RISOLUZIONE OIV-OENO 686-2022

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

IMPORTANTE: Questa risoluzione sostituisce la risoluzione seguente:
- OIV-OENO 462-2014

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

CONSIDERATI i lavori del Gruppo di esperti "Microbiologia",

CONSIDERATO che il presente Codice determina le misure da attuare in vigna e in cantina per contribuire a ridurre i rischi connessi alla presenza di *Brettanomyces*,

DECIDE di sostituire la risoluzione OIV-OENO 462-2014, "Codice di buone pratiche vitivinicole per evitare o limitare la contaminazione da *Brettanomyces* spp." con il testo seguente:

CODICE DI BUONE PRATICHE VITIVINICOLE PER EVITARE O LIMITARE L'ALTERAZIONE DEI VINI DA *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*

1. PREMESSA

- Tra i processi che alterano la qualità del vino, la produzione di fenoli volatili da parte di *Brettanomyces bruxellensis* 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, che possono mascherare il carattere fruttato dei vini.
- 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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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*.

- I lieviti *Brettanomyces* sono presenti sull'uva e sui mezzi di vinificazione, pertanto possono proliferare nel vino nel corso o a seguito della fermentazione alcolica e/o malolattica, durante l'affinamento del vino o dopo il condizionamento.

2. INTERVENTI NEL VIGNETO

Non applicabile (a nostra conoscenza, nessuno studio disponibile). Tuttavia, lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* sono stati rilevati dopo le fasi di arricchimento 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.

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 alterate.

3. 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 danneggiate o botritizzate potrebbe limitare le alterazioni prodotte 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. Questi apporti sono interessanti dal punto di vista organolettico, ma possono aumentare 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 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_2 molecolare e quindi la proliferazione dei *Brettanomyces*).

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

4. 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. È fondamentale dunque rispettare un'igiene ottimale durante la vinificazione (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 fattori più importanti sono la solfitazione e la temperatura:
    - La solfitazione rappresenta la misura 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.
    - Una macerazione prefermentativa ad alta temperatura (superiore a 65 °C) consente, 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 distrugge.
- L'uso di alcuni enzimi con attività cinnamil-esterasica può aumentare il rischio di produzione di fenoli volatili. In ogni caso, sono 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 proliferare non appena la FA rallenta o si arresta. Si devono attuare le pratiche enologiche comunemente raccomandate per la gestione della fermentazione alcolica.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

- L'inoculo dei mosti facendo uso di lieviti selezionati conduce a una FA più stabile.
- Nel caso in cui la fermentazione alcolica rallenti o si arresti, l'ambiente diventa più favorevole alla moltiplicazione dei Brettanomyces. In caso di arresto, si raccomanda di attuare tempestivamente una procedura per la ripresa della fermentazione alcolica.
- Gli zuccheri residui (principalmente glucosio e fruttosio) sono i substrati per lo sviluppo dei Brettanomyces. I vini sono di solito considerati secchi quando il livello di glucosio + fruttosio è inferiore a 4 g/L. Una concentrazione di 0,3 g/L di glucosio + fruttosio è sufficiente a sviluppare una biomassa di Brettanomyces in grado di produrre fenoli volatili per più di 1000 µg/L.
- Al fine di evitare arresti 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 proliferazione 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 e di uve parzialmente appassite.
- Il coinoculo dei lieviti e dei batteri lattici selezionati può contribuire a ridurre la fase di latenza tra fermentazione alcolica e malolattica e, quindi, lo sviluppo dei *Brettanomyces.*

<u>Fermentazione malolattica (FML):</u>

- I parametri fisico-chimici (pH, temperatura, SO_2 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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

sviluppo di *Brettanomyces*.

- Dopo la fermentazione malolattica, si consiglia di eliminare tutti i microrganismi mediante l'aggiunta di SO_2). Queste quantità devono essere aggiustate in base al pH del vino. È possibile ricorrere anche a tecniche fisiche (HHP or UHPH).

Operazioni di affinamento e chiarificazione

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

- È fondamentale controllare la quantità di SO_2 per limitare lo sviluppo dei *Brettanomyces*. La dose raccomandata va da 0,5 a 0,8 mg/L di SO_2 molecolare[1]. Nel caso di ceppi *Brettanomyces* tolleranti/resistenti all'etanolo o SO_2, si raccomanda l'uso di metodi alternativi (chitosano, filtrazione, trattamento termico).
- 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, collaggio 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. I trattamenti con proteine chiarificanti possono ridurre le popolazioni da 40 a 2000 volte. Un collaggio effettuato utilizzando caseina o caseinato di potassio può ridurre i livelli di etilfenoli se questi non sono eccessivamente elevati.
- L'aggiunta di chitosano è una possibile alternativa per controllare la proliferazione dei microrganismi indesiderati, soprattutto i *Brettanomyces* e i ceppi tolleranti/resistenti all'etanolo o SO_2.
- Alcune operazioni di vinificazione (travaso, colmatura, 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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

appropriata, che non siano presenti *Brettanomyces*.

- La temperatura negli spazi della cantina adibiti all'affinamento deve essere attentamente controllata, in particolare nel periodo estivo; vanno evitate temperature oltre i 14 °C per lunghi periodi per non permettere lo sviluppo di *Brettanomyces*.

N.B.:

1. Dopo l'aggiunta di SO2, 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 VBNC non può essere eseguita mediante analisi di routine (ad esempio, conta su piastra di Petri), bensì mediante qPCR o citometria di flusso in grado di evidenziare i Brettanomyces VBNC e quelli vitali.
3. È disponibile un test PCR che consente di prevedere la tolleranza/resistenza di Brettanomyces ai solfiti.

Affinamento in botte

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

Durante il campionamento, è necessario evitare la contaminazione incrociata.

Come accade per ogni alterazione di origine microbica, il vino usato per la colmatura non deve essere contaminato.

Il legno favorisce la proliferazione dei *Brettanomyces,* che sono in grado di svilupparsi sotto forma di pseudoife, di colonizzare i micropori del legno e 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*. Tuttavia, 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_2, che favorisce un potenziale redox relativamente alto e diminuisce la concentrazione di SO_2 (attiva o molecolare), due parametri che favoriscono lo sviluppo dei *Brettanomyces*.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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 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 vigenti 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). Un trattamento a immersione in acqua calda a 60°C con un'esposizione di tempo di 19 min permette di eliminare la popolazione di lieviti fino a una riduzione di 8 del conteggio log.
- 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_2: per la disinfezione di botti vuote e asciutte deve essere usato un minimo di 5 g per botte di SO_2 gassosa. La SO_2 è abbastanza efficace sulla superficie, ma anche in profondità, poiché penetra per i primi millimetri del legno.
- Raschiatura e nuova tostatura delle botti: tale trattamento non disinfetta le botti, ma consente l'eliminazione dello strato più contaminato. La raschiatura e la nuova tostatura 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).

<u>Operazioni di pre-condizionamento</u>

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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

adeguate al fine di prevenire lo sviluppo post-condizionamento dei *Brettanomyces*:

- sterilizzazione mediante filtrazione su membrana (da 0,45 a 0,65 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_2 prendendo in considerazione il pH, il titolo alcolometrico volumico acquisito e la temperatura), un calcolatore in linea che tenga conto di differenti parametri (pH, alcol e temperatura) può essere utilizzato,
- trattamento termico,
- è possibile ricorrere anche a tecniche fisiche (HHP or UHPH).

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 con un basso contenuto di SO_2.

5. CONCLUSIONI

- Si raccomanda vivamente di eseguire analisi a cadenza regolare al fine di rilevare preventivamente 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.
- Controllare la solfitazione e l'SO_2 molecolare.
- Controllare 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 Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

- La gestione di *Brettanomyces* deve essere un approccio preventivo globale che investe tutto il processo di vinificazione.

---

[1] Il prodotto finale deve essere conforme alle normative in vigore riguardanti i limiti di SO_2 totale.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022