva sin dalle prime fasi di sviluppo dell'acino. L'ecologia microbica della superficie dell'uva ha mostrato una grande diversità caratterizzata da piccole popolazioni per ogni specie (Renouf et al. 2007).

Un primo approccio di prevenzione, che consiste in una rigorosa selezione di uve sane, potrebbe svolgere un ruolo nella diminuzione del rischio da *Brettanomyces*, che è generalmente più presente sulle uve ammuffite.

### INTERVENTI DURANTE LA VENDEMMIA

Gestione dell'uva:

I *Brettanomyces* presenti sull'uva non rappresentano la principale specie di lievito (piccola popolazione). Tuttavia, l'eliminazione delle uve ammuffite potrebbe limitare l'alterazione prodotta da *Brettanomyces*.

La vendemmia delle uve con acini a maturazione molto avanzata è sempre più frequente e, in questo caso, si dovrebbero prendere precauzioni particolari. Gli apporti organolettici sono interessanti, ma questo aumenta il rischio di produzione di fenoli volatili giacché l'uva molto matura contiene una quantità maggiore di precursori dei fenoli volatili. Pertanto, lavorare in simili condizioni non aumenta

*Esemplare certificato conforme  
Mendoza, il 14 novembre 2014  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Secretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*

necessariamente la presenza di *Brettanomyces*, ma aumenta invece il rischio legato alla loro attività (minore acidità totale, pH più elevato che influenza direttamente il livello di SO<sub>2</sub> molecolare e quindi la crescita dei *Brettanomyces*).

## INTERVENTI IN CANTINA

A causa di diversi fattori, tra cui l'aumento del titolo alcolometrico, durante la fermentazione alcolica si osserva una diminuzione della diversità microbica. Tuttavia, poiché la specie *Brettanomyces* ha una buona resistenza all'etanolo, la sua presenza non decresce, perciò durante la vinificazione è fondamentale rispettare un'igiene ottimale (uve sane, mezzi di vinificazione e conservazione, ecc.).

### Operazioni e trattamenti prefermentativi

- Si raccomanda di accertarsi che in cantina siano applicate pratiche igieniche adeguate.
- I parametri più importanti sono rappresentati dal livello di solfitazione e dalla temperatura:
  - La solfitazione rappresenta l'azione preventiva più efficace nella fase di prefermentazione per limitare lo sviluppo della popolazione di *Brettanomyces*; tuttavia, si raccomanda di evitare una solfitazione eccessiva (> 8 g/HL) che potrebbe portare a un ritardo della fermentazione malolattica,
  - l'alta temperatura e una macerazione prefermentativa "a caldo" (temperatura superiore a 65 °C) consentono, durante il processo di vinificazione, l'inattivazione dei *Brettanomyces* ma anche di altri microrganismi. Una macerazione "a freddo", a una temperatura inferiore o pari a circa 10 °C, previene la loro proliferazione ma non li uccide.
- In tutti i casi restano possibili ulteriori contaminazioni.

### Operazioni di fermentazione

Fermentazione alcolica (FA):

- Durante la FA, la diversità microbica diminuisce e la specie *Saccharomyces cerevisiae* diviene quella dominante. Tuttavia, *Brettanomyces*, a causa della resistenza all'etanolo e del basso fabbisogno di nutrienti che la contraddistinguono, è in grado di svilupparsi non appena la FA rallenta o si arresta. Si devono attuare le pratiche enologiche comunemente raccomandate per la gestione della fermentazione.
- L'inoculo dei mosti facendo uso di lieviti selezionati conduce a una FA più affidabile.
- Nel caso in cui la fermentazione alcolica rallenti o si arresti, l'ambiente diventa più favorevole alla moltiplicazione dei *Brettanomyces*. Nel caso in cui si arresti, si raccomanda di attuare, al più presto, una procedura per la ripresa della fermentazione alcolica.
- Gli zuccheri residui (principalmente glucosio e fruttosio) sono i substrati per la crescita dei *Brettanomyces*. I vini sono di solito considerati secchi quando il livello di zuccheri è inferiore a 4 g/L. Una concentrazione di 0,3 g/L di zuccheri residui è sufficiente a sviluppare una biomassa di *Brettanomyces* in grado di produrre fenoli volatili per più di 1000 µg/L.

*Esemplare certificato conforme  
Mendoza, il 14 novembre 2014  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*

- Al fine di evitare rischi di fermentazione, i nutrienti dei lieviti (di cui potrebbe beneficiare anche *Brettanomyces*) vanno aggiunti esclusivamente se realmente necessari.

Fase di latenza prima della fermentazione malolattica (FML):

- Una volta completata la FA, le condizioni favoriscono non solo i batteri lattici, ma anche i *Brettanomyces*, sebbene la loro proliferazione rimanga lenta.
- È importante monitorare la popolazione di *Brettanomyces* poiché l'ambiente è relativamente povero di microrganismi.
- I fattori che favoriscono la crescita dei *Brettanomyces* in questa fase sono: la macerazione finale a caldo (40-45 °C), la micro-ossigenazione, il rilascio di zuccheri nel caso di uve non pigiate.
- Il coinoculo dei lieviti selezionati e dei batteri lattici selezionati può contribuire a ridurre la fase di latenza tra fermentazione alcolica e malolattica e, quindi, lo sviluppo dei *Brettanomyces*.

Fermentazione malolattica (FML):

- I parametri fisico-chimici (pH, temperatura, SO<sub>2</sub> totale) influenzano la progressione della FML. Se questa viene ritardata, il rischio di produzione di fenoli volatili aumenta dato che *Brettanomyces* può trarre beneficio da questo lasso di tempo per moltiplicarsi.
- L'uso di colture starter di batteri malolattici è un buon modo per contrastare lo sviluppo di *Brettanomyces*. In alcuni studi hanno dimostrato che il coinoculo o l'inoculo sequenziale precoce impediscono la contaminazione da *Brettanomyces*, riducendo la fase di latenza tra la FA e la FML.
- Dopo la fermentazione malolattica, si consiglia di eliminare tutti i microrganismi mediante l'aggiunta di SO<sub>2</sub>, che può essere utilizzata da sola o in combinazione con il DMDC per ottenere un'azione sinergica (Renouf et al. 2008). Queste quantità devono essere aggiustate in base al pH del vino.

## Operazioni di affinamento e chiarificazione

La prima precauzione indispensabile da prendere è eseguire un'analisi microbiologica completa, tra cui la conta specifica dei *Brettanomyces*. L'analisi deve essere ripetuta per tutta la durata del processo di affinamento.

- È fondamentale controllare la quantità di SO<sub>2</sub> per limitare lo sviluppo dei *Brettanomyces*. La dose raccomandata va da 0,5 a 0,8 mg/L di SO<sub>2</sub> molecolare<sup>1</sup>.
- L'invecchiamento su fecce è un fattore di rischio aggiuntivo, poiché i *Brettanomyces* sono in grado di sopravvivere e proliferare nelle fecce (che rilasciano nutrienti nel vino).
- Una chiarifica mediante travaso, affinamento e filtrazione è essenziale per ridurre la popolazione vitale e la popolazione vitale ma non coltivabile di *Brettanomyces*, la quale è in grado di moltiplicarsi metabolizzando gli zuccheri residui.
- Alcuni agenti di chiarifica sono più efficienti rispetto ad altri. Trattamenti con proteine chiarificanti possono ridurre le popolazioni da 40 a 2000 volte. Un affinamento effettuato

<sup>1</sup> Il prodotto finale deve essere conforme alle normative in vigore riguardanti i limiti di SO<sub>2</sub> totale.

Esemplare certificato conforme  
Mendoza, il 14 novembre 2014  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale

Jean-Marie AURAND

utilizzando caseina o caseinato di potassio può ridurre i livelli di etilfenolo se questi non sono eccessivamente elevati.

- L'aggiunta di chitosano è una possibile alternativa per controllare la crescita dei microrganismi indesiderati, soprattutto i *Brettanomyces*.
- Alcune operazioni di vinificazione (travasamento, colmataura, filtrazione, imbottigliamento, ecc.) possono causare una dissoluzione dell'ossigeno nel vino che favorisce la moltiplicazione dei *Brettanomyces*.
- Se si utilizza la micro-ossigenazione, bisogna verificare, mediante un'analisi appropriata, che non siano presenti *Brettanomyces*.

N.B.:

- 1 Dopo l'aggiunta di SO<sub>2</sub>, la popolazione di *Brettanomyces* può passare (completamente o parzialmente) da uno stato vitale a uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC). Tali cambiamenti portano a una diminuzione della dimensione dei lieviti ed è quindi necessario regolare la filtrazione.
- 2 È altresì importante notare che la conta dei microrganismi in VBNC non può essere eseguita mediante analisi di routine (ad esempio, conta su piastra Petri), bensì mediante qPCR o citometria di flusso con ibridazione in situ in grado di evidenziare indifferentemente i *Brettanomyces* in VBNC e quelli vitali.

### **Affinamento in botte**

L'affinamento in botte è considerato il periodo più critico per l'alterazione da *Brettanomyces*.

Come accade per ogni alterazione di origine microbica, il vino usato per la colmataura non deve essere contaminato. Il legno favorisce la crescita dei *Brettanomyces*, che sono capaci di utilizzare il cellobiosio come fonte di carbonio. Le botti sono difficili da pulire e disinfettare.

Le vecchie botti poco pulite rappresentano una fonte ben nota di contaminazione da *Brettanomyces*. Le botti nuove favoriscono anche la moltiplicazione del lievito e la produzione di fenoli volatili, giacché rilasciano più nutrienti. Inoltre, le botti nuove sono più permeabili all'O<sub>2</sub>, che favorisce un potenziale redox relativamente alto e diminuisce la concentrazione di SO<sub>2</sub> (attiva o molecolare), due parametri che favoriscono lo sviluppo dei *Brettanomyces*.

Per il risanamento delle botti sono stati studiati diversi approcci, ma nessuno di questi ha permesso di rimuovere completamente i *Brettanomyces* dalla superficie interna delle doghe o dal cocchiume. Infatti, la microporosità naturale del legno rende difficile la sua completa disinfezione, poiché i microrganismi rimangono nelle cavità degli strati inferiori del legno. Un trattamento che agisce in profondità è indispensabile per ottenere per risultati efficaci e duraturi nel tempo.

Tuttavia, alcune tecniche di disinfezione delle botti possono ridurre significativamente le popolazioni di *Brettanomyces* e possono essere utilizzate dove concesso dalle normative del paese in questione come, ad esempio:

- trattamento con il vapore: la disinfezione in profondità richiede un tempo di trattamento che sia sufficientemente lungo (risciacqui con acqua fredda, con acqua calda a 70 °C e vapore a bassa pressione per 10 min.),

*Esemplare certificato conforme  
Mendoza, il 14 novembre 2014  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*

- disinfezione con ozono: può avvenire sia con ozono gassoso combinato con un trattamento con acqua calda a 82 °C per 20 min., sia con acqua ozonizzata. In presenza di elevate quantità di sostanza organica, l'ozono non penetra in profondità nel legno,
- disinfezione con SO<sub>2</sub>: per la disinfezione di botti vuote e asciutte deve essere usato un minimo di 5 g per botte di SO<sub>2</sub> gassosa. La SO<sub>2</sub> è abbastanza efficace sulla superficie, ma anche in profondità, poiché penetra per i primi millimetri del legno,
- raschiatura e ribrucatura delle botti: tale trattamento non disinfetta le botti, ma consente l'eliminazione dello strato più contaminato. La raschiatura e la ribrucatura consentono una riduzione dei fenoli volatili dell'80% rispetto alle botti non trattate,
- ultrasuoni: questa tecnica consente una riduzione dei *Brettanomyces* vitali di oltre il 90% (fino a 2-4 mm sotto la superficie interna della doga).

### Operazioni di pre-condizionamento

Prima di eseguire operazioni di condizionamento è necessario valutare il rischio di produzione di fenoli volatili mediante l'esecuzione di controlli analitici (controlli chimici e microbiologici). Una volta valutato il rischio, occorre pianificare le operazioni adeguate al fine di prevenire lo sviluppo post-condizionamento dei *Brettanomyces*:

- sterilizzazione mediante filtrazione su membrana (da 0,45 a 1 µm) o una filtrazione tangenziale per un'efficace rimozione dei lieviti *Brettanomyces* seguita da un condizionamento sterile,
- utilizzo del DMDC per una protezione non persistente,
- utilizzo di antimicrobici che hanno una protezione persistente (acido sorbico solo se i batteri lattici sono stati rimossi completamente, gestione della SO<sub>2</sub> prendendo in considerazione il pH, ecc.),
- trattamento termico.

### Condizioni di conservazione

Al fine di prevenire la proliferazione dei *Brettanomyces* (e la produzione di fenoli volatili) nelle bottiglie durante la conservazione, si raccomanda di conservare le bottiglie a una temperatura inferiore a 12 °C, soprattutto per vini poco filtrati o contenenti un basso livello di SO<sub>2</sub>.

### CONCLUSIONI

- Si raccomanda vivamente di eseguire analisi a cadenza regolare al fine di rilevare preventivamente tutte le contaminazioni da *Brettanomyces*. Durante la procedura di campionamento, bisogna prestare particolare attenzione al fine di evitare le contaminazioni incrociate.
- Si raccomanda vivamente di garantire un'igiene ottimale in cantina.
- Gestire la solfitazione.
- Gestire la temperatura.
- È preferibile provvedere con azioni preventive anziché con processi correttivi.
- Le presenti raccomandazioni si basano sulle conoscenze attuali e possono essere aggiornate sulla base delle ricerche in corso.

*Esemplare certificato conforme  
Mendoza, il 14 novembre 2014  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Secretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*