



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

IL RUOLO DEL LIEVITO BRETTANOMYCES NELLE BEVANDE
ALCOLICHE: DALLA PRODUZIONE DI OFF-FLAVOURS NEI VINI,
ALL'ESALTAZIONE DELLA QUALITA' ORGANOLETTICA DELLE BIRRE
A FERMENTAZIONE SPONTANEA

Relatrice

Prof.ssa Viviana Corich

Laureanda

Gullì Marta

Matricola n. 2044356

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
1. CENNI STORICI E TASSONOMIA	6
1.2 FILOGENESI.....	6
2. GENOMA E FENOMA BRETTANOMYCES.....	8
2.1 GENOMA.....	8
2.2 FENOMA	9
2.2.1 FERMENTAZIONE ALCOLICA	10
2.2.1.2 RESISTENZA A SO ₂	12
3. AROMI PRODOTTI DA BRETTANOMYCES.....	14
3.1 COMPOSTI FENOLICI VOLATILI	14
3.2 ODORE DI “TOPO”	17
3.3 ACIDO ACETICO	19
3.4 ESTERI DI FERMENTAZIONE	19
3.5 ACIDI GRASSI VOLATILI	20
3.6 AROMI DERIVATI DALLA TRASFORMAZIONE DELLO ZUCCHERO	21
4. METODI DI IDENTIFICAZIONE	21
4.1 ANALISI PCR.....	22
4.2 CITOMETRIA A FLUSSO.....	26
5. METODI DI PREVENZIONE.....	28
5.1 IGIENE E SANITIZZAZIONE BOTTI.....	28
5.1.1 METODI FISICI	28
5.1.2 METODI CHIMICI.....	30
5.2 CHITOSANO FUNGINO.....	31
5.3 RIMOZIONE DELLA BIOTINA.....	33
5.4 METODICHE INNOVATIVE	34
6. RUOLO BRETTANOMYCES NELLE BIRRE ACIDE	35
6.1 PROCESSO INDUSTRIALE	36
6.2 TIPOLOGIE DI BIRRE ACIDE.....	38
7. CONCLUSIONI	40
BIBLIOGRAFIA	42

RIASSUNTO

Nella produzione di bevande alcoliche, le fermentazioni sono condotte da ceppi selezionati di lievito *S. cerevisiae*; ciò offre un maggior controllo del processo di trasformazione, ma allo stesso tempo una minore complessità organolettica del prodotto.

In questo elaborato si esplorano le caratteristiche dei lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* (telomorfo *Dekkera*), analizzando gli aspetti tecnologici negativi e positivi. Normalmente, infatti, si associa questo lievito alla generazione di off-flavours nel vino, i quali rendono il prodotto indesiderato dal punto di vista della qualità sensoriale, generando perdite economiche. Gli odori sgradevoli possono ricordare sudore di cavallo, aia, muschio ecc.

Proprio per questi motivi, comprendere le condizioni che favoriscono la crescita di questi lieviti e le modalità di prevenzione è essenziale per preservare la qualità del vino e soddisfare le aspettative dei consumatori. L'elaborato affronta l'importanza dell'identificazione precoce del microrganismo, con l'obiettivo di controllare e prevenire la sua contaminazione. Vengono trattati anche i nuovi approcci alla prevenzione, senza apportare modifiche al vino; si cita l'uso di sostanze antimicrobiche a basso impatto sulla salute, l'eliminazione di nutrienti che favoriscono la crescita del lievito, pratiche di sanitizzazione avanzate delle barriques di fermentazione mediante metodi fisici e chimici. *Brettanomyces* è un lievito contaminante sempre più presente negli ambienti di produzione e presenta un genoma in continua evoluzione. Ulteriori metodi di prevenzione sono dunque in fase di studio, puntando al risparmio dei costi, alla rapidità e alla specificità dei risultati, garantendo la sicurezza del prodotto e del consumatore.

Infine, viene evidenziato come, nella produzione di birre a fermentazione spontanea, il lievito possa invece esaltarne la complessità organolettica. Attraverso una ricerca bibliografica approfondita, l'elaborato dimostra che, sebbene *Brettanomyces* possa rappresentare una sfida per i produttori di vino, stanno emergendo sempre più novità per prevenire la sua crescita. Si dimostra inoltre come la sua presenza nelle birre artigianali può fornire al prodotto un profilo aromatico unico e altamente ricercato. Si forniscono informazioni in merito ad una gestione equilibrata di questo lievito nell'industria delle bevande alcoliche e come ciò possa aprire nuove opportunità al settore.

ABSTRACT

In alcoholic beverage production, fermentation is carried out by selected strains of *S. cerevisiae* yeast. This provides greater control over the transformation process, but at the same time results in a less complex organoleptic profile of the product.

This paper explores the characteristics of yeasts belonging to the *Brettanomyces* genus (teleomorph *Dekkera*), analyzing both the negative and positive technological aspects. In fact, this yeast is typically associated with the generation of *off-flavours* in wine, which makes the product undesirable from a sensory quality standpoint, leading to economic losses. Unpleasant aromas can resemble horse sweat, stable, musk, and others.

For these reasons, understanding the conditions that favor the growth of these yeasts and the method for preventing contamination is crucial to preserving wine quality and meeting consumer expectations. The paper addresses the importance of early microorganism's identification with the goal of controlling and preventing its contamination. It also discusses new prevention approaches that do not alter the wine, such as the use of low-impact antimicrobial substances on health, the removal of nutrients that promote yeast growth, and advanced sanitation practices for fermentation barrels through physical and chemical methods. *Brettanomyces* is an increasingly prevalent contaminant in production environments and possesses a continuously evolving genome. Further prevention methods are therefore under study, focusing on cost savings, speed, and result specificity, while ensuring the safety of the product and the consumer.

Finally, the paper highlights how, in the production of spontaneously fermented beers, this yeast can enhance the organoleptic complexity of the product. Through an extensive literature review, the paper demonstrates that although *Brettanomyces* may pose a challenge for wine producers, new methods are emerging to prevent its growth. It also shows how its presence in craft beers can provide a unique and highly sought-after aromatic profile. The paper provides information on how to manage this yeast in the alcoholic beverage industry and how this can open up new opportunities for the sector.

1. CENNI STORICI E TASSONOMIA

Il lievito *Brettanomyces* è stato descritto per la prima volta nel 1904 dal microbiologo danese Niels Hjelte Claussen, presso un birrificio in Gran Bretagna. Claussen, isolò questo microrganismo dalla birra, dove era responsabile della fermentazione secondaria. La denominazione linguistica del lievito, infatti, deriva dal greco “Brettano” [birra britannica] e “Myces” [fungo]. Inizialmente fu classificato come specie *Torula*; successivamente nel 1921, Kufferath e Van Laer isolarono un ceppo da birre lambic belghe, avente le stesse caratteristiche del lievito di Claussen. Lo classificarono così, in un'unica specie, denominata *Brettanomyces bruxellensis*. Nel 1940, il microbiologo belga Mathieu Custers, descrisse 17 diversi ceppi isolati da birre inglesi e belghe. La classificazione si basava su poche varianti che si riproducevano asessualmente, dette anamorfe; nel 1960 si notò la formazione di ascospore sessuate in alcuni ceppi, introducendo così la controparte telomorfa *Dekkera*. L'odierna nomenclatura del lievito è la seguente: *Brettanomyces/Dekkera* o *B/D*. (Steensels *et al.*, 2015). È da precisare però che la sporulazione avveniva con bassa frequenza, circa dopo tre settimane, generando pareri contrastanti sulla presenza o meno di un effettivo ciclo sessuale (Curtin e Pretorius, 2014).

Attualmente sono state accettate cinque specie di *Brettanomyces*: *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardensis* e *B. nanus*. Una sesta specie, *Brettanomyces acidodurans*, è stata proposta recentemente; tuttavia, presenta una ampia divergenza genetica con le altre cinque specie (Roach e Borneman, 2020).

1.2 FILOGENESI

Le prime analisi genetiche per *Brettanomyces* sono state fatte utilizzando il sequenziamento dell'RNA ribosomiale, il quale è un metodo molto utile per studiare l'evoluzione. Tuttavia, queste analisi hanno dato risultati conflittuali nel posizionamento evolutivo di due specie, *B. custersianus* e *B. naardenensis*. Ciò voleva dire che le specie non venivano sempre collocate nella stessa posizione nell'albero filogenetico.

Successivamente, sono stati pubblicati altri studi che hanno dato risultati più coerenti per *B. custersianus* (dunque collocando questa specie nello stesso ramo delle altre specie), ma hanno continuato a mostrare incertezze riguardo al posizionamento di *B. naardenensis* e *B. nanus*, con ramificazioni leggermente incoerenti. Sono stati infatti raggruppati insieme.

I genomi di *Brettanomyces* dimostrano una notevole variabilità in termini di ploidia e cariotipi, con ceppi aploidi, diploidi e triploidi di *B. bruxellensis* isolati. Tramite elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE), vi è la conferma che il numero di cromosomi di questa specie è stimato tra 4 e 9, a seconda del ceppo, e le dimensioni del genoma ottenuta dalle attuali sequenze genomiche aploidi disponibili varia tra 11,8 Mb e 15,4 Mb.

L'analisi dei geni ribosomali ha permesso di generare una filogenesi completa, analizzando le diversità di origine tra *Brettanomyces* e *Saccharomyces*. Sono stati allineati numerosi geni, riferiti a 3482 ortologhi, derivanti un ancestrale comune, nelle sei specie di *Brettanomyces*. (Micheal J. Roach e Anthony R. Borneman, 2020). Come illustrato nella Fig 1.2, l'albero filogenetico colloca le sei specie di *Brettanomyces* in un gruppo intermedio, assieme ai lieviti *Abaricus sacchari* e *Ogateae polymorpha* (le specie più affini al genere di *Brettanomyces*). Queste specie sono classificate nella Famiglia delle *Pichiaceae*, distaccandosi dalla famiglia delle *Saccharomycetaceae* (Harrouard *et al.*, 2022).

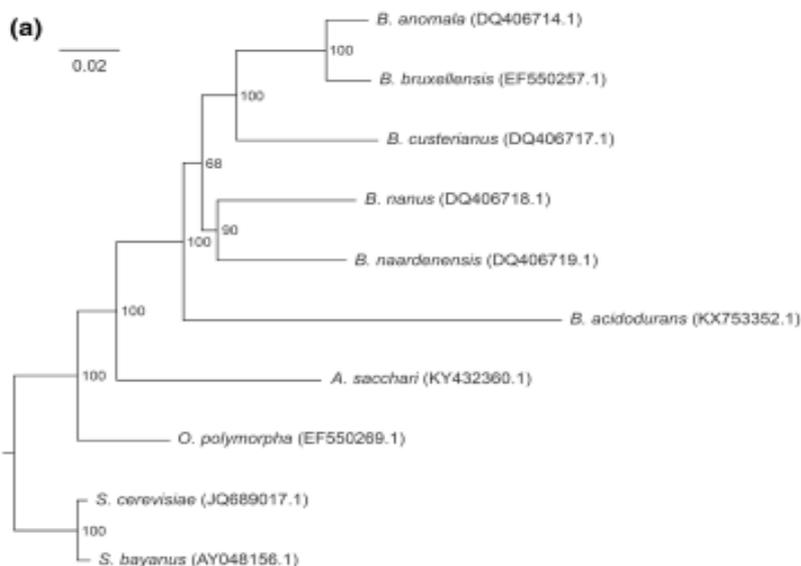


Fig. 1 Albero filogenetico del genere *Brettanomyces* (Harrouard *et al.*, 2022).

2. GENOMA E FENOMA BRETTANOMYCES

Brettanomyces/Dekkera spp. partecipa alla fermentazione alcolica spontanea di birra, vino e sidro. Tuttavia, è stato isolato anche da bevande analcoliche, prodotti lattiero-caseari e olive (Steensels *et al.*, 2015).

Tutti gli ambienti sopra elencati, sono caratterizzati da condizioni molto stressanti, come alta concentrazione di etanolo, basso pH, limitata presenza di ossigeno ecc.

In questo capitolo si fornisce una sintesi degli aspetti genomici di questo lievito e di come i processi evolutivi abbiano permesso di adattarsi ad ambienti ostili. Inoltre, si descrive come i fattori ambientali e la presenza della specie *S. cerevisiae*, ne abbiano influenzato lo sviluppo.

2.1 GENOMA

Tra le specie di *Brettanomyces*, solo *B. nanus*, *B. anomalus* e *B. custersianus*, sono associate esclusivamente ai prodotti fermentati. *B. naardensis* non è stato isolato da alimenti fermentati, ma da bevande gassate. *B. bruxellensis* è invece associato sia ad alimenti fermentati, come la birra e il vino, sia ad altri prodotti, come le olive nere o il Kombucha.

Le dimensioni del genoma ed il contenuto genico di questa specie sembrano essere in linea con gli altri ascomiceti generalmente diploidi. Tuttavia, sono stati isolati numerosi ceppi triploidi da cantine australiane, francesi e sudafricane.

Uno studio a livello genomico su numerosi ceppi *B. bruxellensis* ha evidenziato un elevato livello di eterozigosi (Curtin e Pretorius, 2014). In un altro studio i ricercatori hanno sequenziato il genoma di 53 isolati di *B. bruxellensis*, per la maggior parte da vini di origine europea, e alcuni provenienti da Sud Africa, Australia e Cile. Si è dimostrata un'enorme variabilità genetica intraspecifica, rilevando anche due eventi di ibridazione soprattutto in ceppi triploidi (Sébastien *et al.*, 2020).

B. bruxellensis e *B. anomalus* hanno genomi di grandi dimensioni (da 11,8 Mb a 15,4 Mb) che contengono 5735 geni; un genoma più piccolo invece è posseduto da *B. nanus* (10,2 Mb) con 5083 geni, ma la più elevata densità genica (78%).

Per approfondire l'adattamento ai processi fermentativi, sono stati esaminati i genomi delle diverse specie del genere *Brettanomyces*, focalizzandosi sulle espansioni e perdite di geni. L'espansione in *B. bruxellensis* di geni codificanti l'enzima oligo-1,6-glucosidasi (associato al metabolismo dell'amido e del galattosio), oppure l'espansione in *B. nanus* di geni per gli enzimi β -

galattosidasi e β -glucosidasi (per idrolisi di polisaccaridi complessi e disaccaridi) (Roach e Borneman, 2020), ne sono due esempi.

B. bruxellensis non cresce in presenza di metanolo. Infatti, è stato osservato che manca il gene che codifica per l'enzima alcol ossidasi, seppure possenga tutti gli enzimi necessari per il suo utilizzo (Curtin e Pretorius, 2014).

2.2 FENOMA

Secondo diversi studi, le osservazioni microscopiche dei ceppi di *B. bruxellensis* evidenziano un alto livello di polimorfismo cellulare. Fino ad ora, la maggior parte degli studi si è concentrata sulla capacità di questi lieviti di formare filamenti, trascurando le loro morfologie cellulari diverse. Correlare la diversità morfologica a quella genetica intraspecifica è complesso, a causa dei dati limitati e della variabilità delle condizioni di coltura. Tuttavia, precedenti studi hanno suggerito che la forma cellulare del lievito, potrebbe cambiare a seconda del gruppo genetico del ceppo.

In un recente lavoro, sono stati osservati 74 isolati da vini rossi, di *B. bruxellensis* tramite microscopia ottica, rivelando forme cellulari distintive: cellule allungate, piccole e rotonde (vedi Fig. 2.). Non si è notata alcuna influenza delle condizioni di crescita sulla morfologia, confermando studi precedenti. Inoltre, alcuni ceppi hanno mostrato la capacità di formare strutture multicellulari (Lebleux *et al.*, 2021).

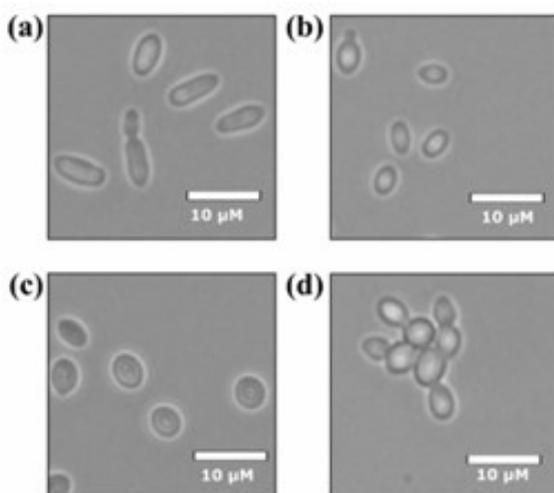


Fig. 2 Polimorfismo della morfologia cellulare osservato al microscopio ottico di ceppi alcuni ceppi isolati da vino rosso appartenenti alla specie *B. bruxellensis*. (a) cellule allungate, (b) cellule piccole e ovoidali, (c) cellule rotonde, (d) aggregati di cellule (Lebleux *et al.*, 2021).

Seppure *Brettanomyces/Dekkera spp.* cresca in numerosi ambiti ecologici in cui è presente anche *Saccharomyces cerevisiae*, i due lieviti esprimono caratteri fenotipici e metabolici nettamente differenti.

È di notevole importanza che siano note le condizioni di crescita ottimali per il lievito specifico, in modo tale da intervenire e modificarle a seconda dell'obiettivo tecnologico (eliminare un contaminante o favorire la crescita dello starter). Nel caso del vino, la crescita di *Brettanomyces* viene limitata modulando le condizioni ambientali, dall'altra parte nella birra, l'obiettivo è di favorire il suo sviluppo.

Di seguito vengono illustrate le caratteristiche fenotipiche e le modalità di crescita e fermentazione del lievito *Brettanomyces/Dekkera*.

2.2.1 FERMENTAZIONE ALCOLICA

In *Brettanomyces/Dekkera* il processo fermentativo, ovvero la trasformazione di zuccheri semplici in etanolo, è regolato dall'effetto Crabtree. In condizioni aerobiche, la respirazione viene repressa e viene favorita la fermentazione, solo se è presente una quantità di zuccheri >3 g/l; in questo modo il lievito assimila velocemente il glucosio e genera etanolo, inibendo la crescita di altri microrganismi. La resa in etanolo può arrivare ad essere anche >14% (v/v). In carenza di glucosio, invece, attraverso la strategia evolutiva "make-accumulate-consume", il lievito attua la respirazione e consuma l'etanolo prodotto e accumulato.

Al contrario di *S. cerevisiae*, la condizione di anaerobiosi in *Brettanomyces spp.* influisce nettamente sulla fermentazione alcolica; ciò è dovuto al cosiddetto effetto Custers (o effetto "Pasteur negativo") nome derivato dallo studente Mathieu Custers, il quale descrisse per la prima volta questo metabolismo. Si tratta dell'inibizione della fermentazione alcolica, a causa dell'accumulo di NADH per la continua produzione di acetato dall'acetaldeide; ciò crea uno squilibrio redox, non essendoci accettori ossigeno/H⁺, bloccando il processo della glicolisi a monte. Questo limita le sue capacità fermentative.

In condizioni di basso ossigeno, il complesso respiratorio NADH-ubiquinone reduttasi è presente e attivo nel lievito, attivando enzimi che producono NADH. Questo complesso, assente in *S. cerevisiae*, permette una produzione più efficiente di ATP anche in condizioni di scarsa disponibilità di ossigeno e nutrienti.

Dunque, un produttore di birra che impiega *Brettanomyces*, deve garantire continua ossigenazione alla biomassa, in modo tale da condurre una fermentazione sostenuta.

Una delle caratteristiche più spiccate di *Brettanomyces spp.* è la sua capacità di utilizzare più fonti di carbonio, tra cui fruttosio, maltosio, saccarosio; il più rilevante per il suo metabolismo è il cellobiosio. Possiede infatti l'enzima β -glucosidasi, che idrolizza il cellobiosio presente in botti di legno di rovere (Menoncin e Bonatto, 2019) e in tini di legno tradizionali utilizzati per la produzione di vino rosso e birre lambic. La sopravvivenza del lievito nella barrique è facilitata dalla diffusione dell'ossigeno, che consente lo sviluppo e limita i livelli di solfito molecolare (ossidandolo); come verrà esposto più avanti, quest'ultimo è un metodo di prevenzione sempre meno attuato.

Oltre a ciò, il microrganismo può passare allo stato bentonico formando "biofilm", che aumentano le sue capacità di sopravvivenza difendendolo da agenti antimicrobici, dunque consentendo di produrre aromi "Brett". Per questi motivi, per combattere questo lievito contaminante è meglio attuare metodi di prevenzione piuttosto che di contrasto (Malfeito-Ferreira, 2018).

2.2.1.2 RESISTENZA A SO₂

L'aggiunta di SO₂ nel vino contro *Brettanomyces spp.* è sempre stata utilizzata come tecnica di prevenzione per la sua crescita, a elevate concentrazioni di etanolo e a basse temperature di conservazione. (Pinto *et al.*, 2020)

Tuttavia, ormai, diversi ceppi di *B. bruxellensis* hanno sviluppato un'elevata resistenza al solfito, utilizzato come antimicrobico e antiossidante durante il processo di vinificazione (Crauwels, et al., 2015). *Brettanomyces* può entrare in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) quando esposto a stress da SO₂. In questo stato, il lievito non cresce su terreni non selettivi ma può rimanere attivo metabolicamente e potenzialmente riprendere la crescita se le condizioni diventano favorevoli (Steensels *et al.*, 2015).

Uno studio molto recente ha investigato il fenomeno della resistenza alla SO₂ di due specifici ceppi di *B. bruxellensis* (AWRI 1499, triploide, e CBS 2499, diploide). Si è osservato che i due ceppi, dopo cinque ore di esposizione ad una concentrazione crescente di SO₂ (da 0,35 mg/l a 16,4 mg/l), hanno rallentato la loro crescita e la loro capacità di moltiplicarsi. Tuttavia, sono riusciti a recuperare i livelli di crescita dopo ottanta ore, aumentando anche la produzione di acido acetico rispetto al controllo senza SO₂, dimostrando, perciò, una buona capacità di adattamento allo

stress causato dai solfiti. I ceppi sono stati coltivati in condizioni enologiche in cui è stato studiato il trascrittoma (analisi sequenze di mRNA).

È emerso che il numero di geni attivati in risposta al fattore di stress era molto inferiore a breve termine, rispetto a quanto osservato a lungo termine, dove la variazione nei livelli di espressione ha coinvolto circa mille geni sono stati trascritti e tradotti.

L'analisi trascrittomica ha rilevato l'attivazione del gene SSU1, presente anche in *S. cerevisiae*, che codifica per un trasportatore specifico di SO₂ in grado di rimuovere i solfiti dalle cellule. È stata quindi confermata anche in *Brettanomyces* l'importanza di questo trasportatore nel meccanismo di detossificazione. Anche i geni PST2 e CLD1, associati alla risposta allo stress ossidativo, sono stati trascritti, testimoniando il loro coinvolgimento nel meccanismo di resistenza.

Dai risultati, è emersa qualche differenza di comportamento tra i due ceppi; infatti, il ceppo triploide presenta una maggiore resistenza allo stress, producendo una quantità più significativa di composti volatili rispetto al ceppo diploide. Queste differenze sono confermate da uno studio che ha esaminato ben 145 ceppi *B. bruxellensis* (in Fig. 4 sono riportati i risultati di tre ceppi), di cui 52 (36%) sono risultati tolleranti a stress da solfito, ma a livelli variabili (Avramova *et al.*, 2018). Ciò conferma, ancora una volta, l'elevata eterogeneità genica tra ceppi di ogni singola specie di lievito. (Federica Valdetara *et al.*, 2020).

Questi risultati indicano chiaramente la necessità di valutare nuove alternative (fisiche, chimiche e biologiche) all'aggiunta di solfiti per eliminare *Brettanomyces* spp. dal vino.

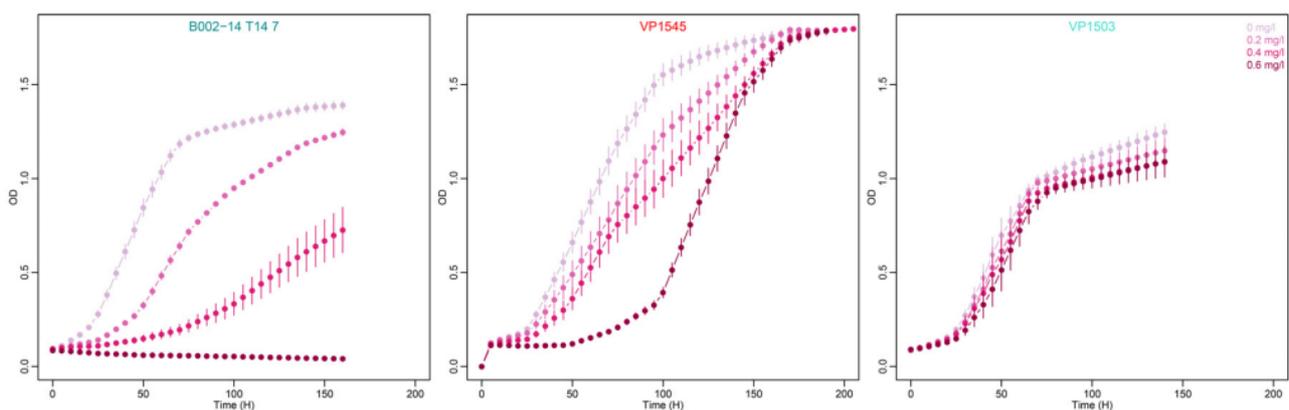


Fig. 4 Curva di crescita dei ceppi B002-14 T14 7, VP1545 e VP1503 appartenenti alla specie *Brettanomyces bruxellensis* in presenza di quattro concentrazioni di SO₂. Concentrazioni di SO₂ testate: lilla 0 mg/l, rosa 0,2 mg/l, fucsia 0,4 mg/l e viola 0,6 mg/l. Sull'asse delle ascisse è rappresentato il tempo di crescita in ore. Mentre sull'asse delle ordinate è riportata "OD" (densità ottica a 600 nm, con la quale si misura la torbidità del terreno di crescita) (Avramova *et al.* 2018)

3. AROMI PRODOTTI DA BRETTANOMYCES

La presenza di *Brettanomyces* spp. nelle barrique tradizionali di vini rossi invecchiati, è associata alla produzione di aromi sgradevoli, denominati per l'appunto "aromi Brett".

Questi composti estremamente volatili, se riscontrati nel vino, possono provocare notevoli perdite economiche. Tuttavia, il lievito è anche responsabile di note aromatiche positive, che possono esaltare il profilo organolettico di birre acide.

3.1 COMPOSTI FENOLICI VOLATILI

I composti fenolici volatili sono i principali indicatori dell'attività di *Brettanomyces* nel vino, in quanto responsabili di caratteristiche aromatiche sgradevoli. Sono infatti descritti come odori di aia, cuoio, medicinale, sudore di cavallo, affumicato o perfino piccante. La loro concentrazione varia in base al mezzo di fermentazione, poiché la quantità dei precursori fenolici (tra cui acido ferulico e p-cumarico) può aumentare significativamente nei vini rossi, data la loro estrazione dalle bucce degli acini durante la macerazione. La via metabolica per la produzione di vinil fenoli è stata studiata da Heresztyn nel 1986 e descrive la capacità di *Brettanomyces* spp. di trasformare gli acidi idrossicinnamici (l'acido ferulico, l'acido caffeico e l'acido p-cumarico) in composti etilici (4-EG, 4-EC e 4-EP) dall'odore distintivo (vedi Fig. 4). Queste reazioni coinvolgono l'enzima idrossicinnammato decarbossilasi (rimuove un gruppo carbossilico dagli acidi) e l'enzima VPR, vinil fenolo reductasi (riduce gli idrossistireni in derivati etilici). L'enzima VPR, in ambiente riducente di fermentazione, utilizza NADH come cofattore per ridurre gli idrossistireni ai loro derivati etilici, contribuendo a mantenere l'equilibrio redox della cellula. Al contrario, *Saccharomyces cerevisiae* non esprime VPR; infatti, produce solamente i derivati vinilici, ma senza la riduzione ai derivati etilici dall'odore sgradevole.

È stata riscontrata in *Brettanomyces* l'attività dell'enzima fenil acrilato decarbossilasi (PAD, codificata dal gene PAD1), in grado di decarbossilare gli acidi fenolici (come l'acido fenilacrilico) e trasformarli in etilfenoli. Questo enzima è espresso anche in *Saccharomyces cerevisiae*.

È stato provato che l'espressione del gene PAD1 detossifica la cellula, contribuendo così ad utilizzare più efficacemente i nutrienti, aumentando il tasso di crescita e la produzione di etanolo in fermentazione.

I principali composti responsabili del “sapore Brett” includono: 4-etilfenolo (4-EP), 4-etilguaiacolo (4-EG) e 4-etilcatecolo (4-EC) e i loro composti intermedi 4-vinilfenolo (4-VP), 4-vinilguaiacolo (4-VG), e 4-vinilcatecolo (4-VC). (Steensels *et al.*, 2015).

Conterno e Henick-Kling (2022) hanno riportato uno studio, effettuato da Farina *et al.*, (2007), il quale indaga sulla quantità di queste molecole in vini rossi Tannat dove è cresciuto *Brettanomyces*. Farina e i suoi collaboratori, tramite microestrazione liquido-liquido, hanno quantificato i fenoli volati riscontrando elevate concentrazioni di 4-EG (fino a 1561 µg/l), 4-EP (fino a 6047 µg/l) e 4-EC (89 µg/l); invece, sono state trovate solo tracce di 4-VG e nessuna traccia di 4-VP.

Nel medesimo studio, sulla base di test effettuati sui consumatori, è stato possibile definire le seguenti soglie di percezione nei vini rossi:

- 774 µg/l per 4-EC
- tra 33 µg/l e 135 µg/l per 4-EP
- tra 250 µg/l e 650 µg/l per 4-EG (Conterno e Henick-Kling, 2022).

Il rapporto tra 4-EP e 4-EG varia significativamente da vino a vino, sono stati infatti osservati valori di 3:1 a oltre 40:1. Le ragioni di queste differenze sono probabilmente dovute al comportamento di diversi ceppi di *Brettanomyces*, alcuni dei quali sono più efficienti nella produzione di un composto rispetto all'altro.

È interessante notare che, mentre 4-EP e 4-EG sono associati a odori fortemente sgradevoli nei vini, gli stessi composti sono considerati essenziali nel definire il profilo aromatico delle birre lambic, American Coolship Ale e altre birre acide belghe. Questa discrepanza nell'effetto percepito nei vini e nelle birre potrebbe derivare dalle differenze nella concentrazione di fenoli volatili: le birre tendono a contenere concentrazioni più elevate di 4-EG (aroma di chiodi di garofano), mentre i vini presentano più 4-EP (aroma di medicinale, simile ad un cerotto). (Steensels *et al.*, 2015).

A causa dei loro effetti negativi sulla qualità del vino, molti ricercatori hanno esaminato i fattori che influenzano la produzione di questi aromi sgradevoli. I risultati indicano che *Brettanomyces bruxellensis* produce 4-EP in condizioni di basso contenuto di zucchero residuo, pH basso, temperatura compresa tra i 25°C e i 28 °C, alta concentrazione di ossigeno e bassa concentrazione di solfiti. Sono tutte condizioni che caratterizzano il processo di maturazione in barrique di vini rossi invecchiati. (Crauwels *et al.*, 2015). Oltre ciò, la varietà di uva scelta influenza la disponibilità

del precursore acido p-cumarico; infatti, come riportato da uno studio di Pöllnitz *et al* (2000), i vini da uve Pinot nero contengono meno acido p-cumarico, e di conseguenza meno 4-EP, rispetto a vini da uve Sauvignon o Merlot (Kheir *et al.*, 2013).

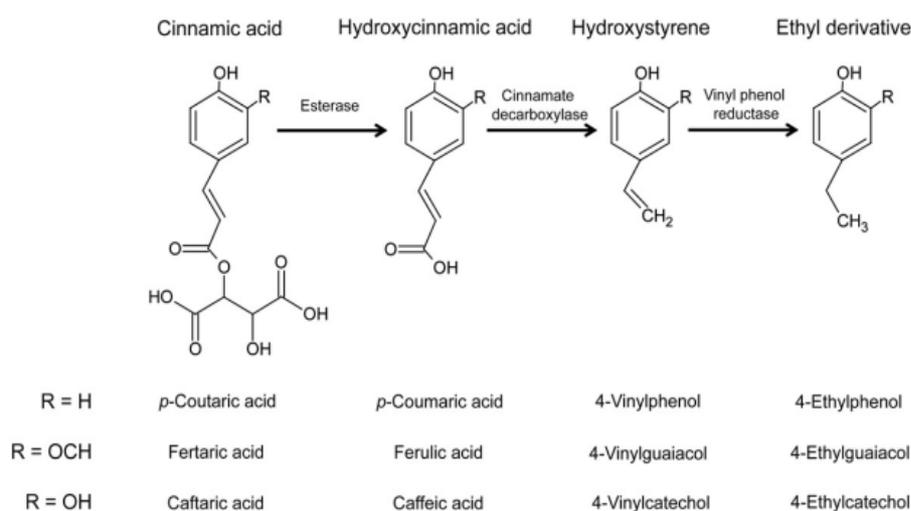


Fig.5 Reazioni ed enzimi coinvolti nella formazione di composti fenolici volatili in *Brettanomyces* (Steensels *et al.*, 2015).

In uno studio condotto da Álvarez Gaona *et al.*, (2021), è stato effettuato uno screening per isolare mutanti di *B. bruxellensis* con produzione ridotta di 4-EP.

Inizialmente sono stati coltivati oltre mille isolati provenienti da vini rossi argentini contaminati ed è stato selezionato un ceppo di *B. bruxellensis* (CH29), scelto per il suo alto tasso di conversione dell'acido p-cumarico in 4-EP. È stato poi aggiunto un agente mutageno al ceppo (etilmetanolsolfonato), causando così una mutagenesi chimica. Le cellule mutanti del ceppo sono state coltivate e incubate, per poi essere sottoposte ad uno "screening" olfattivo effettuato da una persona esperta. L'esperto ha confrontato le colonie mutanti con un ceppo parentale (controllo positivo) e un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* (controllo negativo). Sono state individuati sei ceppi mutanti, che avevano sviluppato "aromi Brett" in quantità inferiore rispetto al controllo positivo. Infine, mediante gas cromatografia (GC/MS), è stato selezionato il ceppo mutante 27 in quanto produce valori di 4-EP di oltre tre volte inferiori (323,4 µg/l) rispetto al ceppo parentale (1130,7 µg/l) (Fig.5). Inoltre, il ceppo selezionato ha mostrato una maggiore varietà e

concentrazione di esteri etilici, che costituiscono uno dei gruppi di composti aromatici più importanti prodotti da *Brettanomyces*.

Sulla base di questi risultati, si può considerare il ceppo mutante 27 selezionato un buon candidato per essere testato come starter di lievito non convenzionale (puro o in co-inoculo) per ottenere birre con nuove proprietà aromatiche. Non è ancora chiaro se possa essere utilizzato come starter anche nei vini, per questo sono necessari ulteriori studi e verifiche al riguardo.

Compound group	Compound name	Description	<i>B. bruxel- lensis</i> CH29 (µg/L)	R.S.D. (%)	mutant 27 (µg/L)	R.S.D. (%)
Alcohols	1-Pentan-1-ol	Medicinal alcohol, fruity, balsamic	172.4	12	129.3*	8
	2-Butyl-1-octanol	–	57.3	18	67.4	4
	2-Hexyl-1-decanol	–	27.1	24	ND	ND
	Heptadecan-1-ol	–	1085.4	8	1108.8	26
Alkanes	10-Heneicosene	–	ND	ND	40.5	11
	Decane	–	27.1	13	30.1	12
Aldehydes	Acetaldehyde	Fruity	7.1	10	9	21
Esters	2,2,4-Trimethylpentanediol-1,3-diisobutyrate	Plastic	24.3	10	44.1*	12
	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	Fruity	4.3	23	4	25
	4-Tert-butylcyclohexyl acetate	Sweet creamy, woody with soft floral	ND	ND	2.3	16
	Ethyl 2-methylbutyrate	Green, fruit, apple	52.9	12	43	17
	Ethyl butyrate	Pineapple, lard, fruity	17.1	24	24.5	30
	Ethyl decanoate	Fruity, liqueur	25.5	24	23.6	25
	Ethyl hexanoate	Apple, slightly sweet, fruity, pineapple, banana	10	38	ND	ND
	Ethyl isobutyrate	Apple, slightly sweet	ND	ND	11.6	22
	Ethyl laurate	Greasy, slightly fruity or floral	ND	ND	12.8	17
	ethyl nonanoate	Fatty acids, fruity, perfumed	ND	ND	2.9	26
	Ethyl octanoate	Fruit, pineapple, apple, brandy	52.7	18	99.7*	14
	Isobornyl acetate	Camphor, pine, balsamic, herbal	8.4	23	7.8	17
	Isopropyl laurate	Alcoholic	3.4	38	1.9	30
Ketones	3-Isopentyl-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one	Solvent, fruity	31.7	23	38.2	18
	2,4-Di-tert-butylphenol	–	100.5	29	187.8*	21
Phenols	4-Ethylphenol	Leather, stable	1130.7	14	323.4*	20
	Cedrol	Cedar	2.7	16	ND	ND
Terpenes	3-Butyl-2-ethyltetrahydrothiophene	Sulfurous, solvent, fruity burnt	15.1	29	20.2	23
	β- methyl-ionone	Woody floral	19.4	21	19	16

Fig. 6 Profilo aromatico del ceppo mutante 27, in confronto al ceppo di controllo CH29. I valori corrispondono alla media di tre repliche di analisi RSD: coefficiente di variazione (Álvarez Gaona *et al.*, 2021).

2.2 ODORE DI “TOPO”

I difetti “mousy” sono aromi riscontrati nel vino e nelle birre acide e derivati dalla presenza di piridine (N-eterocicli), come 2-acetil-3,4,5,6-piridina (APY), originata dalla decarbossilazione

dell'amminoacido ornitina, 2-acetil-1,4,5,6-tetraidropiridina (ATHP) e 2-etil-3,4,5,6-tetraidropiridina (ETHP), originate dalla decarbossilazione dell'amminoacido L-lisina e da altre reazioni che coinvolgono l'etanolo.

Conterno e Henick-Kling (2022), hanno citato l'interessante percorso metabolico di biosintesi di questi aromi, studiato da Grbin *et al.*, (2007) dove l'amminoacido è convertito in 1-piperideina attraverso una deaminazione, mediata da un' α -ossidasi, seguita da una decarbossilazione che avviene tramite l'intermedio 1-piperideina-2-carbossilato. Una reazione di condensazione, tramite acetil-CoA, incorpora la molecola di acetaldeide necessaria per generare ATHP. L'ETHP viene quindi prodotto da ATHP attraverso un processo di riduzione. Inoltre, *Brettanomyces* potrebbe essere in grado di sintetizzare ATHP anche in assenza di lisina, grazie alla sua capacità di biosintetizzare questo amminoacido.

Gli odori sono descritti come "urina di topo" e i sapori sono caratterizzati dal descrittore "biscotti salati", ma in condizioni di basso pH, possono essere percepiti come sapori metallici o amari. Di solito, questi aromi si percepiscono solo dopo la deglutizione del prodotto e il sapore può persistere per più di dieci minuti. Come altri composti, le concentrazioni possono variare tra diverse specie e ceppi di *Brettanomyces* (Steensels *et al.*, 2015).

Sebbene questi aromi siano spesso associati a un sapore sgradevole, alcuni birrai li considerano retrogusti interessanti; si può infatti agire sul contenuto di amminoacidi del mezzo, e di conseguenza sulla quantità desiderata di N-eterocicli, modificando il tipo di malto utilizzato, la quantità di luppolo aggiunto e le condizioni di crescita del lievito. Studi molto ricorrenti, riportati da Martusevice (2024), indicano che il contenuto di aromi di "topo" nelle birre acide diminuisce se viene applicato malto chiaro al processo, piuttosto che malto scuro. Questo perché la bassa temperatura di essiccazione causa una reazione di Maillard più leggera e di conseguenza una

presenza minore di prodotti di degradazione di amminoacidi.

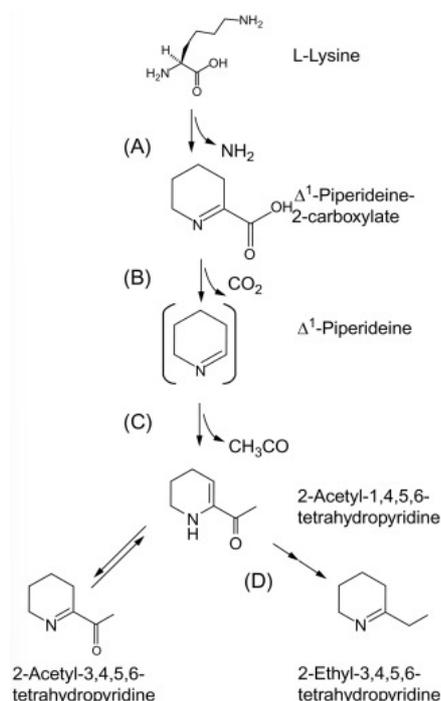


Fig.7 Biosintesi delle molecole responsabili dell'odore di "topo" prodotte da *Brettanomyces spp.* (Conterno e Henick-Kling, 2022).

La risposta degli aromi prodotti con le concentrazioni di amminoacidi del mezzo è certamente di tipo dose-dipendente, tuttavia, è stato condotto uno studio dove è stata sperimentata l'aggiunta di 100 mg/l di ornitina al vino, ottenendo una produzione di soli 0,5 µg/l di APY. Ciò porta alla conclusione che il lievito *Brettanomyces* non sia l'unico responsabile della produzione di APY, ma che siano coinvolti anche batteri lattici deterioranti (Conterno e Henick-Kling, 2022).

3.3 ACIDO ACETICO

In presenza di ossigeno, come spiegato precedentemente, *Brettanomyces* può produrre grandi quantità di acido acetico. Uno studio ha investigato la produzione di questa molecola in presenza di diverse condizioni di ossigeno. È stato rilevato che in condizioni aerobiche l'acido acetico è stato prodotto ad un'elevata concentrazione (9,4 g/l), mentre in condizioni anaerobiche sono stati sintetizzati solo 0,025-0,15 g/L di acido acetico (Conterno e Henick-Kling, 2022). Normalmente nel vino le concentrazioni di acido acetico si attestano tra 0,2 e 0,6 g/l, intervallo sotto la soglia di percezione (0,7 g/l). Nelle birre Lambic, le concentrazioni di acido acetico superano quelle del vino, variando tipicamente da 0,4 a 1,2 g/l. Infatti, le birre fermentate spontaneamente sono dette "birre acide" proprio a causa della forte presenza di acidi organici come l'acido acetico e l'acido lattico. In generale, l'acido acetico diventa un difetto e oltre il limite di legge Europeo, quando la sua concentrazione supera 1,2-1,3 g/l. Tuttavia, questo acido può essere utilizzato dal lievito per la sintesi di aromi molto floreali e fruttati, come gli esteri volatili acetati (Steensels *et al.*, 2015).

3.4 ESTERI DI FERMENTAZIONE

Gli esteri di fermentazione rappresentano un gruppo fondamentale di composti aromatici, responsabili delle note fruttate e floreali nelle birre acide. Il lievito *Brettanomyces* è capace di generare elevate concentrazioni di diversi esteri etilici, grazie all'utilizzo dell'acido acetico prodotto in grandi quantità e dell'acido lattico proveniente dai batteri lattici che partecipano al processo fermentativo.

La principale categoria di esteri riscontrata nelle birre è quella contenenti l'etanolo: acetato di etile, lattato di etile, caprato di etile e caprilato di etile, i quali contribuiscono a donare sentori di frutta tropicale e ananas.

Il lievito può attivamente degradare alcuni esteri acetati, come l'acetato di isoamile (aroma di banana), prodotto da *S. cerevisiae* in quantità considerevoli, grazie all'attività dell'enzima esterasi.

Questo enzima catalizza l'idrolisi degli esteri, portando alla formazione di acidi e alcol. Questa mancata produzione di esteri acetati può essere dovuta all'assenza di geni responsabili per tali attività AFT1 e AFT2 (alcol acetil transferasi).

Nelle fasi avanzate della fermentazione delle birre Lambic, che coinvolgono una varietà di lieviti *Brettanomyces* e diverse specie batteriche, la composizione degli esteri è caratterizzata da basse quantità di acetato di isoamile e significative concentrazioni di acetato di etile, caprato di etile, caprilato di etile e lattato di etile. Le birre tradizionali presentano una concentrazione media di acetato di etile che varia tra 8 e 48 mg/l, mentre nella birra gueuze filtrata si attesta tra 33,4 e 67,6 mg/l e per quella non filtrata tra 60,9 e 167 mg/l.

La concentrazione di lattato di etile nelle birre lambic supera i 400 mg/l, ben oltre la soglia di gusto di 50 mg/l e quella di odore di 14 mg/l. Il caprilato di etile e il caprato di etile, normalmente assenti in birre lager o presenti solo in piccole quantità in birre ale, sono invece tipici delle birre lambic e gueuze, conferendo loro un sapore vinoso e fruttato. In alcune birre gueuze, la concentrazione di etilcaprilato può raggiungere fino a 5,7 mg/l (S. Crauwels *et al.*, 2015).

3.5 ACIDI GRASSI VOLATILI

Brettanomyces/Dekkera, grazie all'enzima esterasi, può rompere il legame estere che coinvolge acidi grassi a catena media, volatili, e lunga (C9, C10, C12, C14, C16). Sebbene i precisi meccanismi metabolici alla base della produzione di acidi grassi volatili in *Brettanomyces* non siano ancora completamente compresi, è stato dimostrato che la degradazione degli amminoacidi gioca un ruolo cruciale. In particolare, L-leucina, viene decomposta in acido isovalerico attraverso un processo che inizia con la transaminazione ad acido α -chetoisocaproico, seguito da decarbossilazione in isoamilaldeide e ossidazione finale in acido isovalerico. La degradazione di L-Isoleucina porta alla formazione di 2-metilbutirrico e la degradazione di L-Valina produce acido isobutirrico. L'acido isovalerico e l'acido isobutirrico sono sapori sgradevoli descritti come rancidi, di muffa e di formaggio, che però in piccole quantità possono conferire complessità alla bevanda; nella birra, infatti, trattandosi di un prodotto molto più complesso del vino, possono conferire quasi dolcezza e sentore di uva (Colomer e al., 2019).

I geni codificanti per la produzione di acidi grassi volatili in *B/D* non sono ancora stati identificati nello specifico. Tuttavia, sono stati individuati nel genoma del microrganismo geni che codificano per alcol e aldeide deidrogenasi implicate nella sintesi di questi aromi (Steensels *et al.*, 2015).

3.6 AROMI DERIVATI DALLA TRASFORMAZIONE DELLO ZUCCHERO

Come già citato precedentemente, *Brettanomyces* possiede l'interessante capacità di idrolizzare il cellobiosio, un disaccaride presente nel legno delle barrique di vino e birra, e di fermentarlo ulteriormente in etanolo. Tale processo richiede l'enzima β -glucosidasi, che permette anche la liberazione di aromi ottenuti dalla trasformazione di composti del legno. Questi aromi, a causa del loro legame con una molecola di zucchero, normalmente risultano solubili in acqua, non volatili e inodori. (Steensels *et al.*, 2015). Nelle fasi finali di fermentazione della birra, invece, questa attività associata al lievito risulta positiva in quanto, in questo modo viene incrementato il profilo aromatico del prodotto. In particolare, nel caso della birra, i glicosidi provengono principalmente dal luppolo e, se viene rimosso lo zucchero, si ottiene un notevole aumento aromatico a causa dell'incremento principalmente di terpeni liberi, come il linalolo (profumo fresco e floreale). Inoltre, *Brettanomyces* spp. è in grado di trasformare alcuni monoterpeni in β -citronellolo e α -terpeniolo, donando sentori aromatici e agrumati alla birra. Questi aromi, tuttavia, possono anche derivare da frutti aggiunti durante il processo, come nel caso della tradizionale birra di ciliegia belga Kriek, dove *Brettanomyces* scinde alcuni composti glicosilati presenti nella ciliegia, producendo molecole aromatiche come benzaldeide, linalolo ed eugenolo (odore di cannella e sapore molto dolce e speziato) (Colomer *et al.*, 2018).

L'attività β -glucosidica di *Brettanomyces bruxellensis* è stata studiata da Kuo *et al.* (2018) per il suo potenziale utilizzo nell'industria alimentare come agente per la produzione di resveratrolo. Questo polifenolo, noto per le sue proprietà antiossidanti e anti-invecchiamento, è presente in grandi quantità nelle bucce d'uva e in alcune piante, e potrebbe rappresentare un'interessante area di ricerca per il miglioramento delle qualità nutrizionali e sensoriali delle bevande fermentate. Lo studio ha riguardato l'isolamento di un mutante di *B. bruxellensis* da vino e la caratterizzazione di una nuova β -glucosidasi per la bioconversione dei piceidi, estratti da vegetali, in resveratrolo.

4. METODI DI IDENTIFICAZIONE

Nel corso degli anni, a causa del notevole danno economico che questo lievito ha causato all'industria vitivinicola, sono stati sviluppati e aggiornati diversi metodi per identificare i singoli ceppi di *Brettanomyces*. Questi protocolli sono essenziali per rilevare la presenza del lievito nel

vino e per poter intervenire, prima che questo possa iniziare il processo fermentativo in botte e produrre gli off-flavour. Le fasi della vinificazione in rosso che richiedono maggiore attenzione sono quelle precedenti e successive alla fermentazione malolattica. Durante queste fasi, per favorire la conversione dell'acido malico in acido lattico, le temperature vengono mantenute più elevate e le concentrazioni di SO₂ sono ridotte. Inoltre, *Brettanomyces* prospera in queste condizioni, poiché, in presenza di una competizione limitata con altri lieviti, trova nutrimento mentre le risorse per *S. cerevisiae* risultano scarse (Malfeito-Ferreira, 2018).

L'identificazione del microrganismo è fondamentale non solo nel settore enologico, ma rappresenta anche un'opportunità interessante per la produzione della birra. Questa pratica consente di individuare le specie in grado di conferire specifici profili aromatici, offrendo così la possibilità di selezionarle e utilizzarle in modo mirato.

È importante tenere presente che queste analisi rappresentano un costo per i produttori di vino e birra; quindi, devono essere efficienti nel fornire i risultati, rapide e non eccessivamente costose.

I metodi convenzionali per l'identificazione e la quantificazione dei microrganismi richiedono tempi lunghi, che possono variare da una a due settimane; ciò a causa del processo di prelievo dei campioni, seguito dalla semina su terreni selettivi e dalle successive analisi biochimiche e osservazioni microscopiche. Queste tempistiche prolungate possono permettere la crescita del microrganismo, con il rischio di danneggiare permanentemente il prodotto. Recentemente, sono state sviluppate nuove tecniche di analisi molecolare e cellulare che offrono il vantaggio di essere rapide nel fornire i risultati. Tra queste, figurano svariati protocolli basati su PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elettroforesi su gel e l'analisi citometrica a flusso.

4.1 ANALISI PCR

L'analisi PCR è una tecnica di analisi del DNA sviluppata nel 1983 dal biochimico statunitense Kary Mullis, ampiamente utilizzata per l'identificazione di microrganismi. Si tratta di un'amplificazione in vitro di specifiche sequenze di DNA *target*, ottenendo così miliardi di copie del frammento di interesse. Il processo si svolge all'interno di un termociclatore e si articola in tre fasi: *denaturazione* della doppia elica di DNA, grazie ad un riscaldamento di 95 °C; *annealing*, in cui la temperatura si abbassa alla specifica temperatura di appaiamento dei primers ; *Estensione*, in cui la temperatura viene alzata a circa 70 °C, temperatura ottimale di lavoro dell'enzima Taq

polimerasi per la polimerizzazione dei nuovi filamenti . Questo procedimento si ripete per n cicli (solitamente trenta), fino a generare miliardi di copie del DNA stampo di interesse. In successione, si effettua un'elettroforesi su gel, per poter separare e visualizzare le sequenze amplificate.

I vantaggi di questa tecnica sono svariati, tra cui l'elevata sensibilità della macchina e la rapidità dell'esecuzione. Sono stati effettuati e perfezionati numerosi protocolli per l'amplificazione di specifiche sequenze presenti nel DNA di *Brettanomyces* per l'identificazione di questo lievito nei vini.

Tra i principali protocolli sviluppati quello di Egli e Henick-Kling (2001), metodo specifico di identificazione, per primo ha permesso di sostituire l'identificazione tramite RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) utilizzato da Mitrakul et al. (1999) che permetteva un'identificazione a livello di ceppo ma non è specifico per la specie. Quest' approccio è stato ritenuto inadeguato nell'identificazione della specie poiché si basa sull'amplificazione casuale di frammenti di DNA, che originano un profilo ceppo-specifico. Questa procedura ha il grave difetto di essere caratterizzata da bassa riproducibilità dei risultati, che causa difficoltà nell'analisi dei dati e la mancanza tra i frammenti amplificati di sequenze di riferimento specie- specifiche.

Il metodo di Egli e Henick-Kling (2001), si è concentrato sull'identificazione di quattro specie di *Brettanomyces* nei vini (19 ceppi in totale): *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus* e *B. naardenensis*. Il lavoro si è basato sull'amplificazione di regioni specifiche non codificanti (ITS1 e ITS2), che includono i geni dell'rRNA 5.8S. Analizzando le dimensioni dei frammenti amplificati dei ceppi di *Brettanomyces*, che variano da 450 a 500 bp, è stata osservata una significativa differenza rispetto alle dimensioni dei frammenti di altri lieviti, tra cui *Saccharomyces cerevisiae*, che variano tra 600 e 900 bp. Inoltre, le dimensioni sono risultate identiche tra i ceppi della stessa specie, ma diverse tra quelli appartenenti a specie diverse del genere *Brattamomyces*. Un protocollo alternativo è stato messo a puntoda Hulin *et al.*, (2014), che ha proposto nuovi *primers*, ognuno basato sulla sequenza del gene TEF-1 α (importante dal punto di vista filogenetico).

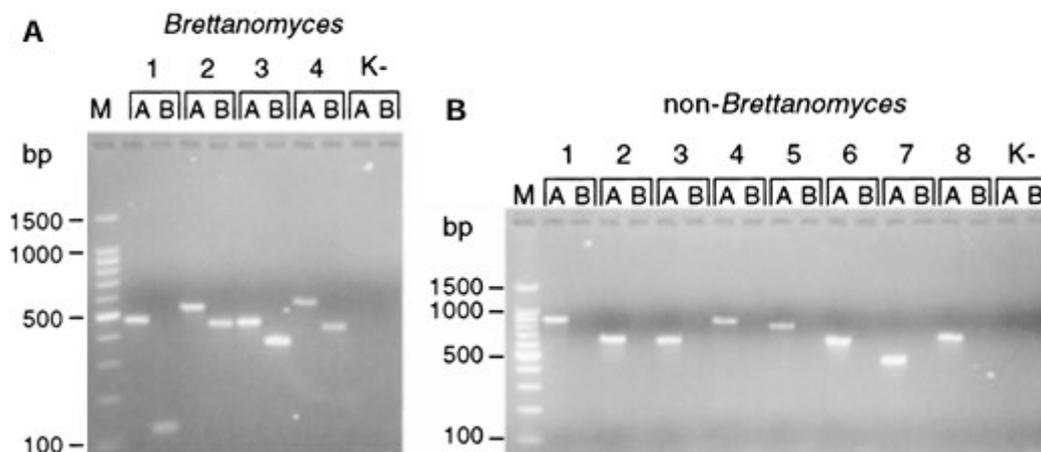


Fig. 8 Identificazione dei ceppi di *Brettanomyces* mediante amplificazione PCR di frammenti ITS.

(A) Distinzione delle quattro specie di *Brettanomyces*: **1** *B. bruxellensis*, **2** *B. anomalus*, **3** *B. custersianus*, **4** *B. naardensis*. Le corsie contrassegnate con A utilizzano la coppia di *primer* pITS1/pITS4, mentre le corsie contrassegnate con B includono un mix di *primer* pB2, pA1, pC1, pN1/pITS4. **(B)** Distinzione di lieviti non-*Brettanomyces*: **1** *Saccharomyces cerevisiae* (Egli e Henick-Kling, 2001).

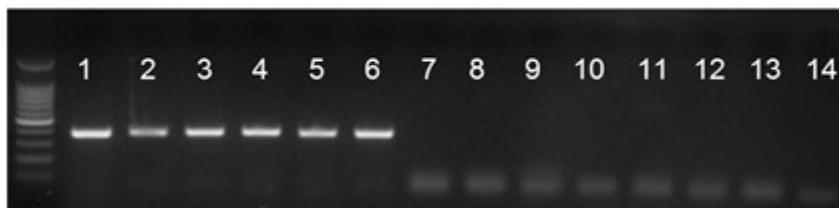


Fig. 9 Identificazione mediante PCR con primers specifici per *B. bruxellensis*. **1, 2, 3, 4, 5, 6** ceppi di *B. bruxellensis*, **7** *B. anomalus*, **8** *B. custersianus*, **9** *B. naardensis*, **10** *B. nanus* (Hulin *et al.*, 2014).

Solo due anni dopo, una nuova tecnica di PCR è stata proposta da Cocolin *et al.*, (2003); si tratta della RT-PCR-DGGE (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), la quale consiste nella trascrizione inversa di geni rRNA in DNA complementare, seguita dall'amplificazione del DNA ed elettroforesi su gel a gradiente denaturante. Questo metodo nasce dalla necessità di evitare la fase di isolamento dei ceppi, che potrebbe causare l'esclusione dall'analisi di determinate colture di microrganismi per i quali la coltivazione selettiva sarebbe problematica. I *primers* utilizzati hannoun'elevata specificità per *B. bruxellensis* e *B. anomalus* e sono stati progettati sulla base delle differenze tra le sequenze di RNA ribosomiale 26S di *Brettanomyces* spp. e lieviti non-*Brettanomyces*. Questa specificità ha permesso di amplificare il DNA estratto direttamente dal vino per la rilevazione di queste due specie.

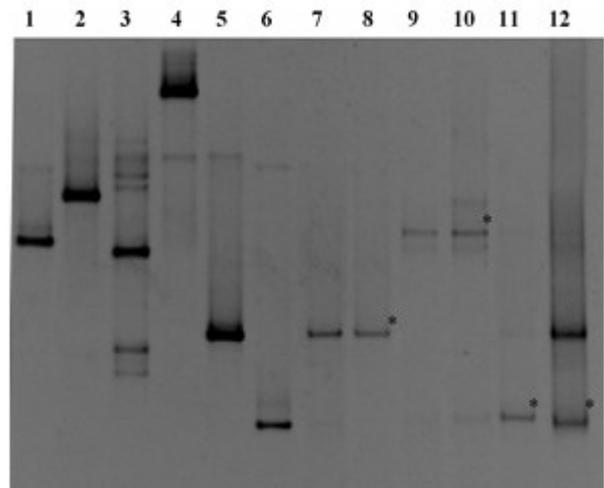


Fig. 10 Risultati da analisi DGGE di frammenti di DNA ottenuti da RT-PCR. In corsia 6 troviamo *Brettanomyces bruxellensis* e in corsia 5 troviamo *Saccharomyces cerevisiae* (Cocolin *et al.*, 2003).

Nello studio di Hayashi *et al.* (2007), è stato applicato un nuovo metodo chiamato LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*). Questa tecnica di amplificazione del DNA, simile alla PCR, si svolge in condizioni isoterme e utilizza più primer specifici. Di conseguenza, il metodo è apprezzato per la sua elevata specificità, efficienza e rapidità.

I ricercatori hanno sviluppato un set di quattro primer per amplificare sequenze target nella regione ITS, permettendo così l'identificazione specifica delle quattro specie di *Brettanomyces*: *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus* e *B. naardenensis*. Inoltre, il metodo LAMP ha dimostrato la capacità di rilevare circa 1×10^1 cfu/ml di lieviti *Brettanomyces/Dekkera* in sospensioni di acqua distillata, vino e birra.

Una tecnica molto comune e apprezzata per la sua rapidità è la qPCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). Il procedimento è simile a quello della tradizionale PCR, con l'importante differenza che utilizza sonde fluorescenti legate al DNA target, consentendo l'osservazione dei risultati in tempo reale, senza necessità di elettroforesi su gel, inoltre premette la quantificazione dei frammenti amplificati e quindi, in modo indiretto la quantificazione delle cellule microbiche presenti nel campione analizzato

Questa metodologia è stata impiegata da Wang *et al.*, (2020) per identificare la specie *B. bruxellensis* in un isolato di vino rosso Merlot proveniente dallo Stato di Washington (USA). Anche in questo caso, il *primer* è stato progettato utilizzando le sequenze ITS. Tuttavia, sono emerse difficoltà nella procedura, poiché si è osservato che le regioni genetiche ITS evolvono (mutano) più

rapidamente rispetto ad altre porzioni del DNA ribosomiale. Questo scenario sottolinea la necessità di esplorare regioni genomiche alternative per migliorare la discriminazione tra le specie. I saggi di qPCR rappresentano strumenti estremamente utili, precisi e rapidi per gli enologi, poiché consentono di correlare le densità delle popolazioni di *Brettanomyces* a fattori come la varietà di uva, le condizioni ambientali e le pratiche agronomiche nel vigneto. Tuttavia, si rende necessaria un'ulteriore ricerca per affinare questi metodi.

In sintesi, le tecniche PCR hanno subito un'evoluzione significativa, passando da metodi tradizionali a tecniche sempre più sofisticate e sensibili. Grazie ai continui studi, questo progresso ha permesso una maggiore rapidità e accuratezza nell'identificazione di *Brettanomyces*, rendendo più efficienti le strategie di controllo di questo lievito.

4.2 CITOMETRIA A FLUSSO

L'analisi citometrica a flusso è una tecnica di laboratorio utilizzata per contare cellule sospese in un campione liquido, grazie al loro passaggio attraverso un laser. Si tratta di un'analisi quantitativa e qualitativa, in quanto permette di misurare il numero di cellule e la tipologia, grazie all'uso di specifici marcatori fluorescenti e anticorpi.

Recentemente De Bellis *et al.*, (2022), ha sviluppato un kit di citometria a flusso per l'identificazione e la quantificazione in breve tempo (1-2 ore), di cellule vitali di *Brettanomyces* nei vini.

Il *Bretta Test* (Kit *Bretta Test* per 80 test, B80, Amarok Biotechnologies, Saint-Malo, Francia) è composto da una sonda fluorescente, l'acetato di fluoresceina (FDA), che permette di colorare le cellule vitali e metabolicamente attive, coniugata ad un anticorpo di coniglio, che riconosce in maniera specifica gli antigeni presenti sulla parte di *Brettanomyces*.

In un primo momento, si è valutata la capacità di questo anticorpo di identificare quattro ceppi di *B. bruxellensis* (Bb1, Bb2, Bb3, Bb4) in colture pure e a varie concentrazioni. La prima analisi delle cellule mediante citometria a flusso, in coltura pura, ha rivelato una popolazione di lieviti omogenea dal punto di vista morfologico. Il 100% di questa popolazione ha infatti riconosciuto l'anticorpo anti-Bretta. Dal campione puro di *S. cerevisiae*, infatti, non è stata rilevata fluorescenza in risposta all'antigene specifico di *B. bruxellensis*.

Lo studio è proseguito con la determinazione della quantità di *B. bruxellensis* in campioni di vino rosso, confrontando i risultati con le concentrazioni ottenute precedentemente mediante conta su

piastra. Gli esiti ottenuti dalla conta su piastra sono risultati più bassi rispetto a quelli rilevati tramite citometria a flusso. Questo conferma che la conta su piastra tende a sottovalutare le concentrazioni di lieviti vitali. La citometria a flusso, infatti, permette anche di identificare cellule in stato vitale, ma non coltivabile (SVNC).

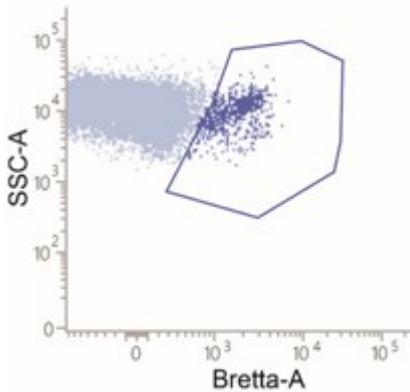


Fig. 11 Rilevamento con citometria a flusso di campioni di vino rosso, contenenti popolazioni di *B. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. Sull’asse delle ascisse è rappresentato l’anticorpo Brett-A, garantendo l’identificazione delle popolazioni cellulari positive (*Brettanomyces*) e negative (*Saccharomyces*). Sull’asse delle ordinate è riportata SSC-A, la quale si riferisce alla “Side Scatter Area”; misura l’area del segnale di luce che viene disperso lateralmente, rispetto al fascio di luce incidente. Si differenziano così due popolazioni separate, in base alla loro complessità strutturale e alla loro specificità verso l’anticorpo (De Bellis *et al.*, 2022).

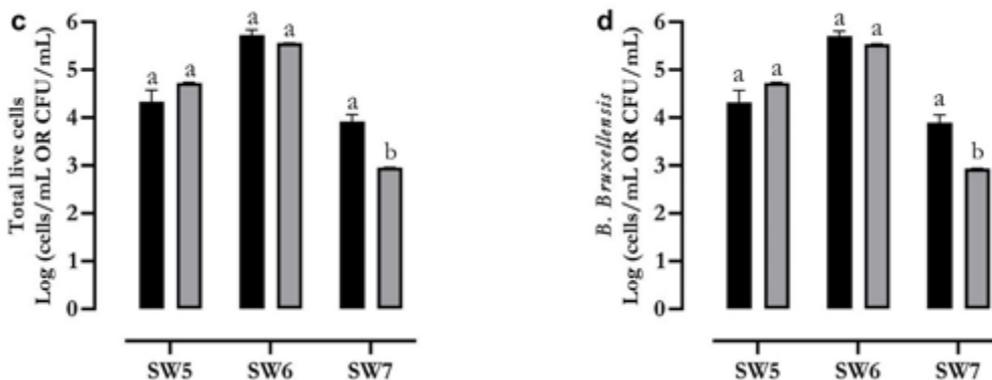


Fig. 12 Concentrazioni di cellule vive totali (grafico a sinistra) e di *B. bruxellensis* (grafico a destra) presenti in tre campioni di vino rosso contaminato (SW5, SW6, SW7). Sono rappresentate in nero le concentrazioni ottenute mediante citometria a flusso e in grigio le concentrazioni ottenute mediante conta su piastra (De Bellis *et al.*, 2022).

In conclusione, i risultati evidenziano che la citometria a flusso, consente una rapida rilevazione di *B. bruxellensis*. Questa tecnica è promettente per identificare la contaminazione nei vini e nelle acque di lavaggio delle botti, offrendo vantaggi in termini di rapidità e conteggio di cellule vive e morte. I costi sono sostenibili, ma la necessità di inviare campioni a laboratori specializzati limita la sua diffusione. Tuttavia, strategie come la "citometria a teleflusso" (collegamento remoto tra enologo e specialista in citometria), potrebbero facilitare l'adozione di queste metodologie direttamente in cantina.

5. METODI DI PREVENZIONE

I metodi di identificazione nel vino sono utili per verificare precocemente la presenza di *Brettanomyces*, così da agire tempestivamente sulla sua crescita. Si deve sottolineare che la prevenzione di questo lievito incomincia dal campo; perciò, è importante gestire correttamente le condizioni del vigneto e selezionare uve sane durante la vendemmia. *Brettanomyces* non è considerato un contaminante solamente nel vino, ma anche nelle birre convenzionali, dove la sua presenza non è desiderata.

L'obiettivo di questo capitolo è fornire una panoramica delle pratiche più attuali e scientificamente validate per prevenire la contaminazione da *Brettanomyces*, garantendo così la produzione di vini e birre di alta qualità e minimizzando i rischi associati alla sua presenza.

5.1 IGIENE E SANITIZZAZIONE BOTTI

La prevenzione di *Brettanomyces* prevede innanzitutto un attento monitoraggio degli ambienti favorevoli alla sua crescita. Le botti di fermentazione, infatti, costituiscono un luogo adatto per questo microrganismo, grazie alla loro elevata porosità (dunque più disponibilità di ossigeno e meno diffusione di SO₂) e alla loro composizione (presenza di cellulosa e altri glicosidi). È dunque fondamentale sterilizzare le barrique attraverso metodi fisici e chimici.

5.1.1 METODI FISICI

Uno dei metodi fisici attualmente in fase di test è il trattamento con acqua calda ad alta pressione (HPHW, High Pressure Hot Water). L'acqua è ampiamente utilizzata nelle aziende vitivinicole, poiché è facilmente reperibile. Le botti possono essere riempite con acqua calda o questa può essere spruzzata attraverso testine fisse o rotanti, utilizzando temperature e pressioni variabili.

In uno studio di Vigentini *et al.*, (2015), riportato da Stadler e Fischer (2020), è stato impostato un protocollo di sanificazione per botti da 225 litri contaminate da tre anni. Un trattamento termico a 60 °C per 19 minuti ha permesso di ridurre le popolazioni superficiali di *Brettanomyces* fino a 8 unità logaritmiche; le cellule situate a una profondità di 5-9 mm nel legno possono essere eliminate dopo un'esposizione di 30 minuti. Inoltre, Marko *et al.* (2005) hanno dimostrato che, se la temperatura dell'acqua dovesse raggiungere gli 82 °C, il legno potrebbe perdere sostanze volatili aromatiche importanti. Pertanto, questa tecnica deve essere eseguita con cautela per preservare le caratteristiche aromatiche del legno di quercia. È importante considerare che i tempi di applicazione devono essere prolungati, poiché il legno ha una bassa conduttività termica, per cui i costi del trattamento risultano essere elevati a causa delle grandi quantità di acqua richieste.

L'uso del vapore è un metodo comune per sanificare botti, filtri e serbatoi in cantina. Per le botti, il vapore è prodotto da un generatore elettrico e immesso nella botte attraverso il foro del tappo. Rispetto all'acqua calda, il trattamento a vapore riduce notevolmente il consumo di acqua, ma i costi di produzione rimangono piuttosto elevati. Studi precedenti di Guzzon *et al.* (2011) hanno osservato una diminuzione di 3,5 unità logaritmiche dopo 30 minuti di vaporizzazione a 45 °C. Successivamente, Cartwright *et al.* (2018) hanno constatato che 10 minuti a 45 °C sono sufficienti per eliminare le popolazioni di lievito a una profondità di 4 mm nel legno, mentre 12 minuti sono necessari per una profondità di 9 mm (Stadler e Fischer, 2020).

Numerosi studi hanno dimostrato che a temperature comprese tra 45 °C e 60 °C, e con tempi di trattamento medi di 10 minuti, è possibile eliminare intere popolazioni di *Brettanomyces*. Tuttavia, vari fattori influenzano l'efficacia del trattamento a vapore, tra cui il tipo di microrganismo, il tempo di esposizione, il tipo di legno utilizzato nelle barrique, la temperatura e la profondità di penetrazione del vapore. Aguilar Solis *et al.* (2018) hanno condotto uno studio su due ceppi di *B. bruxellensis* (CE261 e CE149), isolati da vini rossi contaminati, sottoponendoli a tre diverse temperature di trattamento (45 °C, 50 °C e 55 °C); il ceppo CE261 si è dimostrato più resistente a tutte le temperature, con tempi di riduzione decimale (D) superiori.

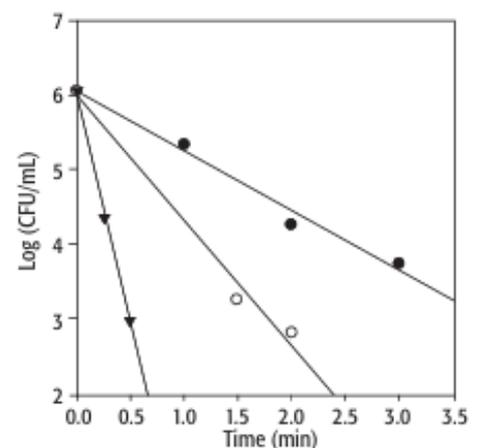
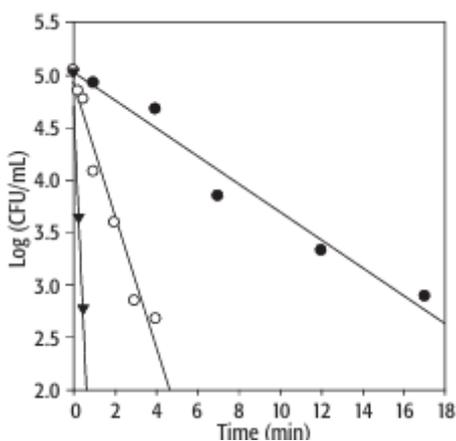


Fig. 13 Inattivazione termica del ceppo CE261 (a sinistra) e del ceppo CE149 (a destra) a 45 °C ●, 50 °C ○, 55 °C ▼. (Aguilar Solis *et al.*, 2018).

Un ultimo metodo fisico per la prevenzione di questo lievito è l'alta pressione idrostatica (HHP, *High Hydrostatic Pressure*) a 100 Mpa per 24 ore, la quale si è dimostrata essere una metodica altamente efficiente nel controllare la crescita di *Brettanomyces* nelle botti. Inoltre, è possibile utilizzare questa tecnica anche in botti contenenti vino contaminato da popolazioni tra 10^4 e 10^6 CFU/ml, in quanto preserva le caratteristiche sensoriali del vino, senza alterare i suoi pigmenti o composti volatili (Kheir *et al.*, 2013).

5.1.2 METODI CHIMICI

Come spiegato in un capitolo precedente, l'anidride solforosa è ormai in disuso come metodo chimico di prevenzione contro *Brettanomyces*, a causa della capacità del lievito di detossificazione e di resistere anche ad alte concentrazioni. Sono stati infatti proposti diversi conservanti alternativi all'SO₂ dotati di attività antiossidante e sicuramente più sicuri per il consumatore.

Uno degli agenti ossidanti più potenti è l'ozono (O₃). Si tratta di una molecola di ossigeno altamente instabile a causa dell'unione di radicali liberi all'ossigeno molecolare ed è frequentemente utilizzata in cantina per la sanificazione di botti, attrezzature e acque di lavaggio. Può essere applicato sia in forma gassosa che in forma liquida. Mentre in forma liquida è stabile per 20 minuti in acqua distillata a 20°C, in forma gassosa il suo effetto è più duraturo in quanto è attivo per 20 ore in aria (Stadler e Fischer, 2020).

Uno studio ha infatti approfondito il tema dell'efficacia dell'ozono contro *Brettanomyces*. Si sono prelevate bacche di uva Barbera, aggiungendo un inoculo artificiale di una miscela di tre ceppi di *B. bruxellensis* e trattate con ozono in forma liquida (per 12 minuti) e gassosa (per 24 ore). Prima che iniziasse il processo fermentativo, è stata effettuata un'analisi microbiologica che ha mostrato una significativa riduzione di *B. bruxellensis*, pari a circa 10^2 cfu/ml, dopo il trattamento con ozono gassoso. Al contrario, nell'uva trattata con ozono liquido, la popolazione ha continuato a crescere, raggiungendo 10^5 cfu/ml (Englezos *et al.*, 2019).

Un ulteriore agente ossidante utilizzato per la sanificazione delle botti è l'acido peracetico (PAA), un disinfettante incolore disponibile in una miscela di acido acetico, perossido di idrogeno e acqua. La disinfezione avviene attraverso la formazione di specie reattive dell'ossigeno che

danneggiano le biomolecole, compromettendo le membrane cellulari. Stadler e Fischer (2020) hanno confermato che un trattamento con 200 mg/l di PAA su botti di vino porta alla loro completa sterilizzazione. Tuttavia, è importante esercitare cautela nel suo utilizzo, poiché se impiegato a concentrazioni inappropriate o per periodi prolungati, potrebbe alterare i composti aromatici del legno. Inoltre, non è ancora chiaro come l'acido acetico derivante dalla decomposizione del PAA possa influenzare la qualità del vino in botte.

5.2 CHITOSANO FUNGINO

L'uso del chitosano è ormai riconosciuto come un metodo efficace di prevenzione contro *Brettanomyces*. Il chitosano è un polisaccaride derivato dalla chitina, un componente dell'esoscheletro dei crostacei. Il suo meccanismo d'azione contro questo lievito consiste nell'agganciarsi alla membrana cellulare del fungo, alterandone la permeabilità e l'equilibrio idrosalino della cellula, provocando infine la morte del microrganismo. Questo additivo antifungino è stato oggetto di numerosi studi per verificarne l'efficacia.

Uno studio ha esaminato l'azione del chitosano su due ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* (E1 e 11a), isolati da vino rosso prodotto nello Stato di Washington (USA), e inoculati in vini rossi Cabernet Sauvignon e Merlot. Durante l'esperimento, sono state utilizzate quattro diverse concentrazioni di chitosano fungino (0, 4, 8 e 12 g/hl), provenienti da due fonti differenti (*Aspergillus niger*, guscio di granchio) mentre il terzo è stato ottenuto modificando il chitosano in chitosano lattato.

Inizialmente, i due ceppi sono stati inoculati in bottiglie da 100 ml di vino rosso Cabernet Sauvignon, a una concentrazione di 5×10^6 cfu/ml, con l'aggiunta delle diverse concentrazioni di chitosano fungino. Le bottiglie sono state incubate a 26 °C per 10 giorni. Successivamente, la coltura è stata utilizzata per inoculare botti di vino Merlot a una concentrazione di 10^6 cfu/ml che sono state lasciate riposare per 68 giorni. Ogni due giorni è stata eseguita un'analisi quantitativa, e al termine del periodo di incubazione, le popolazioni di *Brettanomyces* sono state analizzate tramite microscopia elettronica, mostrando danni evidenti alle cellule fungine (vedi Fig. 14).

I risultati hanno evidenziato che, alla massima concentrazione di chitosano fungino (8 g/hl), si è verificata una diminuzione logaritmica significativa di *Brettanomyces*, passando da 10^6 a 10^3 cfu/ml. Tuttavia, i risultati dipendono dalla tipologia di chitosano utilizzato, dimostrando una maggiore efficienza e costanza del chitosano lattato (vedi Fig. 15).

L'uso del chitosano fungino nella vinificazione è quindi un'opzione sempre più presa in considerazione dagli enologi per il controllo di *Brettanomyces*, specialmente nei contesti di vinificazione biologica o sostenibile. Si tratta di un prodotto naturale, sicuro per la salute umana, che non interferisce con il sapore del vino. Tuttavia, sono ancora in fase di studio le tecniche per la sua rimozione dal vino, un aspetto che potrebbe comportare un aumento dei costi di gestione. Inoltre, poiché il chitosano è un prodotto derivato dai crostacei, potrebbe non essere adatto per persone con allergie ai crostacei. (Petrova *et al.*, 2016)

Fig. 14 Morfologia cellulare ottenuta attraverso la microscopia elettronica del ceppo E1 di *B. bruxellensis* prima dell'aggiunta di chitosano fungino (a sinistra) e dopo l'aggiunta di 10 g/hl (a destra). (Petrova *et al.*, 2016)

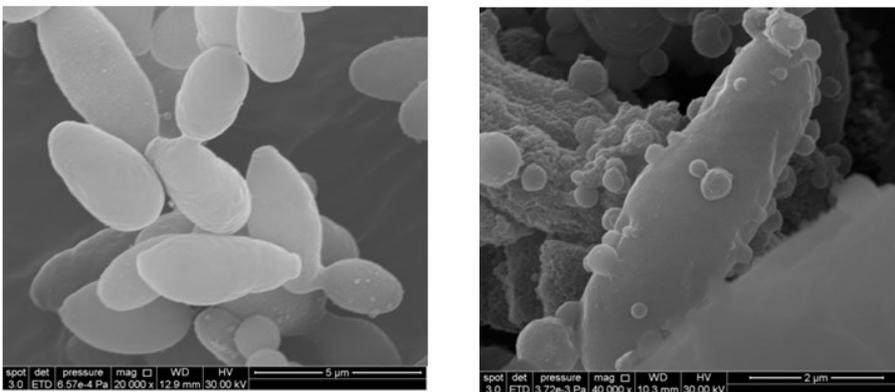
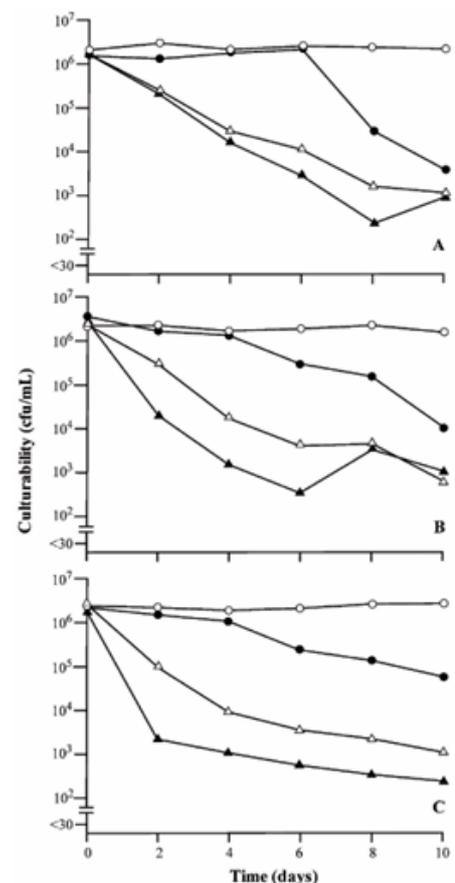


Fig. 15 Andamento del ceppo E1 di *B. bruxellensis* in vino Cabernet-Sauvignon con (A) chitosano da *Aspergillus niger*, (B) guscio di granchio e (C) chitosano lattato presenti a concentrazioni di 0 g/hl ○, 2 g/hl ●, 4 g/hl △, 8g/hl Δ pieno. (Petrova *et al.*, 2016)



5.3 RIMOZIONE DELLA BIOTINA

Valutando i requisiti vitaminici specifici di *B. bruxellensis* e comprendendo le sue esigenze nutrizionali, è stato possibile esplorare la possibilità di limitare la crescita di questo lievito nel vino attraverso la rimozione selettiva di vitamine essenziali.

Uno studio condotto da H. von Cosmos ed Edwards (2016) ha coinvolto la coltivazione di quattro ceppi di *B. bruxellensis* (B1b, 2049, 2091 e N2), isolati da vini provenienti da Francia e Nuova Zelanda. I ceppi sono stati trasferiti in terreni privi di una delle nove vitamine fondamentali: acido p-aminobenzoico, biotina, acido folico, acido nicotinico, myo-inositolo, acido pantotenico, riboflavina, piridossina e tiamina. I terreni contenevano anche due diverse concentrazioni di etanolo (0% e 10%).

I risultati hanno evidenziato che nessuno dei ceppi analizzati aveva bisogno di acido p-aminobenzoico, acido folico, acido nicotinico, myo-inositolo, acido pantotenico o riboflavina. Tuttavia, alcuni ceppi hanno mostrato una richiesta di tiamina, a seconda della presenza o assenza di etanolo, mentre la biotina si è rivelata un nutriente essenziale per la crescita di tutti i ceppi. Infatti, la crescita del lievito è stata influenzata negativamente dalla sua mancanza, mentre quando la sua concentrazione era superiore a 0,2 g/L di biotina, la popolazione raggiungeva valori superiori a 10^6 cfu/ml.

Dal punto di vista biochimico, la biotina gioca un ruolo fondamentale nella carbossilazione dell'acido piruvico e nella sintesi delle basi pirimidiniche, dei nucleotidi della piridina, delle proteine, dei polisaccaridi e degli acidi grassi. Le carenze di biotina sono state correlate a danni alla membrana plasmatica del lievito. Poiché la biotina è anche richiesta da altre specie microbiche benefiche per la vinificazione, come i lieviti coinvolti nella fermentazione alcolica e batteri della malolattica, le tecniche di rimozione della biotina dovrebbero essere utilizzate esclusivamente dopo il completamento di tutte le fermentazioni.

Per la rimozione della biotina, è stata impiegata la proteina avidina, in grado di legarsi in modo permanente alla biotina. Durante l'esperimento, sono stati aggiunti albumi d'uovo contenenti avidina o avidina pura, al fine di ridurre la biodisponibilità della biotina. Una singola molecola di avidina è in grado, infatti, di legare fino a quattro molecole di biotina. Grazie a questo trattamento, si è osservata una diminuzione della popolazione di *B. bruxellensis* di circa 10^3 cfu/ml.

Nonostante la riduzione della crescita, è stata comunque riscontrata qualche attività residua del lievito nei vini trattati. Pertanto, l'uso dell'avidina può essere considerato uno degli ostacoli utili a

limitare il deterioramento del vino causato da *B. bruxellensis*, ma non rappresenta una soluzione definitiva, e dovrebbe essere integrato con altre pratiche di controllo microbiologico per ottenere i migliori risultati.

5.4 METODICHE INNOVATIVE

Recentemente è stata valutata l'efficacia della tecnologia a microonde, che consiste in un trattamento breve (1 minuto ripetuto tre volte) tramite un generatore di impulsi ad alta frequenza (3.000 W) all'interno delle botti di rovere, per rimuovere i microrganismi fino a una profondità di 8 mm nelle doghe. Questo trattamento non ha avuto impatti sulla qualità chimica del legno, sebbene abbia influito sulle popolazioni microbiche, portando a un'eliminazione compresa tra il 35% e il 67% di *B. bruxellensis* nel rovere francese e americano. La riduzione dei microrganismi è risultata maggiore nelle doghe di rovere americano, probabilmente a causa della minore porosità rispetto al rovere francese, facilitando così la pulizia e la sanificazione (Kheir *et al.*, 2013). Lo svantaggio di questo metodo è che richiede di smontare la botte in doghe, il che ne limita l'applicabilità per la sanificazione ordinaria delle botti (Stadler e Fischer 2020).

Negli ultimi dieci anni, è cresciuto l'interesse per la tecnologia ultrasonica nell'industria vinicola. Si utilizzano ultrasuoni ad alta potenza (HPU, *High Power Ultrasound*) con potenza tra 20 e 100 Hz e intensità maggiori di 1 W/cm², i quali generano cavitazione delle cellule a causa della formazione di bolle di gas che, al collasso, generano onde d'urto e forze meccaniche che rompono le membrane cellulari del lievito. Stadler e Fischer (2020) riportano uno studio di Schmid *et al.*, (2011), il quale afferma che per la rimozione completa di *B. bruxellensis* in legno di quercia sono sufficienti 12 minuti di trattamento a 60 °C, con frequenza a 20 Hz e intensità di 4 kW.

Un ulteriore e nuovo approccio preventivo prevede l'aggiunta al vino di una tossina prodotta dal ceppo 18 di *Wickerhamomyces anomalus*, un lievito isolato da una fossa di maturazione di un formaggio naturale. Questo lievito secreta una proteina killer, nota come micocina WA18, che inibisce specificamente la crescita di *Brettanomyces bruxellensis*. La micocina si lega ai glucani ramificati presenti nella parete cellulare e genera specie reattive dell'ossigeno, tossiche per il lievito. È probabile che le condizioni ambientali estreme in cui si è sviluppato questo lievito abbiano dotato la micocina WA18 della capacità di resistere alle condizioni tipiche della vinificazione.

Questa interessante proteina è stata studiata da Comitini *et al.*, (2020), i quali hanno inizialmente valutato in vitro l'attività killer del ceppo 18, misurando attraverso crescita su piastra il diametro delle zone di inibizione attorno ai pozzetti contenenti *B. bruxellensis*. Successivamente, il ceppo è stato isolato e le proteine prodotte sono state purificate tramite ultrafiltrazione. Grazie all'analisi LC-MS, è stata identificata la micocina WA18 e il suo peso molecolare specifico. Infine, è stata valutata l'attività antimicrobica di WA18 contro nove ceppi di *B. bruxellensis* in vini rossi contaminati. La massima attività killer è stata osservata a un pH di 4.2 e a una temperatura di 20 °C. L'assenza di effetti di questa micocina sui ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* rappresenta un prerequisito indispensabile per il suo utilizzo nei processi fermentativi industriali e apre la possibilità di indagare l'esistenza di altri lieviti killer. Inoltre, recentemente è stato scoperto che *Saccharomyces cerevisiae* secerne un biocida, denominato saccaromicina, costituito da peptidi antimicrobici (AMP) derivati dall'enzima glicolitico gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). La saccaromicina ha dimostrato attività contro diverse specie di lieviti associati al vino, in particolare *B. bruxellensis*. Tuttavia, i livelli di saccaromicina naturalmente secreti da *S. cerevisiae* durante la fermentazione alcolica non sono sufficienti a garantire l'eliminazione completa di *D. bruxellensis*. Per questo motivo, l'obiettivo del lavoro descritto è stato quello di sviluppare ceppi geneticamente modificati di *S. cerevisiae* in grado di sovra produrre questi AMP derivati da GAPDH. Grazie ai risultati ottenuti, è stato confermato con successo che i ceppi modificati di *S. cerevisiae* secernono quantità elevate di AMP, in grado di provocare morte a *B. bruxellensis* (Branco *et al.*, 2019).

6. RUOLO BRETTANOMYCES NELLE BIRRE ACIDE

Se *Brettanomyces* rappresenta un elemento negativo per l'industria enologica, per i birrai invece viene considerato come un'opportunità interessante per produrre determinate tipologie di birre, dette acide, con la creazione di un profilo aromatico unico. Queste birre, infatti, sono prodotte senza l'aggiunta di lieviti selezionati, ma lasciando che la comunità microbica naturale del mosto (funghi e batteri) effettui spontaneamente la fermentazione. Grazie alla produzione di "aromi Brett", *Brettanomyces* contribuisce a donare alla birra odori e sapori particolari, come aromi esotici (ananas, mango, frutto della passione), selvaggi, legnosi e gusti acidi.

Oggi, *Brettanomyces* viene utilizzato per ottenere molti stili di birra acida; degli esempi sono le birre belghe Lambic, Kriek e Gueze, la birra inglese Old stout, e molte altre ancora.



Fig. 16 Stili di birre acide suddivise in base al loro aroma predominante tra fruttato, fenolico (chiodi di garofano), legnoso e acido (Serra Colomer et al., 2018).

6.1 PROCESSO INDUSTRIALE

La terra d'origine di questo tipo di birrificazione è il Belgio, ma nel corso degli anni la sua produzione si è estesa anche ad altri paesi europei, fino a raggiungere gli Stati Uniti e il Canada. Il processo industriale per la produzione di birra acida è sostanzialmente simile a quello delle birre convenzionali, con alcune variazioni in specifiche fasi produttive.

Il processo inizia con la preparazione del mosto, attraverso la maltazione, durante la quale l'orzo viene fatto germinare, grazie a un'immersione in acqua calda per circa 24 ore. Nelle birre Lambic, all'orzo germinato si aggiunge un 30% di frumento non maltato; questo perché il frumento è povero di enzimi endogeni, portando ad alte concentrazioni di maltodestrine nel mosto, che probabilmente svolgono un ruolo nella longevità di *Brettanomyces* nel processo di fermentazione e maturazione della birra.

Dopo l'essiccamento dell'orzo e del frumento, si procede con l'ammontamento a una temperatura di circa 65-75 °C, durante il quale vengono attivati gli enzimi di idrolisi che trasformano l'amido in zuccheri fermentescibili, e i complessi proteici in aminoacidi utilizzabili dai microrganismi. Il mosto viene quindi filtrato e bollito per circa due ore, durante le quali si aggiunge il luppolo essiccato. In questo caso, il luppolo non viene impiegato per conferire il gusto amaro alla birra, ma per le sue proprietà antibatteriche, grazie alla liberazione di oli essenziali in esso contenuti, che permettono di contribuire al controllo dei lieviti e dei batteri selvatici. Dopo la bollitura, il mosto viene rapidamente raffreddato attraverso scambiatori termici.

Successivamente, ha inizio la fase di fermentazione primaria spontanea, durante la quale il mosto rimane a contatto con l'aria, in questo modo viene esposto all'ambiente circostante che lo contamina. Questa fase di fermentazione primaria è generalmente divisa in due fasi distinte: fase

di fermentazione alcolica, dove agiscono principalmente i lieviti selvatici, gli enterobatteri e varie specie di lievito *Saccharomyces*, producendo aromi tipici, tra cui l'estere acetato isoamilico, gli acidi grassi caprilico e caprico, l'acido lattico, l'acido acetico e il glicerolo. Successivamente avviene la fase di acidificazione, durante la quale i batteri lattici e acetici producono acido lattico e acido acetico.

Sebbene questa tecnica sia tipicamente impiegata nelle birre Lambic tradizionali, molti birrifici oggi aggiungono inoculi selezionati di microrganismi selvatici per evitare contaminazioni da specie indesiderate (fermentazione mista non spontanea). Gli enterobatteri e le specie del lievito *Saccharomyces* scompaiono dopo circa 30 giorni, a causa dell'esaurimento dei monosaccaridi, delle componenti azotate e dell'aumento di etanolo.

Il mosto viene quindi trasferito in grandi barrique di legno, generalmente di rovere o castagno, e lasciato fermentare per mesi o anni a circa 15 °C (fase di maturazione). Durante la fermentazione secondaria, sopraggiunge anche *Brettanomyces bruxellensis*, il quale è capace di assimilare fonti di azoto alternative (nitrato), riuscendo a sopravvivere alle dure condizioni di pH e scarso nutrimento del fermentato, producendo gli aromi distintivi che caratterizzano il prodotto finale, come acido acetico, tetraidropiridine, esteri, acido isovalerico e fenoli volatili.

In più, in carenza di glucosio, utilizza l'etanolo accumulato e degrada i composti prodotti, donando alla birra il caratteristico descrittore "*funky*" (terroso). Inoltre, grazie all'attività β -glucosidasi, degrada il cellobiosio costituente la botte di legno generando glucosio assimilabile e eliminando i residui glicosidici dei precursori degli aromi varietali, liberando linalolo, β -citronellolo e α -terpeniolo responsabili degli odori floreali.

Al termine della maturazione, la birra viene trasferita in un'altra botte per l'affinamento. Questo passaggio consente di stabilizzare gli aromi, di sedimentare il lievito e di sviluppare completamente il profilo aromatico. Il periodo di maturazione può variare da alcune settimane a diversi mesi, a seconda dello stile di birra e dell'intensità di acidità desiderata (De Roos e De Vuyst 2018).

Nel caso delle birre miscelate, come la Gueuze, diverse birre fermentate spontaneamente vengono unite per ottenere il prodotto finale. La miscela è composta da birre di differenti età, per bilanciare l'acidità, la freschezza e la complessità. La miscelazione avviene prima dell'imbottigliamento, e la birra viene lasciata maturare ulteriormente in bottiglia anche per anni, dando luogo a una seconda fermentazione. Questo processo di maturazione in bottiglia contribuisce a incrementare l'effervescenza e ad arricchire il sapore con nuove sfumature.

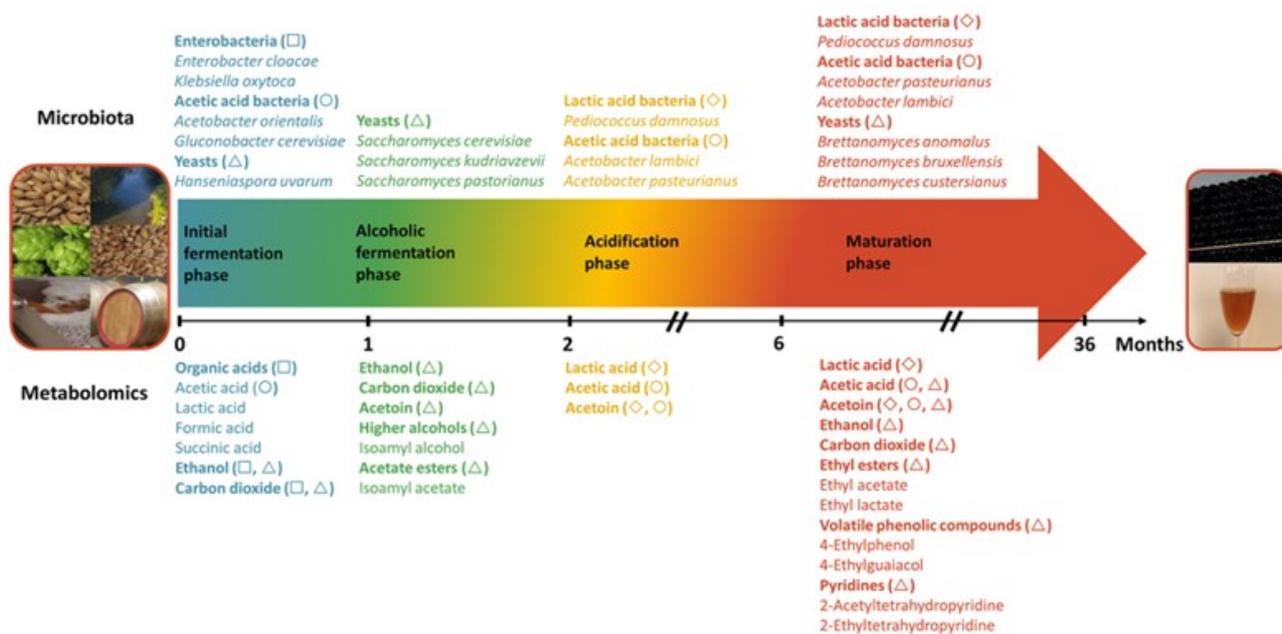


Fig 17. Evoluzione della comunità microbica durante la produzione di birre Lambic. 1) Fase iniziale di fermentazione, 2) Fase di fermentazione alcolica, 3) Fase di acidificazione, 4) Fase di maturazione. (Bongaerts *et al.*, 2021).

6.2 TIPOLOGIE DI BIRRE ACIDE

Tra le birre acide le più famose sono le seguenti.

- **Lambic:** stile di birra originaria del Belgio, prodotta con fermentazione spontanea e invecchiata in botti di legno. Può essere miscelata per creare la **Gueuze** o aromatizzata con ciliegie per ottenere la **Kriek** o con lamponi per ottenere la **Framboise**. Si tratta di una birra dal gusto molto acido, con aromi fruttati e/o legnosi.
- **Flanders Red Ale:** stile di birra rossa acida prodotta nelle Fiandre, con fermentazione mista e invecchiata in botti di legno. Presenta un colore rosso rubino, un'acidità moderata e gusto caratterizzato da note di frutta, vaniglia e con sfumature di cuoio o legno.

- **Berliner Weisse:** stile di birra acida tedesca, caratterizzata da un'acidità pungente e rinfrescante, spesso servita con sciroppi dolci per bilanciare.

- **Gose:** stile di birra acida tedesca, caratterizzata dall'aggiunta di sale e spezie come il coriandolo.

Presenta un gusto molto particolare, con un equilibrio tra acidità e salinità (talvolta interpretato come "sapore di mare").

- **Kettle Sour:** stile di birra acida prodotta mediante fermentazione spontanea a caldo, dove prevalgono i batteri lattici.

Si tratta di una birra molto acida, talvolta con aggiunta di frutta (limone o mela verde), la quale conferisce freschezza e leggerezza.

- **American Wild Ale:** stile di birra acida prodotta negli Stati Uniti, con fermentazione mista e invecchiata in botti di legno rovere.

Si tratta di un'interpretazione moderna della Lambic, spesso con l'aggiunta di frutta o invecchiate in botti precedentemente usate per il vino o i distillati.

Il sapore si presenta acido, con aroma agrumato e sentori di terra o muschio.

7. CONCLUSIONI

Il lievito *Brettanomyces*, pur essendo noto principalmente per il suo impatto negativo nella produzione di vino, si rivela avere un ruolo fondamentale nella creazione di birre a fermentazione spontanea, dove la sua presenza è invece considerata un valore aggiunto. Questo lievito ha la capacità di produrre una vasta gamma di composti aromatici, grazie al suo particolare metabolismo fermentativo e alla sua tolleranza allo stress. Gli “aromi Brett”, infatti, possono arricchire i profili organolettici delle birre acide in modo significativo, ma allo stesso tempo causano gravi problematiche nella qualità sensoriale dei vini e delle birre convenzionali, generando *off-flavours* (sudore di cavallo, cerotto, medicinale ecc.). Per questa ragione, nell’elaborato è stata svolta un’approfondita ricerca sulle soluzioni innovative e rapide per l’identificazione precoce di *Brettanomyces*, tra cui RAPD-PCR, qPCR e la recente tecnica di analisi citometrica a flusso. Secondo i dati esaminati e tenendo conto dei tempi di analisi, si osserva che il metodo di identificazione più efficiente è l’analisi mediante qPCR, poiché rappresenta uno strumento estremamente preciso e rapido per gli enologi nell’identificazione di *Brettanomyces*. Inoltre, l’analisi citometrica a flusso viene considerata una tecnica molto interessante ed economica, che, se approfondita adeguatamente, potrebbe offrire numerosi vantaggi in cantina. Grazie alla consultazione di numerosi studi, l’elaborato ha illustrato l’evoluzione delle tecniche impiegate nel settore enologico per la prevenzione di *Brettanomyces*, che permettono di limitare SO₂, molecola tossica anche per il consumatore. Tra le alternative studiate, l’uso del chitosano fungino si è rivelato efficiente, in quanto è un prodotto sicuro per il consumatore e fornisce ottimi risultati nella riduzione della crescita del lievito. Si ipotizza inoltre che l’aggiunta di tossine prodotte da *Wickerhamomyces anomalus* possa rappresentare un valido metodo di prevenzione contro *Brettanomyces* e che ulteriori studi a riguardo possano aprire nuove opportunità per la scoperta di nuovi lieviti “killer”.

Brettanomyces gioca un ruolo estremamente positivo nella fermentazione di birre cosiddette acide, contribuendo alla complessità organolettica e a un profilo aromatico unico e ricco di sfumature sensoriali, con note che spaziano dal “funky”, all’acido, al fruttato.

Esaminando con precisione i processi fermentativi e i prodotti metabolici che questo lievito dona alla birra acida, si è potuto produrre un nuovo ceppo mutante, il quale sviluppa “aromi Brett” sgradevoli in quantità inferiore rispetto al controllo. Ciò può aprire una nuova opportunità al settore della birra, e magari anche del vino, per poter selezionare *Brettanomyces* e aggiungerlo

durante il processo fermentativo; in questo modo si possono ottenere nuovi prodotti con particolarità aromatiche uniche e dinamiche.

In conclusione, le informazioni riportate nell'elaborato sottolineano quanto il controllo accurato delle condizioni di crescita di questo lievito siano la chiave per la sua corretta gestione. La ricerca e lo sviluppo di nuove strategie di controllo e prevenzione, unite a una maggiore comprensione dei meccanismi di fermentazione, offrono nuove opportunità per sfruttare il potenziale di *Brettanomyces* in modo efficiente nell'industria delle bevande alcoliche.

8. BIBLIOGRAFIA

Agnolucci M., Tirelli A., Cocolin L., Toffanin A. (2017). “*Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking”. *World Journal Microbiology Biotechnoly.* 33. 180. 2-6.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-017-2345-z>

Aguilar Solis A., Lourdes A., M. Gadoury D., Worobo R. (2018). “Thermal Inactivation of Wine Spoilage Yeasts to Validate Steam Sanitation Protocols in Wineries”. *Food Safety Magazine.* 60-70.

Alvarez Gaona I., Assof M. V., Jofré V. P., Combina M., Ciklic I. F. (2021). “Mutagenesis, screening and isolation of *Brettanomyces bruxellensis* mutants with reduced 4-ethylphenol production”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 37. 6: 3-9.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-020-02981-5>

Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarède I., Albertin W. (2018). “Molecular Diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*’ Sulfur Dioxide Sensivity Through Genotype Specific Method”. *Frontiers in Microbiology.* 9. 1260: 1-7.

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.01260/full>

Berbegal C., Spano G., Fragasso M., Grieco F., Russo P., Capozzi V. (2018). “Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine”. *Applied Microbiology Biotechnoly.* 102: 569–576. [https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-](https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8666-x)

[017-8666-x](https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8666-x)

Bongaerts D., De Roos J., De Vuysta L. (2021). “Technological and Environmental Features Determine the Uniqueness of the Lambic Beer Microbiota and Production Process”. *Applied and Environmental Microbiology.* 87. 18: 4-13.

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.00612-21>

Branco P., Sabir F., Diniz M., Carvalho L., Albergaria H., Prista C. (2019). “Biocontrol of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in alcoholic fermentations using saccharomycin-

overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103: 3073–3083. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-09657-7>

Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G. “Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines”. *Applied and environmental microbiology*. 70. 3: 1347-1354. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.70.3.1347-1355.2004>

Comitini F., Agarbati A., Canonico L., Gallik E., Ciani M. (2020). “Purification and Characterization of WA18, a New Mycocin Produced by *Wickerhamomyces anomalous* Active in Wine Against *Brettanomyces bruxellensis* Spoilage Yeasts”. *Microorganisms*. 9. 56: 2-12. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/56>

Crauwels S., Steensels J., Aerts G., Willems K. A., Verstrepen K. J., Lievens B. (2015). “*Brettanomyces bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry”. *BrewingScience*. 68: 110-117. https://scholar.google.com/scholar?hl=it&as_sdt=0%2C5&q=%E2%80%9CBrettanomyces+Bruxellensis%2C+Essential+Contributor+in+Spontaneous+Beer+Fermentations+Providing+Novel+Opportunities+for+the+Brewing+Industry&btnG=

Curtin D. C., Pretorius I. S. (2014). “Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*”. *Federation of European Microbiological Societies*. 14: 997-1005. <https://academic.oup.com/femsyr/article/14/7/997/531977?login=false>

DeBellis D., Di Stefano A., Simeone P., Patruno A., Cichelli A., Marchisio M., Tofalo R., Mari E., Lanuti P., Catitti G., 1,2, Vespa S., Granchi L., Viti C., Chiacchiaretta P. (2022). “Rapid Detection of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine by Polychromatic Flow Cytometry”. *International Journal of Molecular Science*. 23. 15091: 1-10. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/23/15091>

Egli M. C. e Henick-Kling T. “Identification of *Brettanomyces/Dekkera* Species Based on Polymorphism in the rRNA Internal Transcribed Spacer Region”. *Am. J. Enol. Vitic*. 52. 3: 242-246. <https://www.ajevonline.org/content/52/3/241.short>

Galafassi S., Capusoni C., Mokdaduzzaman M., Compagno C. (2013). "Utilization of nitrate abolishes the "Custers effect" in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products". *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 40: 297–303.

<https://academic.oup.com/jimb/article/40/3-4/297/5994916?login=false>

Gounot J., Neuveglise C., Freel C. K., Devillers H., Piskur J., Friedrich A., Schacherer J. (2020). "High Complexity and Degree of Genetic Variation in *Brettanomyces bruxellensis* Population". *Genome Biol. Evol.* 12. 6: 795–807.

Harrouard J., Eberlein C., Ballestra P., Dols- Lafargue M., Masneuf- Pomarede I., Cécile Miot-Sertier C., Schacherer J., Albertin W. (2022). "*Brettanomyces bruxellensis*: Overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast". *Molecular Ecology*. 32: 2374-2395.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/mec.16439>

Hayashia N., Araib R., Tada S., Taguchic H., Ogawa Y. (2007). "Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method". *Food Microbiology*. 24: 778-785.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002007000135>

Hulina M., Harrisona E., Stratford M., Wheals A. E. "Rapid identification of the genus *Dekkera/Brettanomyces*, the *Dekkera* subgroup and all individual species". *International Journal of Food Microbiology*. 187: 7–14.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514003158>

J. Roach M., R. Borneman A. (2020). "New genome assemblies reveal patterns of domestication and adaptation across *Brettanomyces (Dekkera)* species". *Roach and Borneman BMC Genomics*. 21. 194: 2-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6595-z>

Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C., Lteif R. (2013). "Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts". *Eur Food Res Technol*. 237: 655-671. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-013-2036-4>

Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C., Lteif R. (2013). "Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts". *Eur Food Res Technol.* 237 :655–671. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-013-2036-4>

Kuo H., Wang R., Huang C., Lai J., Lo Y., Huang S. (2018). "Characterization of an extracellular b-glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production". *Journal of Food and Drug Analysis.* 26: 163-171. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949817300455>

Lebleux M., Denimal E., De Oliveira D., Marin A., Desroche N., Alexandre H., Weidmann S., Rousseaux S. (2021). "Prediction of Genetic Groups within *Brettanomyces bruxellensis* through Cell Morphology Using a Deep Learning Tool." *Journal of Fungi.* 7. 581: 7. <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/8/581>

Malfeito-Ferreira M. (2018). "TwoDecades of "Horse Sweat" Taint and *Brettanomyces* Yeasts in Wine: Where do We Stand Now?". *Beverages.* 4. 32: 1-5. <https://www.mdpi.com/2306-5710/4/2/32>

Menoncin M. e Bonatto D. (2018). "Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing". *The Institute of Brewing & Distilling.* 125: 402-411. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.580>

Mitina I., Zgardan D., Sturza R., Scutaru I. (2019). "The methodological aspects of using real-time polymerase chain reaction (rt-pcr) in *Brettanomyces/dekkera* detection". *Journal of Engineering Science.* Vol. XXVI: 117-125. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/79921

Petrova B., Cartwright Z. M., Edwards C. G. (2016). "Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines". *Journal of International Science Vigne Vin (France).* 59. 1: 49-56. <https://oeno-one.eu/article/view/54>

Serra Colomer M., Chailyan A., Fennessy R. T., Olsson K. F., Johnsen L., Solodovnikova N., Forster J. (2020). "Assessing Population Diversity of *Brettanomyces* Yeast Species and Identification of Strains for Brewing Applications". *Frontiers in Microbiology*. 11. 637: 3-8. [Frontiers | Assessing Population Diversity of Brettanomyces Yeast Species and Identification of Strains for Brewing Applications](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01637/full)

Serra Colomer M., Funch B., Forster. (2019). "The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production". *Current Opinion in Biotechnology*. 56: 30-35. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166918300922>

Serra Colomer M., Funch B., Solodovnikova N., John Hobbey T., Förster J. (2020). "Biotransformation of hop derived compounds by *Brettanomyces* yeast strains". *Wiley Online Library*. 126: 280-288. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.610>

Smith D. B., Divol B. (2016). "*Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages". *Food Microbiology*. 59: 161-175. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002016302659>

Stadler E., Fischer U. (2020). "Sanitization of Oak Barrels for Wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68: 5283–5295. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.0c00816>

Steensels J., Daenen L., Malcorpsc P., Derdelinck G., Verachtertd H., J. Verstrepn K. (2015). "*Brettanomyces* yeasts-From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations". *International Journal of Food Microbiology*. 206: 24-38. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515001865>

Von Cosmos N. H., G. Edwards C. (2016). "Use of Nutritional Requirements for *Brettanomyces bruxellensis* to Limit Infections in Wine". *Fermentation*. 2. 17: 1-7. <https://www.mdpi.com/2311-5637/2/3/17>

Wang X., A. Glawe D., M. Weller D., Okubara A. P. (2020). "Real-time PCR assays for the quantification of native yeast DNA in grape berry and fermentation extracts". *Journal of*

Microbiological Methods. 168. 105794: 2-8.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701219307468>

Wdral D., Shewfelt R., Frank J. (2010). "The challenge of *Brettanomyces* in wine". *Food Science and Technology.* 43: 1475.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810002288>

Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil P. (2020). "PCR Past, Present and Future". *BioTechniques.* 69. 4: 317-322. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2144/btn-2020-0057>