



**fondazione banfi**

---

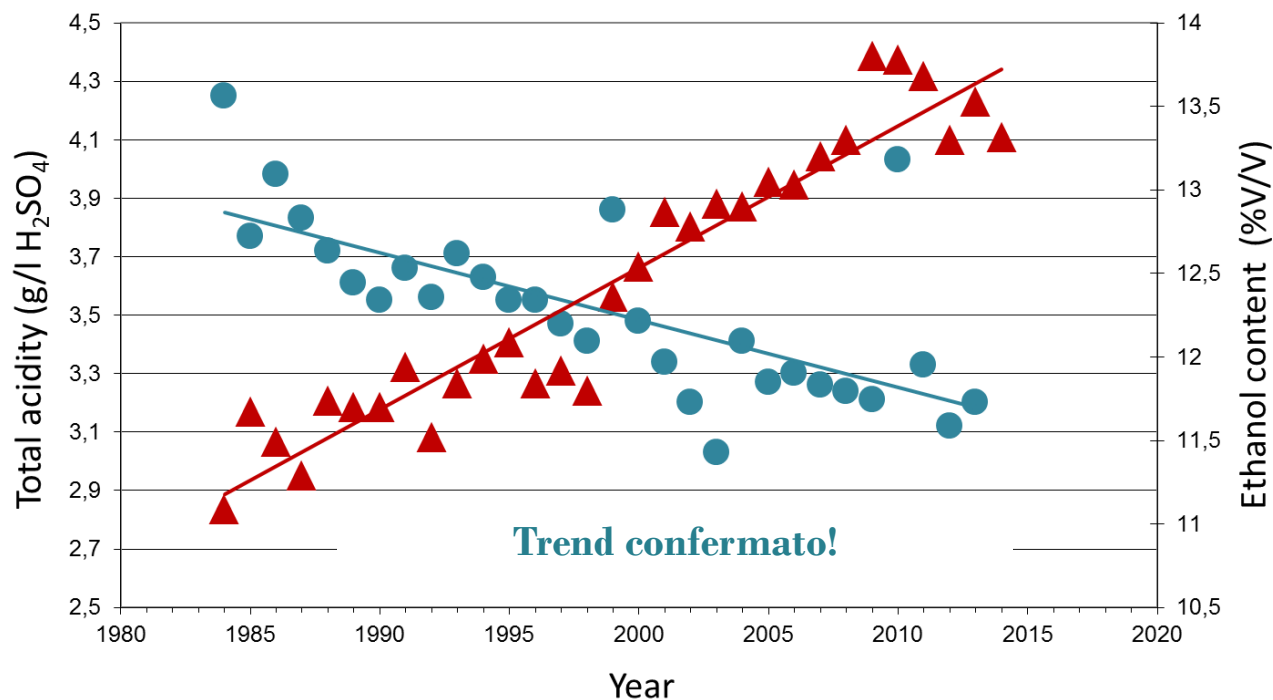
**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

**Il climate change e la fermentazione  
dei mosti: nuove strategie di intervento**

Paola Vagnoli

# Evidenze del cambiamento climatico sui parametri base del vino

## Andamento del contenuto in alcool e acidità del vino



**Alcool**



**Acidità totale**



**pH**

Analisi di ~1500 vini/anno nell' area Languedoc Roussillon, Francia Fonte: laboratorio DUBERNET



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

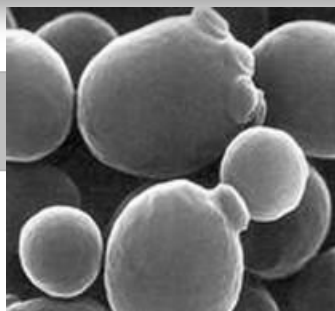
# Problematiche del cambiamento climatico sui parametri base del vino



- Incremento del rischio di arresti di fermentazione
- Effetto negativo sulla componente aromatica
- Raccomandazioni per la salute pubblica
- Incremento dei costi (tasse)

## Soluzioni

Lieviti a bassa resa

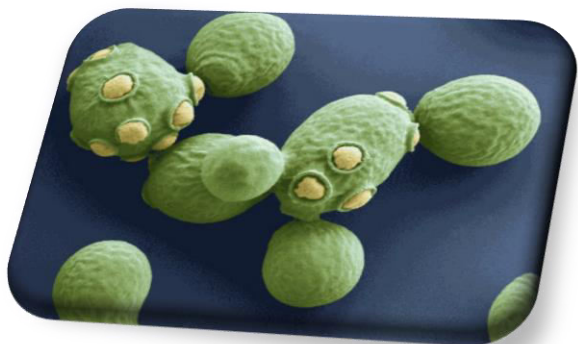


**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

Da anni nella lista dei desideri degli enologi...



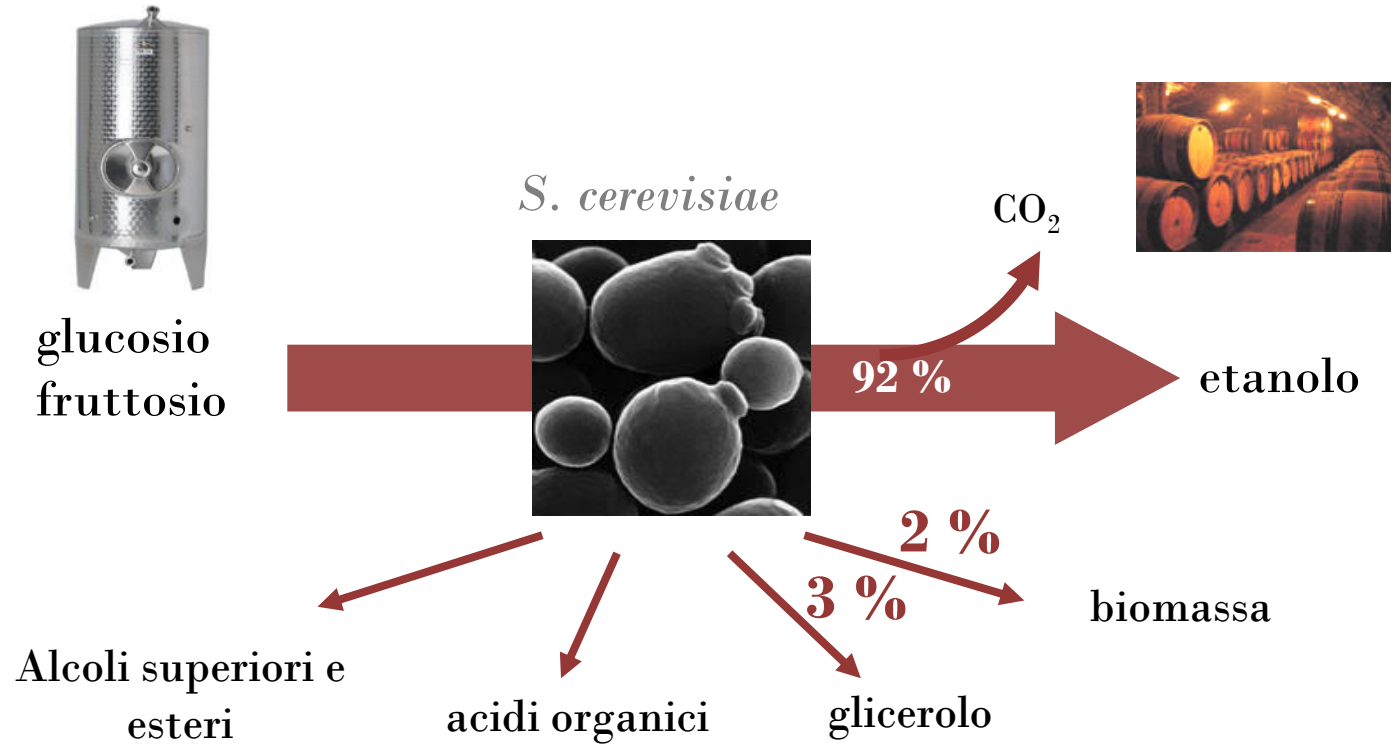
Diminuire il grado alcolico senza ripercussioni  
sul profilo sensoriale



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## Lievito e metabolismo degli zuccheri



# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool



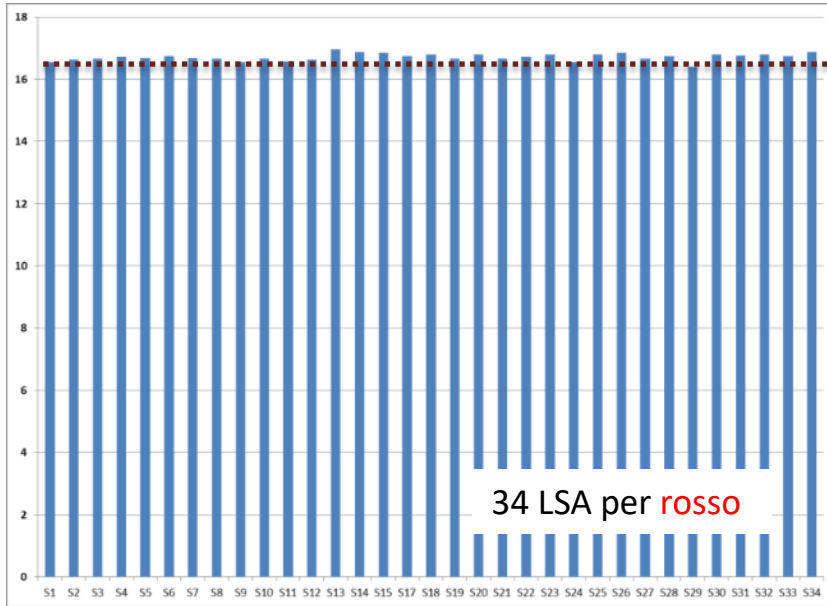
**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

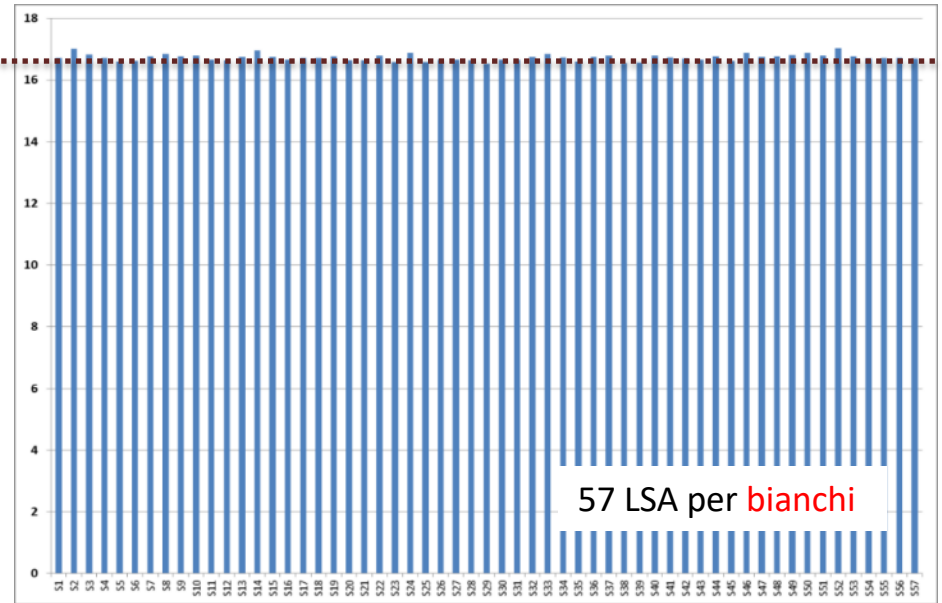
# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## Screening lieviti commerciale

280 g/l zuccheri iniziali , 28° C  
Tutti i ceppi hanno concluso la FA con < 1g/l



200 g/l zuccheri iniziali , 15° C  
Tutti i ceppi hanno concluso la FA con < 1g/l



Fisiologicamente :16,83 g zuccheri for 1% di alcool

Bassa diversità in resa tra 91 ceppi di LSA < 0,3 % v/v



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

Diversità molto ridotta nella resa in alcool tra ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*



# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool



Progetti in collaborazione



LALLEMAND OENOLOGY



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

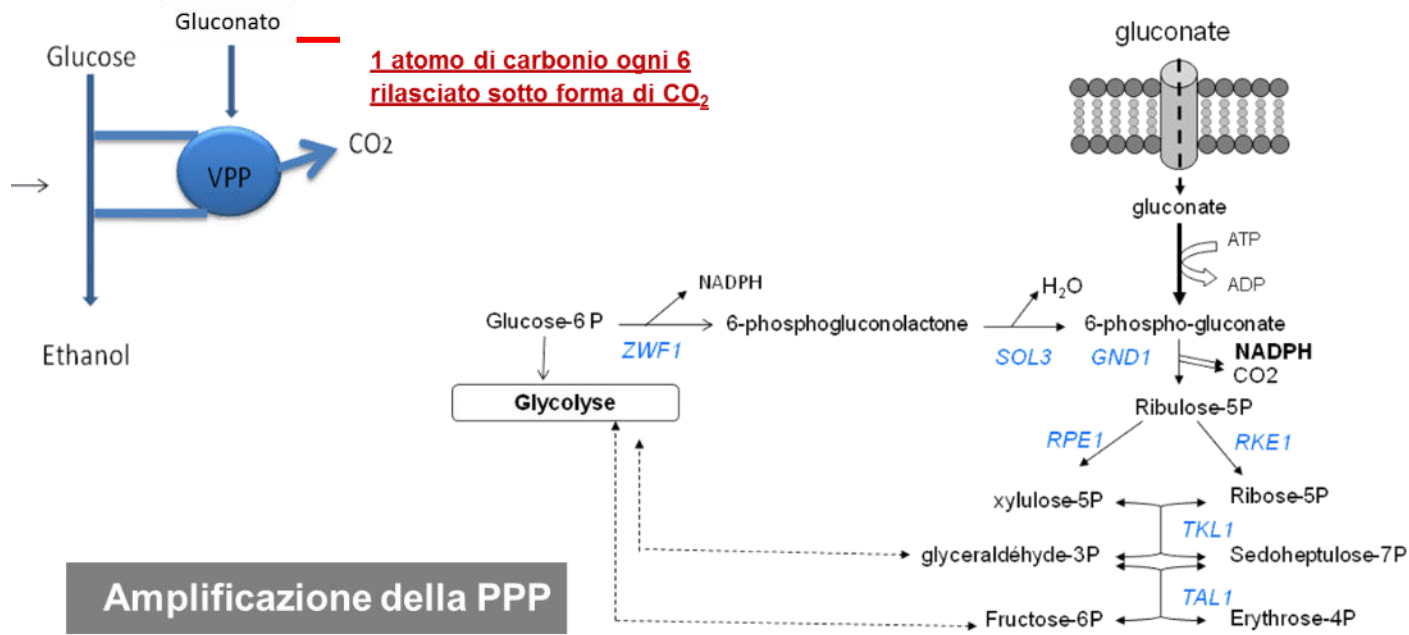


# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## 1° PROGETTO

Obiettivo iniziale del progetto

Ridirezionare il flusso di carbonio verso la via dei Pentoso Fosfati (Pentose Phosphate Pathway-PPP) per diminuire il contenuto di etanolo finale



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS



Metabolic Engineering

Volume 13, Issue 3, May 2011, Pages 263–271

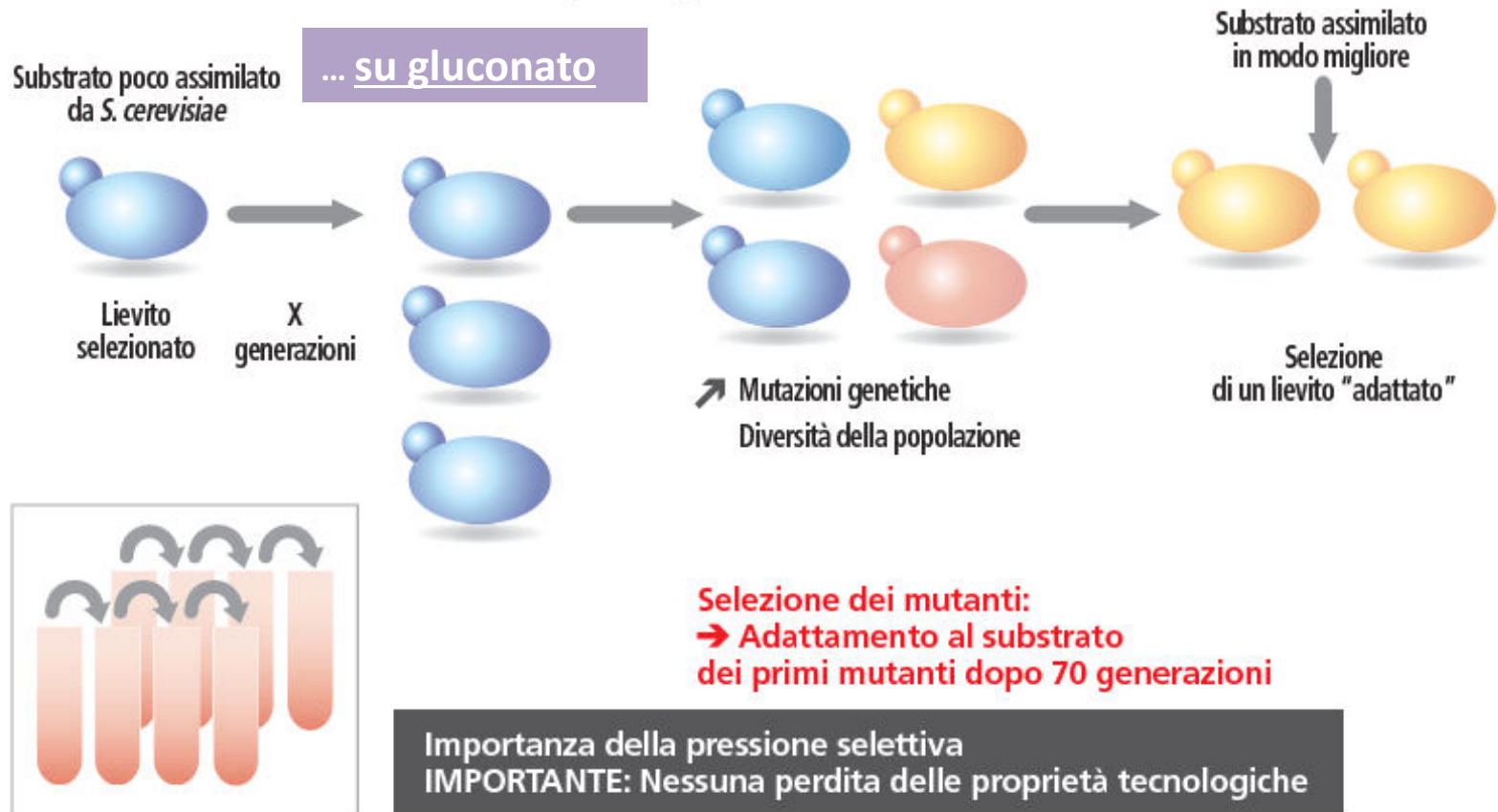
Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway

Axelle Cadière<sup>a, b</sup>, Anne Ortiz-Julien<sup>b</sup>, Carole Camarasa<sup>a</sup>, Sylvie Dequin<sup>a</sup>

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## 1° PROGETTO

### "Adattamento evolutivo": principi teorici



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

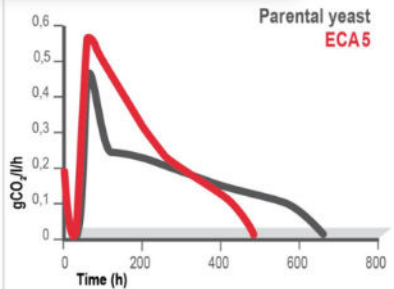
# La ricerca del lievito basso produttore di alcool

## RISULTATI

## 1° PROGETTO

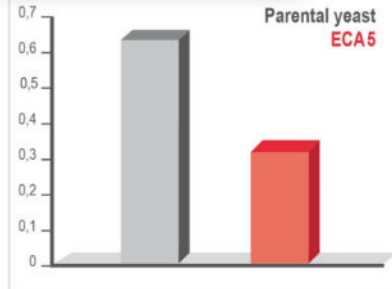
Dopo 70 generazioni

MS 70 240g/L glucosio 18°



Buone performance fermentative anche in condizioni di carenza d'azoto

MS 300 : Acetate (g/L)



Produzione di acetato ridotta in mosto sintetico non carente in nutrienti (MS300)

Nessun effetto sul decremento in alcool !

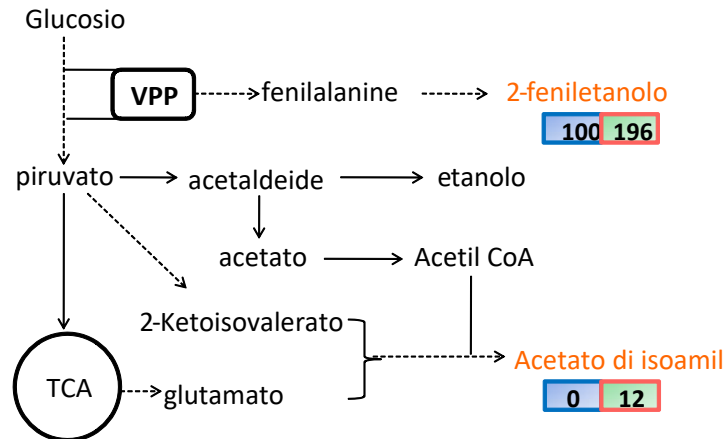


Laboratorio - Mosto sintetico

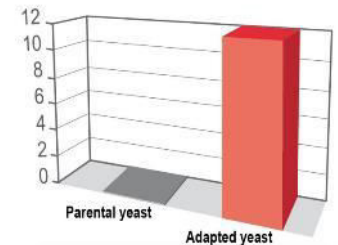
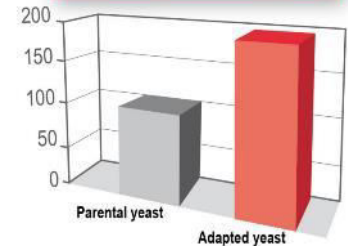


Iper produzione di esteri e di alcoli superiori!

## Nuove proprietà tecnologiche



2-phenylethanol (mg/L)



Isoamyl-acetate (mg/L)

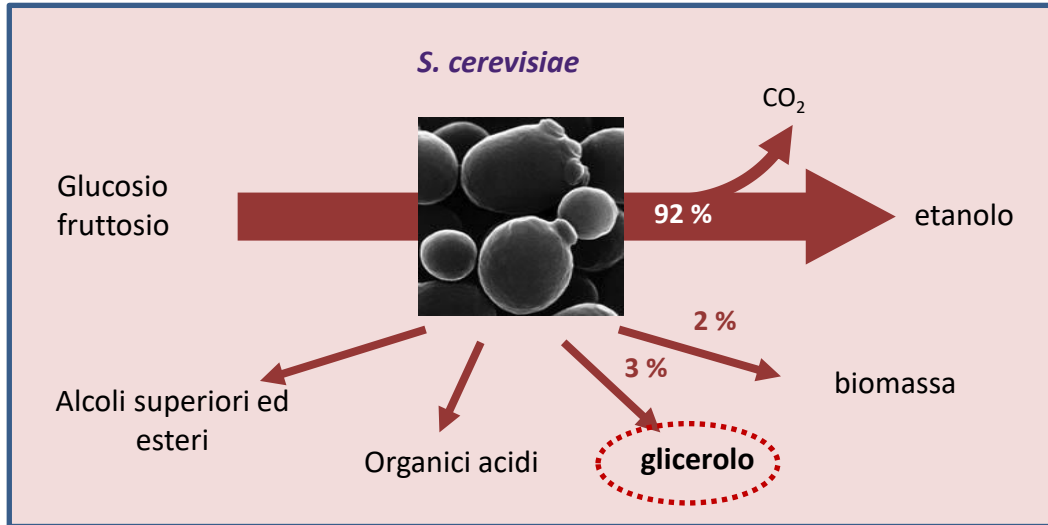


**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## 2° PROGETTO

Spostare il metabolismo degli zuccheri verso la produzione di altri metaboliti



*REFERENCE : Tilloy V; (April 2013) Développement de nouvelles souches de levures oenologiques à faible rendement en éthanol par évolution adaptative. Thèse Montpellier SupAgro*

### FATTORI CHIAVE DA RISPETTARE

- Mantenere il bilancio redox
- Preservare le caratteristiche fermentative e organolettiche del ceppo
- Evitare la produzione e accumulo di composti indesiderati



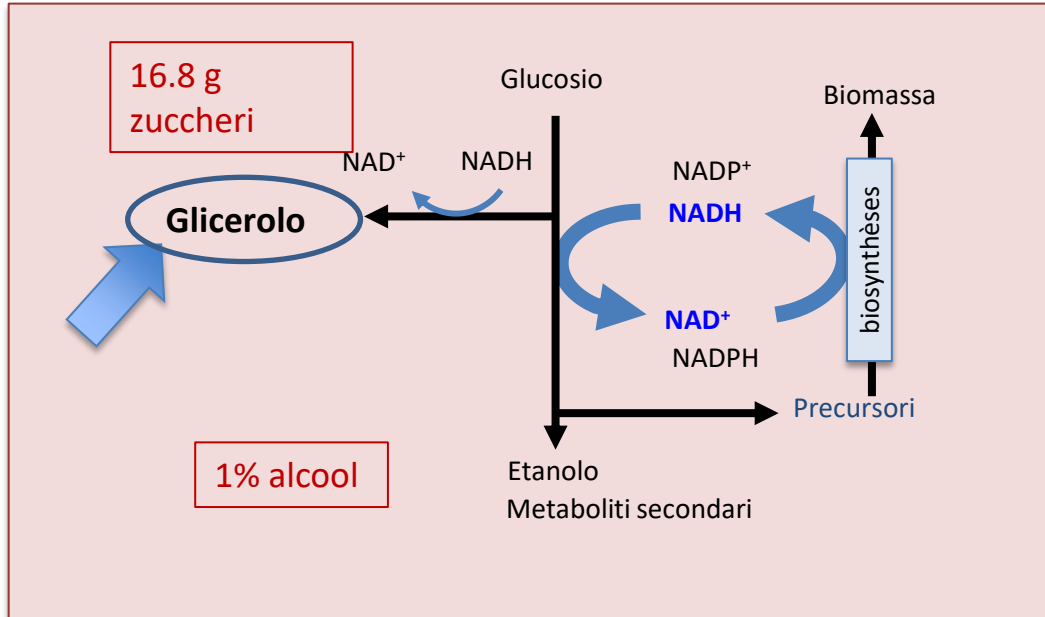
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## 2° PROGETTO

Spostare il metabolismo degli zuccheri verso la produzione di altri metaboliti



### Over produzione di GLICEROLO

- Il prodotto più abbondante (6-9 g/L), dopo l'etanolo e la CO<sub>2</sub>
- Impatto positivo nel vino : dolcezza, corpo
- Re-ossidazione di NADH a NAD<sup>+</sup>

REFERENCE : Tilloy V; (April 2013) Développement de nouvelles souches de levures oenologiques à faible rendement en éthanol par évolution adaptative. Thèse Montpellier SupAgro



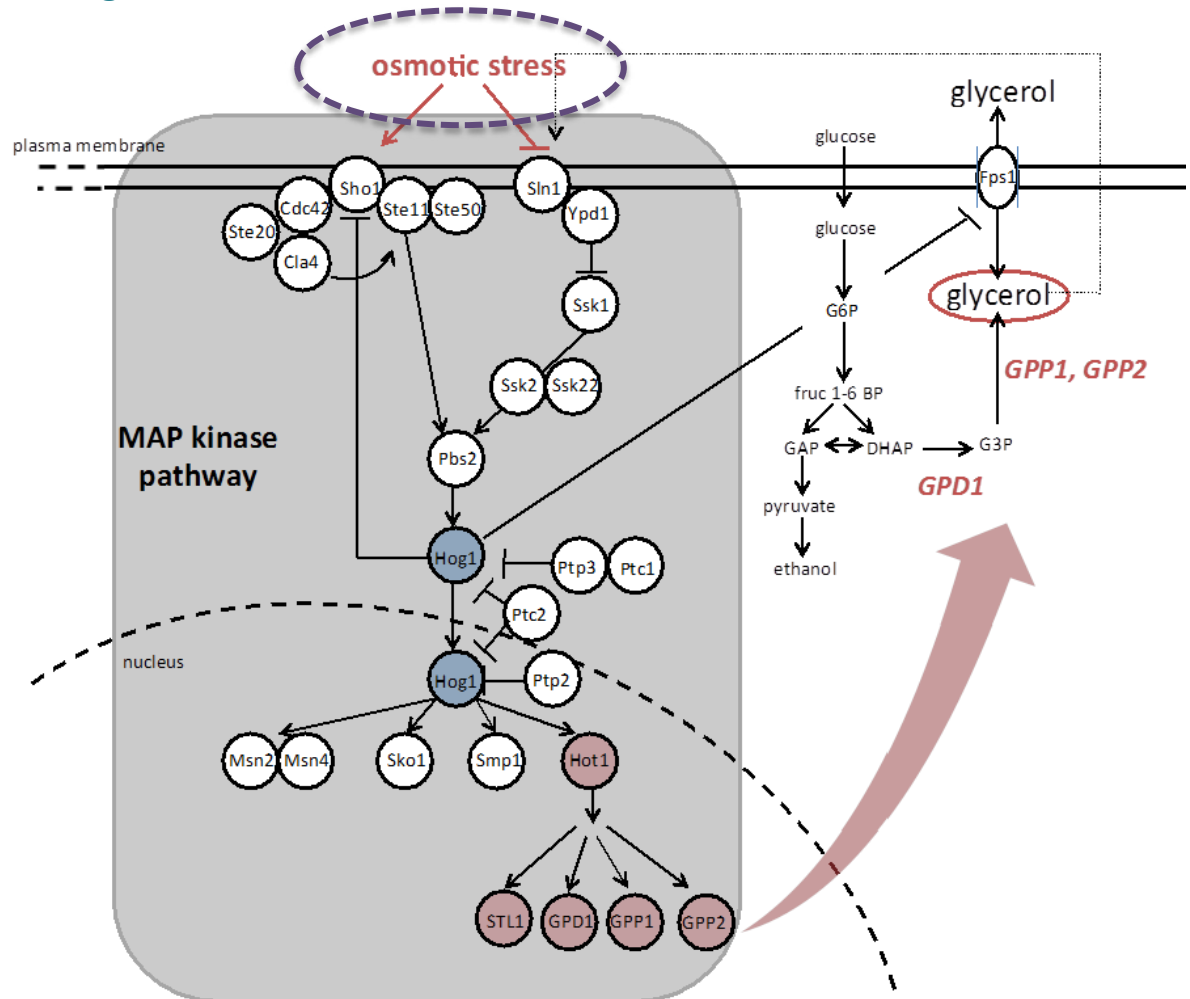
fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## 2° PROGETTO

Come favorire la produzione di glicerolo



The High Osmolarity Glicerol (HOG) pathway



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

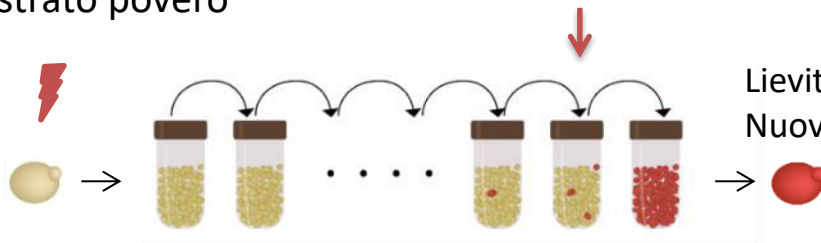
## 2° PROGETTO

### Evoluzione Adattativa per stimolare la produzione di glicerolo

Stress,  
substrato povero

Emergenza e selezione di  
mutazioni « positive »

Lievito evoluto  
Nuovo fenotipo

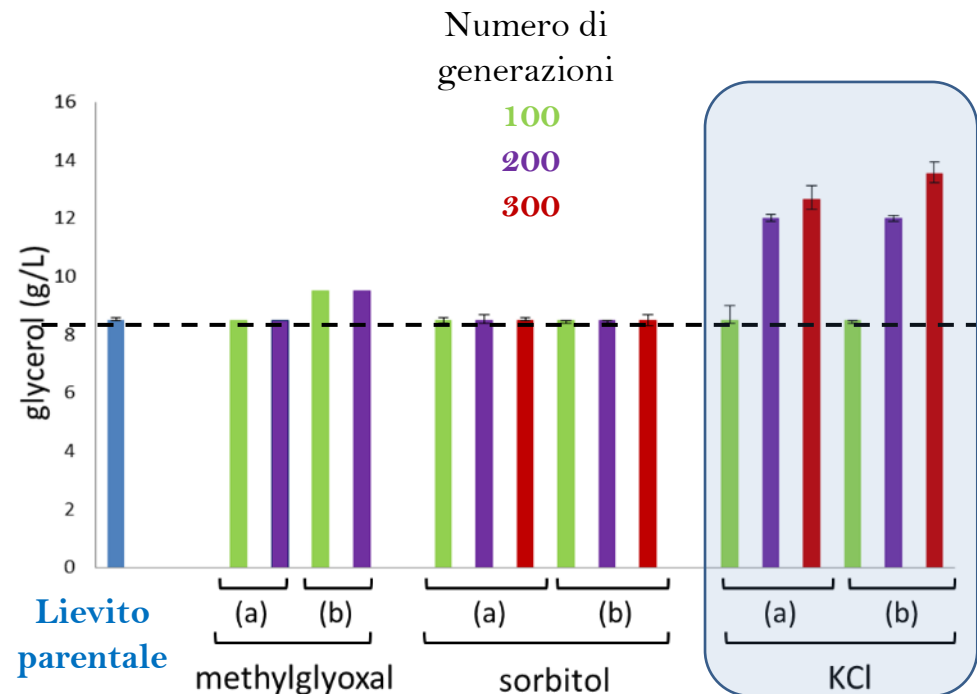


Centinaia di generazioni

Bassa frequenza di mutazioni spontanee

### 3 Condizioni di stress

- Metilgliossale
- Sorbitolo
- KCl



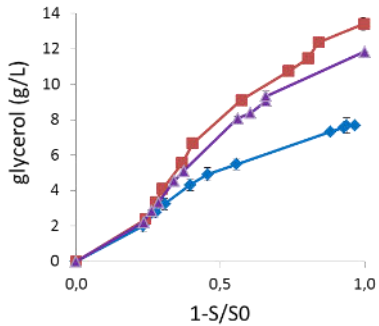
fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

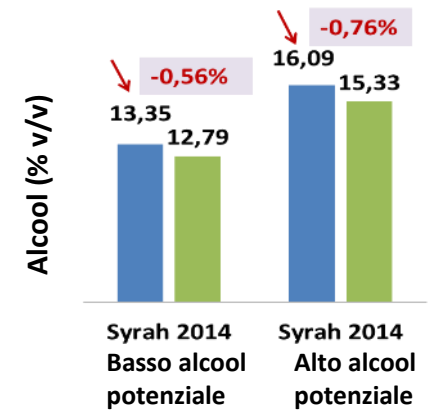
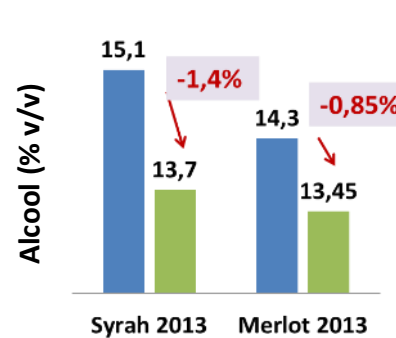
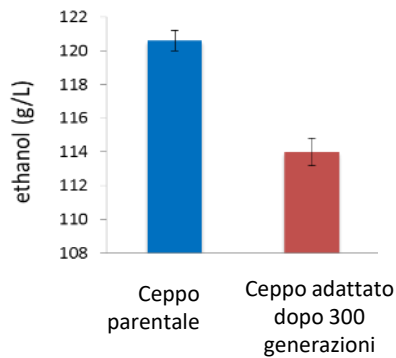
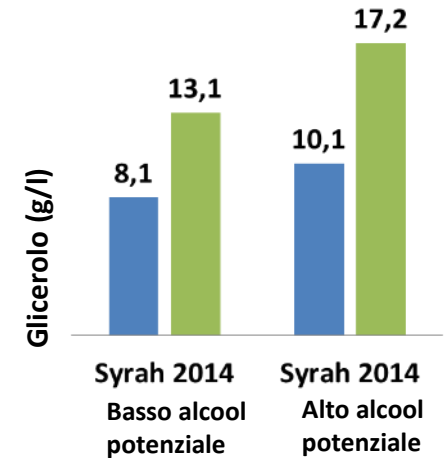
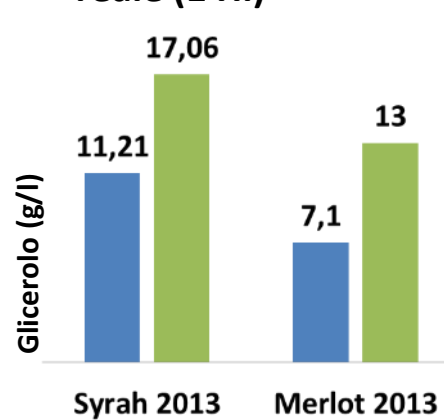


# Caratterizzazione dei ceppi adattati

Su scala di laboratorio in mosto sintetico (1L)



Su scala pilota in mosto reale (1 HI)



■ Ceppo parentale ■ Ceppo adattato

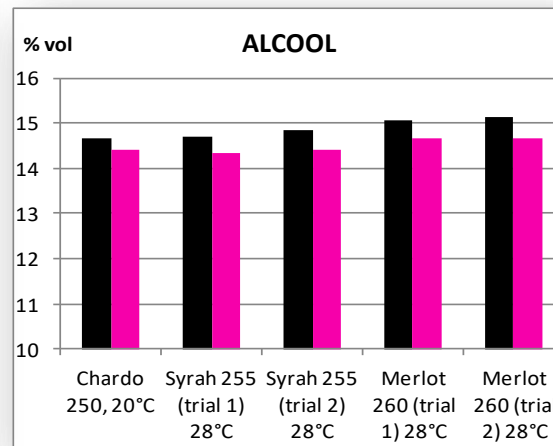
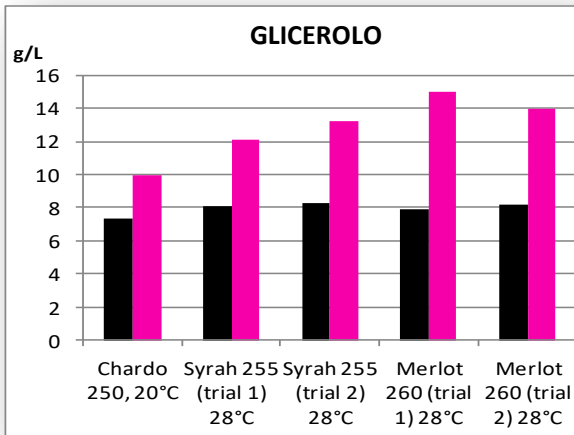
DIMINUZIONE MEDIA DELL'ETANOLO: 0.6 - 0.8% (VOL/VOL)



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# Caratterizzazione su Chardonnay , Merlot e Syrah ( laboratorio)

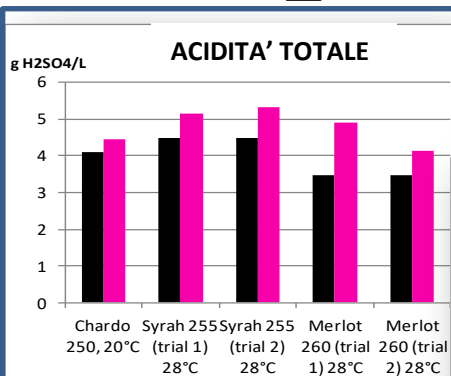


■ Ceppo parentale ■ Ceppo ottimizzato



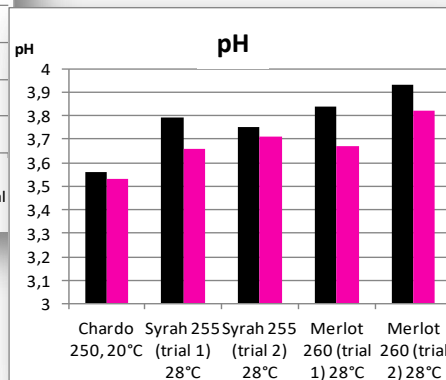
**Overproduzione del Glicerolo (+6 g/l)**

Consistente riduzione dell'alcool - 0,5%

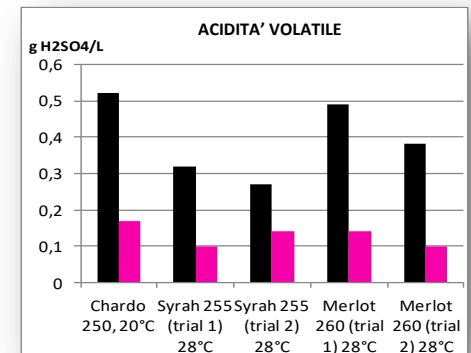


Inaspettata, ma significativa ed interessante

ATTIVITÀ ACIDIFICANTE!



+ 0,5-1,5 g/l Acidità totale & riduzione pH



Significativa riduzione dell'acidità volatile!



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

New perspectives in the use of commercial strains for winemaking

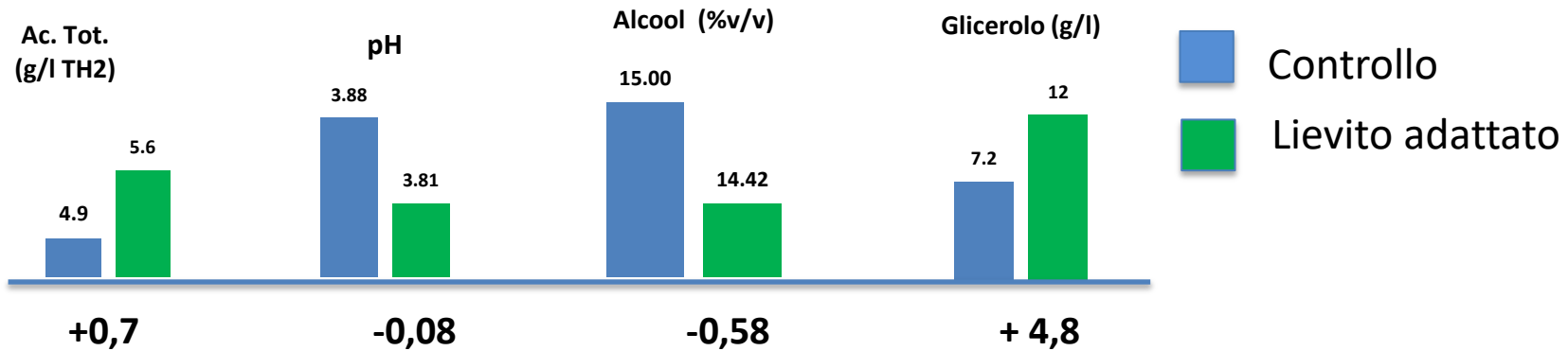
ALCUNE  
ESPERIENZE  
IN CANTINA



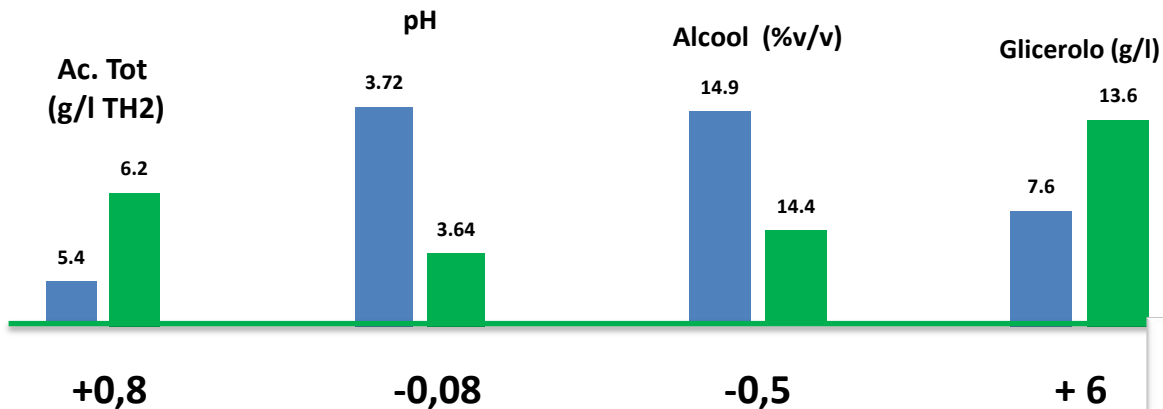
**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

# 2015 TEMPRANILLO, RIBERA DEL DUERO - SPAGNA



# 2015 TOURIGA FRANCA, DOURO VALLEY -PORTOGALLO

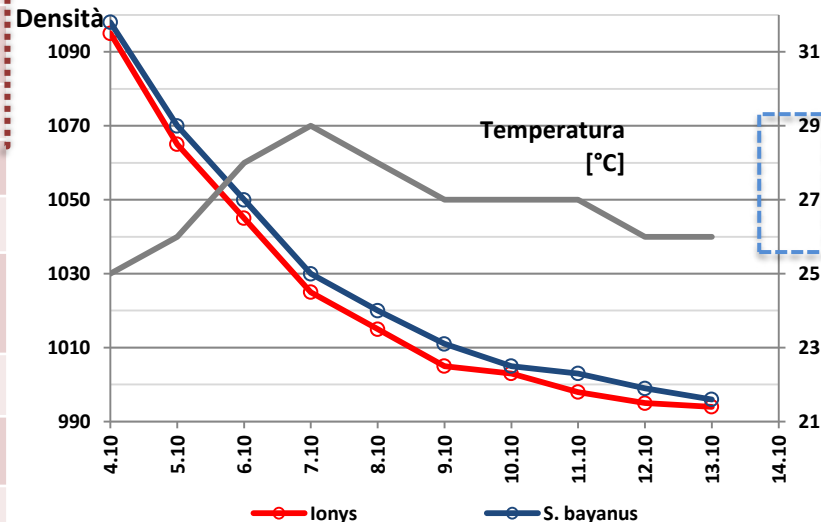


**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

# 2015 CABERNET SAUVIGNON TOSCANA 60 HL (I)

	Analisi mosto		Analisi vino	
	Lievito Adattato	S.bayanus	Lievito Adattato	S.bayanus
Zuccheri [g/L]	269	266	<2	<2
<b>Alcol [%]</b>	<0.30	<0.30	<b>14,90</b>	<b>15,60</b>
<b>Glicerolo [g/l]</b>	n.d.	n.d.	<b>14,2</b>	<b>10,1</b>
<b>Acidità Totale [g/L]</b>	4,49	4,19	<b>7,04</b>	<b>5,59</b>
<b>pH</b>	3,53	3,56	<b>3,51</b>	<b>3,64</b>
SO <sub>2</sub> Libera [mg/L]	1	1	4	4
SO <sub>2</sub> Totale [mg/L]	19	17	32	39
Ac. Volatile [g/L]	0,05	<0.05	0,26	0,35
APA [mg/L]	93	90	n.d	n.d
Ac. Malico [g/L]	0,68	0,71	0,25	0,12
Ac. Tartarico [g/L]	5,4	5,2	3,00	2,90
Ac. Succinico [g/L]	<0.1	<0.1	1,73	1,58



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

## 2016 MICROVINIFICAZIONE CABERNET SAUVIGNON 100 L



Analisi vini	Lievito adattato	oKay	ICV D21
	Media di 3 vinificazioni	Media di 2 vinificazioni	singola
Zuccheri [g/L]	<1.0	<1.0	<1.0
Alcol [%]	15,00	15,70	15,82
Glicerolo [g/l]	15,5	11,5	10,8
Acidità Totale [g/L]	6,92	5,87	5,88
pH	3,51	3,62	3,6
Acidità Volatile [g/L]	0,45	0,58	0,56
Acido Malico [g/L]	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Acido Lattico [g/L]	1,37	1,33	1,4
Acido Succinico [g/L]	1,8	1,3	1,3

Temperatura 25-28° C



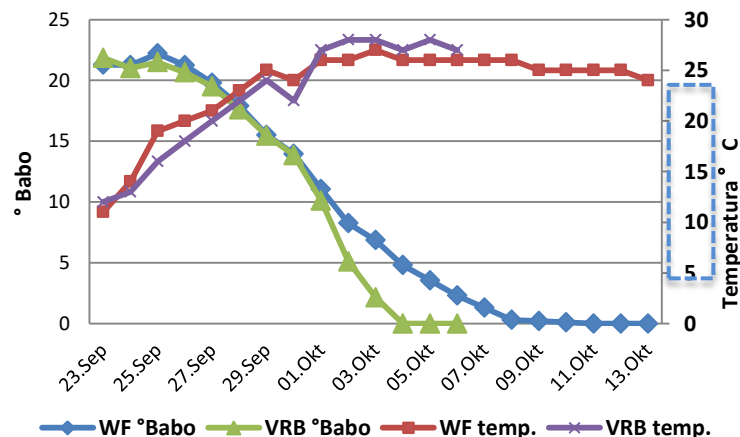
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

## 2015 CABERNET SAUVIGNON TOSCANA 90 HL (II)

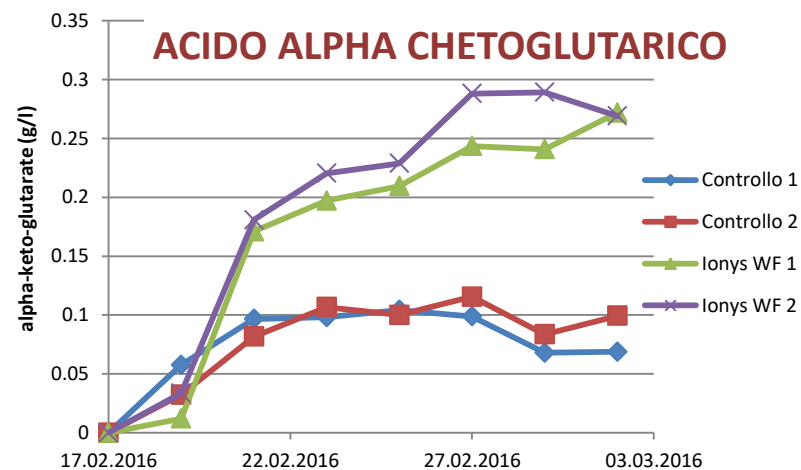
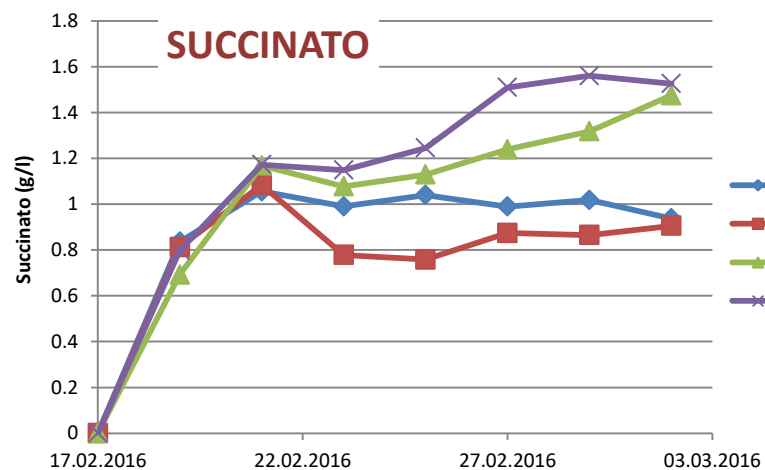
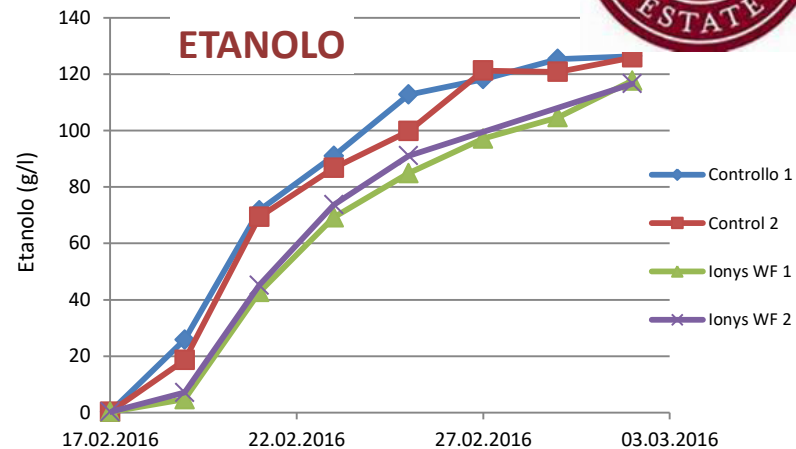
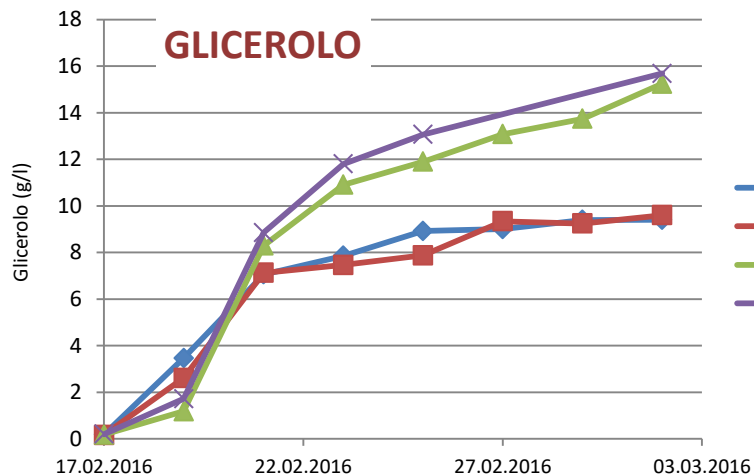
Analisi vini dopo 1 anno in barriques	Lievito adattato	Uvaferm VRB
Zuccheri [g/L]	<1.0	<1.0
Alcool [%]	14,49	14,62
Glicerolo [g/l]	14,9	9,5
Acidità Totale [g/L]	5,92	4,93
pH	3,43	3,53
Acidità Volatile [g/L]	0,34	0,53
Acido Malico [g/L]	< 0,1	< 0,1
Acido Lattico [g/L]	0,92	0,98
Acido Tartarico [g/L]	2,2	2,3
Acido Succinico [g/L]	1,45	1,3

### MACERAZIONE PRE-FERMENTATIVA A FREDDO



# 2016 SHIRAZ BAROSSA VALLEY AUSTRALIA 120 HL

Prova in duplicato, Lievito Adattato (Ionys WF) e Controllo (Lalvin Rhone 2323)



**fondazione banfi**

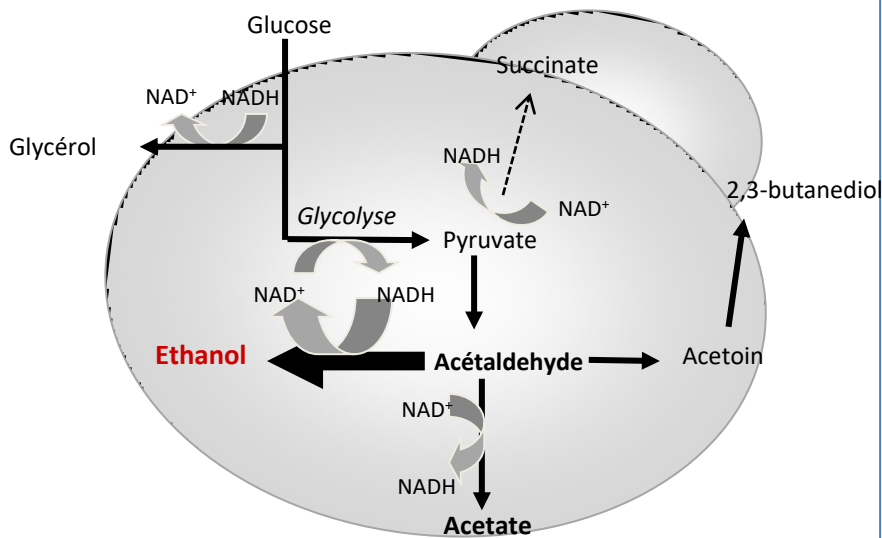
SANGUIS JOVIS



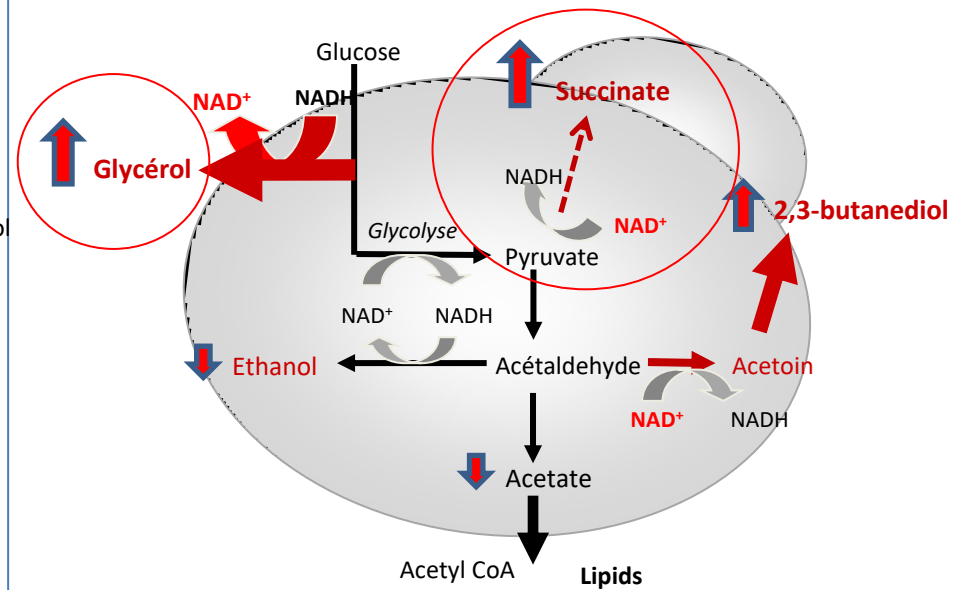
# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## Lievito dal metabolismo peculiare

Metabolismo *Saccharomyces cerevisiae*  
: bilancio redox intracellulare



Lievito Adattato : un metabolismo particolare , re-diretto verso la produzione di glicerolo e acidi organici



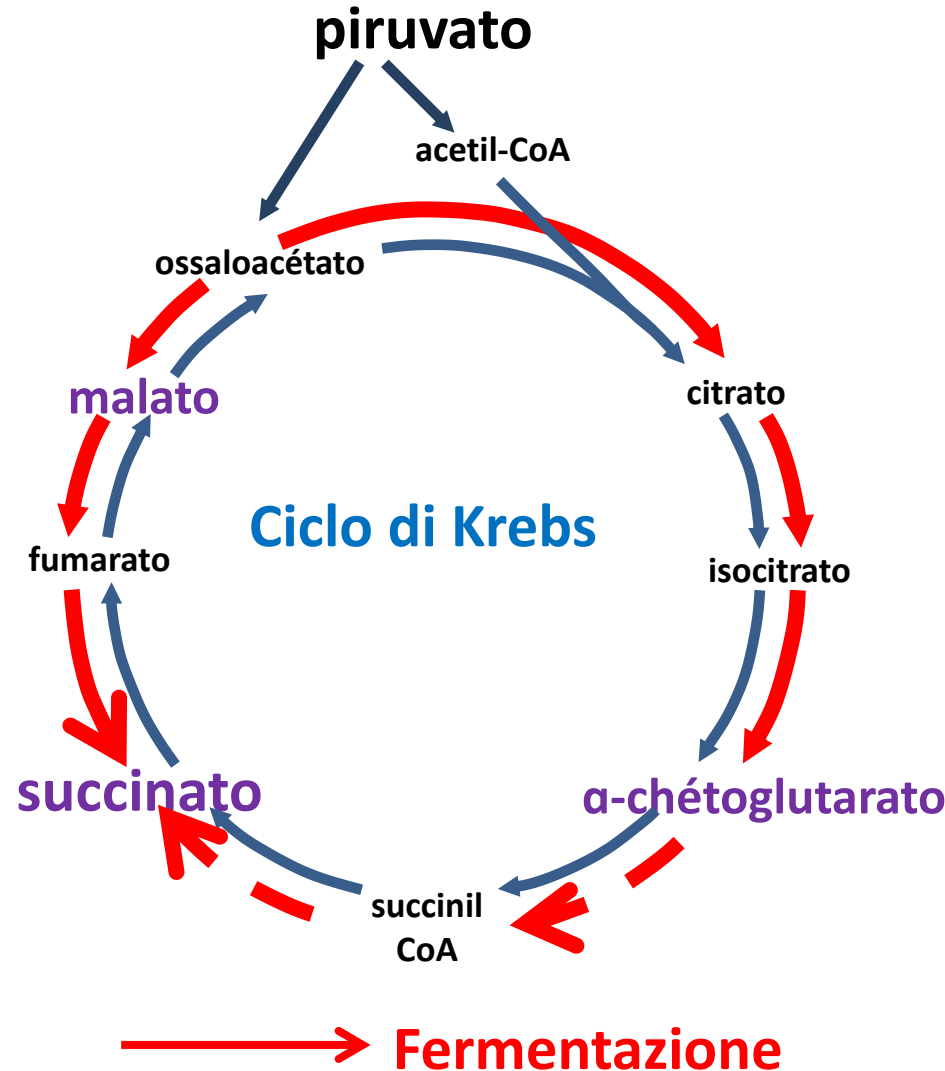
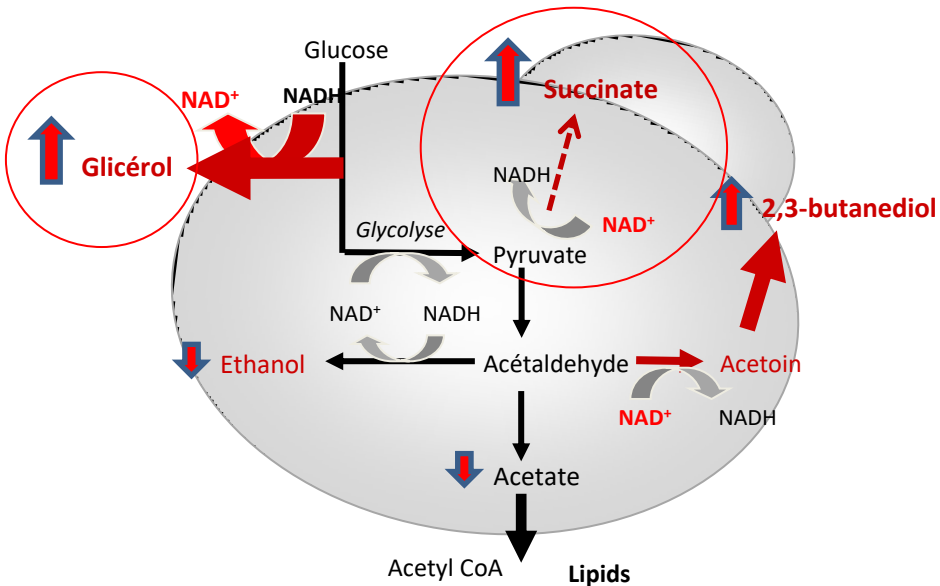
fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## Lievito dal metabolismo peculiare

IONYS<sub>WF</sub><sup>TM</sup> : un metabolismo particolare ,  
re-diretto verso la produzione di glicerolo e  
acidi organici



fondazione banfi

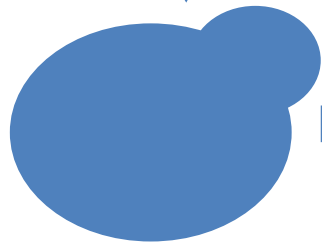
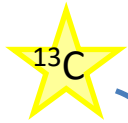
SANGUIS JOVIS

# UN METABOLISMO PECULIARE

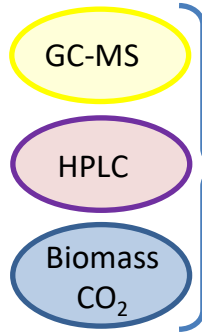
Conferma del comportamento mediante la “isotopic affiliation”  
Modellizzazione dei flussi metabolici con il carbonio marcato (CCM)

Uno strumento potente per analizzare in modo più approfondito i flussi intracellulari delle sostanze organiche

Isotopo del carbonio “marchato”



Bilancio del carbonio



Mappatura



Analisi delle interazioni

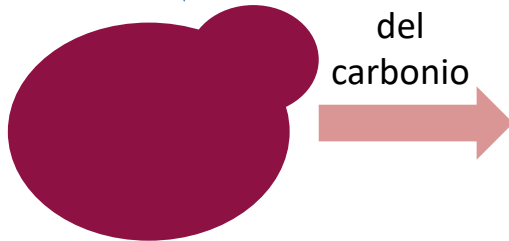
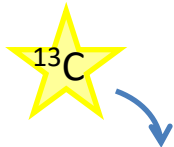


**fondazione banfi**

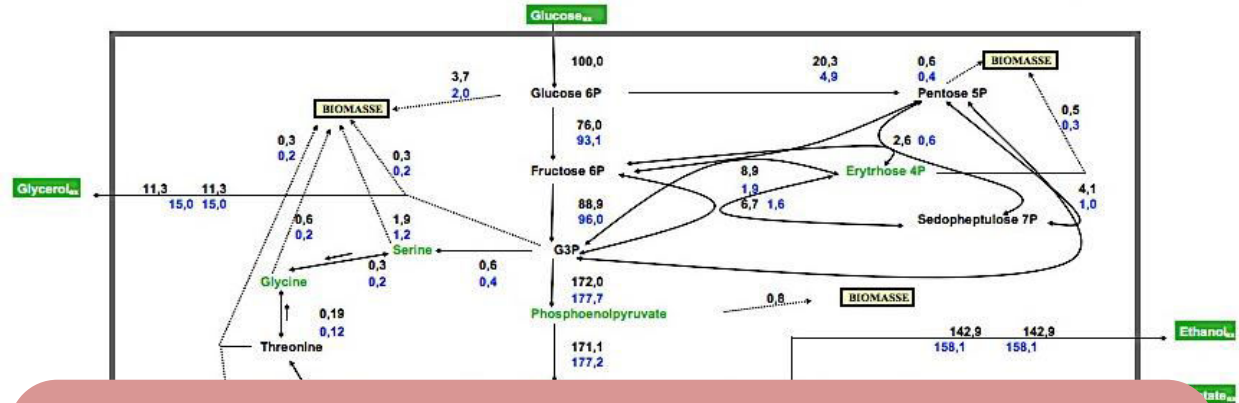
SANGUIS JOVIS

# UN METABOLISMO PECULIARE

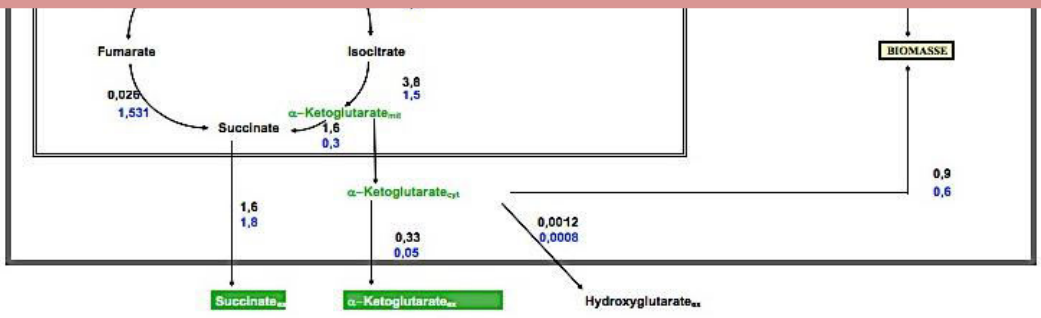
Conferma del comportamento mediante la “isotopic affiliation”  
 Modellizzazione dei flussi metabolici con il carbonio marcato (CCM)



Condizioni dell'esperimento:  
 Crescita in fase esponenziale  
 MS210 - 260 g/L glucosio - 28° C



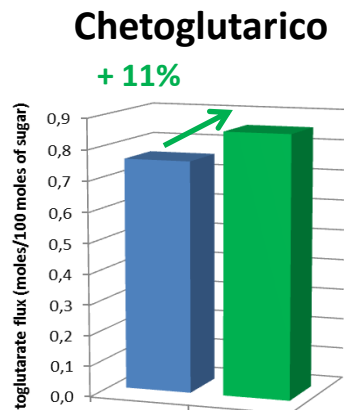
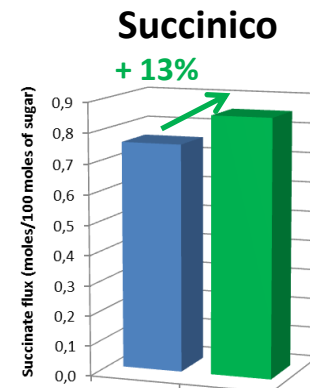
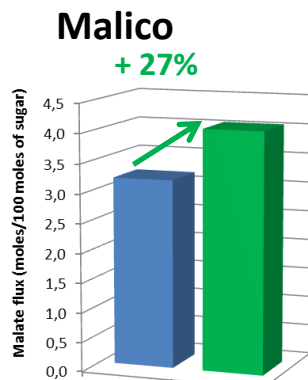
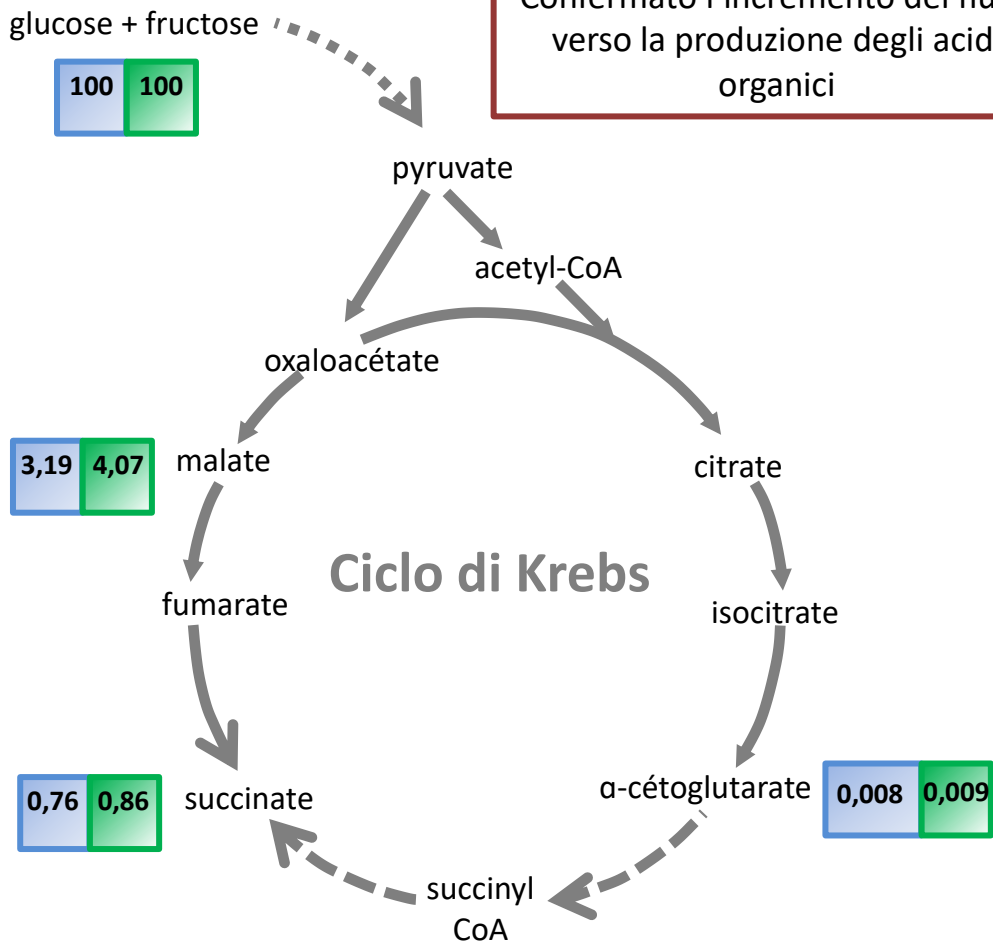
Il modello dei flussi deve essere completato con alcune interazioni mancanti  
 I primi risultati confermano i risultati ottenuti sulle fermentazioni con IONYS<sub>WF</sub>



# ANALISI METABOLICA

## Tasso di produzione degli acidi organici a fine fermentazione

Confermato l'incremento dei flussi verso la produzione degli acidi organici



Condizioni dell'esperimento:  
MS210 - 260 g/l glucosio/fruttosio -  
**28° C**

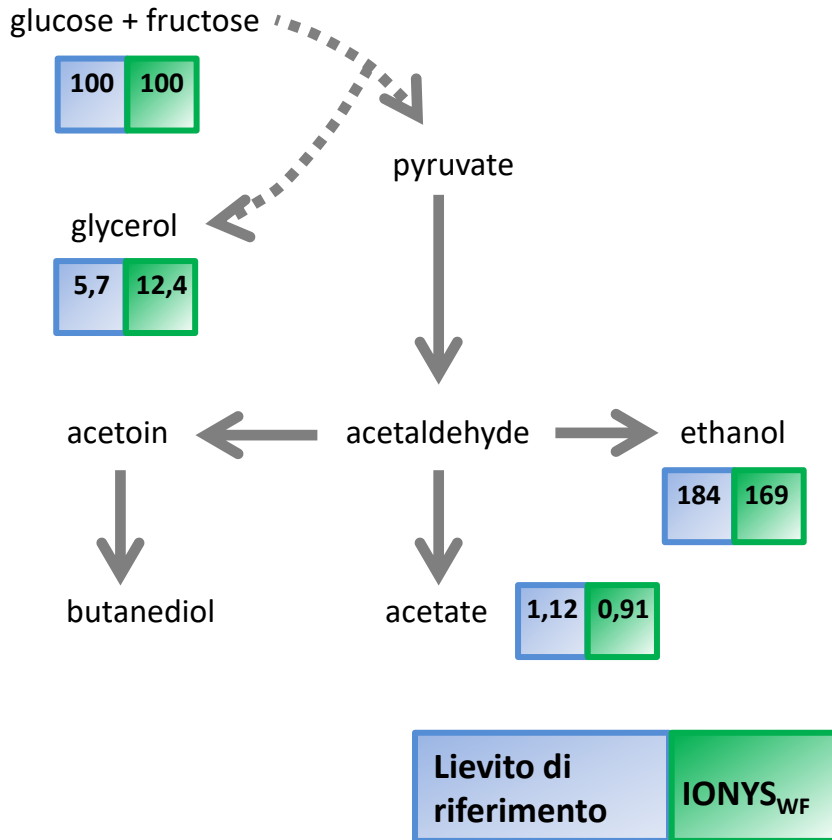
Lievito di riferimento	IONYS <sub>WF</sub>
------------------------	---------------------



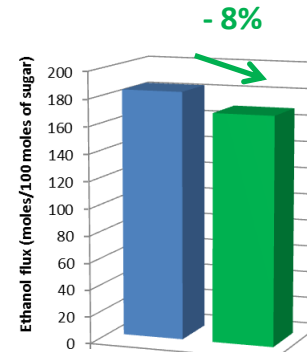
# ANALISI METABOLICA

## ...glicerolo più elevato e riduzione dell'etanolo

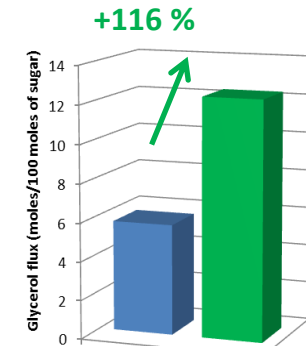
Aumento dei flussi di carbonio per la produzione di glicerolo e diminuzione di etanolo e acido acetico



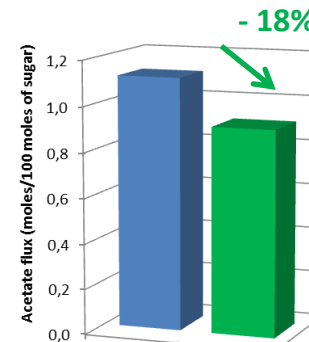
### Etanolo



### Glicerolo



### Acido acetico



Condizioni  
dell'esperimento:  
MS210 - 260 g/l  
glucosio/fruttosio -  
**28° C**



# UN LIEVITO PECULIARE PER LA GESTIONE DELLE FERMENTAZIONI ALCOLICHE

- ▶ Marcata deviazione del metabolismo verso la produzione di glicerolo (+4-7g/L)
- ▶ Lievito con potere acidificante , incremento dell'acidità totale
  - ▶ Succinico , malico ....
- ▶ Bassa produzione di acidità volatile
- ▶ Alcool .....riduzione di 0.5-0.8% (v/v)
- ▶ Temperature ottimali: 25° - 28° C



→ Lavori in corso :

identificazione delle basi genetiche  
responsabili del fenotipo del ceppo



# La ricerca del lievito con bassa resa in alcool

## Approccio con lieviti non-*Saccharomyces*

[Microb Cell Fact.](#) 2012; 11: 18.  
Published online 2012 Feb 3. doi: [10.1186/1475-2859-11-18](#)

PMCID: PMC3295710

***Starmerella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation**

[Vesna Milanovic](#)<sup>1</sup> [Maurizio Ciani](#)<sup>1</sup> [Lucia Oro](#)<sup>1</sup> and [Francesca Comitini](#)<sup>2</sup>†

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

yes

no

maybe

7 anni di progetto con *Starmerella bombicola*

ARCHIVED

*Starmerella bacillaris*



APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

***Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine**

[Vasileios Englezos](#)<sup>1</sup> · [Kalliopi Rantsiou](#)<sup>1</sup> · [Francesco Cravero](#)<sup>1</sup> · [Fabrizio Torchio](#)<sup>2</sup> · [Anne Ortiz-Julien](#)<sup>3</sup> · [Vincenzo Gerbi](#)<sup>1</sup> · [Luca Rolle](#)<sup>1</sup> · [Luca Coccolin](#)<sup>1</sup>

Received: 17 December 2015 / Revised: 2 February 2016 / Accepted: 21 February 2016

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

## Un approccio microbiologico per ridurre la gradazione alcolica del vino: fermentazioni miste *C. zemplinina* e *S.cerevisiae*

- Caratterizzazione fenotipica e selezione di ceppi di *Candida zemplinina* ( Cz)
- Valutazione della Cz in condizioni enologiche: messa a punto e ottimizzazione di colture miste
- Prove in combinazione con Ionys<sub>WF</sub> per l'ottenimento di vini a bassa gradazione alcolica:
  - prove di laboratorio
  - prove pilota



## Caratterizzazione fenotipica di ceppi di *C. zemplinina*

Treatment	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Glycerol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Ethanol (% v/v)	Residual Sugar (g/L)	Sugar for 1% Ethanol
Must	116.45 ± 0.02	116.79 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	233.24 ± 0.04	0 ± 0.00
Pure fermentations							
FC54	21.5 ± 12.99	0.16 ± 0.23	11.83 ± 0.92	0.40 ± 0.02	11.72 ± 1.29	21.67 ± 12.76	18.09 ± 0.90
CBE4	29.66 ± 12.21	0.04 ± 0.06	12.87 ± 0.34	0.40 ± 0.02	11.96 ± 0.76	29.71 ± 12.15	17.01 ± 0.07
C.z03	32.43 ± 13.94	0.15 ± 0.21	12.56 ± 0.47	0.36 ± 0.04	11.71 ± 0.85	32.59 ± 13.71	17.14 ± 0.07
S.c49	0.31 ± 0.17	0.71 ± 0.05	7.79 ± 0.12	0.25 ± 0.05	13.82 ± 0.02	1.02 ± 0.22	16.80 ± 0.01
BC	0.12 ± 0.01	0.41 ± 0.01	8.32 ± 0.32	0.14 ± 0.01	14.04 ± 0.20	0.54 ± 0.20	16.62 ± 0.33

The data are expressed as average ± deviation standard

- Lievito Fruttifilico
- Elevata produzione di glicerolo (anche su fermentazioni incomplete)

### MINORE RESA IN ALCOOL

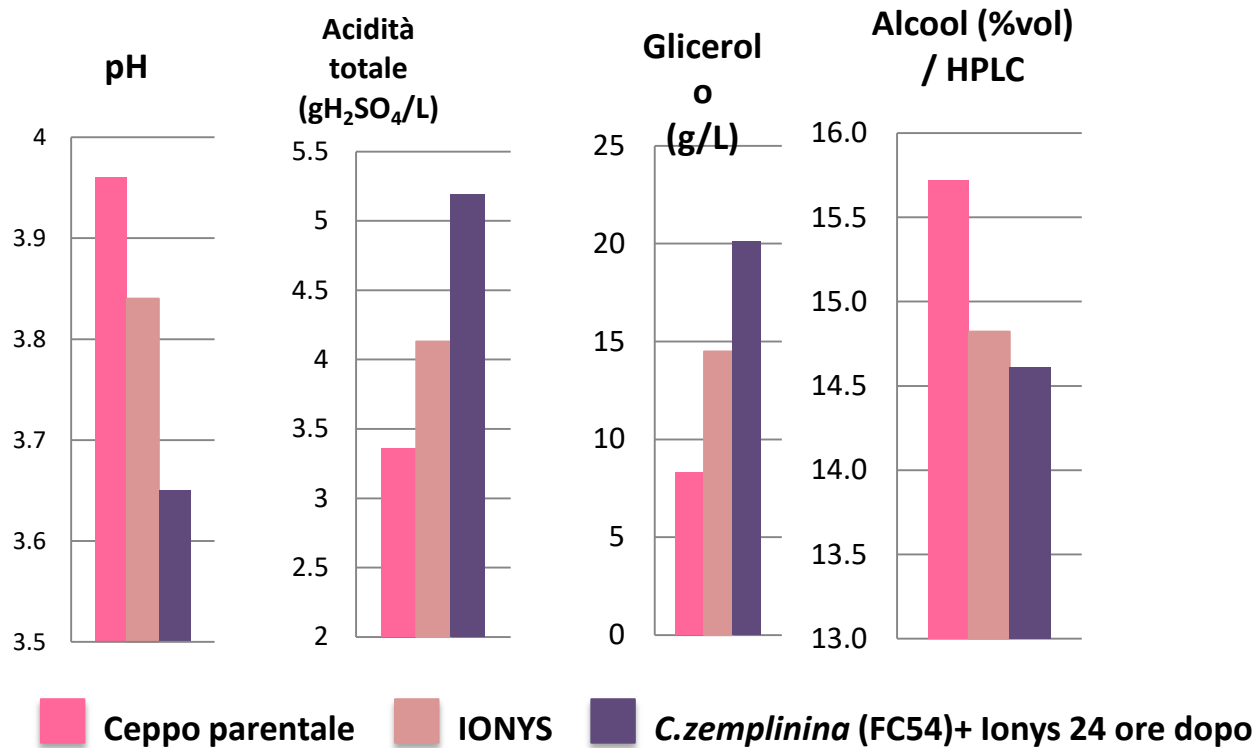
18,09 g/l di zuccheri per produrre 1° alcool invece che 16,83 g/l del *S. cerevisie*



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# Inoculo sequenziale *Candida zemplinina* (Cz)- inoculo IONYS WF dopo 24 ore



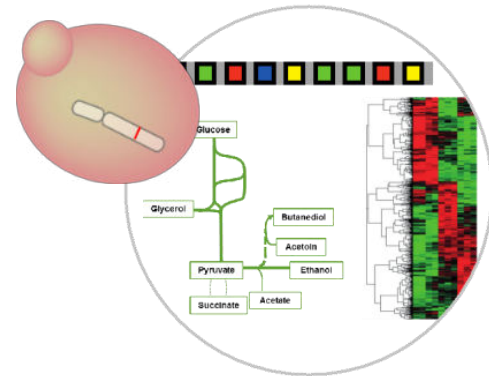
Approccio combinato Cz + Ionys - diminuzione del livello di etanolo e altro ancora ...

- Riduzione di 1,1 ° di etanolo
- Diminuzione del pH
- Aumento del livello di acidità totale
- Aumento del glicerolo



# Prospettive per il progetto « lievito con bassa resa in alcool »

- Sviluppo di ceppi più performanti nella riduzione della resa in alcool (seguendo la stessa strategia di evoluzione adattativa)
- Identificazione delle basi genetiche che controllano queste proprietà e comprensione dei meccanismi coinvolti per arrivare alla selezione di nuovi ceppi
  - Trascrittomica
  - Sequenziamento
  - mappatura dei QTL
- Continua Ricerca di lieviti non *Saccharomyces*



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

Altro «recente» desiderio degli enologi...



### Obiettivi

- ▶ Vini con acidità bilanciata
- ▶ Pulizia degli aromi e longevità
- ▶ Evitare alterazioni microbiologiche



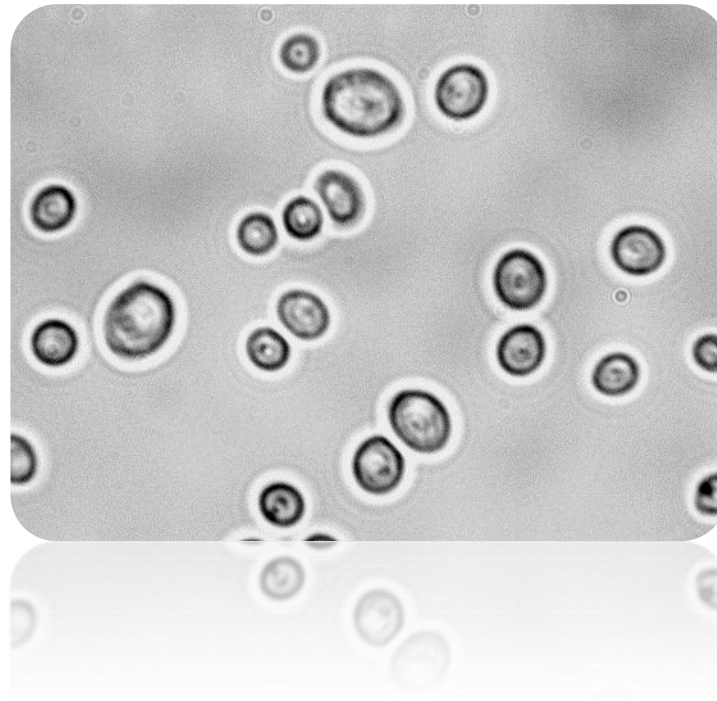
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

**... con un'acidità naturale !**

# Prospettive per l'« incremento naturale dell'acidità »

*Lachancea thermotolerans*



**fondazione banfi**  

---

**SANGUIS JOVIS**

# Prospettive per l'« incremento naturale dell'acidità »



Food Microbiology

Volume 33, Issue 2, April 2013, Pages 271-281



*Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine

Mirko Gobbi<sup>a</sup>, Francesca Comitini<sup>a</sup>, Paola Domizio<sup>a</sup>, Cristina Romani<sup>a</sup>, Livio Lencioni<sup>a</sup>, Ilana Mannazzò<sup>d</sup>, Maurizio Ciani<sup>a</sup>,

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>

[Get rights and content](#)



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS





# Prospettive per l'« incremento naturale dell'acidità »

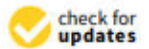


Review

## *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology

Antonio Morata <sup>1,\*</sup> , Iris Loira <sup>1</sup> , Wendu Tesfaye <sup>1</sup>, María Antonia Bañuelos <sup>2</sup>, Carmen González <sup>1</sup> and José Antonio Suárez Lepe <sup>1</sup>

Received: 20 June 2018; Accepted: 6 July 2018; Published: 11 July 2018



- Utilizzato in inoculo sequenziale o mix
- Produce acido lattico
- Abbassa il pH
- Interessante per le zone calde
- Acidifica in maniera naturale

**Abstract:** *Lachancea (kluyveromyces) thermotolerans* is a ubiquitous yeast that can be naturally found in grapes but also in other habitats as soil, insects and plants, extensively distributed around the world. In a 3-day culture, it shows spherical to ellipsoidal morphology appearing in single, paired cells or short clusters. It is a teleomorph yeast with 1–4 spherical ascospores and it is characterized by a low production of volatile acidity that helps to control global acetic acid levels in mixed or sequential inoculations with either *S. cerevisiae* or other non-*Saccharomyces* species. It has a medium fermentative power, so it must be used in sequential or mixed inoculations with *S. cerevisiae* to get dry wines. It shows a high production of lactic acid able to affect strongly wine pH, sometimes decreasing wine pH by 0.5 units or more during fermentation. Most of the acidification is produced at the beginning of fermentation facilitating the effect in sequential fermentations because it is more competitive at low alcoholic degree. This application is especially useful in warm areas affected by climatic change. pH reduction is produced in a natural way during fermentation and prevents the addition of tartaric acid, that produces tartrate precipitations, or the use of cation exchangers resins highly efficient reducing pH but with undesirable effects on wine quality. Production of lactic acid is done from sugars thus reducing slightly the alcoholic degree, especially in strains with high production of lactic acid. Also, an improvement in the production of 2-phenylethanol and glycerol has been described.



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# Prove con un ceppo specifico di *Lachancea thermotolerans*

2016: Tempranillo in Spain

*Lachancea  
thermotolerans*  
+EC1118      EC1118

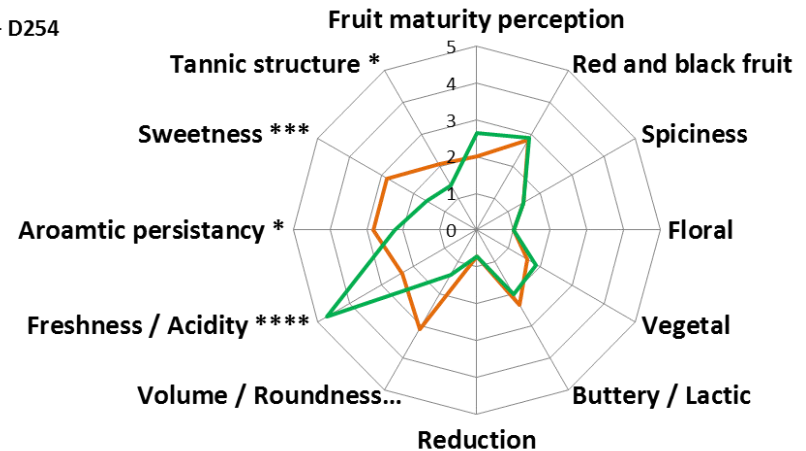
Alcool (% vol ± 0,15)	13,6	14,09
Glu+Fru (g/L)	0,88	0,09
pH (20°C ± 0,02)	3,47	3,43
Acidità totale (g TH2/L)	9,7	6,3
Ac.lattico (g/L ± 0,1)	3,3	0,11
Glicerol (g/L ± 0,1)	9,68	7,97

2017: Merlot INRA Pech Rouge

Analisi fine FML	Ceppo Controll o	<i>Lachancea thermotolerans</i> + ceppo controllo
Alcool (% vol.)	15,92	15,22
Acidità totale (g/L TH2)	6,5	11,40
pH	3,64	3,28
Ac lattico (g/L)	1,25	7,8

## Profilo organolettico

— D254  
— Laktia + D254



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# Cambiamento climatico e nuovo trend



Vini con  
bassa  $\text{SO}_2$ !



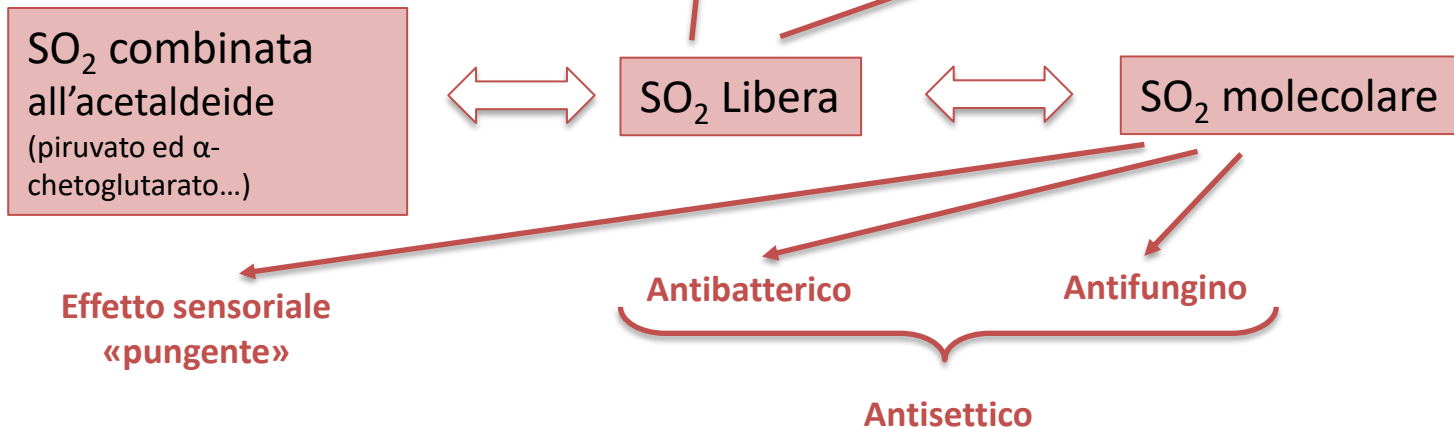
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# Cambiamento climatico e nuovo trend



↓ SO<sub>2</sub>



La SO<sub>2</sub> molecolare è la forma di anidride solforosa maggiormente responsabile **dell'attività anti-microbica**



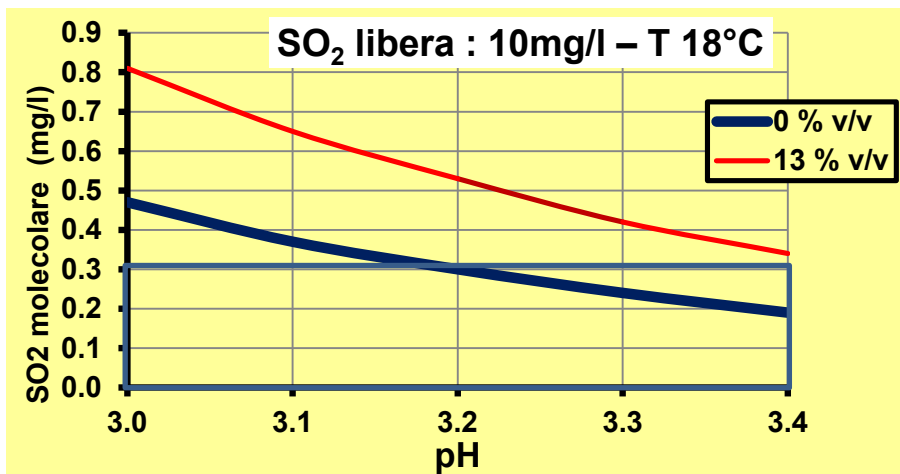


# SO<sub>2</sub>

## Influenza del pH sulla SO<sub>2</sub>

La SO<sub>2</sub> molecolare è la forma di anidride solforosa maggiormente responsabile dell'attività anti-microbica

•  $SO_2 \text{ Molecolare} = SO_2 \text{ libera} / ( 10^{(pH - 1.81)} + 1 )$



- L'SO<sub>2</sub> molecolare aumenta con l'abbassarsi del pH e con l'innalzarsi di etanolo e temperatura
- **Livello di SO<sub>2</sub> molecolare letale per i batteri: 0.3 mg/L- 0.5 mg/L.**

SO2 (mg/l)		SO2 moléculaire (mg/l) à 18°C				
ajouté	libre	pH3.0	pH3.1	pH3.2	pH3.3	pH3.4
20	6	0.28	0.22	0.18	0.14	0.11
30	9	0.42	0.34	0.27	0.21	0.17
40	12	0.56	0.45	0.36	0.29	0.23
50	15	0.70	0.56	0.45	0.36	0.29
60	18	0.84	0.67	0.54	0.43	0.34

↑ pH ↓ SO<sub>2</sub> molecolare

Riduzione dell'azione antimicrobica!

Obiettivo :

Cercare di ridurre al minimo la SO<sub>2</sub> legata per averne il più possibile disponibile



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

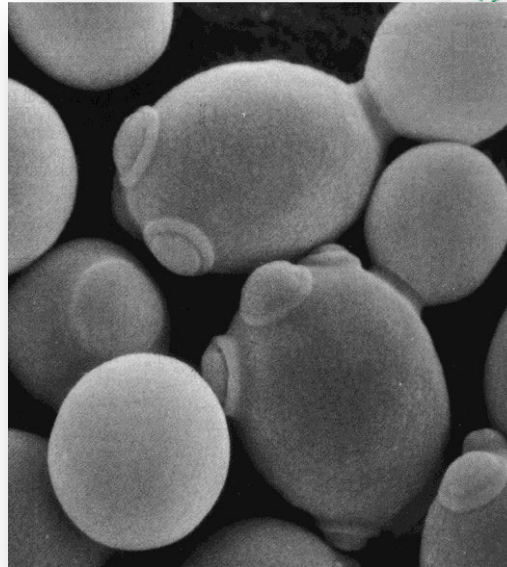


# Ridurre il contenuto di molecole in grado di legare la SO<sub>2</sub>



Lieviti basso produttori di SO<sub>2</sub> e acetaldeide

Progetto in collaborazione



**fondazione banfi**  

---

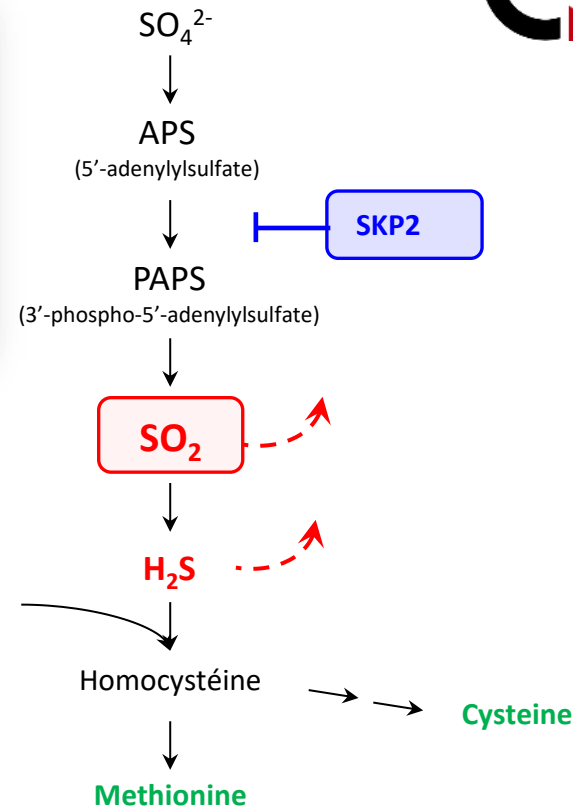
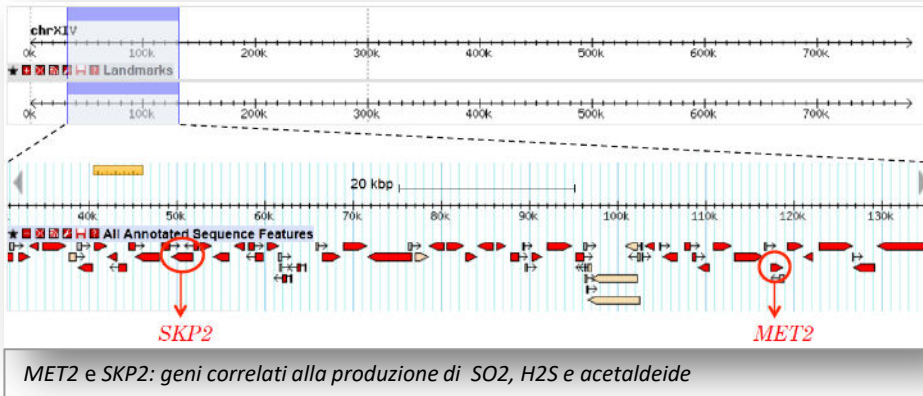
**SANGUIS JOVIS**

# Ridurre il contenuto di molecole in grado di legare la SO<sub>2</sub>

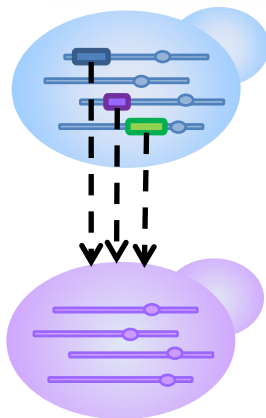
## Mappaggio e identificazione dei geni implicati

Geni individuati sul XIV cromosoma:

Identificazione di due geni legati la metabolism dello zolfo: *MET2* and *SKP2*



Brevetto INRA: "Méthode de contrôle de la production de SO<sub>2</sub>, d'H<sub>2</sub>S et d'acétaldehyde par des levures"  
PCT/IB2013/050623

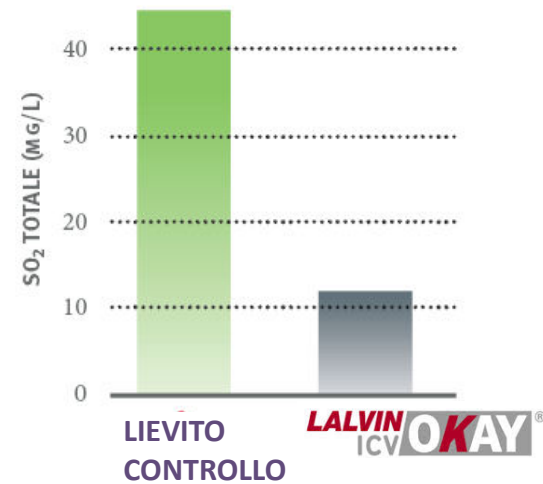
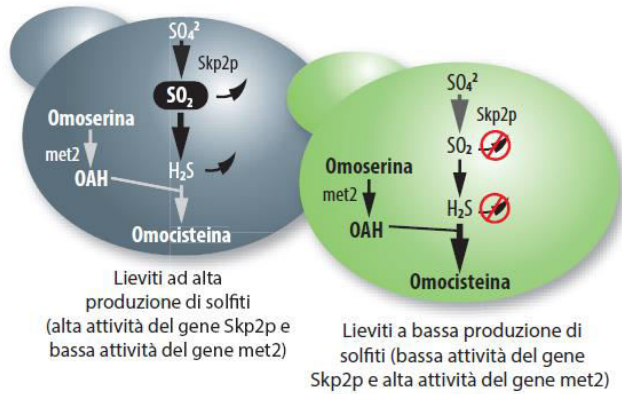


*SKP2*<sup>JN17</sup> & *MET2*<sup>JN17</sup>: Due geni chiave che controllano e regolano l'intero metabolism dello zolfo

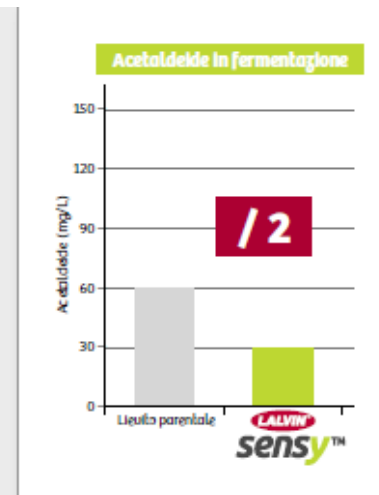
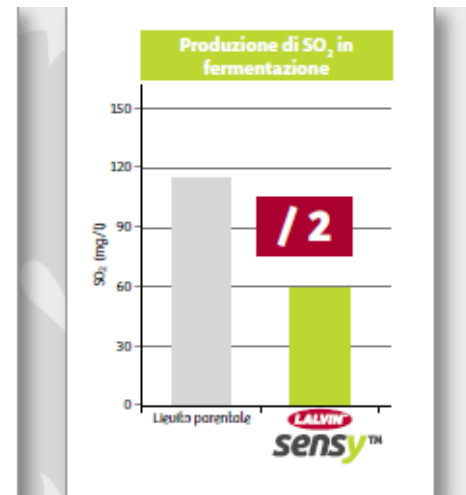


**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

# Ridurre il contenuto di molecole in grado di legare la SO<sub>2</sub>



Controllo simultaneo della produzione di SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, e indirettamente acetaldeide, mediante la corretta combinazione degli alleli dei geni SKP2 e MET2



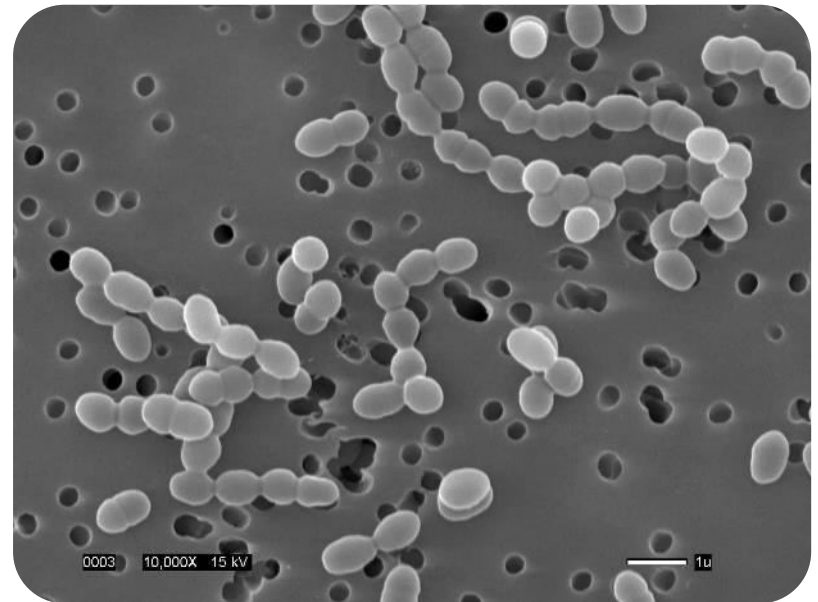
**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS



# Cambiamento climatico e Fermentazione Malolattica



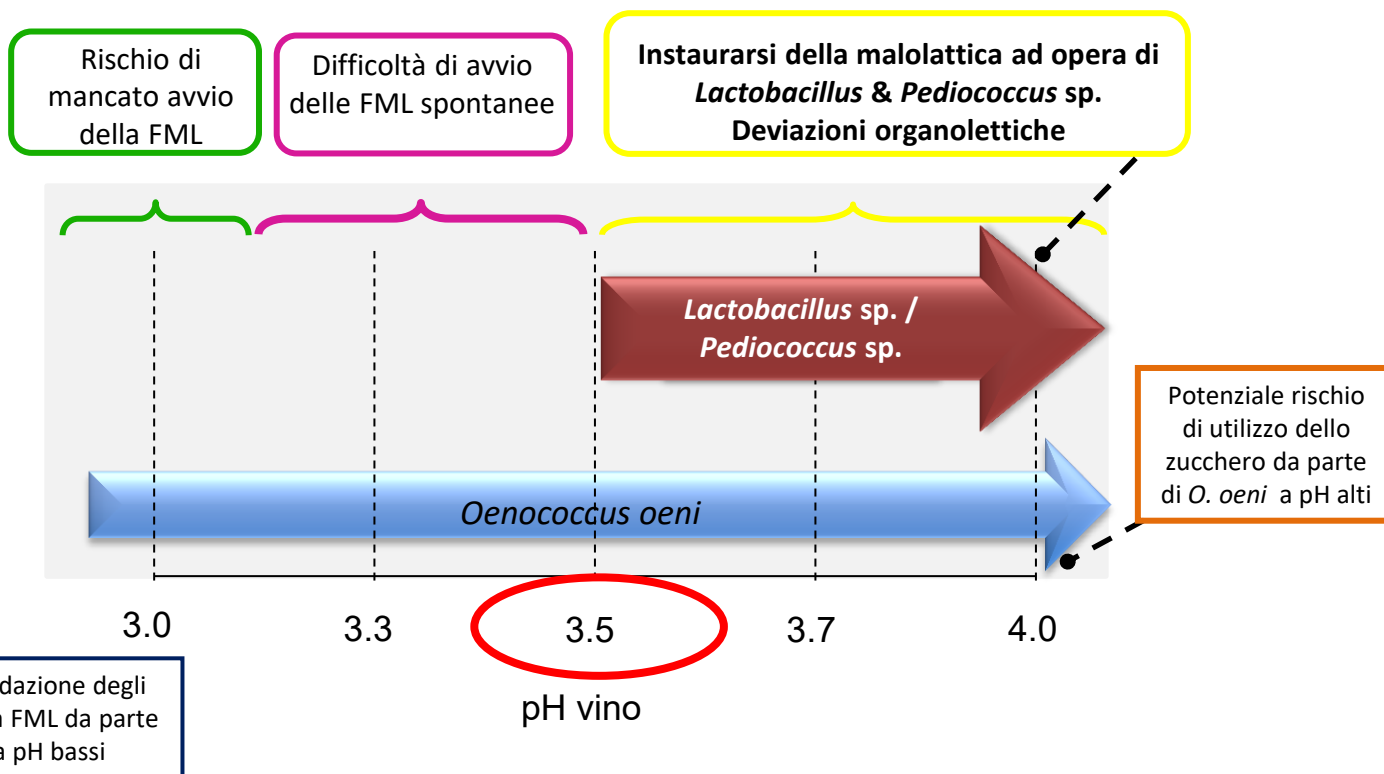
**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS



# Cambiamento climatico e Fermentazione Malolattica



## Influenza del pH sulla Fermentazione Malolattica

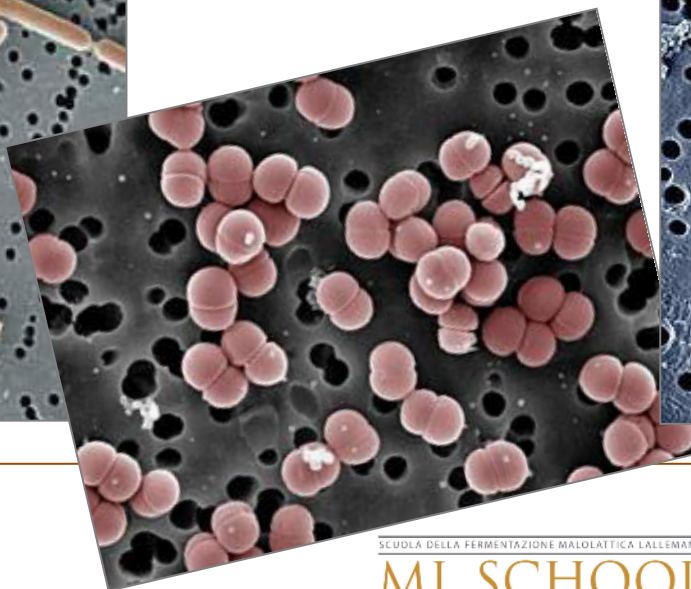
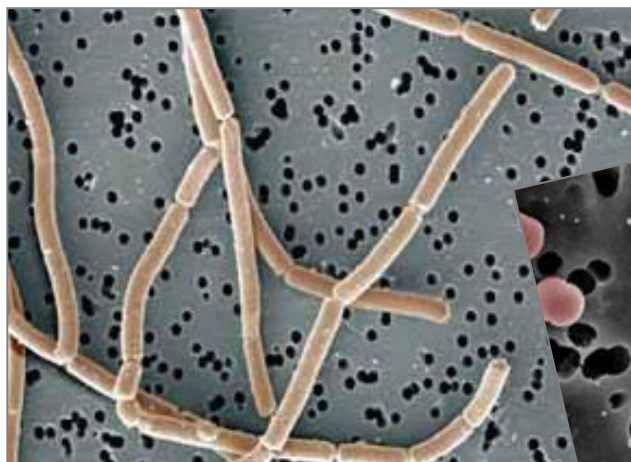


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# I BATTERI LATTICI presenti nel vino

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
<b>Morfologia cellulare</b>	Bastoncellare, accoppiata	Cocchi rotondi o ovali, in paia o catene	Cocchi rotondi o ovali, in catene di varia lunghezza	Cocchi, raggruppati in tetradi
<b>Dimensione cellulare (um)</b>	0,5-1,5 × 1-10	0,5-0,7 × 0,7-1,2	0,5-0,7 × 0,7-1,2	0,4-1,4
<b>Fermentazione del glucosio</b>	Omo- o etro- lattica a seconda delle specie	Eterlottica	Eterlottica	Omolattica
<b>Principali specie</b>	<i>Etero- L. brevis, L. cellobiosus, L. casei, L. delbruekii, L. buchneri, L. fermentum, L. sakei</i> <i>Omo- L. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>O. oeni</i>	<i>P. damonosus</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. parvulus</i>





# Rischi legati alle fermentazioni spontanee a pH alti

PROBLEMA	CONDIZIONI DI RISCHIO	MICROORGANISMI COINVOLTI	SUBSTRATI	PRODOTTI	EFFETTI SUL VINO
Degradazione della glicerina	Basso alcol, <b>pH &gt; 3,5</b> , vini invecchiati	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i>	Glicerina, glicenina	Acroleina, acido lattico acido acetico	Amaro, aumento acidità volatile
Degradazione zuccheri residui	<b>pH elevati</b> , bassi tenori alcolici, zuccheri residui	<i>Batteri lattici eterofermentanti</i>	Zuccheri fermentescibili, in particolare fruttosio	Acido lattico, acido acetico....	Aumento acidità volatile, perdita di complessità ed equilibrio, perdita note varietali, torbidità, gas
Metabolismo degli zuccheri non fermentescibili in vini «secchi»	Vini con piccoli residui zuccherini, specialmente rossi, <b>pH elevato</b>	<i>Batteri lattici eterofermentanti</i>	Arabinosio, xilosio, fruttosio	Acido acetico	Aumento acidità volatile
Gusto di topo	<b>pH elevato</b> , ossidazione	<i>Lactobacillus</i> , <i>Oenococcus</i>	Aminoacidi (lisina e ornitina), zuccheri	Piridine	Note aromatiche sgradevoli (Mousy)



**Raffaele Guzzon PhD**  
Centro di Trasferimento Tecnologico  
Fondazione Edmund Mach



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

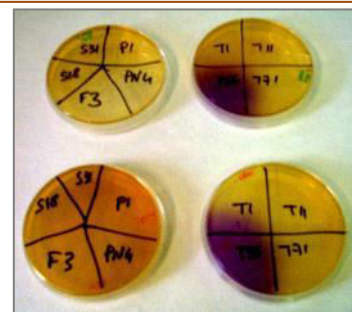
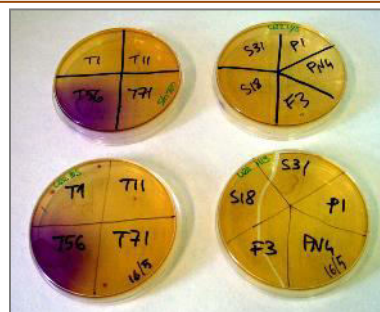
SCUOLA DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA LALLEMAND  
**ML SCHOOL**

Giugno 2018, FEM San Michele all'Adige



# Rischi legati alle fermentazioni spontanee a pH alti

PROBLEMA	CONDIZIONI DI RISCHIO	MICROORGANISMI COINVOLTI	SUBSTRATI	PRODOTTI	EFFETTI SUL VINO
Perdita tipicità, riduzione aromi varietali	Vini bianchi e rossi aromatici, <b>pH elevati</b> , bassa SO <sub>2</sub> , uve poco sane	Batteri lattici, soprattutto eterofermentanti ( <i>Pediococcus</i> )	Acidi organici, zuccheri, amminoacidi	Acido lattico, etil-lattato, etil-acetato, diacetile	Perdita tipicità, aromi grossolani, vini pesanti, note rancide e burrose
Produzione fenoli volatili	Vini rossi a <b>pH elevato</b>	<i>Pediococcus</i> e <i>Lactobacillus</i>	Acidi cinnamici	4-VP, 4-VG, 4-EP, 4-EG	Note aromatiche sgradevoli (Brett)
Accumulo di ammine biogene	<b>pH elevato</b> , batteri non selezionati, residui di aminoacidi, sosta sulle fecce fini	Batteri lattici	Amminoacidi	Istidina, putrescina, cadaverina	Problemi commerciali e sanitari, odori di feccia, carne, sporco



Raffaele Guzzon PhD  
 Centro di Trasferimento Tecnologico  
 Fondazione Edmund Mach



**fondazione banfi**  
 SANGUIS JOVIS

SCUOLA DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA LALLEMAND  
**ML SCHOOL**

Giugno 2018, FEM San Michele all'Adige

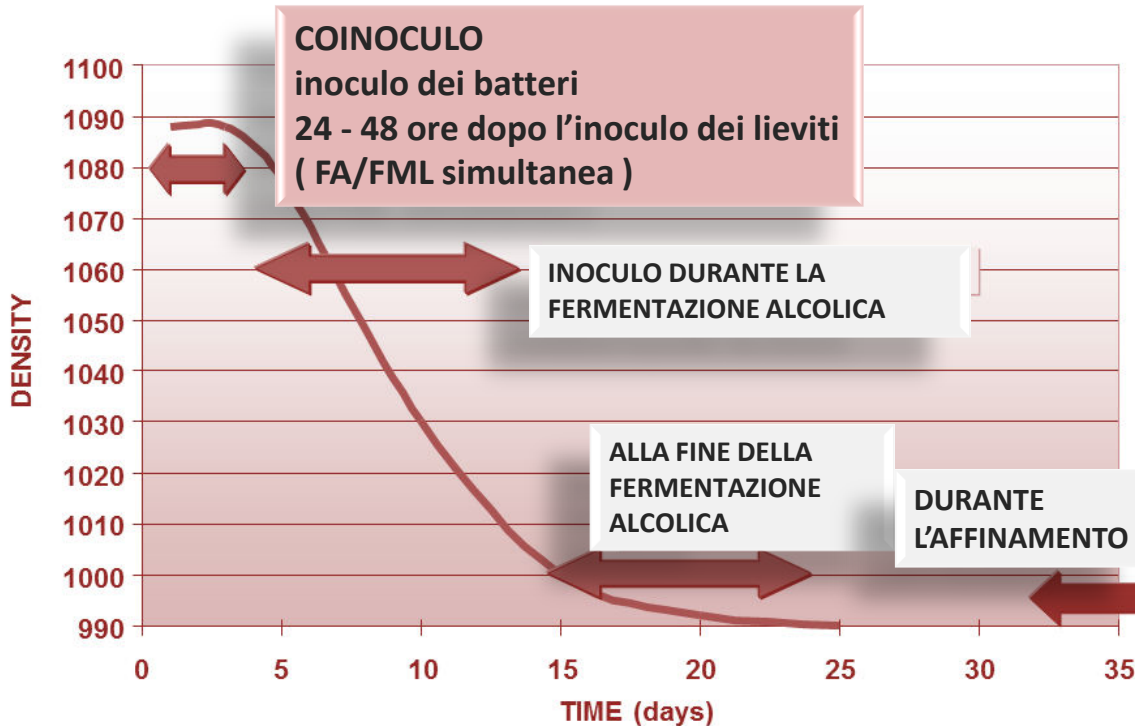


# Interventi per evitare la crescita di batteri malolattici indesiderati senza aggiunte eccessive di SO<sub>2</sub> :Biocontrollo



↓ SO<sub>2</sub>

## La FML e la tecnica del coinoculo



### Vantaggi

- Immediata **dominanza** sui batteri indigeni
- Acclimatazione gradualmente alle condizioni del vino
- Assicura la FML nei vini ad **elevato grado alcolico**
- La FML **finisce più velocemente** ed il **vino** può essere **stabilizzato prima** ( effetto su *Brettanomyces*, etc.)



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

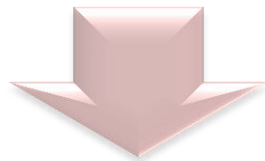


# 100 VINI (VENDEMMIA 2008)



*Evaluation of technological effects of yeast-bacterial  
co-inoculation in red table wine*  
pubblicato su *Italian Journal of Food Science* (2010) 3: 257-263

## COINOCULO IN MOSTI DA UVE DI DIFFERENTI VARIETÀ



MOSTI CON DIVERSE CARATTERISTICHE  
CHIMICHE



VINIFICAZIONI 100-200 LITRI



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

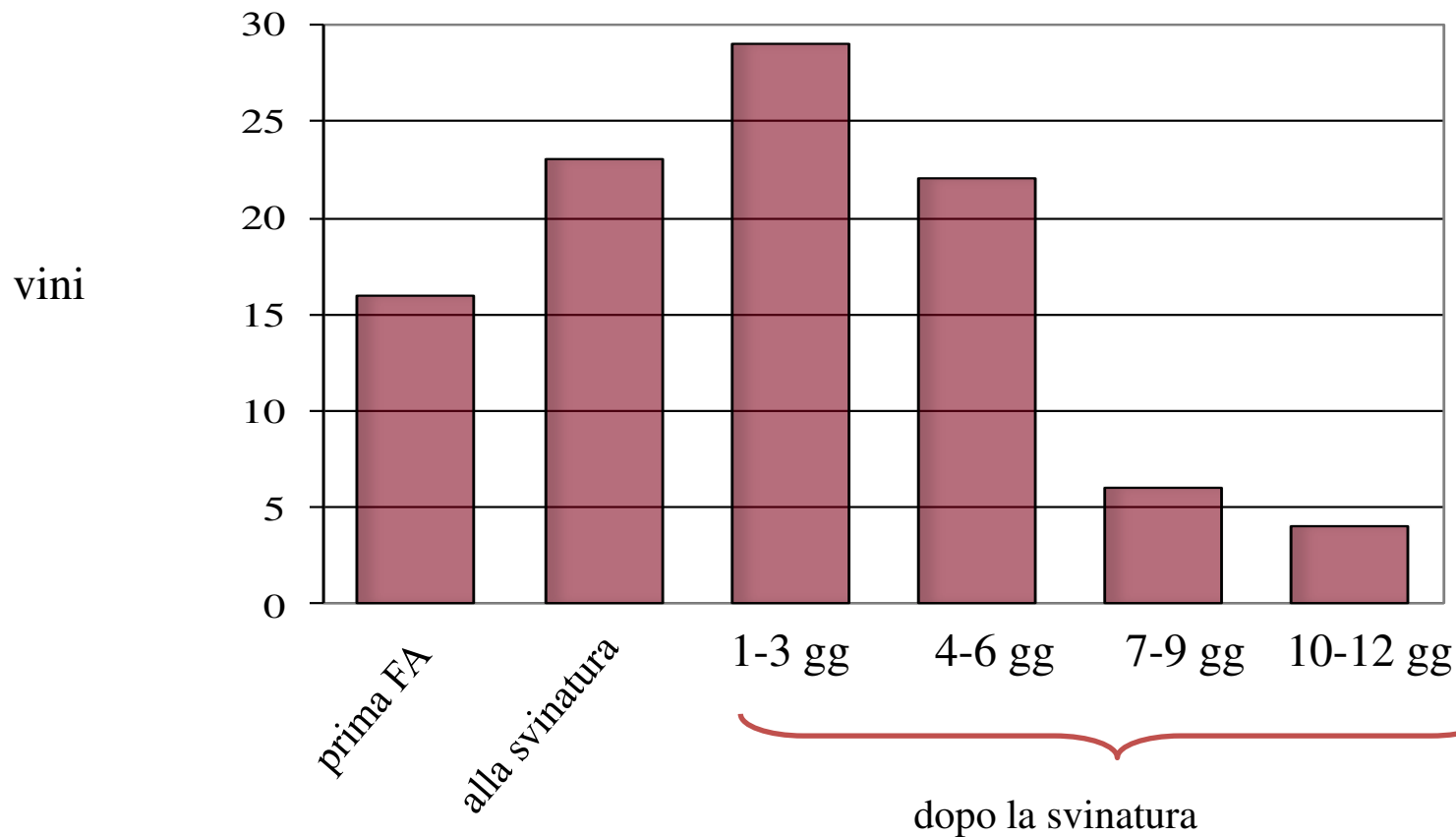
grape variety	origin	n. <sup>1</sup>	pH	reducing sugars °brix	titratable acidity <sup>2</sup> (g/L)	L-malic acid (g/L)
Sangiovese	Italy	9	3.27 (3.10-3.44)	19.4 (17.9-21.5)	6.13 (5.12-6.92)	1.40 (0.98-2.08)
Corvina	Italy	36	3.25 (2.89-3.64)	21.0 (18.8-23.8)	6.28 (4.10-8.94)	1.50 (0.66-3.46)
Rondinella	Italy	4	3.19 (3.12-3.23)	19.4 (19.0-19.7)	4.61 (4.52-4.65)	0.96 (0.57-1.51)
Teroldego	Italy	2	3.18 (3.03-3.33)	18.0 (17.6-19.1)	8.49 (5.80-11.17)	1.43 (1.41-1.45)
Refosco	Italy	1	3.28	19.5	7.00	1.32
Longanesi	Italy	1	3.24	20.8	6.92	2.08
other local varieties <sup>3</sup>	Italy	22	3.28 (3.01-3.48)	20.1 (17.7-24.5)	7.05 (3.90-12.85)	2.60 (1.38-5.80)
Alfrocheiro Preto	Portugal	1	3.25	17.5	6.30	1.19
Castelão	Portugal	1	3.19	16.4	4.95	1.29
Tinta Aragonés	Portugal	1	3.20	18.0	5.05	1.45
Tinto Cão	Portugal	1	3.30	18.9	5.88	2.69
Touriga francesa	Portugal	1	3.39	17.8	5.04	1.29
Touriga nacional	Portugal	1	3.16	18.6	6.38	1.28
Trincadeira	Portugal	1	3.25	16.9	5.84	1.78
Tinta barrica	Portugal	1	3.58	19.1	4.44	1.24
Mencia	Spain	1	3.39	16.2	4.64	1.19
Pietro picudo	Spain	1	3.28	19.5	7.54	1.35
Tempranillo	Spain	1	3.31	19.2	4.99	1.68
Tinta de toro	Spain	1	3.42	20.5	5.03	1.71
Cabernet Sauvignon	France	9	3.36 (3.28-3.48)	21.4 (19.9-23.2)	5.54 (4.90-6.72)	2.06 (1.33-3.19)
Merlot	France	2	3.24 (3.20-3.27)	19.5 (18.8-20.2)	6.73 (6.38-7.07)	1.24 (1.23-1.25)
Syrah	France	1	3.38	19.9	6.69	3.11
Blaufränkisch	Austria	1	3.19	20.9	6.17	1.17





# 100 VINI -MALOLATTICA SVOLTA!

## Durata Delle Fermentazioni Malolattiche



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

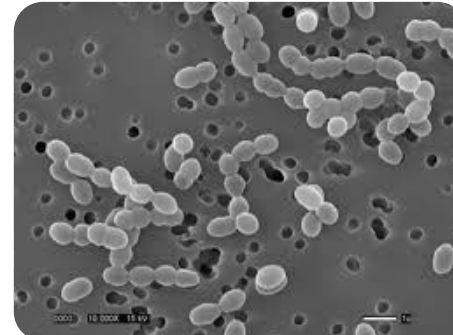
# Il coinoculo come Bio Controllo

## Un nuovo approccio

*Lactobacillus plantarum*



*Oenococcus oeni*



<b>Fermentazione degli zuccheri (esosi)</b>	<b>ETEROFERMENTATIVI FACOLTATIVI</b> = 2 x lattato
<b>Parametri del vino per le migliori performance</b>	pH >3,4 Alcool < 15.5%vol SO <sub>2</sub> Totale < 50 ppm Temperatura > 17°C

<b>ETEROFERMENTATIVI OBBLIGATI</b> = Lattato + acetato + etanolo + CO <sub>2</sub>
pH > 3.1 Alcool < 15.5%vol SO <sub>2</sub> Totale < 50 ppm Temperatura > 17°C



Con pH >3,5, in caso di arresto di fermentazione alcolica probabilità di produzione di acido acetico e D-lattico dagli zuccheri residui



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

## Il coinoculo come Bio Controllo



### LA SOLUZIONE

per gli enologi che temono il coinoculo in condizioni di pH alto / alto alcool potenziale

### La Malolattica a pH alti gestita con uno specifico ceppo di *Lb.plantarum*

Capace di completare la FML in modo veloce prima della crescita dei batteri indigeni evitando la produzione di metaboliti indesiderati : *acidità volatile, amine biogene, fenoli volatili ....*

**Nuovo processo di produzione** che ottimizza l'attività del sistema enzimatico malolattico e permette una malolattica molto veloce



- ▶ Biomassa non in grado di moltiplicarsi
- ▶ Immediata dominanza sulla flora indigena
- ▶ Malolattica completata prima della fine della FA
- ▶ Il vino può essere stabilizzato immediatamente dopo la fine della FA



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

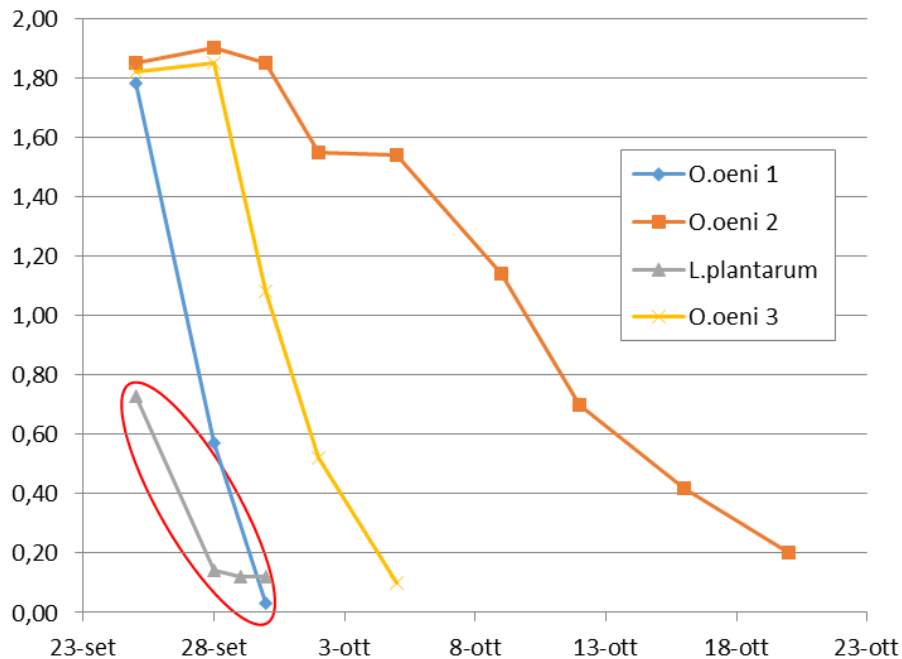
# Il coinoculo come Bio Controllo

La Malolattica pH elevati gestita con uno specifico ceppo di *Lb.plantarum*

EFFICIENZA - VELOCITÀ  
SANGIOVESE 2015 , UMBRIA



## CINETICA FERMENTAZIONE MALOLATTICA



Analisi vino	O.oeni 1	O.oeni 2	L.plantarum	O.oeni 3
Alcol (% vol.)	14.04	13.73	14.16	14.68
Zuccheri residui	1.1	1.2	1.3	1.4
Acidità totale g/l	5.19	4.88	5.45	5.11
Ac. volatile g/L	0.27	0.26	0.22	0.34
pH	3.62	3.6	3.59	3.66



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# Cambiamento climatico e nuovi trend



↓ SO<sub>2</sub>

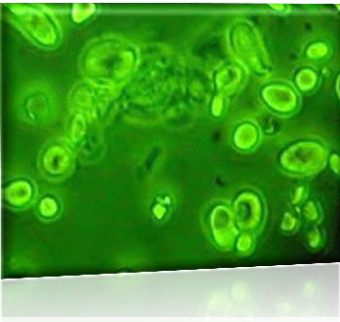
Cellule di *Brettanomyces* sp.  
osservate al microscopio elettronico



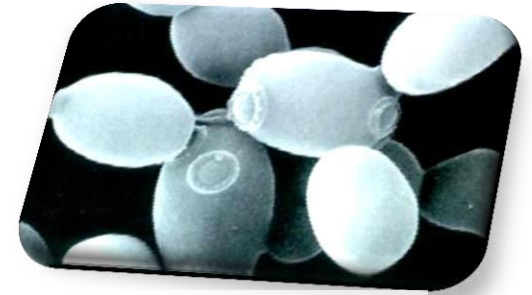
Altro problema ....



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS



## *Brettanomyces bruxellensis*



### I DIFETTI

#### Molecole prodotte da *Brett*

- ▶ Acido acetico (acidità volatile fino a 2.75 g/L)
- ▶ Tetraidropiridine (condensazione di lisina e etanolo): «mousy taint»
- ▶ Fenoli volatili (4-etilguaiacolo et 4-etilfenolo) : «stalla e sudore di cavallo»

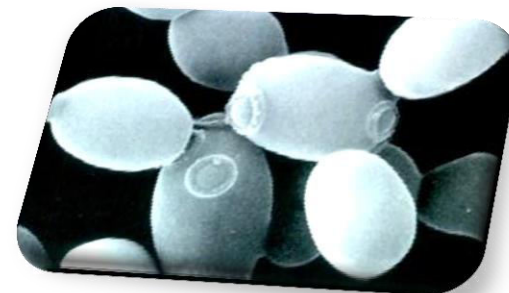
- ▶ Una piccola contaminazione con bassa attività può essere sufficiente
- ▶ 1/6 dei ceppi di *Brett* non producono fenoli volatile
- ▶ *Brettanomyces* può sopravvivere nello stato Viable But Non Culturable (VBNC) per lunghi periodi.



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# Brettanomyces bruxellensis



## PREVENZIONE

### Gestione

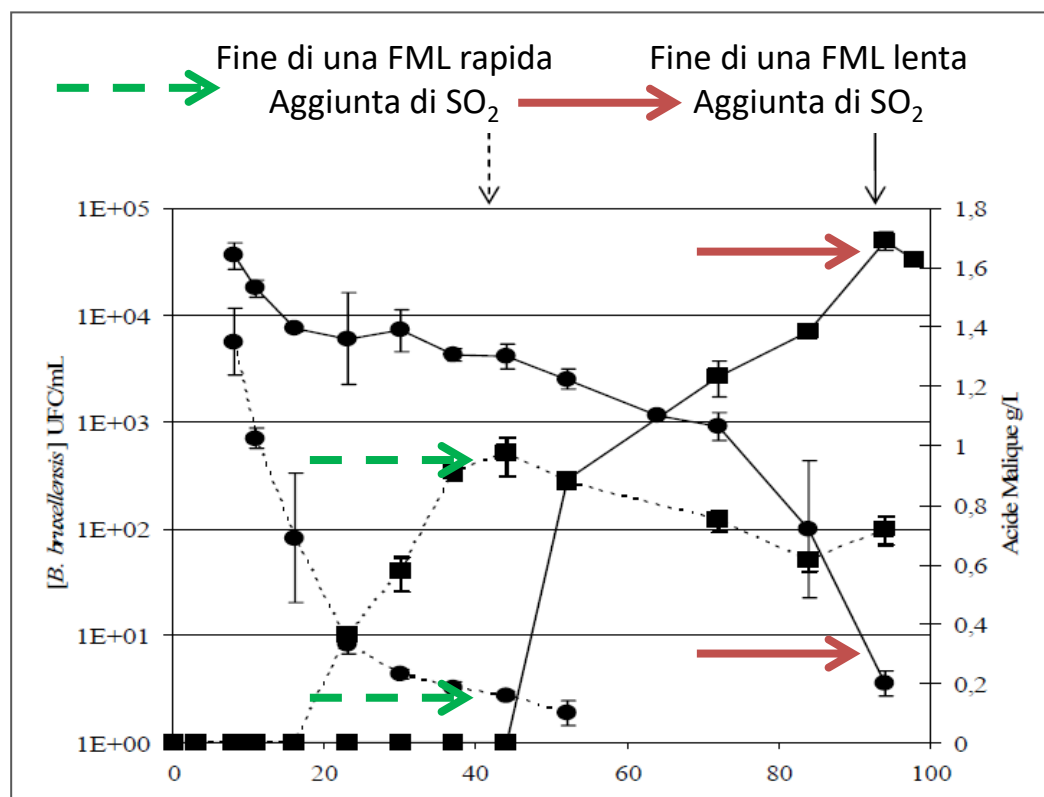
#### ► fermentazione alcolica

Prevenire arresti o rallentamenti di fermentazione

#### ► fermentazione malolattica

Prevenire arresti o rallentamenti di fermentazione, privilegiando il coinoculo, e stabilizzando precocemente i vini

### Gestione di FML e SO<sub>2</sub>



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS



# Prevenzione Brett – Buone pratiche OIV

RISOLUZIONE OIV-OENO 462-2014

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

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



<http://www.oiv.int/it/norme-e-documenti-tecnici/le-risoluzioni-dell39oiv/risoluzioni-oenologia>

## Fase di latenza prima della fermentazione malolattica (FML):

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



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS



# Prevenzione Brett – Buone pratiche OIV

RISOLUZIONE OIV-OENO 462-2014

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

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



<http://www.oiv.int/it/norme-e-documenti-tecnici/le-risoluzioni-dell39oiv/risoluzioni-oenologia>

## Fermentazione malolattica (FML):

- I parametri fisico-chimici (pH, temperatura, SO<sub>2</sub> totale) influenzano la progressione della FML. Se questa viene ritardata, il rischio di produzione di fenoli volatili aumenta dato che *Brettanomyces* può trarre beneficio da questo lasso di tempo per moltiplicarsi.
- L'uso di colture starter di batteri malolattici è un buon modo per contrastare lo sviluppo di *Brettanomyces*. In alcuni studi hanno dimostrato che il coinoculo o l'inoculo sequenziale precoce impediscono la contaminazione da *Brettanomyces*, riducendo la fase di latenza tra la FA e la FML.



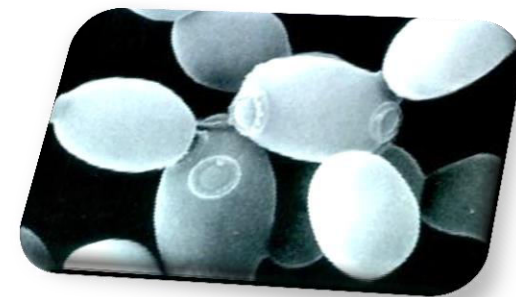
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# Prevenzione Brett – Fermentazione malolattica

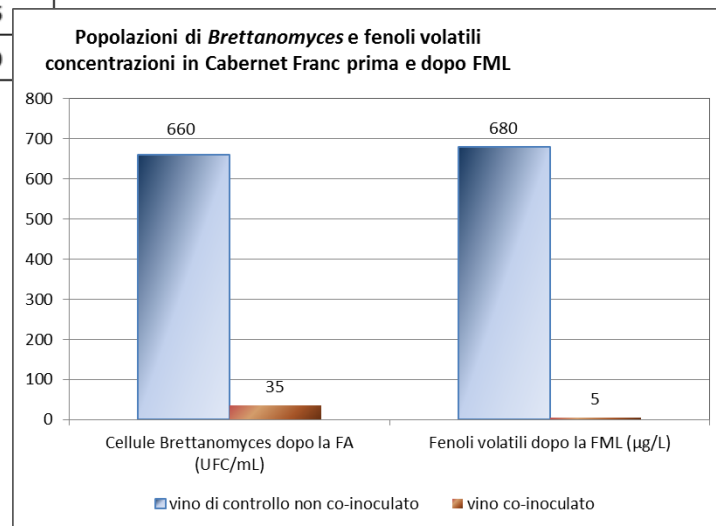
## Influence of Inoculation with Malolactic Bacteria on Volatile Phenols in Wines

Vincent Gerbaux, Caroline Briffox, Ann Dumont, Sibylle Krieger  
 American Journal of Enology and Viticulture, 60:2 2009; 233-236



	CELLAR REGULATED AT 18°-19°C			CELLAR REGULATED AT 14°-15°C		
	Control <sup>a</sup>	Bacteria 1	Bacteria 2	Control <sup>a</sup>	Bacteria 1	Bacteria 2
Time required for MLF (days)	58	16	13	124	31	27
Volatile phenol levels (µg/L)						
4-ethylguaiacol	404	8	7	551	20	15
4-ethylphenol	870	17	9	1119	46	32
Average sensory analysis score (on a scale of 1 to 10)						
Visual quality	5.6	6.0	6.0	6.0	5.1	5.1
Aroma quality	3.8	5.1	4.7	3.4	4.8	5.0
Taste quality	3.8	4.9	4.3	3.5	4.9	4.5
Overall quality	3.4	4.7	4.3	3.5	4.9	4.5
Intensity of animal defect	3.8	0.7	0.9	4.4	0.4	1.0

<sup>a</sup> Not inoculated with lactic acid bacteria



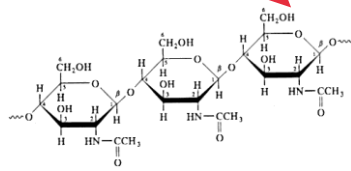
**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

# Prevenzione e cura Brett – Chitosano di origine fungina

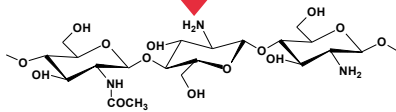


**Aspergillus niger**  
micelio

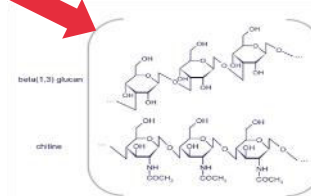


**Chitina**

deacetilazione



**Chitosano**



**Chitin-glucan**

Antonie van Leeuwenhoek  
DOI 10.1007/s10482-014-0362-6

ORIGINAL PAPER

*Eur. Food. Res. Technol.*, 2008, 226:68;  
Borner & PL Teisseidre, Chitosan, chitin  
and chitin effects on minerals and  
contaminants

**Effectiveness of chitosan against wine-related  
microorganisms**

Simel Bağder Elmacı • Gökşen Gülgör •  
Mehmet Tokatlı • Hüseyin Erten • Ash İşci •  
Filiz Özçelik

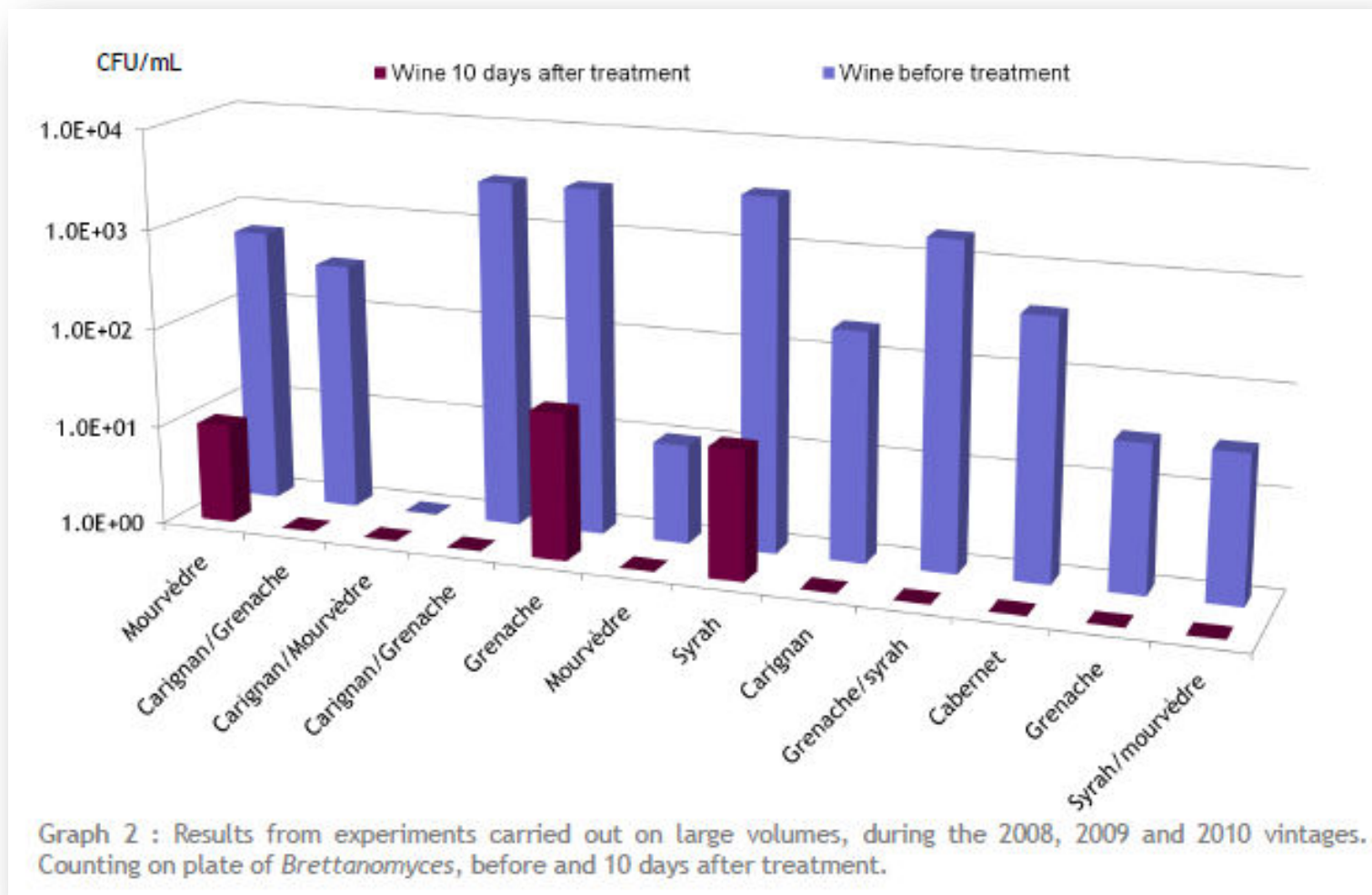
Received: 2 October 2014 / Accepted: 16 December 2014  
© Springer International Publishing Switzerland 2014



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# Cura Brett – Chitosano di origine fungina



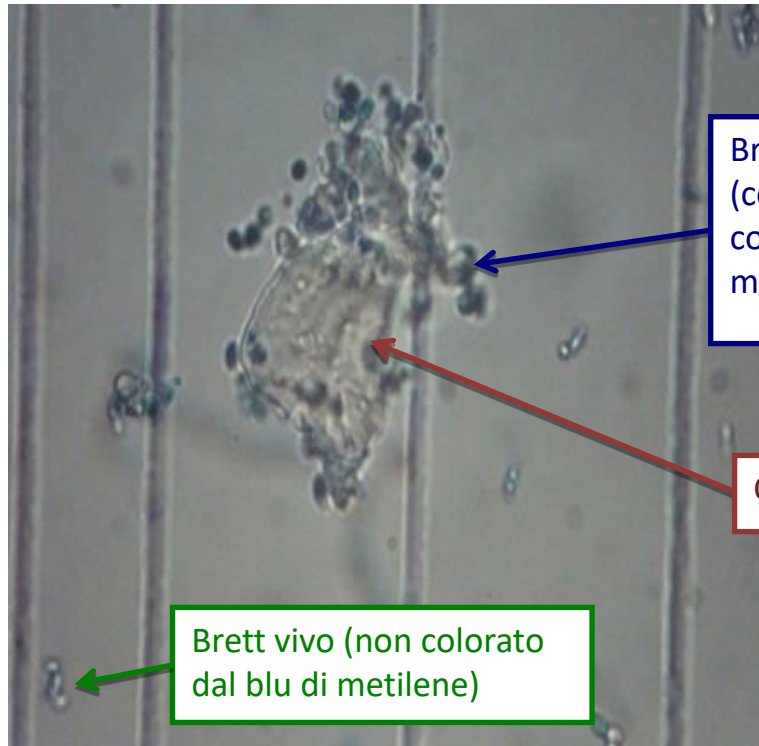
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

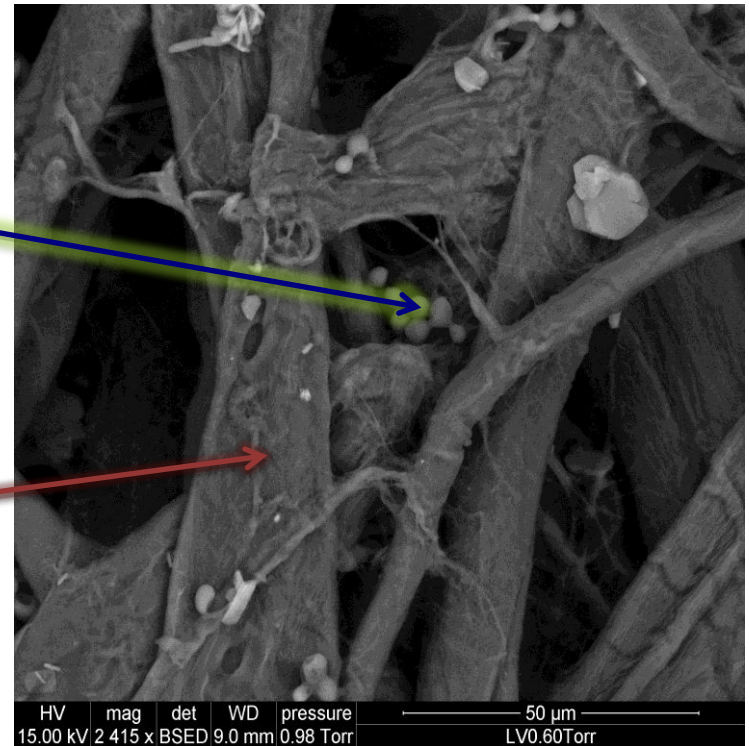
# Meccanismo di azione Chitosano di origine fungina - Brett

Osservazione microscopica: ➔ **fenomeno di adsorbimento**

Sperimentazione in collaborazione con  
Kitozyme, ICV, ENSIACET  
(P. Taillandier, P. Streihaiano)



Microscopio ottico



Microscopio elettronico a scansione

Revue des Œnologues n° 143, p.27-28, April 2012



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

> Presenza di NBI : **fenomeno di adsorbimento, effetto mortale (maggioranza delle cellule morte )**

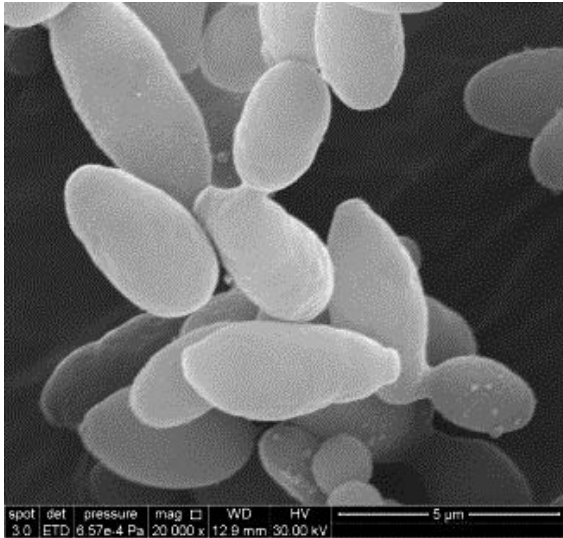


# Meccanismo di azione Chitosano di origine fungina - Brett

Foto con microscopio a scansione elettronica di sedimenti prelevati dalle barriques

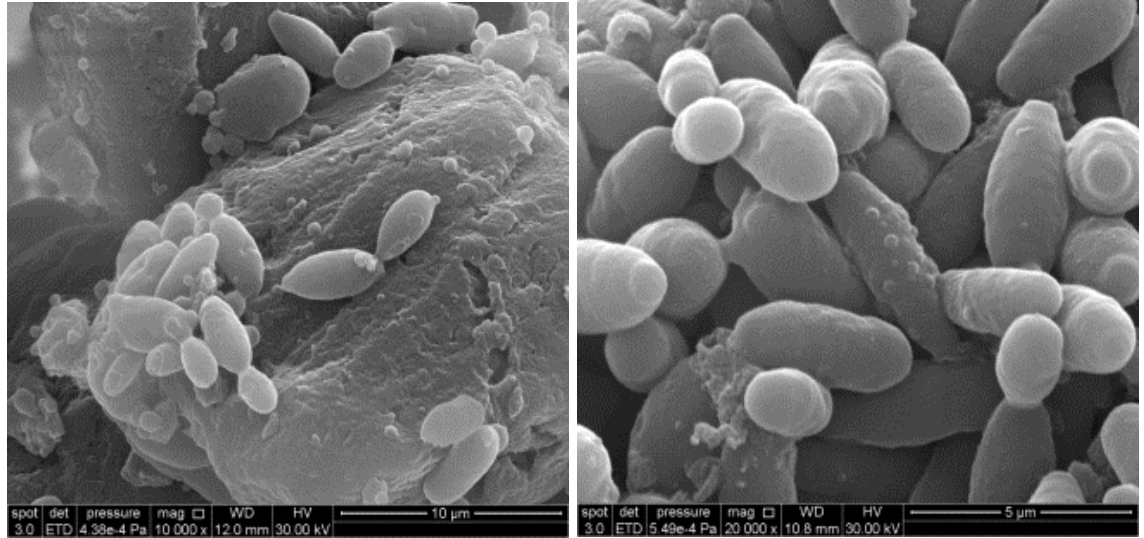
- Risultati R&D -Dr. C. Edwards, Washington State University

**Controllo non trattato**



Micrografia a scansione elettronica di *B. bruxellensis* prelevato da vino senza aggiunta di No Brett Inside (sedimento in barrique)

**Barrique trattata con 4 g/hl di NoBrett Inside**



Micrografia a scansione elettronica di *B. bruxellensis* da vino trattato con 4 g/hL No Brett inside (sedimento in barrique)

*Petrova et al., 2016 (J. Int. Sci. Vigne Vin)*

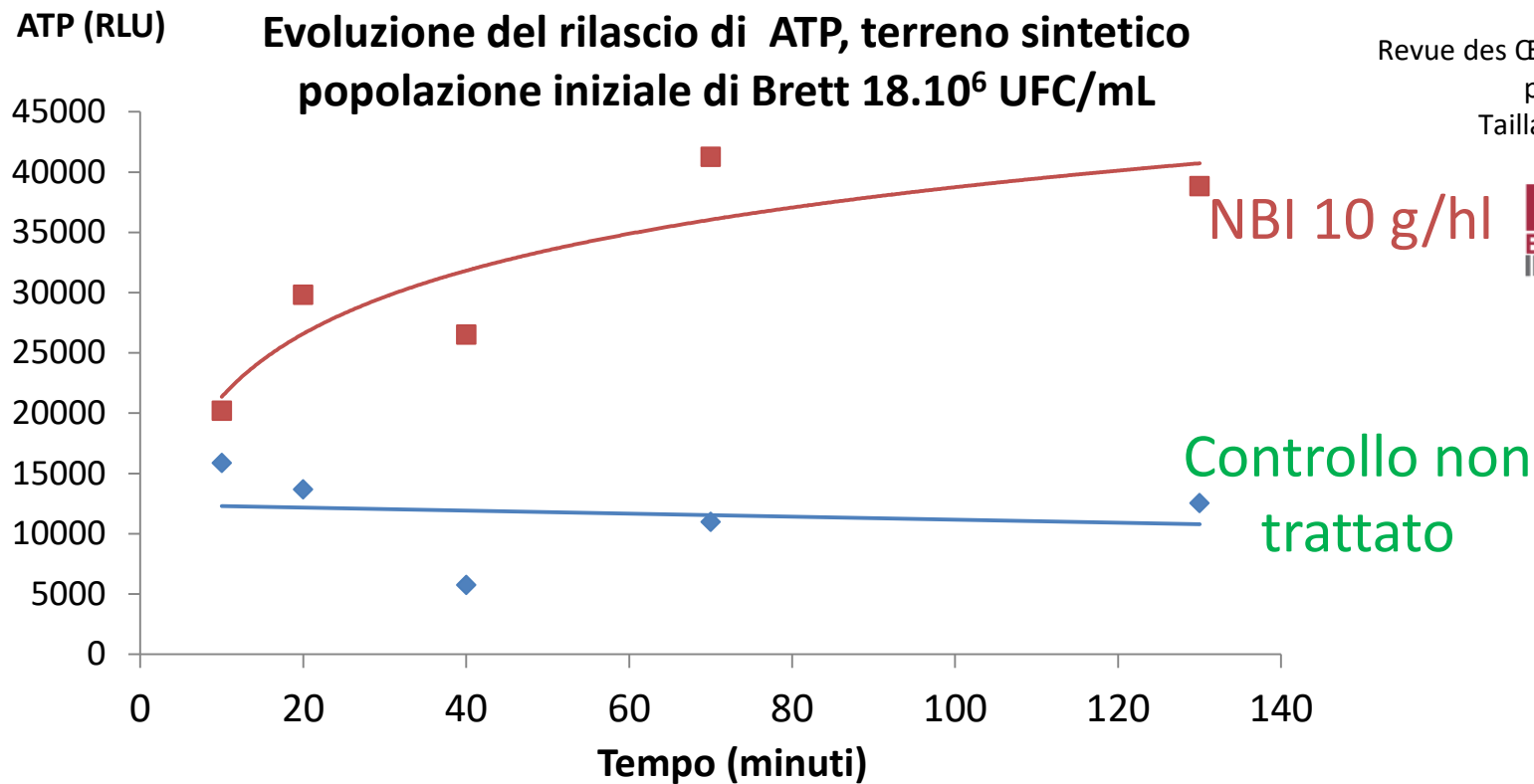


**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

# Meccanismo di azione Chitosano di origine fungina - Brett

Revue des Œnologues n° 143,  
p.27-28, April 2012  
Taillandier, JAM, 2014



> Incremento di ATP rilasciata nel mezzo in presenza di NBI

**L' ATP rilasciata dalle  
cellule di *Brettanomyces*  
è un effetto diretto della  
morte cellulare  
(distruzione delle  
membrana plasmatica)**

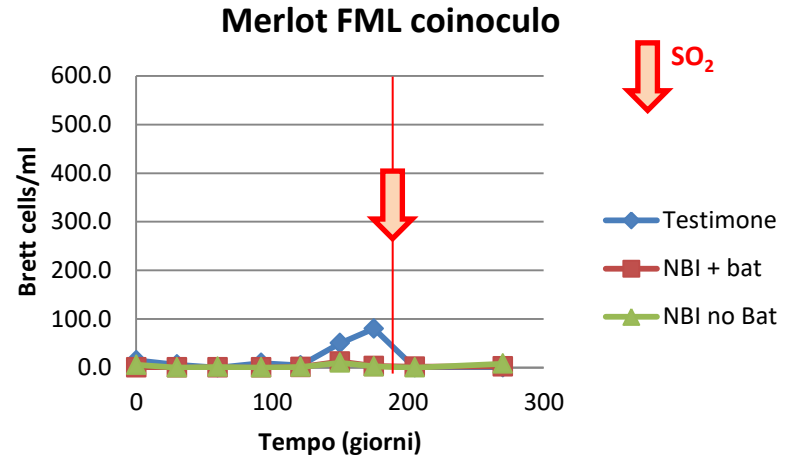
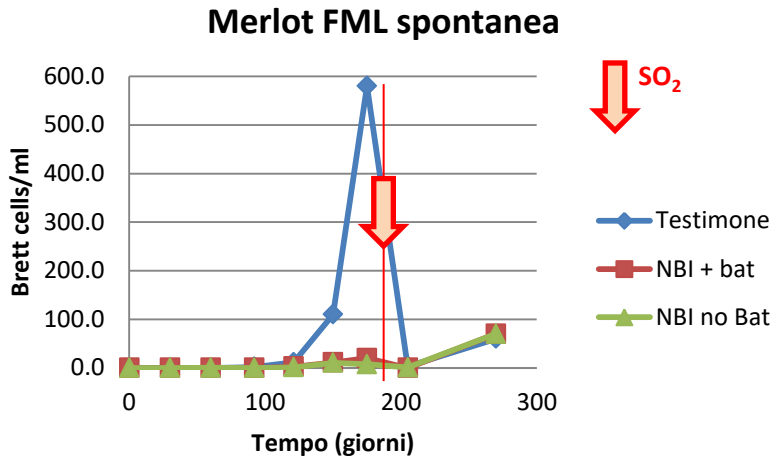


**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

# Prevenzione Brett – Chitosano di origine fungina e coinoculo



- Scala di cantina (Merlot, Toscana, 2011-2012)



Nardi et al., Wine Studies, 2014

- Nessuna crescita elevata di cellule di *Brettanomyces* (sempre sotto 100 UFC/mL) eccetto che per il controllo sulla FML spontanea
- NBI ha inibito la crescita di Brett fino a 6 mesi sui vini da FML spontanea

Degustazione : nessun impatto sul contatto di NBI a lungo termine (6 - 9 mesi)



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS



**Grazie per l'attenzione**

**Grazie per l'organizzazione**



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

[fondazionebanfi.it](http://fondazionebanfi.it)