RISOLUZIONE OIV-OENO 576B-2017

MONOGRAFIA SUI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES

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 l'aumento dell'uso dei lieviti non-Saccharomyces nel processo di vinificazione e la richiesta di definire tali lieviti,

CONSIDERATO che i lieviti non-Saccharomyces possono essere utilizzati per inoculare mosti e vini e che tale inoculo può essere seguito da inoculo sequenziale o essere effettuato simultaneamente con lieviti appartenenti a specie di Saccharomyces,

DECIDE di integrare il Codex enologico internazionale con la monografia "Lieviti selezionati non-Saccharomyces spp.":

Lieviti selezionati non-Saccharomyces spp.

1. OGGETTO, ORIGINE E CAMPO D'APPLICAZIONE

I lieviti non-Saccharomyces possono essere utilizzati per inoculare uve, mosti e vini in conformità alla risoluzione OENO-MICRO 14-546. Inoltre, poiché un'aggiunta di lieviti non-Saccharomyces potrebbe non essere sufficiente al completamento della fermentazione alcolica, l'inoculo di lieviti non-Saccharomyces può essere seguito oppure essere effettuato simultaneamente con un inoculo di lieviti Saccharomyces spp.

I lieviti in grado di conferire le proprietà enologiche desiderate devono essere stati isolati dalle uve, dai mosti o dai vini, essere il risultato di un'ibridazione di ceppi isolati da uve/mosti/vini, oppure derivare da altri lieviti.

Prima di utilizzare lieviti enologici geneticamente modificati è necessario richiedere l'autorizzazione alle autorità competenti.

2. ETICHETTATURA

La confezione deve contenere le seguenti informazioni:

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

- nome del genere, nome della/della specie, nome del/dei ceppo/i e tutti gli elementi che possano garantire la tracciabilità del prodotto,
- stato fisico del prodotto, secondo quanto descritto al punto 3,
- nome del selezionatore,
- nome e indirizzo del fabbricante o dell'imprenditore commerciale o del distributore,
- istruzioni d'uso raccomandate dal fabbricante,
- tasso di inoculo raccomandato,
- numero minimo di cellule rivivificabili per grammo di prodotto (UFC come determinato al punto 4.6) garantito dal fabbricante, con indicazione della temperatura di conservazione raccomandata,
- numero di lotto di produzione, data di scadenza e condizioni di conservazione,
- ove applicabile, indicazione che il ceppo o i ceppi di lievito sono stati ottenuti mediante modificazione genetica e la/le caratteristica/che modificata/e,
- tutti gli additivi presenti.

3. CARATTERISTICHE

La formulazione è una coltura pura, una coltura mista di ceppi non-Saccharomyces o una coltura mista di ceppi Saccharomyces e non-Saccharomyces.
I lieviti non-Saccharomyces selezionati possono essere utilizzati nelle seguenti forme:

- lievito secco attivo (ADY) con almeno il 92% di materia secca e un contenuto di lieviti rivivificabili uguale o superiore a 1010 UFC/g di materia secca,
- lievito congelato attivo (AFY) con una percentuale di materia secca compresa nell'intervallo di 40-85% e un contenuto di lieviti rivivificabili uguale o superiore a 1010 UFC/g di materia secca,
- lievito compresso (COY) con una percentuale di materia secca compresa nell'intervallo di 30-35% e un contenuto di lieviti rivivificabili uguale o superiore a 1010 UFC/g di materia secca,
- crema di lievito (CRY) con una percentuale di materia secca compresa

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

nell'intervallo di 18-25% e un contenuto di lieviti rivivificabili uguale o superiore a 1010 UFC/g di materia secca,

- lieviti incapsulati (sfere) o lieviti immobilizzati (ENY) con alginato e/o altri prodotti ammessi dall'OIV con almeno l'86% di materia secca e un livello di lieviti rivivificabili uguale o superiore a 109 UFC/g di materia secca.

4. LIMITI E METODI ANALITICI

4.1. Umidità

Misurare l'umidità attraverso la perdita in peso di 5 g di prodotto fatto essiccare a 105 °C fino al raggiungimento di un peso costante.

Il tenore deve essere conforme alle caratteristiche relative all'umidità o al tenore d'acqua descritte al punto 3.

4.2. Piombo

Procedere al dosaggio secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

Il tenore deve essere inferiore a 2 mg/kg del relativo preparato descritto al punto 3.

4.3. Mercurio

Procedere al dosaggio secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

Il tenore deve essere inferiore a 1 mg/kg del relativo preparato descritto al punto 3.

4.4. Arsenico

Procedere al dosaggio secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

Il tenore deve essere inferiore a 3 mg/kg del relativo preparato descritto al punto 3.

4.5. Cadmio

Procedere al dosaggio secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

Il tenore deve essere inferiore a 1 mg/kg del relativo preparato descritto al punto 3.

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

4.6. Lieviti rivivificabili totali

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale. La conta deve essere conforme alle caratteristiche descritte al punto 3.

4.7. Lieviti di genere, specie o ceppo differente da quello indicato in etichetta

I generi, le specie e i ceppi riportati sulla confezione devono rappresentare almeno il 95% della popolazione totale di lieviti.

Vedere l'allegato 1.

4.8. Muffe

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

La conta deve essere inferiore a 103 UFC/g del relativo preparato descritto al punto 3.

4.9. Batteri lattici

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

La conta deve essere inferiore a 105 UFC/g del relativo preparato descritto al punto 3.

4.10. Batteri acetici

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

La conta deve essere inferiore a 104 UFC/g del relativo preparato descritto al punto 3.

4.11. Salmonella

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale.

Controllarne l'assenza su un campione di 25 g.

4.12. Escherichia coli

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale utilizzando il terreno selettivo-differenziale per Escherichia coli. Controllarne l'assenza su un campione di 1 g.

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

4.13. Stafilococchi

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale. Valutare la presenza di stafilococchi mediante una coltura di arricchimento su terreno liquido Giolitti e Cantoni. Confermare quindi tale presenza su un terreno solido Baird Parker.

Qualora il terreno Giolitti e Cantoni restituisca dei risultati positivi, confermare la presenza di stafilococchi mediante isolamento su un terreno solido Baird Parker. Per inoculare i terreni solidi Baird Parker ed ottenere quindi le colonie isolate, utilizzare un'ansa del terreno di coltura positivo.

Controllarne l'assenza su un campione di 1 g.

4.14. Coliformi

Procedere alla conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del Codex enologico internazionale utilizzando il terreno selettivo-differenziale per coliformi e agar desossicolato.

La conta deve essere inferiore a 102 UFC/g del relativo preparato descritto al punto 3.

5. ADDITIVI

Devono essere conformi alla normativa vigente.

6. CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

I prodotti devono essere conservati e propagati in un ambiente atto a favorire la loro stabilità genetica.

Fare sempre riferimento alle raccomandazioni del fabbricante.

7. DOCUMENTAZIONE RELATIVA AL PRODOTTO

La documentazione del prodotto deve riportare in modo specifico le norme per la conservazione, il trasporto, la manipolazione e le condizioni d'uso (temperatura, attivazione, reidratazione quando necessaria, eventualmente mediante sospensioni appropriate in vino o mosto, ecc.).

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

ALLEGATO 1

1. Ottenimento delle colonie

Prelevare un campione da 1 g e sospenderlo in condizioni asettiche in 100 mL di una soluzione sterile contenente saccarosio al 5%. Omogeneizzare e lasciare riposare a una temperatura di 25-30 °C per 20 min.

Dopo aver eseguito le diluizioni seriali decimali adeguate, spargere 0,1 mL di campione diluito sulla superficie di una piastra nutritiva di agar e YEPD (20 g di glucosio, 20 g di peptone, 10 g di estratto di lievito, 100 mg di cloramfenicolo per sopprimere la crescita batterica e 150 mg di bifenile per sopprimere la crescita delle muffe, 20 g di agar, acqua q.b. per portare a volume di 1000 mL). Incubare per sei giorni a 25°C in aerobiosi. Tutti i lieviti possono crescere, a prescindere dalle specie presenti.

2. Identificazione di generi, specie e ceppi contaminanti

L'identificazione si esegue partendo dalle colonie isolate sulle piastre.

In base alle caratteristiche, la popolazione contaminante (che non è rappresentata né dal ceppo puro né dai differenti ceppi in caso di ceppi misti) deve essere inferiore a 5% della popolazione totale. Dopo le diluizioni necessarie a ottenere le singole colonie, se vengono identificate 20 colonie su 300, una contaminazione del 5% corrisponde (idealmente) a 1 colonia su 20.

Procedere all'identificazione del contaminante a livello della specie, e quindi a livello di genere, mediante sequenziamento D1/D2 (vedere il punto 2.1). Se tutte le colonie risultano essere della stessa specie, si può verificare che un ceppo contaminante sia inferiore al 5% analizzando 20 colonie mediante SSR (vedere il punto 2.2).

Se il preparato è una miscela di due o tre specie/ceppi, quello meno rappresentato deve corrispondere al 15% del totale. La verifica della composizione della miscela mediante identificazione delle colonie non è appropriata. In effetti, per una miscela composta da due ceppi, il meno rappresentato dovrebbe produrre 3 colonie su 20 identificate, raccolte tra le 400 presenti sulla piastra.

Pertanto, si suggerisce di eseguire il controllo per due o più specie presenti nella miscela (proporzione delle diverse specie) mediante PCR quantitativa specifica con sonde complementari alla sequenza bersaglio di ciascuna delle specie attese. In questo caso non è necessaria una coltura preliminare su piastra. Il DNA viene estratto direttamente dal campione.

Per il controllo di miscele contenenti ceppi della stessa specie (proporzione dei diversi

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

ceppi), la sola possibilità disponibile ad oggi non può escludere la coltura su piastra e l'identificazione delle colonie a livello del ceppo; tuttavia, il risultato deve essere interpretato con cautela, dal momento che la presenza di ciascun ceppo sulla piastra è influenzato, da una parte, dalla capacità di crescita del ceppo stesso e, dall'altra, dal numero troppo ridotto di colonie identificabili.

2.1. Identificazione delle specie

La specie viene identificata mediante sequenziamento del DNA del dominio variabile D1/D2 della regione ribosomiale 26S ottenuta mediante amplificazione con PCR. Si tratta del “metodo di elezione” per l’identificazione delle specie di lievito: i ceppi con una differenza nella sequenza nel dominio D1/D2 di 600 nucleotidi superiore all’1% non appartengono alla stessa specie.

1. Sospendere separatamente le colonie direttamente nella miscela per la PCR, oppure prima in acqua (circa 50 µL, in base alla dimensione della colonia) e aggiungere il campione alla miscela per la PCR;
2. miscela per la PCR (volume finale di 50 µL): 10 mM di Tris HCl a pH 8, 50 mM di KCl, Triton allo 0,1% v/v X100, 0,2 mg/mL di BSA, glicerolo 3,12% v/v, 1,5 mM di MgCl2, 200 µM di dNTPs, 0,1 U/µL di polimerasi Taq;primer: NL1/NL4. NL 1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG) e NL 4 (5'-GGTCCGTGTTTCAA GACGG);
3. eseguire l'amplificazione dopo 10 min a 95°C per rendere accessibile il DNA, attraverso 30 cicli costituiti dalle seguenti fasi: 95 °C per 1 min, 55 °C per 45 s, 72 °C per 1 min e quindi una fase finale a 72 °C per 7 min;
4. purificare il prodotto della PCR utilizzando un kit di purificazione dei prodotti della PCR e sequenziarlo utilizzando i primer usati per l'amplificazione;
5. confrontare le sequenze ottenute con quelle disponibili sul database Genbank (www.ncbi.nih.gov./Genbank).

2.2. Identificazione dei ceppi

Una volta identificata la specie è possibile identificare i ceppi. Per molte specie di lieviti enologici, almeno per le specie principali utilizzate come starter, il metodo più affidabile e preciso per l'identificazione si basa sull'analisi delle sequenze ripetute (microsatelliti) SSR. In una precisa posizione del loro genoma, i ceppi differiscono per il numero di ripetizioni delle sequenze brevi. Questi loci sono delimitati dalle regioni conservate le quali vengono scelte come primer per l'amplificazione mediante PCR.

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017

L'analisi consiste nell'amplificazione mediante PCR dei diversi loci (utilizzando primer adeguati per ciascuna specie di lievito) e quindi nella misurazione della loro lunghezza mediante elettroforesi capillare per sequenziamento (con risoluzione prossima a quella nucleotidica).

Note:

1. al momento della redazione del presente documento, non è possibile eseguire la tipizzazione del ceppo per tutte le specie di lievito;
2. al fine di poter seguire i progressi scientifici, la scelta dei primer adatti per ciascuna specie viene effettuata facendo riferimento ai lavori pubblicati su riviste scientifiche internazionali di peer review;
3. per alcune specie, sono stati analizzati fino a un massimo di 9-12 loci, alcuni loci sono risultati essere più discriminanti di altri;
4. è possibile semplificare l'analisi considerando in un primo momento un numero ridotto di loci, scegliendoli tra quelli che presentano il miglior potere discriminante, e quindi proseguendo con l'analisi in caso di ambiguità;
5. l'amplificazione può essere condotta in multiplex, questo consente di abbreviare i tempi dell'analisi e semplificarla.

Esemplare certificato conforme Sofia, 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2017