

ISTITUTO SPERIMENTALE PER L'ENOLOGIA
Sezione Operativa Periferica di Velletri

1891



1991

SIMPOSIO INTERNAZIONALE

**BIOTECNOLOGIE E QUALITÀ
DEL VINO**

organizzato in occasione del Centenario della
SEZIONE OPERATIVA PERIFERICA DI VELLETRI

Terzo incontro internazionale
LALLEMAND

27-28-29-30 Aprile 1991

FINALITÀ DEL SIMPOSIO

L'incontro vede riuniti studiosi ed esperti di fama internazionale e vuole:

- rappresentare un momento di sintesi sulle attuali conoscenze, in ordine alle tematiche del simposio;
- costituire un momento di incontro e di confronto con l'industria e il mondo agricolo;
- costituire un momento di divulgazione scientifica nonché di partecipazione degli utilizzatori delle biotecnologie al dibattito sulle problematiche riguardanti i progressi applicativi del biochimismo delle fermentazioni.

Hanno collaborato alla realizzazione del simposio:

REGIONE LAZIO

ASSESSORATO ALL'AGRICOLTURA, FORESTE, CACCIA E PESCA

ENTE REGIONALE SVILUPPO AGRICOLO NEL LAZIO (E.R.S.A.L.)

PROVINCIA DI ROMA

CAMERA DI COMMERCIO, INDUSTRIA, ARTIGIANATO E

AGRICOLTURA DI ROMA

XI COMUNITÀ MONTANA DEL LAZIO "CASTELLI ROMANI E PRENESTINI"

COMUNE DI GENAZZANO - ASSESSORATO AGRICOLTURA

COMUNE DI VELLETRI

BANCA COOPERATIVA PIO X - VELLETRI

COMITATO PROMOTORE:

Italo EYNARD

Presidente Consiglio di Amministrazione Istituto Sperimentale Enologia.

Jean CHAGNON

Presidente Lallemand INC Montreal (Canada)

Giulio SANTARELLI

Deputato al Parlamento

Carlo PROIETTI

Assessore all'Agricoltura, Foreste, Caccia e Pesca della Regione Lazio

Italo BECCHETTI

Presidente E.R.S.A.L.

Salvatore CANZONERI

Presidente della Provincia di Roma

Lamberto MANCINI

Assessore all'Agricoltura della Provincia di Roma

Roberto TOMEI

Presidente XI Comunità Montana del Lazio

Maurizio ZANNOLA

Sindaco di Velletri

Luciano LUCCI

Presidente Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Roma

Mario CHIARELLI

Assessore all'Agricoltura XI Comunità Montana del Lazio

Luigi PAPACCI

Presidente Banca Cooperativa Pio X di Velletri

Fiorenzo CIARLA

Assessore all'agricoltura del Comune di Velletri

Augusto LUCIDI

Assessore all'Agricoltura Comune di Genazzano

Simposio patrocinato da: Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste
Presidenza Giunta Regionale del Lazio

COMITATO SCIENTIFICO

Mario CASTINO
Gaetano CIOLFI
Claudio DELFINI
Rocco DI STEFANO
Italo EYNARD
Claudio FALCONE
Annibale GANDINI

Aldo GAROFOLO
Simonetta MORETTI
Lanfranco PARONETTO
Antonio PIRACCI
Guido SPERA
Luciano USSEGLIO-TOMASSET

COMITATO ORGANIZZATORE

Istituto Sperimentale per l'Enologia - Sezione Operativa Periferica di
Velletri, tel. 06/9639027-9630222 - Fax 9634020

Direttore Dr. Gaetano CIOLFI

Membri:

Francesca ADINOLFI
Leone BAROZZI
Luigi BERTINI
Antonio FACCIUTO
Luciano FAGIOLO
Andrea FRANCO
Enzo GIANNINI
Angiolo GIORLANDO

Giorgio INGRETOLLI
Eugenio LILLINI
Carlo MODI
Giuseppe MORANA
Lanfranco PARONETTO
Livio PERINI
Giovanni TOZZI

"LA VITICOLTURA DEL LAZIO"

Nel 1928, in uno scritto sulla sperimentazione enologica, il Prof. Giovanni Dalmaso ricordava la Cantina Sperimentale di Velletri ed in particolare l'attività del prof. Angelo Longo il quale, "pur non trascurando le finalità enologiche dell'istituzione, diede però uno specialissimo impulso agli studi viticoli, impiantando ampi vivai di viti americane, e soprattutto interessantissimi vigneti sperimentali e ricche collezioni ampelografiche" ed in questo campo Velletri divenne un centro di studi "veramente notevole, giustamente ammirato anche da parte di molte competenze straniere".

Per molte zone del Lazio la viticoltura rappresenta una coltura tradizionale, sovente con scarse alternative, e costituisce quindi un'importante fonte di occupazione.

Nella formazione della produzione lorda vendibile agricola regionale, la viticoltura concorre, compresa l'uva da tavola, nella misura del 13%. Il settore enologico, da solo, raggiunge circa l'11%.

La diminuzione graduale della superficie a vigneto, cui si assiste anche in questa regione in seguito agli incetivi all'espanto, deve essere compensata da un miglioramento qualitativo della produzione enologica che possa tradursi in un incremento di reddito.

Nel Lazio si hanno attualmente 21 vini a DOC i cui quantitativi, rispetto alla produzione di vino regionale, sono progressivamente crescenti. Nell'ultimo quadriennio la percentuale è passata da 9,6 a 11,0 a 12,4 a 13,5 con una linea di tendenza chiaramente stabilizzata all'aumento.

Questo è di per sé un indice dell'orientamento verso una produzione più qualificata e tipicizzata.

Al miglioramento qualitativo dell'enologia della Regione ha dato indubbiamente un contributo rilevante la Sezione Operativa di Velletri dell'Istituto sperimentale per l'Enologia e l'augurio che può essere espresso in occasione delle manifestazioni del centenario è che essa diventi sempre più e sempre meglio il punto di riferimento essenziale per l'evoluzione qualitativa dei vini del Lazio.

Italo EYNARD
*Presidente dell'Istituto Sperimentale
per l'Enologia*

IL CENTENARIO DELLA SEZIONE OPERATIVA DI VELLETRI DELL'ISTITUTO SPERIMENTALE PER L'ENOLOGIA

L'attuale Sezione dell'Istituto Sperimentale nasce come Regia Cantina Sperimentale, istituita per volere di Menotti Garibaldi con R.D. del 21 novembre 1891 su un'area messa a disposizione del Comune.

A decorrere dal 1° luglio 1924, la Regia Cantina veniva trasformata in Ente Morale consorziale con la partecipazione del Ministero Agricoltura e Foreste, della Provincia di Roma, della Camera di Commercio di Roma e del Comune di Velletri. L'attività di ricerca della Cantina Sperimentale si è estrinsecata soprattutto nel settore viticolo, compreso quello delle uve da tavola; questo Ente ha sempre rappresentato un importante polo di formazione professionale a tutti i livelli tant'è che, ancora oggi, gli anziani dell'agricoltura lo ricordano con grande affetto.

Dal punto di vista scientifico, l'operato della Cantina è stato sempre apprezzato in Italia e all'estero grazie all'elevata statura professionale del Prof. Angelo Longo, direttore dal 1896 al 1923, e del Prof. Vincenzo Prosperi, direttore dal 1924 al 1955, cui succedette il Prof. Michele Palieri.

Con D.P.R. 23 novembre 1967 n. 1318 (riordinamento della sperimentazione agraria), alla Cantina Sperimentale subentrava l'Istituto Sperimentale per l'Enologia con sede in Asti, di cui Velletri costituisce una delle tre sezioni periferiche, gestito dal Ministero Agricoltura e Foreste, ma con lo status di Ente autonomo. L'Ente, di grado universitario, rappresenta nella realtà odierna un concreto punto di riferimento per gli operatori del settore enologico e per la formazione delle nuove leve di tecnici. In particolare l'Istituto deve *"provvedere agli studi ed alle ricerche di ordine fisico, chimico e biologico riguardante la composizione e la trasformazione delle uve, la preparazione, la conservazione ed il miglioramento tecnologico dei prodotti vinicoli, secondo le esigenze poste dallo sviluppo della produzione vitivinicola nel contesto dei mercati interni ed internazionali"*.

Il Direttore S.O.P. Velletri
Dr. Gaetano CIOLFI

**BREVE STORIA DELL'ATTIVITÀ SCIENTIFICA
DELLA CANTINA SPERIMENTALE DI VELLETRI**

Le ragioni storiche che portarono alla istituzione, nel 1891, della Regia Cantina Sperimentale di Velletri, nonché il lavoro svolto nel corso dei decenni successivi, sono tutt'ora documentati da appunti del Prof. Vincenzo Prospero direttore dal 1924 al 1955. Tale materiale è stato gentilmente raccolto dalle figlie Erminia e Maria Prospero che sentitamente ringraziamo.

“Poche istituzioni sono sorte in un ambiente così storicamente importante, per le sue nobili tradizioni viti-vinicole e così propizio, per le favorevoli condizioni di clima e di terreno che offre alla coltura della vite, come la Cantina Sperimentale di Velletri.

La viticoltura non è sempre stata fonte di benessere e di tranquillità per i nostri viticoltori!

Alle crisi periodiche dei secoli passati se ne sono aggiunte, verso la fine del secolo scorso, delle nuove, che hanno portato alla viticoltura duri colpi, fino ad insidiarne l'esistenza. Ci si riferisce alla comparsa di malattie nuove, quali l'oidio, la peronospera e soprattutto la fillossera.

La comparsa di quest'ultima in Europa ha una storia molto movimentata; si ritiene che le prime infezioni risalgano al 1862, ma è solamente nel 1868 che questo insetto fu identificato in Francia dopo che aveva già provocato distruzioni notevoli in vaste estensioni di vigneti in quella Nazione.

In Italia la scoperta della prima infezione avvenne nel 1879, e, da allora, la sua diffusione è stata incessante; in alcune zone

come in Sicilia e in Puglia ha avuto effetti veramente disastrosi per le conseguenze economiche che ne sono derivate a quelle popolazioni.

La comparsa di questo flagello portò ovunque una profonda perturbazione economica e sociale e una rivoluzione nel campo colturale della vite, poiché, mentre da una parte con la distruzione dei vigneti si recidevano di colpo dalle sue basi, le sorgenti di una ricchezza accumulatasi nel tempo, dall'altra con la ricostituzione dei vigneti con nuovi sistemi, venivano a modificarsi radicalmente tradizioni, pratiche ed abitudini rimaste pressoché stazionarie nei secoli.

Sorgevano nuovi problemi da affrontare, nuove direttive da seguire, i nostri viticoltori dovevano apprendere ed applicare nuove tecniche in sostituzione di quelle tradizionali. Si trattava di risolvere problemi ardui riguardanti l'adattamento al suolo, la resistenza alla fillossera, l'affinità d'innesto, la fertilità dei nuovi impianti e altre problematiche il cui studio richiedeva una paziente e intelligente sperimentazione.

In queste condizioni lasciare i viticoltori a se stessi significava decretare la fine della coltivazione della vite.

Sorsero così in Italia ad iniziativa dello Stato le prime istituzioni viti-vinicole, delle quali alcune con scopi prevalentemente didattici ed altre a carattere sperimentale.

Questa di Velletri, che rientra in quest'ultima categoria, venne istituita con R.D. del 28 novembre 1891 e la sua nascita ci ricorda l'opera instancabile di Menotti Garibaldi che alla sua creazione dedicò tutta la sua passione nutrita per questa terra che lo ebbe a rappresentante in Parlamento fino alla fine della sua vita.

In seguito, con R.D. 19 giugno 1924 la Regia Cantina Sperimentale fu trasformata in Ente Morale Consorziabile autonomo, sotto la vigilanza del Ministero dell'Agricoltura e di cui facevano parte obbligatoriamente lo Stato e la Provincia di Roma.

I compiti assegnati a questa Cantina Sperimentale erano i seguenti:

- 1) Studio di orientamento ai fini della ricostituzione dei vigneti su portinnesti americani;
- 2) Studio dei vitigni e delle uve in rapporto alla vinificazione e al commercio delle uve da mensa;
- 3) Sperimentazione e ricerche inerenti l'industria e il commercio del vino;
- 4) Studi sui mezzi di difesa della vite dalle malattie parassitarie;
- 5) Diffusione di razionali pratiche viticole ed enologiche;
- 6) Esecuzione di analisi per conto di privati e di Enti pubblici, di mosti, di vini e di altri prodotti agrari, nonché di sostanze utili all'esercizio dell'agricoltura;
- 7) Di altri incarichi speciali inerenti alla viticoltura ed alla enologia, che potevano esserle affidate dal Ministero dell'Agricoltura.

Per svolgere tali compiti, l'Istituto dispone di un vivaio di viti americane, di una ricca raccolta ampelografica, ritenuta la più completa d'Italia, di vigneti sperimentali, di una cantina per sperimentazione enologica e di un laboratorio chimico per le analisi.

In questo periodo i meriti acquisiti dall'Ente furono veramente tanti; lo dimostrano i continui attestati di stima da parte di studiosi ed autorità straniere nonché nazionali.

In una relazione ufficiale del governo francese, il Direttore generale dei servizi viti-vinicoli riferiva: «La cantina sperimentale di Velletri est un Istitut vraiment remarquable, il est l'un des plus beaux et mieux conçus de l'Europe». Il Presidente dell'Ufficio Internazionale della Vite e del Vino così si esprimeva: «...la Cantina Sperimentale di Velletri ci ha meravigliati».

La Cantina Sperimentale di Velletri è stata sempre presente in tutte le manifestazioni e in tutti i Congressi viti-vinicoli nazionali ed internazionali, facendo parte ufficialmente delle delegazioni italiane (Bucarest, Losanna, Ginevra, Parigi, Lisbona, Tunisi, Rabat ecc.).

Inoltre la Cantina ha partecipato con i suoi prodotti (uva e vini) a tutte le mostre viti-vinicole che si sono tenute in Italia, ottenendo attestati di primo grado.

A seguito della rapida diffusione della fillossera gli sforzi furono concentrati nel preparare la ricostituzione dei vigneti distrutti con l'impiego delle viti americane.

Velletri in questo campo, che si presentava quanto mai oscuro e irto di difficoltà, ha portato un contributo notevolissimo con i suoi lavori sperimentali. È noto come la quasi totalità del vigneto italiano, ricostituito dopo l'invasione fillosserica, sia stato effettuato su portinnesti prodotti e selezionati in Francia, colpita prima di noi dal flagello, e costretta quindi prima di noi a trovarne i mezzi di difesa.

Questa via dall'apparenza facile non è stata priva di difficoltà a causa degli insuccessi ai quali ha dato luogo, particolarmente numerosi nelle zone aride e ricche di calcare del Mezzogiorno d'Italia. Non fa meraviglia quindi che i nostri viticoltori chiedessero a gran voce nuovi tipi di portinnesti di crea-

zione prettamente italiana e quindi più adatti e più acclimatati al nostro ambiente culturale così diverso da quello francese, e aventi caratteristiche che togliessero le incertezze e le preoccupazioni che portava con sé l'impiego di viti di origine straniera.

A differenza delle vie seguite da altri, che per il lavoro di ibridazione utilizzarono come progenitori le stesse viti provenienti dalla Francia, presso la Cantina di Velletri si è partiti da viti americane ottenute in Italia direttamente da seme, ottenendone dei prodotti prettamente locali e quindi in via generale più rispondenti alle speciali condizioni di clima e di terreno e più affini per l'innesto alle varietà del nostro paese.

A lato di questa attività tecnico-scientifica si è svolta parallela l'istruzione dei viticoltori nelle nuove pratiche della viticoltura moderna, con i risultati i più soddisfacenti, formando una maestranza specializzata, numerosa, delle più abili, tanto che la Cantina Sperimentale è stata considerata oltre che per le viti, un vivaio anche per l'educazione e preparazione dei giovani alle esigenze viticole.

In media tali corsi venivano frequentati annualmente, negli anni '30-'40, da 280 giovani viticoltori.

L'opera della Cantina non si è limitata a catalogare, a produrre e sperimentare nuovi portinnesti americani, a compilare l'inventario delle varietà di uve da vino e da tavola più conosciute e diffuse nel mondo viticolo; bensì si è esplicitata, in una misura altrettanto attiva, anche nel miglioramento della produzione attraverso la creazione di nuovi tipi di uve da tavola e da vino con ricerche e lavori di genetica.

Nel settore delle uve da tavola, alle vecchie varietà di scarso valore si sono sostituite delle varietà di maggior pregio che,

dopo aver guadagnato il mercato interno, si sono spinte anche verso i mercati stranieri.

Si sono prodotte nuove varietà a maturazione differenziata che vennero a colmare una vera lacuna nella produzione italiana.

Altro importante contributo l'Istituto ha portato alle ricerche e allo studio dei mezzi più idonei alla difesa dai parassiti animali e vegetali che infestano la vite, all'uso dei concimi in rapporto alla natura dei terreni, alla tecnica dei nuovi impianti, all'applicazione di sistemi più confacenti di allevamento e di potatura delle viti, problema strettamente legato alle esigenze dei diversi vitigni e all'ambiente colturale, alla diffusione in Italia delle migliori uve da tavola e da vino.

Intanto l'enologia laziale negli anni '30-'40 si dibatteva in una profonda crisi di immagine e di qualità: il panorama ampelografico locale veniva radicalmente modificato e ai tradizionali vitigni – Trebbiano giallo o Greco, i Cesanesi, la Malvasia di Candia, la Malvasia nostrale, il Bellone, il Trebbiano verde, il Bovino bianco – veniva sostituito, quasi ovunque, il Trebbiano toscano dalla produzione più consistente e costante. Inoltre si assisteva al progressivo abbandono della viticoltura collinare soprattutto nelle aree interne della Regione, viticoltura, questa, più dispendiosa ma sicuramente idonea a produrre vini particolari.

La Cantina Sperimentale anche in questa circostanza fece sentire la sua presenza cercando di indirizzare i produttori ed applicando le nuove tecniche enologiche.

Alla rivoluzione viticola degli anni a cavallo fra la fine del secolo scorso e l'inizio del presente, si avvertiva, ora, chiara-

mente la necessità di far seguire una rivoluzione cultural-eno-
logica. Infatti, come riferisce il Prof. Prosperi, i vini prodotti allo-
ra con sistemi tradizionali presentavano, di norma, elevate aci-
dità volatili e non si prestavano al trasporto in altre Regioni
d'Italia.

In parte i problemi di allora sono stati avviati a risoluzione là
dove la tecnologia è riuscita ad apportare consistenti vantaggi
alla produzione di vino. Molti problemi, però, restano tuttora
insoluti e solo un forte impegno nel settore della ricerca potrà
far riguadagnare il tempo perduto.

Per meglio assolvere a tale compito è subentrato alla Canti-
na Sperimentale l'Istituto Sperimentale per l'Enologia, Ente au-
tonomo di grado universitario istituito con D.P.R. 23 Novembre
1967 n. 1318 (riordinamento della sperimentazione agraria).
L'Istituto intende avvalersi per condurre a buon fine tale attività
di ricerca anche della collaborazione di Enti territorialmente
competenti, così come è già avvenuto in questa occasione,
quali la Regione Lazio, l'E.R.S.A.L., le Camere di Commercio, e
quanti, Enti pubblici o privati, abbiano a cuore le sorti della viti-
vinicoltura del Lazio che deve sempre più diventare un settore
trainante per l'economia agricola di tutta la Regione.

ISTITUTO SPERIMENTALE PER L'ENOLOGIA S.O.P. VELLETRI

Il Direttore

Dr. Gaetano CIOLFI

Apertura Convegno

Sabato 27 Aprile 1991

CELEBRAZIONE DEL CENTENARIO

(Incontro su invito)

- ore 10.00 Prof. Italo EYNARD
*Presidente del Consiglio di Amministrazione dell'Istituto
Sperimentale per l'Enologia*
Prof. Luciano USSEGLIO-TOMASSET
Direttore Istituto Sperimentale per l'Enologia
Saluto delle Autorità presenti
Aperitivo d'Onore
- ore 11.30 Comune di Velletri:
Incontro con il Sindaco e gli Amministratori
- ore 13.00 Pranzo ufficiale
- ore 17.00 Trasferimento a Villa Tuscolana (Frascati)
Accoglienza ospiti stranieri
- ore 19.00 Presentazione vini del Lazio
- ore 20.30 Cena di benvenuto alla presenza di Autorità, allietata dal
gruppo folkloristico di Velletri "O Stazzo".

PROGRAMMA SCIENTIFICO

Prima sessione

Domenica 28 Aprile

LA DEGRADAZIONE BIOLOGICA DELL'ACIDO MALICO

(Incontro riservato agli studiosi)

Moderatori: P. BARRE e I. EYNARD

ore 8.30

Inizio lavori

ore 8.45

F. RADLER:

La seconda fermentazione del vino: degradazione dell'acido malico. Scoperta, applicazione, conseguenze e controllo

ore 9.05

T. HENICK-KLING, D.J. COX, E.B. OLSEN:

Produzione di energia durante la fermentazione malolattica

ore 9.25

H.J.J. VAN VUUREN:

*La biologia di **Leuconostoc oenos***

ore 9.45

W.R. SPONHOLZ:

Il metabolismo dell'arginina da parte di batteri lattici e sua relazione nella produzione di etilcarbammato

ore 10.05

DISCUSSIONE

ore 10.25

Pausa caffè

ore 11.00

V. GERBAUX:

Il problema della selezione di stipti di batteri lattici e della loro utilizzazione pratica

ore 11.20

M. VALADE:

Il decorso della fermentazione malolattica nella Champagne

ore 11.40

A YOYEAUX:

*Preparazione industriale di **Leuconostoc oenos***

ore 11.55

R. MATERASSI, L. GRANCHI, A. MATI, M. VINCENZINI:

Ricerche sui batteri malolattici nei vini del Chianti

ore 12.10

DISCUSSIONE

ore 12.30

Colazione di lavoro

- ore 14.15 P. TAILLANDIER, P. STREHAIANO:
*Aspetti metabolici e cinetici della degradazione dell'acido malico da parte degli **Schizosaccharomyces pombe***
- ore 14.35 D. DELTEIL, J.M. JARRY:
*La degradazione biologica dell'acido malico. Elementi di scelta e tecniche d'inoculo di **Schizosaccharomyces** nella vinificazione in bianco*
- ore 14.55 C. DELFINI:
La degradazione biologica dell'acido malico durante la vinificazione. Stato attuale e difficoltà per i vini italiani
- ore 15.10 A. LONVAUD-FUNEL, A. JOYEUX:
Identificazione dei batteri lattici del mosto e del vino mediante ibridazione con sonde nucleiche
- ore 15.30 DISCUSSIONE
- ore 15.45 Pausa caffè
- ore 16.00 G. AMATI, G. ARFELI, M. SIMONI, A. GANDINI, V. GERBI, C. TORTIA, R. ZIRONI:
Inibizione della fermentazione malolattica mediante il lisozima: aspetti microbiologici e tecnologici
- ore 16.15 T. SOZZI:
Difficoltà d'innesco della fermentazione malolattica a causa dei batterifagi
- ore 16.30 G.A. FARRIS, P. CABRAS, M. BUDRONI, T. SATTA, M. MELIS:
Interazioni tra i fermenti lattici dei vini e alcuni fitofarmaci impiegati in viticoltura
- ore 16.40 DISCUSSIONE
- ore 15.00-17.00 Registrazione dei Convegnisti a Villa Tuscolana (Frascati)

17.15 Pertuze x Lemozzano

**L'ESPRESSIONE DELLE CARATTERISTICHE ENOLOGICHE DEL
LIEVITO SELEZIONATO IN FUNZIONE DELLE CONDIZIONI DI
FERMENTAZIONE E DEGLI OBIETTIVI TECNOLOGICI**

Moderatori: F. RADLER, L. USSEGLIO-TOMASSET

- ore 9.00 Inizio lavori
- ore 9.05 P. BARRE
*Modalità d'intervento sull'espressione dei caratteri degli
stipiti di lieviti*
- ore 9.30 G. CIOLFI, A. GAROFOLO, S. MORETTI, G. SPERA,
M. MORASSUT, F. CECCHINI:
*Variazioni metaboliche del lievito in funzione delle
differenti condizioni nutrizionali*
- ore 9.50 M.L. DELIA, P. STREHAIANO:
*Cinetiche di fermentazione alcolica. Influenza di alcuni
fattori (biologici, chimici e fisici)*
- ore 10.10 J.M. SABLAYROLLES:
*Importanza dell'azoto assimilabile e dell'ossigeno sulla
cinetica delle fermentazioni alcoliche*
- ore 10.30 DISCUSSIONE
- ore 10.50 Pausa caffè
- ore 11.05 T. HENICK-HLING, INGA-MAI LARSSON:
*L'effetto della composizione azotata nel mezzo e dello
stipite di lievito sulla formazione di etilcarbammato*
- ore ~~11.25~~ L. USSEGLIO-TOMASSET:
Le sostanze volatili prodotte dai lieviti
- ore 11.40 P. VEZINHET:
*Realizzazione e prospettive del miglioramento genetico
degli stipiti di lievito*
- ore 12.00 D. DELTEIL, J.M. JARRY:
*Caratterizzazione degli aromi di fermentazione. Effetti
dello stipite del lievito e della composizione del mosto. Un
approccio analitico*
- ore 12.20 DISCUSSIONE
- ore 13.00 Colazione di lavoro

Moderatori: G. PARISI, F. RADLER

- ore 15.00 F. LAVALLÉE:
Proposta di una lievito d'identificazione di stipiti con caratteristiche enologiche
- ore 15.15 M.S. GRANDO, A. CAVAZZA:
*Controllo della purezza fermentativa: riconoscimento della specie **Saccharomyces cerevisiae***
- ore 15.30 C. COLELLA, A. NEPI, M. POLSINELLI:
Analisi di frammenti di restrizione del DNA mitocondriale di alcuni ceppi di lievito
- ore 15.45 C. FALCONE:
Il sistema delle alcol deidrogenasi (ADH) in lieviti di specie diverse
- ore 16.00 DISCUSSIONE
- ore 16.15 Pausa caffè
- ore 16.45 F. RADLER:
Il metabolismo degli acidi organici da parte dei lieviti
- ore 17.05 C. DELFINI:
Contributi sperimentali sui fattori metabolici e tecnologici che agiscono sulla produzione di acido acetico da parte dei lieviti durante la fermentazione alcolica
- ore 17.20 A. PIRACCI, R. LOVINO, G. CIOLFI:
Il metabolismo dell'acido acetico ad opera di lieviti di specie diverse nel corso di rifermentazioni alcoliche
- ore 17.35 M. CASTINO:
Indagine sull'importanza di alcuni fattori per il conseguimento di elevate gradazioni alcoliche con mosti da uve passite
- ore 17.50 P. ROMANO, G. SUZZI:
*Indagine preliminare sull'idoneità enologica di **Zygosaccharomyces***
- ore 18.05 W.R. SPONHOLZ
L'origine degli esteri indesiderati nel vino
- ore 18.20 DISCUSSIONE

Terza sessione

Martedì 30 Aprile

ore 9.00 SINTESI DEI LAVORI

Pierre BARRE

Discussione finale

ore 10.30 INCONTRO STAMPA

PROGRAMMA SOCIALE

Domenica 28 Aprile: Partenza ore 17.00 per visita alle zone di produzione del Cesanese. Ricevimento ufficiale al Comune di Genazzano. Cena con illustrazione dei vini e denominazione di origine e ad indicazione geografica della zona e loro abbinamento con piatti tipici locali.

Lunedì 29 Aprile: Partenza alle ore 19.30 per Monteporzio Catone. Cena alla presenza di Autorità con presentazione dei vini del Lazio.

Martedì 30 Aprile: Partenza ore 11.30 per visita stabilimenti vinicoli del Frascati e colazione alle ore 13.00. Trasferimento a Roma per visita guidata della città. Cena di commiato alle ore 20.00 in un caratteristico ristorante "romano". (Programma riservato).

GLI INCONTRI INTERNAZIONALI LALLEMAND

Originariamente fondata come ditta per la produzione di Lievito per la panificazione, LALLEMAND, ormai da 15 anni, concentra le sue migliori risorse alla selezione, alla produzione e all'utilizzazione di numerosi ceppi di lievito secco per la fermentazione del vino.

I risultati di incremento qualitativo offerto dalla microbiologia e soprattutto dai lieviti selezionati sono stati messi in evidenza in tutte le regioni vitivinicole del mondo. Nel contempo però le conoscenze teoriche e le varie esperienze che permettano la migliore gestione dei microorganismi, nel valorizzare sempre più il ruolo dei professionisti del vino, necessitano di aggiornamenti, di approfondimenti e di solidi agganci scientifici: lo sviluppo della qualità non può essere il frutto dell'improvvisazione.

Per questi motivi, la società LALLEMAND, facendosi carico di alcune istanze del mondo scientifico e tecnico, ritiene di dover organizzare annualmente un "qualificato" incontro fra specialisti a livello mondiale, su argomenti precisi riguardanti l'applicazione delle biotecnologie in enologia.

LALLEMAND si ritiene orgogliosa di aver scelto l'Italia e il LAZIO in particolare come sede di questo importante appuntamento e di poter in questo modo contribuire all'organizzazione del simposio internazionale "BIOTECNOLOGIE E QUALITÀ DEL VINO" in occasione del centenario della Sezione di VELLETRI dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia.

Così, nel contesto di un rinnovato interesse della sperimentazione in Italia per i temi della microbiologia enologica, LALLEMAND augura i migliori successi alla promozione qualitativa del vino Italiano.

LALLEMAND

casa madre: 1620 Prefontaine HTW 2N8, Montreal - Que. CANADA.

LALLEMAND

stabilimento di produzione europea: DANSTAR - Grenå: - Danimarca.

LALLEMAND

centro logistico operativo: SETRIC BIOLOGIE - 3 Chemine de Menude, Colomiers - Francia.

LALLEMAND

succursale italiana: via Rossini 14/G Castel D'Azzano - Verona.

"IL CESANESE"

Plinio il Vecchio nella sua "Naturalis Historia" ci offre la più antica testimonianza della produzione, nei colli a sud di Roma, di uve rosse da vino (Alveole), forse capostipiti degli attuali Cesanesi. Il nome Cesanese compare ufficialmente nel 1600 ed è citato come "ottimo vino nero". Nel secolo scorso esso rappresenta l'unico vitigno rosso dei Castelli Romani e delle zone limitrofe, suddiviso nelle sottovarietà "Comune" e "di Affile". Attualmente la sua coltivazione è concentrata nelle località collinari di Affile, Piglio, Olevano Romano e Genazzano e zone circostanti, dove vengono prodotti gli omonimi vini Cesanese a denominazione di origine controllata. La sottovarietà di Affile, caratterizzata da acino molto piccolo, concorre maggiormente, in termini qualitativi, a produrre il vino rosso più tipico del Lazio. Il profumo varietale è gradevole e richiama l'aroma di violetta, l'acidità naturale è moderata, il grado alcolico elevato e il gusto tipico. Dopo maturazione in botte di 6-10 mesi acquisisce una piacevole morbidezza ed il suo colore, nelle annate non sfavorevoli, è rosso rubino intenso.

Dr. Aldo GAROFOLO

"IL FRASCATI"

La produzione vinicola è il fiore all'occhiello di Frascati, la cittadina che dà il nome all'omonimo vino. Il terreno vulcanico, ricco di potassio ed il clima temperato permettono al vino Frascati di ben coniugare la corposità con la freschezza.

La zona di produzione del vino Frascati si estende tra i Comuni di Frascati, Grottaferrata, la parte ovest di Monteporzio Catone ed una piccola parte dei Comuni di Roma e Montecompatri. La denominazione Frascati è antichissima e serve ad indicare un caratteristico prodotto della provincia di Roma. L'origine di questo vino risale all'epoca degli splendori della Roma imperiale ed ancora oggi è tra i vini bianchi italiani più noti.

Il Frascati ha goduto il favore dei papi, dei re e dei poeti. Il papa Gregorio XVI non mancava di bere ogni giorno un "quartarolo scarso di Frascati"; la Regina di Inghilterra durante un suo viaggio a Roma compiuto nel 1823, si entusiasma tanto di questo vino che volle portarne diversi campioni a corte; Goethe lo definì "un paradiso".

Il vino Frascati si presenta brillante, di colore giallo paglierino, con profumo caratteristico delicato e sapore morbido, vellutato. Può essere secco, amabile (zuccheri 1-3 %) e cannellino (zuccheri 3-5 %).

La sua gradazione alcolica va dagli 11 agli 11,50 gradi. Viene servito fresco e, nella versione amabile e dolce, ben si accompagna ai dolci tradizionali.

Ma vino a Frascati non significa solo Frascati D.O.C. Nella cittadina sopravvive più che altrove un'antica tradizione castellana: la "fraschetta", un'osteria dove si possono gustare i diversi tipi di vino accompagnati da prodotti della gastronomia locale.

Dr. Simonetta MORETTI

Sono stati presentati i seguenti posters:

CONTROLLO DELLA PUREZZA FERMENTATIVA: RICONOSCIMENTO DELLE SPECIE DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES

AGOSTINO CAVAZZA, MARIA STELLA GRANDO e CINZIA ZINI
Istituto Agrario, Via March, 1 - 38010 San Michele all'Adige - Trento (Italy)

RIFERMENTAZIONI DI DIFFERENTI SUBSTRATI AD OPERA DI SPECIE DI LIEVITI DIVERSI IN PRESENZA DI ELEVATI TENORI DI ACIDO ACETICO

LOVINO R., PIRACCI A., SCAZZARIELLO M.
Istituto Sperimentale Enologia S.O.P., Barletta

INFLUENZA DEI TRATTAMENTI ANTIPARASSITARI SULLA DISTRIBUZIONE DELLA MICROFLORA DELLE UVE

GAIA P., DELFINI C., PAGLIARA A.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

STUDIO BIOMETRICO SULLA PRODUZIONE DI ACIDI GRASSI C₈, C₁₀, C₁₂ E LORO ESTERI ETILICI DA PARTE DEI LIEVITI NEL CORSO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA

RAVAGLIA S., DELFINI C.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia - Asti

PRODUZIONE, MIGLIORAMENTO GENETICO E DIFFUSIONE DI LIEVITI SELEZIONATI PER L'INDUSTRIA ENOLOGICA. PROGETTO "COLLEZIONE NAZIONALE DEI LIEVITI E DEI BATTERI SELEZIONATI DEL VINO" - MINISTERO AGRICOLTURA E FORESTE

BARDI L., DELFINI C.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

CRITERI METODOLOGICI SEGUITI, RISULTATI OTTENUTI E PROSPETTIVE NELLA SELEZIONE DI LIEVITI PER USO ENOLOGICO

DELFINI C.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

PRODUZIONE DI BENZALDEIDE E ACIDO BENZOICO DA PARTE DI LIEVITI ISOLATI DA VINO E *BOTRYTIS CINEREA* CON E SENZA AGGIUNTA DI ALCOL BENZILICO

DELFINI C., GAIA P., BARDI L., MARISCALCO G., CONTIERO M., PAGLIARA A.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

ELENCO DEI RELATORI

F. RADLER

*Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg
Universität Mainz - Germania*

T. HEINICH-KLING, D.J. COX, E.B. OLSEN

*Cornell University, Department of Food Science and Technology, Agricultural Experiment
Station, Geneva, NY - USA*

H. J. J. VUUREN

*Department of Microbiology and Institute Biotechnology, University of Stellenbosch
Sud Africa*

W. R. SPONHILZ

Microbiology and Biochemistry, Forschungsanstalt, Geisenheim - Germania

V. GERBAUX

ITV Beame - Francia

M. VALADE

Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne - France

A. JOYEUX

Société Equilait et Equifarm - Francia

R. MATERASSI, L. GRANCHI, A. MATI, M. VINCENZINI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, CNR, Firenze - Italia

P. TAILLANDIER, P. STREHAIANO

E.N.S.I.G.C., Toulouse - Francia

D. DELTEIL, J.M. JARRY

Institut Cooperatif du Vin, Lattes - Francia

C. DELFINI

Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti - Italia

A. LONVAUD-FUNEL, A. JOYEUX

Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II, Talence - Francia

A. AMATI, G. ARFELLI, M. SIMONI

C.R.I.V.E., Università di Bologna - Italia

A. GANDINI, V. GERBI, C. TORTIA

*Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Università di
Torino - Italia*

R. ZIRONI

Istituto di Tecnologie Alimentari, Università di Udine - Italia

T. SOZZI

Centro Ricerche Yomo, Milano - Italia

G.A. FARRIS, M. BUDRONI

Istituto di Microbiologia Agraria, Università di Sassari - Italia

P. CABRAS, T. SATTA, M. MELIS

Istituto di Farmacologia e Tossicologia Sperimentale, Università di Cagliari - Italia

P. BARRE

INRA, Institut des Produits de la Vigne, Montpellier - Francia

C. CIOLFI, A. GAROFALO, S. MORETTI, G. SPERA, M. MORASSUT, F. CECCHINI
Istituto Sperimentale per l'Enologia, S.O.P. di Velletri - Italia

M.L. DELIA

E.N.S.I.G.C., Toulouse - Francia

J.M. SABLAYROLLES

I.N.R.A., Institut des Produits de la Vigne, Montpellier - Francia

INGA-MAO LARSSON

*Cornell University, Department of Food Science and Technology, Agricultural
Experiment Station, Geneva, NY - USA*

L. USSEGLIO-TOMASSET

Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti - Italia

P. VEZINHET

I.N.R.A., Institut des Produits de la Vigne, Montpellier - Francia

F. LAVALLEE

Lallemand Inc., Montréal - Canada

M.S. GRANDO, A. CAVAZZA

Istituto Agrario, San Michele all'Adige, Trento - Italia

C. COLELLA, A. NEPI, M. POLSINELLI

Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze - Italia

C. FALCONE

Dipartimento di Biologia Cellulare e Sviluppo, Università di Roma - Italia

A. PIRACCI, R. LOVINO

Istituto Sperimentale per l'Enologia, SOP di Barletta - Italia

M. CASTINO

Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti - Italia

P. ROMANO, G. SUZZI

*Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università di
Bologna, Reggio Emilia - Italia*

ISTITUTO SPERIMENTALE PER L'ENOLOGIA
Sezione Operativa Periferica di Velletri

ABSTRACTS

SIMPOSIO INTERNAZIONALE

BIOTECNOLOGIE E QUALITÀ DEL VINO

INTERNATIONAL SYMPOSIUM

BIOTECHNOLOGY AND WINE QUALITY

Terzo incontro internazionale
Third international meeting

LALLEMAND

Frascati (Roma) – Aprile 1991

ABSTRACTS

La presente pubblicazione
è stata stampata con il contributo
dell'ENTE REGIONALE PER LO SVILUPPO AGRICOLO NEL LAZIO
(E.R.S.A.L.)

RELAZIONI

PRIMA SESSIONE

DOMENICA 28 APRILE

LA SECONDA FERMENTAZIONE DEL VINO: DEGRADAZIONE DELL'ACIDO MALICO, SCOPERTA, APPLICAZIONI, CONSEGUENZE E CONTROLLO

THE SECOND FERMENTATION IN WINE: MALIC ACID DEGRADATION, DISCOVERY, APPLICATION, CONSEQUENCES, AND CONTROL

FERDINAND RADLER

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Postfach 3980, D-6500 Mainz, Germany

Nel corso dell'ultimo secolo è stato studiato l'andamento del grado di acidità durante il processo fermentativo del vino. In un primo tempo si pensava che i lieviti intervenissero nella degradazione dell'acido malico, si è poi scoperto essere i batteri lattici gli agenti di questa degradazione, a cui è stato dato il nome di fermentazione malolattica. La fermentazione malolattica non è desiderata in tutti i vini, spesso nei vini rossi è ricercata e nei vini bianchi è inibita. Il primo risultato di tale fermentazione è la decarbossilazione dell'acido L-malico ad acido L-lattico, in questo modo, si determina una diminuzione dell'acidità totale e un lieve incremento del pH.

I batteri lattici inoltre metabolizzano piccole quantità di un ampio range di costituenti del vino come zuccheri, acidi carbossilici, aminoacidi, la decarbossilazione di questi ultimi porta alla formazione di ammine non desiderate nel vino.

Come conseguenza della metabolizzazione di composti che legano l'anidride solforosa, come l'acetaldeide, l'acido piruvico, l'acido 2-ossi-glutarico, si ha una diminuzione di anidride solforosa in forma combinata e un aumento in forma libera, rispetto al contenuto totale. Il sapore del vino è influenzato dalla formazione di alcuni composti aromatici come il diacetile.

The decrease of acidity during the process of wine fermentation has been observed in the last century. At first, yeasts were thought to be involved but soon lactic acid bacteria were detected as the agents of this acid degradation that is now called malolactic fermentation. The biochemical mechanism has been described in detail. Depending on the type of wine, most often in red wines, the malolactic fermentation is wanted and promoted, on the other hand, in many white wines it is attempted to inhibit or prevent this bacterial fermentation. The primary result of the malolactic fermentation is the decarboxylation of L-malic acid to L-lactic acid, thereby the total acidity is lowered and the pH is slightly increased. Further changes are observed, as the lactic acid bacteria metabolize small amounts of a wide range of constituents of wine like sugars, carboxylic acids and amino acids. The decarboxylation of amino acids leads to the formation of amines which are not wanted in wine. By metabolizing compounds that bind sulfur dioxide like acetaldehyde, pyruvic acid or 2-oxoglutaric acid slightly less sulfur dioxide is bound, thus more free sulfur dioxide is present in wine at the same content of total sulfur dioxide. The taste of wine is influenced by the formation of some flavour compounds like diacetyl. Once the malolactic fermentation has occurred and malic acid has been degraded, such wines are regarded as

Il vino che ha subito la fermentazione malolattica, a causa della degradazione dell'acido malico, presenta una maggiore stabilità. Se le condizioni del vino sono favorevoli, la fermentazione malolattica avviene spontaneamente, altrimenti può essere indotta attraverso l'inoculo di colture starter, normalmente della specie *Leuconostoc oenos* o specie di lattobacilli. Condizioni sfavorevoli e in particolare un'alta concentrazione di anidride solforosa, prevengono la fermentazione malo-lattica. Alcuni esperimenti hanno mostrato che tale fermentazione può anche essere controllata con il batteriocida nisina.

*more stable than wines containing malic acid. If the general conditions of the wine are favourable, the malolactic fermentation occurs spontaneously or may be induced by starter cultures, usually of the species *Leuconostoc oenos* or species of *Lactobacillus*. Unfavourable conditions and in particular high concentrations of sulfur dioxide will prevent the malolactic fermentation. Experiments have shown that the malolactic fermentation can also be controlled with the bacteriocin Nisin.*

PRODUZIONE DI ENERGIA DURANTE LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

ENERGY FROM MALOLACTIC FERMENTATION

THOMAS HENICK-KLING, DONALD J. COX, and ERIK B. OLSEN

Cornell University, Department of Food Science and Technology, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY, USA.

Durante il loro sviluppo nel vino, i batteri lattici convertono rapidamente L-malato in L-lattato e CO_2 . Studi relativi alla reazione di decarbossilazione ad opera dell'enzima malolattico hanno dimostrato che non si produce ATP né altri metaboliti intermedi nel corso di tale reazione.

Dalle nostre ricerche è risultato che utilizzando cellule intere, di *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, e *Pediococcus pentosaceus*, durante la fermentazione malolattica viene prodotto ATP.

Durante la fermentazione malolattica si genera un gradiente elettrochimico (Δp) attraverso la membrana cellulare che determina la produzione di ATP mediante il legame dell'ATPasi alla membrana.

Il sistema che produce energia ha quattro componenti:

1) la migrazione dello ione malato nella cellula;

*During growth in wine, lactic acid bacteria rapidly convert L-malate to L-lactate and CO_2 . Studies of the reaction of this decarboxylation carried out by the malolactic enzyme showed that no ATP or other metabolic intermediates are produced. Our studies on whole cells of *Leuconostoc oenos*, *Lc. mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, and *Pediococcus pentosaceus* showed that ATP is produced during malolactic fermentation. Malolactic fermentation, generates an electrochemical gradient (Δp) across the cell membrane which drives ATP production via the membrane bound ATPase. The energy producing system has three components, 1) the electrogenic uptake of malate¹ into the cell; 2) the decarboxylation of malate inside the cell by the malolactic enzyme; 3) electroneutral efflux of lactate + H^+ , and 4) the membrane bound ATPase. This mechanism potentially can produce one mole of ATP for every three moles of malate converted to lactate. The actual amount of ATP pro-*

- 2) la decarbossilazione del suddetto ione all'interno della cellula operata dall'enzima malolattico;
- 3) la fuoriuscita della forma neutra del lattato + 1 H⁺;
- 4) il legame dell'ATPasi alla membrana.

Tale meccanismo può produrre potenzialmente una mole di ATP ogni 3 moli di malato convertito a lattato. La quantità reale di ATP prodotta durante la reazione è un po' più bassa e dipende dal pH dell'ambiente, dalla concentrazione extracellulare del lattato, e dallo stato energetico della cellula.

La massima quantità di ATP è prodotta a valori di pH uguali o inferiori a 4,5. A pH superiori a 5,5 la fermentazione malolattica non contribuisce in modo significativo alla produzione di ATP necessaria per la crescita cellulare.

La conoscenza del ruolo della fermentazione malolattica, e dei fattori che la regolano durante la crescita dei batteri lattici a bassi valori di pH, potrebbe rendere possibile la produzione di culture starters aventi una notevole vitalità cellulare ed una elevata attività malolattica.

duced from the reaction is somewhat lower and depends on the external pH, the external lactate concentration, and the energy status of the cell. Maximum amounts of ATP from the reaction are produced at pH values at and below 4.5. At pH values above 5.5, malolactic fermentation does not contribute significant amounts of ATP to the growth of the bacteria. The understanding of the role of malolactic fermentation and its regulation during growth of lactic acid bacteria at low pH, should make it possible to produce starter cultures under controlled conditions which have high viability and high cell malolactic activity.

LA BIOLOGIA DI *LEUCONOSTOC OENOS*

BIOLOGY OF LEUCONOSTOC OENOS

H.J.J. VAN VUUREN

Department of Microbiology and Institute for Biotechnology, University of Stellenbosch, 7600 South Africa.

Leuconostoc oenos è il principale organismo associato alla fermentazione malolattica nel vino. Sorprendentemente poco si sa circa le diversità esistenti tra i ceppi di *L. oenos*.

Batteriofagi di *L. oenos* sono stati isolati ma il loro materiale genetico è stato scarsamente caratterizzato. La genetica di *L. oenos* non è stata studiata e le informazioni su elementi extra cromosomici sono scarsi. In questa trattazione viene riferito di alcune ricerche che riguardano gli aspetti sopra elencati.

Leuconostoc oenos is the main organism associated with malolactic fermentation in wine. Surprisingly little is known about the diversity of *L. oenos* strains that exist. Bacteriophages of *L. oenos* have been isolated but their genetic material poorly characterized. The genetics of *L. oenos* has not been studied and information on extrachromosomal elements is scant. In this paper I would like to describe some of the research we have done on the above-mentioned aspects.

La correlazione genotipica fra 53 ceppi di *L. oenos* e *Leuconostoc* spp. di riferimento, è stata determinata mediante analisi numerica computerizzata del profilo delle proteine cellulari solubili, della composizione delle basi del DNA e delle ibridazioni DNA-DNA. Ceppi di *L. oenos* sono stati riuniti in un ampio gruppo con $r \geq 0,83$. Due sottogruppi elettroforetici sono stati individuati con $r > 0,86$. Sedici dei diciotto ceppi nel secondo sottogruppo producono polisaccaridi extracellulari. Molti di questi ceppi sono di origine francese. *L. oenos* è genotipicamente omogeneo e costituisce una specie molto definita. Il profilo elettroforetico delle proteine cellulari solubili è stato impiegato per caratterizzare l'impronta dei singoli stipti.

Venti batteriofagi specifici di *L. oenos* sono stati isolati da vini rossi del Sud Africa che avevano difficoltà a compiere la fermentazione malolattica. Ventinove su trentanove ceppi di *L. oenos* erano sensibili a questi fagi. I batteriofagi erano morfologicamente simili al tipo B-fagi di Bradley, con testa esagonale e lunga coda flessibile, non contrattile.

L'analisi di endonucleosi di restrizione del DNA del fago rivela l'esistenza di 5 gruppi di fagi. Il genoma del fago 10 è costituito da una catena di DNA lineare di 38,1 Kb con le estremità coesive. Il contenuto G+C è 42,9 mol % C+C. Il genoma del fago 10 è stato clonato in pv C18 e frammenti di 26 Kb sono stati ordinati in sequenza. Un frammento di 5 Kb è stato completamente ordinato in sequenza e sono stati identificati degli ORF.

Plasmidi sono stati usati come vettori per la clonazione in batteri e sono stati isolati da streptococchi lattici, lattobacilli, pediococchi e *Leuconostoc* spp. non acidofili. Sono stati isolati 11 plasmidi da 8 ceppi di *L. oenos*; le dimensioni dei plasmidi sono comprese fra 2,47 e 4,61 Kb. Sono state determinate le mappe di restrizione di alcuni di tali plasmidi.

The genotypic relatedness among 53 strains of L. oenos and reference Leuconostoc spp. were determined by computerized numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions and DNA-DNA hybridizations. L. oenos strains were grouped into a large cluster at $r \geq 0.83$. Two electrophoretic subgroups were found at $r > 0.86$. Sixteen of the 18 strains in subgroup II produced extracellular polysaccharide. Many of these strains were from French origin. L. oenos is genotypically homogenous and forms a distinct species. Electrophoretic patterns of total soluble cell proteins were found to be useful for fingerprinting of individual strains.

Twenty bacteriophages specific for L. oenos were isolated from South African red wines showing stuck malolactic fermentations. Twenty nine out of 39 strains of L. oenos were sensitive to these phages. The bacteriophages were morphologically similar to Bradleys' type B-phages, possessing hexagonal heads and long, flexible non-contractile tails. Restriction endonuclease analysis of phage DNA revealed the existence of five phage groups. The genome of phage 10 was found to be a linear DNA molecule of 38.1 kb with cohesive ends. The G+C content is 42.9 mol % G+C. The genome of phage 10 was cloned into pUC18 and fragments of 26 kb have been sequenced. A 5 kb fragment has been fully sequenced and ORFs were identified.

Plasmids are used extensively as cloning vectors in bacteria and have been isolated from lactic streptococci, lactobacilli, pediococci and non-acidophilic Leuconostoc spp. We isolated 11 plasmids from eight L. oenos strains. Plasmid sizes ranged from 2.47 to 4.61 kb. Restriction maps for some of these plasmids have been determined.

IL METABOLISMO DELL'ARGININA DA PARTE DI BATTERI LATTICI E SUA RELAZIONE NELLA PRODUZIONE DI ETIL-CARBAMMATO

THE BREAKDOWN OF ARGININE BY LACTIC ACID BACTERIA AND ITS RELATION TO ETHYL CARBAMATE PRODUCTION

W.R. SPONHOLZ

Microbiology and Biochemistry, Forschungsanstalt, D 6222 Geisenheim, Germany.

Leuconostoc oenos è il principale batterio della fermentazione malolattica. Attualmente viene usato come starter di partenza. Durante la fermentazione malolattica vengono fermentati anche il glucosio e il fruttosio con formazione di acido acetico, d-lattato e mannitolo con conseguente deterioramento del vino. Alcuni stipti sono responsabili del metabolismo dell'aminoacido arginina ad ornitina ed urea, questa, in seguito, è metabolizzata ad ammoniaca.

L'urea è sospettata essere il principale precursore per la formazione del cancerogeno etil-carbammato.

Comunque non è certa la trasformazione dell'arginina ad urea e ammoniaca ad opera dei batteri lattici *Leuconostoc oenos* e lattobacilli, come pure non è sicura la formazione di etil-carbammato da questi precursori.

Leuconostoc oenos is the preferred lactic acid bacterium for malo-lactic fermentation. Nowadays it is used as a starter culture. During the fermentation of L-malate to L-lactate, also glucose and fructose are fermented. So acetic acid, d-lactate and mannitol are formed spoiling wines.

Some strains are responsible for the breakdown of the aminoacid arginine to ornithine and urea. This is further metabolized to ammonia. Urea is suspected as the main precursor for the formation of the cancerogen ethylcarbamate by ethanolysis. The breakdown of arginine to urea and ammonia by lactic acid bacteria, as *Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri* are discussed, as also the formation of ethylcarbamate from these precursors.

IL PROBLEMA DELLA SELEZIONE DI STIPTI DI BATTERI LATTICI E DELLA LORO UTILIZZAZIONE PRATICA

LE PROBLEME DE LA SELECTION DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES ET DE LEUR UTILISATION DANS LA PRATIQUE

VINCENT GERBAUX

ITV Beaume 27, Rue des Roles

L'inseminazione dei vini mediante batteri lattici selezionati rappresenta, oggi, una tecnica affidabile. Il suo sviluppo ha comportato approfondimenti e intense collaborazioni tra studiosi e ditte produttrici di questi microorganismi.

L'ensemencement des vins en bactéries lactiques, sélectionnées est aujourd'hui une technique fiable. Mais son développement a nécessité de nombreuses études et une étroite collaboration entre chercheurs, expérimentateurs et fabricants de micro-organismes. Rap-

Si ricorda che a metà degli anni '80 l'inseminazione batterica di un vino era ancora assai incerta. I principali parametri condizionanti la riuscita di questa tecnica sono i seguenti:

- isolamento di stipti di batteri lattici idonei e produzione di biomassa liofilizzata;
- definizione delle migliori condizioni di impiego della biomassa;
- definizione del campo di applicazione della biomassa stessa.

Il punto di partenza è stato l'isolamento di nuovi stipti di batteri. In effetti le prime biomasse di batteri lattici di cui si disponeva agli inizi degli anni '80 erano troppo poco resistenti alle condizioni sfavorevoli imposte dai vini. L'ITV ha largamente contribuito alla soluzione attraverso le sue delegazioni regionali. Il punto fondamentale di questa selezione è stato quello di individuare vini contenenti una flora batterica indigena interessante. La scelta dei vini è stata effettuata in funzione sia della evoluzione della fermentazione malolattica, sia delle caratteristiche fisico-chimiche (segnatamente: pH, grado alcolico, tenore in SO_2 , temperatura).

Gli stipti isolati sono stati conservati a -80°C in mezzo glicerato adatto. Le prove di selezione in laboratorio danno qualche indicazione sull'attitudine di uno stipte a sviluppare nelle condizioni sfavorevoli ma non ci dicono quale sia il grado di efficacia della biomassa in un vino. Gli stipti più interessanti sono stati prodotti in unità pilota; il loro reale interesse sarà valutato in seguito per diversi inoculi su vini diversi.

Uno stipte di batterio lattico prodotto in forma liofilizzato, anche se resistente non può essere inoculato direttamente in un vino. In effetti, il tasso di mortalità sarebbe tale da rendere l'inoculo inefficace. L'ITV ha lavorato, in questi ultimi anni, sulla definizione delle procedure di impiego della biomassa liofilizzata. Tutti i parametri sono stati ottimizzati per favorire l'impianto di batteri nel vino. Nel contempo, abbiamo studiato in particolare il mezzo di riattivazione, le diffe-

pellons qu'au milieu des années 1980, l'ensemencement bactérien d'un vin était encore très incertain.

Les principaux paramètres conditionnant la réussite de cette technique sont les suivants:

- *L'isolement de souches de bactéries lactiques performantes et la fabrication de biomasses lyophilisées.*
- *La définition du ou des meilleurs protocoles de mise en oeuvre de ces biomasses.*
- *La définition du champ d'application de ces biomasses.*

L'isolement de nouvelles souches a été le point de départ de l'étude. En effet, les premières biomasses de bactéries lactiques dont nous disposions au début des années 80 étaient trop peu résistantes aux conditions défavorables imposées par le vin. L'ITV a largement contribué à cette sélection en faisant appel notamment à ses délégations régionales. Le point clé de cette sélection est de trouver des vins renfermant une flore indigène intéressante. Le choix de ces vins a été effectué en fonction d'une part, de l'évolution de la fermentation malolactique et d'autre part, des caractéristiques physico-chimiques (notamment: pH, degré alcoolique, teneur en SO_2 , température). Les souches isolées sont conservées au congélateur à -80°C dans un milieu adapté et glycérolé. Les tests de sélection en laboratoire donnent quelques indications sur l'aptitude d'une souche à se développer dans des conditions défavorables mais ne prévoient pas avec certitude l'efficacité d'une biomasse dans un vin. Les souches les plus intéressantes sont produites en unité-pilote. Leur intérêt réel sera ensuite évalué en réalisant de multiples essais d'ensemencement avec des vins les plus divers.

Une souche de bactéries lactiques produite sous forme lyophilisée, aussi résistante soit-elle, ne peut être inoculée directement dans un vin. En effet, le taux de mortalité serait tel qu'il rendrait l'ensemencement inefficace. L'ITV a travaillé ces dernières années sur la définition de protocoles de mise en oeuvre des biomasses lyophilisées. Tous les paramètres ont été opt-

renti tappe del protocollo e la loro durata, il livello della popolazione da riattivare.

Infine, si fa notare che, attualmente, non esistono stipti adattati a tutti i tipi di vino. Le biomasse disponibili possono essere schematicamente divise in due gruppi: quelle più adatte per vini rossi in generale e quelle più adatte per vini bianchi e per vini rossi più acidi. Le prime si impiantano rapidamente nel vino e innescano la FML in brevi lassi di tempo, ma sono rapidamente inibite quando le condizioni del mezzo si fanno sfavorevoli. Le seconde si adattano a condizioni più sfavorevoli ma presentano una fase di latenza più lunga.

In conclusione possiamo affermare come i tecnici possano ben controllare il decorso della FML grazie all'inoculo di batteri nel vino; questa tecnica, però, per essere pienamente efficace, necessita di una rigida applicazione del protocollo di impiego da parte degli utilizzatori in quanto le biomasse batteriche sono costituite da microorganismi viventi utilizzati in condizioni estreme.

Infine ricordiamo che l'inoculo batterico di un vino deve essere sempre preparato: non è corretto inseminare un vino troppo solfitato o avente una temperatura troppo bassa.

misés pour favoriser l'implantation des bactéries dans le vin. Ainsi, nous avons étudié notamment le milieu de réactivation, les différentes étapes du protocole et leur durée, le niveau de population à réactiver...

Enfin, notons qu'actuellement, il n'existe pas de souche adaptée à tous les types de vins. Les biomasses actuellement disponibles peuvent être schématiquement divisées en deux groupes: celles plus adaptées aux vins rouges en général et celles plus adaptées aux vins blancs et aux vins rouges les plus acides. Les premières s'implantent rapidement dans le vin et réalisent la FML dans de brefs délais, mais sont rapidement inhibées quand les conditions sont très défavorables. Les secondes s'adaptent aux conditions les plus défavorables mais présentent des délais d'implantation assez long.

En conclusion nous pouvons dire que les professionnels ont mainte ant la possibilité de bien maîtriser leur FML grâce à l'ensemencement bactérien des vins. Mais cette technique pour être pleinement efficace, nécessite de l'application de la part de l'utilisateur. Les biomasses bactériennes sont des micro-organismes vivants utilisés dans des conditions extrêmes. Enfin, rappelons que l'ensemencement bactérien d'un vin doit être préparé: Il n'est pas logique d'ensemencer un vin trop sulfité ou présentant une température trop basse. ■

IL CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA NELLA CHAMPAGNE

LA MAITRISE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE EN CHAMPAGNE

MICHEL VALADE

Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne

I vini di Champagne sono caratterizzati da una acidità abbastanza elevata, con un pH vicino, se non addirittura inferiore a 3,0 e un tenore di acido malico compreso tra 5 e 8 g/l a conclusione della fermentazione alcolica.

Perciò, la fermentazione malolattica (FML) è molto ricercata in questa Regione.

Les vins de Champagne sont caractérisés par des acidités assez élevées, avec des pH voisins, voire inférieurs à 3,0 et des teneurs en acide malique de l'ordre de 5 à 8 g/l en fin de fermentation alcoolique. De ce fait, la fermentation malolactique (FML) est le plus souvent recherchée en Champagne. Elle permet de ré-

Essa permette di ridurre l'acidità del vino e assicura stabilità microbiologica prima della spumantizzazione in bottiglia.

Il lavoro realizzato durante 8 anni dal Servizio Tecnico del CIVC ha riguardato essenzialmente le possibilità di inseminazione mediante batteri liofilizzati selezionati.

Il successo dell'inseminazione della FML dipende da tre fattori complementari:

- uno stipte di batterio adattato;
- una preparazione liofilizzata di buona qualità, ottenuta da questo stipte;
- un protocollo di inseminazione con tali batteri liofilizzati e più in generale una strategia di utilizzazione coerente applicata fin dalla vendemmia.

Detta strategia (solfitazione moderata dei mosti, preparazione di un mosto di avviamento) si integra in maniera molto razionale con il lavoro di cantina. Prove di fattibilità industriale realizzate in questi ultimi 5 anni hanno permesso di inseminare con successo parecchi milioni di ettolitri.

Questa FML può ugualmente essere realizzata a bassa temperatura (10-12°C), dunque senza il riscaldamento della cantina.

Con un costo del tutto accettabile, inferiore a 5 F per ettolitro, le conseguenze economiche del decorso di questa inseminazione sono considerevoli: guadagno in riscaldamento, guadagno in manodopera, guadagno di tempo, disponibilità più rapida e migliore qualità del vino.

duire l'acidité des vins et assure sa stabilité microbiologique avant la prise de mousse en bouteilles.

Le travail réalisé depuis huit ans par les Services Techniques du CIVC a été orienté essentiellement sur les possibilités d'ensemencement par l'intermédiaire de bactéries lyophilisées sélectionnées.

Le succès de l'ensemencement de la FML dépend de trois facteurs complémentaires:

- *une souche de bactérie adaptée;*
- *une préparation lyophilisée de bonne qualité, obtenue à partir de cette souche;*
- *un protocole d'ensemencement avec ces bactéries lyophilisées et plus largement une stratégie d'utilisation cohérente, appliquées dès la vendange.*

Cette stratégie (sulfitage modéré des moûts, préparation d'un pied de cuve) s'intègre de manière très rationnelle au travail de la cuverie.

Des essais de faisabilité industrielle réalisés ces cinq dernières années ont permis d'ensemencer avec succès plusieurs millions d'hectolitres. Cette FML peut également être réalisée à basse température (10-12°C), donc sans chauffage de la cuverie.

Pour un coût tout à fait acceptable, inférieur à 5 F par hectolitre, les conséquences économiques de la maîtrise de cet ensemencement sont considérables: gain de chauffage, gain de main d'œuvre, gain de temps, disponibilité plus rapide et meilleure qualité des vins. ■

PREPARAZIONE INDUSTRIALE DI *LEUCONOSTOC OENOS*

PREPARATION INDUSTRIELLES DE *LEUCONOSTOC OENOS*

ANDRÉ YOYEAUX

Directeur Soc. Equilait Equifarm - France

La produzione industriale di *Leuconostoc oenos* è simile, nelle tappe principali, alla preparazione di fermenti lattici utilizzati nell'industria agro-alimentare.

1 - SELEZIONE di stipti in funzione di

La production industrielle de Leuconostoc oenos ressemble dans ses principales étapes à ce que l'on connaît pour la plupart des ferments lactiques utilisés dans les industries agro-alimentaires.

criteri specifici ricercati dagli utilizzatori. Spesso gli stipiti sono selezionati in collaborazione con gli Istituti tecnici specializzati in enologia.

2 - CONSERVAZIONE degli stipiti per assicurare il loro mantenimento nel tempo nonché le loro proprietà. Le tecniche più usuali sono la liofilizzazione e la congelazione.

3 - FERMENTAZIONE: gli stipiti conservati in tubi su mezzo solido agarizzato o liquido servono per la preparazione di inoculi. Il mosto di avviamento viene realizzato in fermentatori dopo aver sterilizzato il mezzo di coltura. I parametri di fermentazione sono regolati in considerazione dei criteri specifici di ciascun ceppo.

4 - SEPARAZIONE: per centrifugazione o microfiltrazione i batteri vengono separati dal surnatante. I batteri così separati vengono aggiunti di additivi di protezione al fine di proteggere le cellule durante le fasi di liofilizzazione.

5 - LIOFILIZZAZIONE: questa operazione si sviluppa in due tappe. Si effettua prima una congelazione a bassissima temperatura, quindi una sublimazione sotto vuoto che permette di ottenere una polvere contenente da 3 al 5% di umidità.

6 - CONDIZIONAMENTO: le polveri sono titolate, eventualmente mescolate e condizionate all'aria, in gas inerte o sotto vuoto secondo la necessità.

7 - CONTROLLO QUALITÀ: si distingue generalmente il controllo effettuato durante il processo che permette di ottenere una produzione ottimale da quello che dovrà garantire la migliore qualità commerciale del prodotto.

1 - *SELECTION des souches en fonction des critères spécifiques recherchés par les utilisateurs. Le plus souvent les souches sont sélectionnées en collaboration avec les Instituts Techniques spécialisés en oenologie.*

2 - *MAINTENANCE souches pour assurer leur conservation dans le temps et conserver leur propriété. Les techniques les plus usuelles sont la lyophilisation et la congélation.*

3 - *FERMENTATION: les souches réveillées en tubes sur milieux gélosés ou liquides servent à préparer un inoculum qui ensèmcera la cuve de production proprement dite. Cette production est réalisée dans des fermenteurs où le milieu de culture à été préalablement stérilisé. Les paramètres de fermentations sont régulés en considération des critères spécifiques de chaque souche.*

4 - *SEPARATION: Par centrifugation ou microfiltration les bacteries qui nous intéressent sont séparées du surnageant. Des additifs de protection sont ajoutés afin de protéger les cellules dans l'étape suivante de lyophilisation.*

5 - *LYOPHILISATION: cette opération se déroule en deux étapes. On effectue d'abord une congélation à très basse température puis sublimation sous vide qui permet de donner une poudre contenant 3 à 5% d'humidité.*

6 - *CONDITIONNEMENT: les poudres sont mises au titre, éventuellement mélangées et conditionnées sous air, gaz inerte où vide selon les besoins.*

7 - *CONTROLE QUALITE: on distingue généralement les contrôles effectués pendant le procédé qui permettent d'obtenir une production optimale de ceux réalisés sur le produit qui doivent garantir la qualité commerciale du produit.* ■

RICERCHE SUI BATTERI MALOLATTICI NEI VINI DEL CHIANTI

INVESTIGATIONS ON THE MALOLACTIC BACTERIA IN "CHIANTI" WINES

R. MATERASSI, L. GRANCHI, A. MATI e M. VINCENZINI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Sez. Microbiologia Applicata - Università - e Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - CNR - P.le delle Cascine, 27 - Firenze

Nella prospettiva di selezionare ceppi di batteri malolattici da impiegare nella disacidificazione dei vini del Chianti, è stata effet-

In order to select strains of lactic acid bacteria suitable for the deacidification of wines in the Chianti district, a number of malo lactic

tuata una caratterizzazione fisiologico-biochimica di 68 ceppi di batteri lattici isolati da campioni di vino, vino feccioso e deposito feccioso, provenienti da diverse aziende della zona di produzione del "Chianti Classico". Tale studio è stato condotto tenendo presenti le caratteristiche che un batterio malolattico ideale dovrebbe possedere quale, in primo luogo, una elevata attività malolattica in ambiente acido e ad alta gradazione alcolica.

Dei ceppi isolati, appartenenti alla specie *Leuconostoc oenos* (53 ceppi), *Pediococcus parvulus* (5 ceppi) e *Lactobacillus* spp. (10 ceppi), è stata pertanto valutata la capacità di degradare l'acido malico (4g l^{-1}) alla temperatura di 30°C in mezzo sintetico a valori di pH decrescenti (3,7-3,4-3,2) e in presenza di concentrazioni crescenti di etanolo (0-10%-12% v/v). Il numero dei ceppi attivi è diminuito progressivamente con l'aumentare della concentrazione idrogenionica e del grado alcolico. A pH 3,2 e in presenza del 12% (v/v) di etanolo soltanto 4 ceppi, tutti appartenenti alla specie *Leuconostoc oenos*, sono risultati capaci di degradare completamente l'acido malico. Di questi, 3 sono risultati attivi anche in presenza degli acidi ottanoico e decanoico ($0,5\text{-}5\text{ mg l}^{-1}$), sostanze prodotte dai lieviti durante la fermentazione alcolica e generalmente riconosciute inibenti l'attività dei batteri lattici.

In vino, ottenuto mediante fermentazione alcolica di mosto solfitato (50 mg l^{-1} di SO_2) e di mosto non solfitato col ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* PC80, i 4 ceppi di *Leuconostoc oenos* hanno degradato completamente l'acido malico, alle temperature di 20° e 25°C , analogamente a quanto riscontrato nel mezzo sintetico.

Di uno dei 4 ceppi considerati è stata inoltre seguita la fermentazione malolattica in vino alla temperatura di 20°C in relazione a cinque diverse concentrazioni cellulari di partenza ($10^7\text{-}10^5\text{-}10^4\text{-}10^3\text{-}10^2\text{ CFU ml}^{-1}$), determinando, nel corso del processo fermentativo, sia la degradazione dell'acido malico sia il numero di cellule vitali. Nelle prove con

bacteria strains were isolated from samples collected in different wine-cellars and characterized for their main physiological and biochemical properties. Of the 68 strains isolated, 53 were identified as Leuconostoc oenos, 10 as Lactobacillus spp. and 5 as Pediococcus parvulus.

In a synthetic medium only 3 strains of Leuconostoc oenos were able to actively metabolize malic acid under the most severe conditions tested (pH 3,2; 12% v/v ethanol concentration; addition of 5 mg litre⁻¹ of octanoic and decanoic acid). These strains were able to rapidly ferment malic acid in a red wine; their activity was unaffected by the addition of 50 mg SO₂ litre⁻¹ of must before the beginning of alcoholic fermentation.

The kinetics of growth and survival of Leuconostoc oenos in wine and the time course of malic acid degradation were investigated. The size of the inoculum is of paramount importance in determining the speed of malic acid fermentation. Complete degradation of malic acid occurred in 19 days with an inoculum of $1.4 \cdot 10^7\text{ cfu.ml}^{-1}$ while 61 days were required when the inoculum was reduced to $6.10^5\text{ cfu.ml}^{-1}$. As a rule, the cells surviving in wine after inoculation and the duration of the malolactic fermentation were directly related to the inoculum size.

inoculo iniziale pari a $1,4 \times 10^7$ e 6×10^5 CFU ml^{-1} , l'acido malico è stato degradato completamente rispettivamente in 19 e 61 giorni, mentre in quella con inoculo di 5×10^4 e 5×10^3 CFU ml^{-1} è stata registrata, dopo 146 giorni di incubazione, una concentrazione di acido malico residuo pari a 0,45 e 1,0 ml^{-1} , rispettivamente.

Il saggio con inoculo a concentrazione cellulare di 8×10^2 CFU ml^{-1} ha dato esito negativo. Per quanto riguarda la sopravvivenza

degli inoculi in vino, nei primi giorni di incubazione è stata osservata una progressiva diminuzione delle cellule vitali. Successivamente, si è verificata una fase di moltiplicazione cellulare al termine della quale la concentrazione in cellule vitali ha raggiunto valori superiori a quelli iniziali.

I risultati conseguiti fanno ritenere i 4 ceppi di *Leuconostoc oenos* estremamente promettenti per l'induzione della fermentazione malolattica nei vini del Chianti. ■

ASPETTI METABOLICI E CINETICI DELLA DEGRADAZIONE DELL'ACIDO MALICO DA PARTE DEGLI *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

ASPECTS METABOLIQUES ET CINETIQUES DE LA DEGRADATION DE L'ACIDE MALIQUE PAR LES SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

P. TAILLANDIER, P. STREHAIANO
E.N.S.I.G.C. Toulouse

Al momento attuale, uno dei punti chiave per un dominio della vinificazione resta il controllo della "disacidificazione". In particolare, è auspicabile eliminare, nella maggioranza dei casi, l'acido malico; ciò nello stesso tempo per ragioni organolettiche e per la stabilità ulteriore del vino. I metodi disponibili, il più diffuso dei quali è la fermentazione malolattica (F.L.M.) presentano un certo numero d'inconvenienti. Per la F.M.L. il problema maggiore resta la difficoltà del suo avvio e del suo dominio. Ragione per cui i lieviti del genere *Schizosaccharomyces* hanno ben presto interessato gli Enologi. Questi lieviti possiedono in effetti la capacità originale di degradare l'acido malico in un mosto in etanolo e anidride carbonica.

La specie *Schizosaccharomyces pombe* è apparsa la più efficace e le sono stati dedicati numerosi lavori, che hanno portato a dati talvolta contraddittori.

Con un ceppo isolato dall'I.C.V. abbiamo realizzato uno studio metabolico e cinetico al fine di proporre un procedimento uti-

A l'heure actuelle, un des points clé pour une maîtrise de la vinification reste le contrôle de la "désacidification". En particulier, il est souhaitable d'éliminer, dans la majorité des cas, l'acide malique; ceci à la fois pour des raisons organoleptiques que pour la stabilité ultérieure du vin. Les méthodes disponibles, dont la plus répandue est la fermentation malo-lactique (F.M.L.) présentent un certain nombre d'inconvénients. Pour la F.M.L. le problème majeur reste la difficulté de son déclenchement et sa maîtrise. C'est pourquoi les levures du genre Schizosaccharomyces ont très tôt intéressé les Oenologues. Ces levures possèdent en effet la capacité originale de dégrader l'acide malique d'un milieu sucré en éthanol et en gaz carbonique.

L'espèce Schizosaccharomyces pombe est apparue comme la plus efficace et de nombreux travaux lui ont été consacrés, conduisant d'ailleurs à des données parfois contradictoires.

Avec une souche isolée par l'I.C.V. nous avons procédé à une étude métabolique et ci-

lizzabile nella pratica di cantina per condurre alla reazione di demolizione dell'acido malico. Sono stati messi in evidenza i punti seguenti:

- 1) l'acido malico non costituisce per questo ceppo né una fonte d'energia, né una fonte di carbonio per la sintesi di biomassa;
- 2) la demolizione dell'acido malico non è legata allo sviluppo;
- 3) la demolizione dell'acido malico non è legata al consumo di zucchero;
- 4) l'intensità della reazione del consumo di acido malico è legata alla quantità di biomassa presente.

Al livello del procedimento, ciò ha portato a sviluppare l'inoculo dei lieviti in condizione di forti concentrazioni ottenute immobilizzando queste cellule all'interno di sfere di alginato. In un esperimento pilota su scala industriale, questo procedimento ha permesso di moltiplicare le velocità di reazione per un fattore 3.

nétiqne afin de proposer un procédé utilisable à l'échelle de la cave pour mettre en oeuvre la réaction de démalication.

Les points suivants ont été mis en évidence:

- 1) *l'acide malique ne constitue pour cette souche ni une source d'énergie, ni une source de carbone pour la synthèse de biomasse;*
- 2) *le démalicage n'est pas lié à la croissance;*
- 3) *le démalicage n'est pas lié à la consommation de sucre;*
- 4) *l'intensité de la réaction de consommation d'acide malique est liée à la quantité de biomasse présente.*

Au niveau du procédé, ceci a conduit à développer la mise en oeuvre des levures en condition de fortes concentrations obtenues en immobilisant ces cellules au sein de billes d'alginate. Sur un pilote industriel, ce procédé a permis de multiplier les vitesses de réaction par un facteur 3. ■

LA DEGRADAZIONE BIOLOGICA DELL'ACIDO MALICO. ELEMENTI DI SCELTA E TECNICHE DI INOCULO DI SCHIZOSACCHAROMYCES NELLA VINIFICAZIONE IN BIANCO

LA DEGRADATION BIOLOGIQUE DE L'ACIDE MALIQUE. ELEMENTS DE CHOIX ET TECHNIQUE DE MISE EN OEUVRE DES SCHIZOSACCHAROMYCES EN VINIFICATION EN BLANC

D. DELTEIL et J.M. JARRY

Institut Coopératif du Vin. La Jasse de Maurin, 34978 Lattes, France

In enologia, l'applicazione in cantina di un procedimento tecnologico deve essere studiata in funzione dei suoi effetti sul prodotto finito: il vino. Nel corso della degradazione biologica dell'acido malico del mosto con l'impiego di *Schizosaccharomyces pombe*, si possono ugualmente ottenere buoni risultati.

In primo luogo occorre considerare gli effetti positivi:

- correzione dell'acidità totale dei vini fortemente acidi, (caso in cui la fermentazione malolattica è molto difficile da far avvenire)

En oenologie, l'application en cave d'un procédé doit être raisonnée en fonction de ses effets sur le produit final: le Vin. Dans le cas de la dégradation biologique de l'acide malique des moûts par Schizosaccharomyces pombe (ou démalicage), il en est bien sûr de même.

En premier lieu, il faut considérer les effets positifs:

- *ajustement de l'acidité totale des vins de très forte acidité, (cas où la fermentation malolactique est très difficile à réaliser et nécessite une désacidification chimique préalable);*

- *gain aromatique en richesse et frai-*

re e il vino necessita di una disacidificazione chimica preliminare);

- miglioramento dell'aroma più ricco e fresco in rapporto ad una fermentazione ad opera di *Saccharomyces* su mosti molto acidi (quando l'azione di *Schizosaccharomyces* è limitata alla degradazione malica e la fermentazione è, in seguito, realizzata da uno stipite selezionato di *Saccharomyces*);

- mantenimento della ricchezza e della freschezza florale e fruttata nella misura in cui la fermentazione malolattica non è più necessaria.

In questo modo di procedere, i punti negativi da evitare sono:

- comparsa di composti aromatici sgradevoli quando si lascia fermentare lo *Schizosaccharomyces* per lungo tempo dopo degradazione dell'acido malico;

- ottenimento di prodotti squilibrati al lorché i mosti presentano una acidità totale insufficiente.

Quando la scelta è realizzata in funzione degli obiettivi dei prodotti, i vantaggi per il produttore sono:

- possibile diversificazione della gamma di prodotti; messa sul mercato di vini precoci con qualità differenti, soprattutto dove tradizionalmente i vini bianchi acidi raggiungono i loro optimum solo a seguito di una maturazione molto lunga;

- guadagno di tempo in rapporto alla fermentazione malolattica;

- responsabilizzazione e coinvolgimento del personale quando è necessaria una procedura migliore quanto a igiene e qualità;

- controllo dell'efficacia della demolizione malica realizzabile in tempo reale per titolazione e osservazione al microscopio.

D'altra parte gli inconvenienti possono essere:

- contaminazione probabile di partite per le quali non è desiderabile la demolizione malica (rischio minimo nella pratica);

- efficacia non sempre garantita per la competizione con la flora indigena dovuta a mancanza di igiene;

cheur par rapport à une fermentation par Saccharomyces sur les moûts très acides (quand l'action des Schizosaccharomyces est limitée au démalicage et que la fermentation est ensuite réalisée par une souche sélectionnée de Saccharomyces);

- maintien de la richesse et de la fraîcheur florale et fruitée dans la mesure où la fermentation malolactique n'est plus nécessaire.

Dans cette démarche, les points négatifs à éviter sont:

- apparition de composés aromatiques lourds et disgracieux quand on laisse les Schizosaccharomyces fermenter longtemps après le démalicage;

- obtention de produits déséquilibrés dans le cas de moûts présentant une acidité totale insuffisante.

Quand le choix est réalisé en fonction des objectifs de produits, les avantages pour la cave sont:

- diversification possible de la gamme de produits; mise en marché précoce de vins de styles différents, surtout dans les zones où traditionnellement, les vins blancs acides n'atteignent leur optimum qu'après un élevage assez long;

- gain de temps par rapport à la fermentation malolactique;

- responsabilisation et implication du personnel car il faut une vraie démarche d'hygiène et de qualité;

- contrôle d'efficacité du démalicage réalisable en temps réel par titration et observation microscopique.

D'autre part, les inconvénients peuvent être:

- contaminations possibles de cuves sur lesquelles le démalicage n'est pas recherché (risque quasiment nul dans la pratique);

- efficacité inégale dans les caves où le niveau de la microflore levurienne indigène est élevé par manque d'hygiène;

- approvisionnement en biomasse difficile (actuellement, pas de Levures Sèches Actives);

- mise en oeuvre des biomasses liquides nécessitant un processus lourd.

- approvvigionamento di biomassa difficile (attualmente non vi sono lieviti secchi attivi);

- la preparazione di biomassa liquida necessita di tempi lunghi.

Alla luce di questi differenti elementi risulta attualmente spiegato il perché si ricorre così poco a questa tecnica di disacidificazione.

Dopo aver passato in rassegna gli elementi concreti di scelta, viene descritto un esempio di applicazione che abbiamo sperimentato in cantina. A partire da biomassa liquida prodotta dal Dipartimento di Microbiologia dell'Istituto Cooperativo del Vino, il protocollo sperimentale è basato sulla moltiplicazione di un lievito in cantina, l'insemenzamento del mosto con *Schizosaccharomyces* quindi, dopo degradazione controllata dell'acido malico, il mosto è stato avviato alla fermentazione con uno stipte selezionato di *Saccharomyces*. Nel corso della trattazione saranno discussi gli effetti sul vino.

A la vue de ces differents éléments, il semble logique qu'actuellement, peu de caves aient recours a ce procédé biologique de désacidification.

Après avoir passé en revue les éléments concrete da choix, nous décrivons un exemple d'application que nous avons développé avec une cave. A partir de biomasse liquide produite par le Département Microbiologie de l'Institut Coopératif du Vin, ce protocole est basé sur la multiplication d'un levain liquide en cave, l'ensemencement de la cuve en Schizosaccharomyces puis, après démalicage contrôlé, second ensemencement avec une souche sélectionnée de Saccharomyces. Les effets sur les vins produite sont discutés.

LA DEGRADAZIONE BIOLOGICA DELL'ACIDO MALICO DURANTE LA VINIFICAZIONE. STATO ATTUALE E DIFFICOLTÀ PER I VINI ITALIANI

BIOLOGICAL DEGRADATION OF MALIC ACID DURING THE VINIFICATION. STATE OF THE ART AND DIFFICULTIES FOR ITALIAN WINES

CLAUDIO DELFINI

Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

Non tutti i vini italiani necessitano della fermentazione malolattica; quando questa è necessaria, per favorirne l'innesco, si adottano vari accorgimenti quali l'innalzamento del pH, l'aumento della temperatura delle masse vinarie e l'impiego di colture di batteri malolattici diversamente preparate.

Tentativi vengono inoltre fatti per ottenere la FM con batteri ed enzimi immobilizzati e per progettare fermentatori che facilitino l'innesco della FM nei vini particolarmente acidi.

Le colture liofilizzate di batteri malolattici proposte da qualche anno a questa par-

The particular extension of the Italian territory on the terrestrial latitude consents the production of wines having acid-salt compositions very different and, thus, not all getting benefit by degradation of malic acid. The most acid red wines of Northern Italy, having pH from 2.8-3.2, generally improve their tasting and olfactive characteristics with the malolactic degradation (FML). An opposite opinion, instead, we have with regard to the white, rosé, sparkling-base wines and red wines, as Lambrusco, to be drunk young and sprightly, and generally with respect to the wines yield in the Southern and insular regions. For these wines the FML

te non hanno dimostrato di risolvere soddisfacentemente il problema della FM, e soprattutto proprio nei casi difficili, per i quali soltanto la loro proposta appare pienamente giustificata.

Il problema dell'esistenza dei batteriofagi, sia negli starters in fase di preparazione sia nei vini, agenti contro le colture inoculate, non appare ancora risolto e meriterebbe più attenzione da parte degli studiosi.

La fermentazione maloalcolica (FMA) presenta importanti controindicazioni enologiche quando comporta la degradazione completa dell'ac. malico, sia per la modificazione negativa del profumo sia per gli effetti devastanti sugli equilibri acido-salini del vino (eccessivo innalzamento del pH e eccessivo abbassamento del potere tampone).

I vini ottenuti con *Schizosaccharomyces* spp. presentano un profumo più o meno alterato in funzione del ceppo impiegato, che viene nella maggioranza dei casi non preferito rispetto a quello prodotto dai *Saccharomyces*.

The lyophilized cultures of malolactic bacteria commercially available in Italy have not demonstrate to resolve satisfactorily the problem of FM, particularly for hard wines, in which their proposition appears fully justified. The existence of bacteriophages, both in the starters during preparation and in the wines, is a problem not yet resolved and is worthy of more attention by the researchers. The maloalcoholic (FMA) fermentation has important contraindications when it involves the complete degradation of malic acid, both for the negative modification of the flavour and for the devastating effects on the wine acid-salt equilibrium, excessive increase of pH and decrease of buffer capacity. The wines obtained with Schizoyeasts have an altered flavour dependent with the strain employed.

Further, the utilization in graduated fermentation of Schizosaccharomyces with Saccharomyces is difficult in the practice and it does not assure to obtain the degradation of malic acid only. ■

can represent a danger for the stability of the major wine components, as sugars, tartaric acid and glycerol, with serious organoleptic consequences.

The production of large amounts of lactic acid and acetic acid from the sugars is very frequent especially in the wines of central and southern Italy or in those less acid of Northern Italy (Cabernet, Merlot, Ruchè, etc.).

Addition of SO₂, acidification and filtration are the most employed techniques to prevent and to stop dangerous FM. Fatty acids C₈, C₁₀ and C₁₂, nisine and lisozyme are in experimentation. Increasing of pH and temperature of the wine masses and the addition of malolactic cultures differently prepared are the most employed techniques to favour FM.

Hot climate well mature grapes, cultural practices less intense, use of few amounts of SO₂ during crushing, early separation of the must-wine from the skins and the heating of the wine masses appear the main factors that have favoured the spontaneous FM in the last years.

Attempts are made to obtain FM with immobilized bacteria and enzymes and to design biofermenter that facilitate the induction of FM in acid wines.

IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI LATTICI DEL MOSTO E DEL VINO MEDIANTE IBRIDAZIONE CON SONDE NUCLEICHE

IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES DU MOUT ET DU VIN PAR HYBRIDATION AVEC DES SONDES NUCLEIQUES

ALINE LONVAUD-FUNEL et ANNICK JOYEUX

Institut d'Oenologie. Université de Bordeaux II. 351, Cours de la Libération 33405-Talence, France

L'identificazione dei batteri mediante ibridazione ADN/ADN si basa sulla omologia della sequenza di acidi nucleici di stipti appartenenti alla stessa specie. Essa è altresì basata sulla proprietà di monocatene di ADN complementari ad ibridarsi fra di loro. Il confronto avviene quindi al livello di genoma del batterio e non sulla sua espressione che può variare a seguito di mutazioni puntiformi o a seguito di differenti condizioni di coltura.

La realizzazione implica la preparazione di una sonda specifica attraverso la marcatura dell'ADN di uno stipte di riferimento. D'altra parte, l'ADN di stipti da identificare deve essere estratto e immobilizzato su un filtro. Dopo denaturazione i due ADN sono messi in presenza di condizioni appropriate dove l'ibridazione si produce se le catene sono complementari, dunque se gli stipti appartengono alla stessa specie. L'ibrido formato è riconosciuto grazie alla marcatura realizzata sulla sonda, sia per autoradiografia nel caso di una sonda radioattiva sia per lo sviluppo di una reazione colorata nel caso di una sonda fredda.

Per i batteri lattici del vino, cocchi e bacilli, omofermentativi ed eterofermentativi, l'ADN totale estratto dagli stipti di riferimento marcati a caso, si è dimostrato specifico per l'identificazione di specie abitualmente riscontrate. È il caso per esempio di *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *Ln. mesenteroides*, *Ln. oenos*. Solo certi stipti di *Lb. hilgardii* e *Lb. brevis* non possono essere riconosciuti attraverso sonde di ADN totale; la ricerca di sonde più specifiche è in corso.

L'identificazione des bactéries par hybridation ADN/ADN repose sur l'homologie de séquence des acides nucléiques des souches appartenant à la même espèce. Elle est aussi basée sur la propriété des chaînes d'ADN complémentaire monocaténaire à s'hybrider entre elles. Elle s'adresse donc au génome lui-même de la bactérie et non à son expression qui peut varier à la suite de mutations ponctuelles ou avec les conditions de culture.

La réalisation implique la préparation d'une sonde spécifique par marquage de l'ADN d'une souche de référence. D'autre part, l'ADN des souches à identifier doit être extrait et immobilisé sur un filtre. Après dénaturation les deux ADN sont mis en présence dans des conditions appropriées où l'hybridation se produit si les chaînes sont complémentaires, donc si les souches appartiennent à la même espèce. L'hybride formé est repéré grâce au marquage réalisé sur la sonde, soit par autoradiographie dans le cas d'une sonde radioactive soit par le développement d'une réaction colorée dans le cas d'une sonde froide.

*Pour les bactéries lactiques du vin, coques et bacilles, homofermentaires et hétérofermentaires, l'ADN total extrait des souches de référence, marqué au hasard, s'est avéré spécifique pour l'identification des espèces habituellement rencontrées. C'est le cas par exemple pour *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *Ln. mesenteroides*, *Ln. oenos*. Seules certaines souches de *Lb. hilgardii* et *Lb. brevis* ne peuvent être reconnues par des sondes d'ADN total; la recherche de sondes plus spécifiques est en cours.*

Les sondes d'ADN permettent d'identifier les souches de bactéries en une seule opération

Le sonde di ADN permettono di identificare stipiti di batteri in una sola operazione contrariamente ai metodi convenzionali che esigono la conoscenza di un numero importante di caratteri fenotipici. Il metodo si applica all'identificazione di stipiti isolati dal mosto e dal vino in colture pure. Ma recentemente è stata utilizzata per l'ibridazione diretta su colonie sviluppatesi su mezzo solido sopprimendo così la tappa dell'isolamento. In questo modo è possibile calcolare la popolazione batterica di un miscuglio mentre la si identifica. Così per la prima volta l'evoluzione della popolazione in numero e in specie è stata seguita direttamente nel corso della vinificazione, essendosi evitato così l'errore ineluttabile legato all'isolamento delle colonie. Questo metodo è pure adatto alla rivelazione di batteri contaminanti che provocano certe alterazioni dei vini.

contrairement à la méthode conventionnelle qui exige la connaissance d'un nombre important de caractères phénotypiques. La méthode s'applique à l'identification de souches isolées de moût et de vin, en culture pure. Mais récemment, elle a été utilisée pour l'hybridation directe sur colonies développées sur milieu solide supprimant ainsi l'étape d'isolement. De cette façon il est possible de dénombrer tout en les identifiant les bactéries d'un mélange. Ainsi pour la première fois l'évolution des populations en nombre et en espèces a été suivie directement au cours de la vinification, en évitant l'erreur inéluctable liée à l'isolement des colonies. Cette méthode est aussi adaptée à la détection de bactéries contaminantes provoquant certaines altérations des vins.

INIBIZIONE DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA MEDIANTE IL LISOZIMA: ASPETTI MICROBIOLOGICI E TECNOLOGICI

INHIBITION OF MALOLACTIC FERMENTATION BY LYSOZYME: MICROBIOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL ASPECTS

A. AMATI, G. ARFELLI, M. SIMONI
C.R.I.V.E. - Sezione Enologica - Università di Bologna.

A. GANDINI, V. GERBI, C. TORTIA
Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali - Sezione di Microbiologia e Industrie Agrarie - Università di Torino

R. ZIRONI
Istituto di Tecnologie Alimentari - Università di Udine

Nell'ottica di una riduzione dell'impiego dell'anidride solforosa in vinificazione è stata valutata l'attività del lisozima, un enzima ad azione muramidasi e chitinolitica, nei confronti dei batteri lattici presenti nei mosti e nei vini.

A tale scopo sono state condotte numerose prove nel corso di più vendemmie a partire da uve con caratteristiche compositive assai diverse vinificate in bianco.

L'enzima è stato impiegato a dosaggi di-

In order to reduce use of sulfur dioxide in wine-making, the activity of lysozyme on lactic acid bacteria of musts and wine was studied. Many tests were carried during several vintages on different kind of grapes fermented off skins.

The enzyme was used at concentrations from 0 to 1000 ppm, with and without sulfur dioxide, before or after the alcoholic fermentation.

Chemical and microbiological analysis were carried at the end of fermentation and

versi, compresi fra 0 e 1000 ppm, in associazione o meno con anidride solforosa (fino a 80 ppm), prima o dopo la fermentazione alcolica.

I rilievi analitici effettuati alla svinatura e periodicamente durante la conservazione hanno evidenziato che:

- il lisozima, a dosi superiori alle 100 ppm, riduce la popolazione batterica proporzionalmente alla sua concentrazione con conseguente ritardo nell'avvio e nel completamento della fermentazione malolattica;

- per impedire definitivamente l'attività dei batteri lattici presenti nei vini occorrono dosaggi compresi fra 500 e 1000 ppm di lisozima; se però la carica batterica supera il milione di U.F.C. per ml neppure le 1000 ppm si sono dimostrate sufficienti per l'inibizione totale;

- l'impiego dell'enzima nella fase pre-fermentativa consente di ridurre il dosaggio a 250 ppm e di evitare il rischio di una precoce attività batterica;

- la presenza del lisozima nella fase prefermentativa non modifica sostanzialmente le caratteristiche chimiche ed organolettiche dei vini.

È ancora oggetto di studio l'eventuale sinergismo fra lisozima ed anidride solforosa.

during storage of wines. The following results were obtained:

- lysozyme concentrations higher than 100 ppm reduce the number of lactic acid bacteria proportionally to the concentration used, causing a consequent delay in the malolactic fermentation;

- lysozyme concentrations from 500 to 1000 ppm are needed to stop lactic acid bacteria activity definitively; however total inhibition was not obtained with 1000 ppm of the enzyme if the viable cells were more than 10^6 /ml;

- lower quantities of lysozyme (250 ppm) are effective and early bacterial activity can be avoided if the enzyme is added before alcoholic fermentation;

- presence of lysozyme in musts does not substantially change chemical and organoleptical characteristics of the wines obtained.

The synergy between lysozyme and sulfur dioxide is still under study.

DIFFICOLTÀ DI INNESCO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA A CAUSA DEI BATTERIOFAGI

DIFFICULTÉS DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE CAUSÉES PAR LES BACTÉRIOPHAGES

TOMMASO SOZZI

Centro Ricerche Yomo - Pasturago di Vernate, Milano

I batteriofagi o fagi sono virus che hanno la capacità di distruggere le cellule batteriche. Come tutti i virus possono riprodursi solo all'interno delle cellule viventi. Mentre una cellula ne origina due, un fago è in grado di

Les bactériophages ou phages sont des virus qui ont la propriété de détruire les cellules bactériennes. Comme tous les autres virus, ils peuvent se multiplier uniquement à l'intérieur des cellules vivantes. Pendant qu'une cel-

produrne più di cento (per nostra fortuna i fagi sono specifici, ossia possono attaccare solo uno dei ceppi aventi le stesse caratteristiche).

La fermentazione malolattica è prodotta dai fermenti lattici chiamati *Leuconostoc oenos*. Anche questi batteri possono essere distrutti dagli attacchi fagici. Il problema dei fagi è molto noto nell'industria lattiero-casearia, mentre è solo negli ultimi dieci anni che si è cominciato a considerare e a studiare la questione, prima mai affrontata, nella produzione enologica.

La fermentazione malolattica viene totalmente inibita se il numero dei fagi è elevato; quando invece la presenza fagica risulta debole, la fermentazione malolattica si innesca ma in seguito si arresta completamente.

I fagi dei *Leuconostoc oenos* sono stati isolati da vini con problemi di fermentazione malolattica in quasi tutti i paesi produttori. I fagi non sono stati isolati solo nei paesi produttori in cui non è stata compiuta una ricerca in tal senso.

Lo studio dell'attacco fagico in enologia deve essere affrontato seriamente, se si vuole giungere a controllare la fermentazione malolattica con l'impiego di colture selezionate.

lule en développe deux, un phage produit plus de cent particules virales (heureusement les phages sont spécifiques, c'est-à-dire ils peuvent attaquer une seule des souches ayant les mêmes caractéristiques).

La fermentation malolactique est produite par les ferments lactiques appelés Leuconostoc oenos. Ces bactéries aussi peuvent être détruites par les attaques phagiques. Le problème des phages est très connu dans l'industrie laitière, mais seulement dans les dernières dix années on a commencé à prendre en considération et à étudier le sujet dans l'industrie oenologique.

La fermentation malolactique est totalement arrêtée si le nombre des phages est élevé si la présence phagique est faible, la fermentation malolactique commence, mais après les phages causent l'arrêt total de la fermentation.

Les phages de Leuconostoc oenos ont été isolés de vins avec problèmes de fermentation malolactique presque dans tous les pays producteurs.

Les phages n'ont pas été isolés seulement dans les pays producteurs qui n'ont pas conduit telles recherches.

L'étude de l'attaque phagique doit être affronté sérieusement si on veut arriver à contrôler la fermentation malolactique par l'emploi de cultures sélectionnées. ■

INTERAZIONI TRA I FERMENTI LATTICI DEI VINI E ALCUNI FITOFARMACI IMPIEGATI IN VITICOLTURA

INTERACTIONS BETWEEN LACTIC ACID BACTERIA AND PESTICIDES IN WINE MAKING

G.A. FARRIS*, P. CABRAS**, M. BUDRONI* T. SATTA**, M. MELIS**

* Istituto di Microbiologia Agraria "A. Capriotti, Università degli Studi di Sassari

** Istituto di Farmacologia e Tossicologia Sperimentale, Università degli Studi di Cagliari

L'utilizzazione dei prodotti chimici per il controllo dei parassiti in viticoltura è ormai diventata una normale pratica agronomica. Pertanto è frequente che l'uva destinata alla vinificazione ne contenga dei residui, con

By now, the utilization of chemicals to control pests in viticulture has become normal agronomic practice. Thus, the grapes used in wine making frequently contain residues of these substances, with possibly damaging re-

possibili ripercussioni negative sia sulla microflora blastomicetica responsabile della fermentazione alcolica che, soprattutto, sulla salute dei consumatori.

Numerosi meccanismi possono intervenire a determinare la diminuzione dei principi attivi di questi prodotti durante la fermentazione: idrolisi acida, adsorbimento sui solidi sospesi, sulla feccia e sulle vinacce. Recentemente abbiamo messo in evidenza un'azione diretta dei lieviti sulla degradazione di alcuni fitofarmaci, durante la fermentazione.

Nulla o quasi, invece, si conosce sulle possibili interazioni esistenti tra i fermenti lattici responsabili della fermentazione malolattica e i fitofarmaci impiegati in viticoltura.

Abbiamo impostato, quindi, la presente indagine per valutare se e quanto la diminuzione dei residui di pesticidi nel vino sia da attribuire all'azione diretta dei fermenti lattici.

Sono stati impiegati standard analitici (98,5%) di sei fitofarmaci (benalaxyl, carbendazim, dichlofluonid, folpet, triadimefon e vinclozolin), aggiunti (circa 5 ppm in una prima prova e circa 1 ppm in una seconda) ad un vino bianco (alcol, 11,5%, Acidità totale 4,8%, zuccheri 0,15%, acido malico 4,09%) arricchito con il 2% di estratto di lievito. Come fermenti lattici sono stati impiegati un ceppo di *Lactobacillus plantarum* ed un ceppo di *Leuconostoc oenos*.

La fermentazione malolattica è stata seguita per 10 giorni alla temperatura di 20°C, determinando a quattro e a dieci giorni dall'inoculo, oltre il contenuto in acido malico per via enzimatica, i residui dei singoli pesticidi. Per l'analisi dei residui è stata impiegata una metodica HPLC. I principi attivi sono stati estratti utilizzando cloroformio per il carbendazim e benzene per tutti gli altri. I recuperi sono stati quantitativi alle concentrazioni utilizzate nelle prove.

percussions on the blastomycetic microflora responsible for the alcoholic fermentation, or, indeed, on the health of the consumer. In many ways, vinification may reduce the principal agents of these pesticides - during fermentation, for example, under acid hydrolysis or adsorption by the marc, lees or solids in suspension. Also during fermentation, we have found direct degradation of some residues by the yeasts. Little appears to be known, however, regarding any possible interactions with the lactic acid bacteria responsible for the malolactic fermentation. The present investigation was aimed at discovering whether the LAB can reduce pesticidal residues and, if so, by how much.

*Six pesticides (benalaxyl, carbendazim, dichlofluonid, folpet, triadimefon and vinclozolin) of 98.5% analytical standard were tested with 2 LAB strains (*Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*) in a white wine (11.6% alcohol, 4.8% total acidity, 0.15% sugars, 4.09% malic acid) enriched with 2% yeast extract. Two series of malolactic fermentation trials were conducted at 20°C. (i) with pesticide addition of 5 ppm and (ii) 1 ppm, assays being made at 4d and 10d after inoculum. Malic acid content was determined enzymatically and pesticide residue by an HPLC method. Chloroform was used to extract carbendazim and benzene for the other five.*

MODALITÀ DI INTERVENTO SULL'ESPRESSIONE DEI CARATTERI DEGLI STIPITI DI LIEVITI

LES MOYENS D'INTERVENTION SUR L'EXPRESSION DES CARACTERES DES SOUCHES DE LEVURES

P. BARRE

I.N.R.A. - Institut des Produits de la Vigne 2, place Viala 34060 Montpellier Cedex 1, France

I risultati di una fermentazione alcolica sono sempre legati all'interazione di un gran numero di parametri che è possibile raggruppare in tre categorie:

- 1° - le caratteristiche genetiche dello stipite utilizzato (nel caso, ben inteso, di una fermentazione in purezza);
- 2° - la composizione dei mosti e dei mezzi di coltura;
- 3° - la conduzione delle fermentazioni (temperatura, agitazione, modo continuo, impiego di cellule incluse o fissate).

È spesso insufficiente prendere in considerazione uno o più parametri appartenenti a ciascuno dei gruppi per trarre conclusioni circa i loro effetti, in quanto si verificano interazioni fra parametri diversi. È importante, comunque, studiare le interazioni fra i parametri principali sui cui è possibile agire.

I mezzi di intervento possono esplicarsi sui tre gruppi. A livello di stipite selezionato: si può considerare una modificazione delle sue attitudini tramite intervento genetico. Tre tipi di obiettivi possono essere perseguiti: espressione di una nuova proprietà; soppressione di una proprietà giudicata negativa; infine penso che, a medio e lungo termine, si possa intervenire sui sistemi di regolazione che permettano una modificazione delle caratteristiche dello stipite agendo su dei parametri esterni che possano consentire un orientamento della fermentazione alcolica.

A livello di mosto: una migliore conoscenza della sua composizione, come pure le

Les résultats d'une fermentation alcoolique sont toujours liés à l'interaction d'un grand nombre de paramètres que l'on peut regrouper en trois catégories:

- 1° - *la dotation génomique de la souche utilisée (dans le cas, bien sûr, d'une fermentation en souche pure);*
- 2° - *la composition fins des moûts en tant que milieu de culture;*
- 3° - *le mode de conduite des fermentations (température, agitation, mode continu, mise en oeuvre de cellules incluses ou fixées).*

Il sera donc souvent insuffisant de prendre en considération un (ou des) paramètre(s) appartenant à un de ces groupes pour en tirer des conclusions générales sur son effet: elles ne seraient, en effet, valables que si cet effet n'était pas sensiblement modifié par des interactions avec d'autres paramètres. Il est donc souhaitable d'identifier ceux d'entre eux qui dépendent aux conditions précédentes, mais également d'étudier les interactions entre paramètres principaux sur lesquels on peut agir.

Les moyens d'intervention portent donc sur les trois groupes définis ci-dessus. Au niveau de la souche sélectionnée: on peut en envisager la modification de ses aptitudes par une intervention génétique. Trois grands types d'objectifs peuvent être poursuivis: expression d'une nouvelle propriété; suppression d'une propriété jugée négative; enfin, je pense qu'à moyen et long terme, l'intervention sur des systèmes de régulation permettant une modula-

giuste considerazioni delle esigenze di una fermentazione circa la scelta delle condizioni pre-fermentative si rendono ormai indilazionabili.

Si dovrà quindi agire in modo tale da agiustare il mezzo per correggere le sue eventuali carenze. La correzione dell'azoto assimilabile (in relazione con la produzione di alcoli superiori), l'apporto di ossigeno (in relazione alla produzione di esteri), l'aggiunta di tiamina (in relazione alla concentrazione residuale di acidi chetonici) sono metodi ormai praticabili.

A livello di condotta: il parametro più importante è la temperatura che evidenzia il suo effetto sulla cinetica della fermentazione e sul completamento corretto della fermentazione stessa, nonché sulla elaborazione dei prodotti secondari della fermentazione come riscontrato da numerosi Autori.

Le tendenze generali si individuano ugualmente anche se non si può mettere in evidenza la parte legata agli effetti diretti della temperatura o i suoi effetti indotti come per esempio l'intensità dei diversi flussi metabolici che è possibile stimare mediante la valutazione della velocità istantanea di fermentazione. L'enologo dispone in modo incontestabile di mezzi per indirizzare l'espressione dei caratteri enologici di un lievito. Questo fatto va però visto con prudenza in quanto si è in presenza di un sistema molto variabile e vi è ancora molta imprecisione nelle relazioni esistenti fra alcuni dati analitici e le loro conseguenze organolettiche.

tion de l'effet souche par action sur des paramètres externes constituera un moyen efficace d'orientation de la fermentation alcoolique.

Au niveau des moûts de raisin: une meilleure connaissance systématique de leur composition, ainsi qu'une prise en considération des exigences de la fermentation lors du choix des opérations préfermentaires sera de plus en plus nécessaire. On pourra alors mieux ajuster sa composition par voie naturelle ou artificielle. L'ajustement de l'azote assimilable (en relation notamment avec la production d'alcools supérieurs), l'apport en oxygène dissous (en relation avec la production d'esters), l'addition de thiamine (en relation avec la concentration résiduelle en acides cétoniques) peuvent déjà être mis en oeuvre.

Au niveau du mode de conduite: le paramètre le plus important est incontestablement la température. Outre son effet sur la cinétique fermentaire et notamment sur l'achèvement correct des fermentations, de nombreux travaux ont mis en évidence son influence sur la répartition des sous-produits. Des tendances générales se dégagent même si l'on n'a pas encore pu mettre en évidence la part qui revient aux effets directs de la température, ou bien à ses effets induits, par exemple, l'intensité des divers flux métaboliques que l'on peut sommairement estimer par la mesure de la vitesse instantanée de fermentation).

L'oenologue dispose donc incontestablement de moyens pour infléchir l'expression des caractères oenologiques des souches de levure. Il se heurte cependant dans ses généralisations à la variabilité d'un système multifactoriel, ainsi qu'à la grande imprécision qui existe encore dans les relations entre certaines données analytiques et leurs conséquences organoleptiques.

VARIAZIONI METABOLICHE DEL LIEVITO IN FUNZIONE DELLE DIFFERENTI CONDIZIONI NUTRIZIONALI

METABOLIC VARIATIONS OF YEAST RELATED WITH DIFFERENT NUTRITIONAL CONDITIONS

G. CIOLFI, A. GAROFOLO, S. MORETTI, G. SPERA, M. MORASSUT, F. CECCHINI
Istituto sperimentale per l'enologia Sezione Operativa Periferica di Velletri

Con la sperimentazione effettuata si voleva rispondere ai seguenti quesiti: è possibile pilotare il metabolismo del lievito - se sì, entro quale limite - nella direzione volta ad esaltare vie metaboliche che ci consentano di prevedere il risultato da noi ritenuto favorevole per una determinata fermentazione?

Per rispondere all'interrogativo si è agito su due gruppi fondamentali di composti: fonte azotata e vitamine. Modificando gli equilibri fra questi due gruppi è stato possibile condizionare il metabolismo del lievito il cui fulcro è rappresentato dall'acetil CoA.

Nel corso del lavoro è stato valutato l'impiego di diversi additivi volti ad incrementare il metabolismo del lievito di cui l'effetto più vistoso è evidenziabile da una accresciuta velocità di fermentazione e da una accresciuta capacità a portare a secco un mosto; è stato, altresì, ipotizzato il meccanismo di azione dei composti con capacità attivanti sul sistema enzimatico del lievito. Il fenomeno attivante è risultato maggiormente evidente allorché l'intervento è stato effettuato prima dell'avvio della fermentazione e non durante il suo decorso. Dal punto di vista metabolico, differenze sostanziali, nell'ambito di *Saccharomyces cerevisiae*, si verificano a carico della razza fisiologica (r.f.) *uvarum* rispetto alle altre razze.

Saccharomyces cerevisiae r.f. *uvarum* è meno sensibile a squilibri nutrizionali del mezzo; questo lievito è però fortemente condizionato dall'inositolo presente, peraltro, in grande abbondanza nei mosti naturali. Questa vitamina, componente essenziale di alcuni fosfogliceridi, entra nella costituzione delle membrane; a livello metabolico, la caren-

With the experimentation we did we wanted to answer the following questions: It is possible to guide yeast metabolism - if it is possible within which limit to exalt the metabolic pathways to foresee the result we think to be favourable to a particular fermentation?

To answer the question we operated on two fundamental groups of compounds: nitrogen source and vitamins we succeeded in conditioning yeast metabolism, whose fulcrum is Acetyl-coenzyme A, changing the balance these two groups.

*During the work we tested the use of different additives to increase the yeast metabolism whose biggest effect is put into evidence by an increased speed of fermentation and by an increased capacity to dry a must. We also supposed the way the activating compounds act upon the enzymatic system of yeast. The activating phenomenon resulted clearer when the intervention was done before the fermentation started and not during its course. From the point of view of metabolism, substantial differences, about the *Saccharomyces cerevisiae*, are to be debited to the physiological race (*ph. r.*) *uvarum* and not to other races.*

*Saccharomyces cerevisiae ph.r. uvarum is less sensitive to nutritional lack of balance of the medium; but this yeast is strongly conditioned by the present inositol in big abundance in natural musts. This vitamin, an essential component of some phosphoglycerids, enters in the membranes constitution; at metabolic level the lack of inositol reflects upon the functioning of mitochondria interrupting the flux of Acetyl-coenzyme A upon oxalacetate to form citrate. The addition of nitrogen or of vitamins exerts, upon the *Saccharomyces cerevi-**

za di inositolo si ripercuote sul funzionamento del mitocondrio con interruzione del flusso di acetyl CoA su ossalacetato per formare citrato. L'aggiunta di azoto o di vitamine esercita, su *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum*, azione positiva volta all'incremento di acidi grassi, acidi fissi, esteri di acidi grassi, fenil etanolo e volta ad una riduzione di acido acetico nel mezzo. Altre r.f. della specie *Saccharomyces cerevisiae* sono, al contrario, fortemente condizionate da squilibri che possono determinarsi fra fonte azotata e vitamine nonché all'interno stesso dei due gruppi; questo fatto comporta variazioni ritenute negative a livello di composti legati principalmente all'acetyl CoA: acido acetico, steroli, grassi, acidi grassi e loro esteri. In particolare l'effetto più vistoso di questo squilibrio è legato alla fluttuazione della concentrazione di acido acetico nel mezzo durante la fermentazione, concentrazione che risulta facilmente controllabile con l'impiego della r.f. *uvarum*.

Un sistema valido ed equilibrato la fine di apportare correzioni nutrizionali del mezzo è risultato essere l'estratto cellulare a freddo più o meno integrato ricavato dallo stesso lievito impiegato nel corso della fermentazione.

Nella sua globalità il lavoro conferma un punto che si ritiene fondamentale: l'impiego di un lievito deve essere sempre accompagnato da indicazioni precise circa la sua tendenza metabolica e circa i rimedi atti a riequilibrare eventuali scompensi nutrizionali del mezzo; questo fatto diventa sempre più importante man mano che la tecnologia diviene sempre più sofisticata.

Da quanto esposto risulta evidente come l'impiego di un lievito secco sia da preferirsi allo stesso allo stato fresco; inoltre va considerata seriamente la opportunità di un impiego generalizzato della r.f. *uvarum* al posto della r.f. *cerevisiae* o *bayanus* tranne nei casi in cui ciò può essere espressamente controindicato: fermentazione di mosti che non devono completare il processo fermentativo.

siae ph. r. uvarum, a positive action for the increase of fat acids, fixed acids, esters of fat acids, phenyl-ethanol and for the reduction of acetic acid in the medium.

On the contrary other ph.r. of Saccharomyces cerevisiae genus are strongly conditioned by possible lacks of balance between nitrogen source and vitamins and by possible lacks of balance inside each of the groups. This fact brings variations thought as negative at the level of compounds chiefly related to the Acetyl-coenzyme A: acetic acid, sterols, fats, fat acids and their esters. Particularly the clearest effect of this lack of balance is related to the fluctuation of acetic acid concentration in the medium during the fermentation; the concentration is easily controlled using the ph.r. uvarum.

A valid and balanced system to bring nutritional corrections to the medium is the from cold cell extract, more or less integrated, obtained from the same yeast used during the fermentation.

In its whole the work confirms a fundamental point the use of a yeast must be accompanied by precise directions about its metabolic tendency and the remedies to re-equilibrate a possible nutritional lack of balance in the medium.

This fact is always more important as technology goes on.

So it is evident that the use of dry yeast is preferable to the same yeast but fresh; moreover we have seriously to consider the opportunity of a general use of ph. r. uvarum instead of ph. r. cerevisiae or bayanus except when it is clearly contra-indicated: fermentation of musts which must not complete the fermentative process.

CINETICHE IN FERMENTAZIONE ALCOLICA INFLUENZA DI ALCUNI FATTORI (BIOLOGICI, CHIMICI, FISICI)

CINETIQUES EN FERMENTATION ALCOOLIQUE INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS (BIOLOGIQUES, CHIMIQUES, PHYSIQUES)

M.L. DELIA, P. STREHAIANO
E.N.S.I.G.C. Toulouse

In fermentazione alcolica, le cinetiche di crescita e di produzione osservate non seguono i modelli descritti da Monod o da Luedeking e Piret. Le cinetiche osservate, molto più complesse, coinvolgono le risposte del metabolismo dei lieviti alle condizioni interne (regolazione metabolica) o esterne (ambiente).

Fra i fattori che esercitano un ruolo fondamentale su queste reazioni di sviluppo e di produzione, l'Ossigeno (in associazione con la concentrazione di zucchero), i Co-metaboliti inibitori e la Temperatura meritano nel contesto enologico un'attenzione particolare.

1°. OSSIGENO E ATTIVITÀ DEI LIEVITI

Gli aspetti qualitativi negativi di una areazione, in generale mal controllata, hanno portato gli enologi ad essere assai diffidenti nei confronti dell'ossigeno. In realtà, nel corso della fermentazione alcolica, l'ossigeno deve essere considerato come un substrato indispensabile alla buona attività dei lieviti e il suo apporto ponderato rispetto al mezzo autorizza un migliore dominio della fermentazione.

2°. CO-METABOLITI INIBITORI

Le cinetiche di sviluppo e di produzione sono controllate dalla sintesi di co-metaboliti inibitori. La loro natura non è ancora ben definita, tuttavia alcuni "artifici" tecnici permettono già di controllare i loro effetti.

3°. TEMPERATURA

Il ruolo della temperatura sulle velocità di reazione è riconosciuta da lungo tempo. In enologia tuttavia questi soli aspetti di velocità non sono sufficienti e una cura particolare

En fermentation alcoolique, les cinétiques de croissance et de production observées ne suivent pas les formalismes décrits par Monod ou par Luedeking et Piret. Les cinétiques observées, beaucoup plus complexes, traduisent les réponses du métabolisme levurien aux contraintes internes (régulation métabolique) ou externes (environnement).

Parmi les facteurs qui exercent un rôle fondamental sur ces réactions de croissance et de production, l'Oxygène (en association avec la concentration en sucre), les Co-métabolites inhibiteurs et la Température méritent dans le contexte oenologique une attention particulière.

1°. OXYGÈNE ET ACTIVITÉ LEVURIENNE

Les aspects qualitatifs négatifs d'une aération, en général mal contrôlée, ont conduit les oenologues à être très méfiants vis à vis de l'oxygène. En réalité, au cours de la fermentation alcoolique, l'oxygène doit être considéré comme un substrat indispensable à la bonne activité des levures et sa fourniture raisonnée au milieu autorise une meilleure maîtrise de la fermentation.

2°. CO-MÉTABOLITES INHIBITEURS

Les cinétiques de croissance et de production sont contrôlées par la synthèse de co-métabolites inhibiteurs. Leur nature n'est pas encore bien définie, mais cependant des "artifices" techniques permettent déjà de contrôler leurs effets.

3°. TEMPÉRATURE

Le rôle de la température sur les vitesses de réaction est reconnu depuis longtemps. En Oenologie cependant ces seuls aspects de vitesse ne sont

deve essere rivolta agli aspetti organolettici e analitici.

Alcuni esempi di fermentazione realizzati in differenti condizioni illustrano bene queste risposte specifiche di ciascun ceppo a questo fattore fisico che l'enologo moderno ha i mezzi per controllare.

pas suffisants et un souci particulier doit être apporté aux aspects organoleptiques et analytiques.

Quelques exemples de fermentation réalisées sous différentes conditions illustrent bien ces réponses spécifiques de chaque souche à ce facteur physique que l'oenologue moderne a les moyens de contrôler. ■

IMPORTANZA DELL'AZOTO ASSIMILABILE E DELL'OSSIGENO SULLA CINETICA DELLE FERMENTAZIONI ALCOLICHE

IMPORTANCE DE L'AZOTE ASSIMILABLE ET DE L'OXYGENE SUR LA CINETIQUE DES FERMENTATIONS ALCOOLIQUES

J.M. SABLAYROLLES

I.N.R.A. - Institut des Produits de la Vigne 2, place Viala 34060 Montpellier Cedex 1, France

Numerosi parametri sono suscettibili di influenzare il decorso della fermentazione alcolica in condizioni enologiche e, anche se molti di essi sono stati ben identificati, non è possibile poter precisare la loro importanza per ciascuna fermentazione. Malgrado tutto ve ne sono alcuni che sono particolarmente importanti come l'azoto assimilabile e l'ossigeno.

È ormai assodato che l'azoto assimilabile (composto essenzialmente di azoto ammoniacale e amminico) é, nelle condizioni enologiche, il nutriente che influenza di più la cinetica della fermentazione.

In effetti esiste una buona correlazione fra il tenore in azoto e la velocità della fermentazione e ciò nella quasi totalità delle concentrazioni osservate nei mosti (circa 50 mg N/l fino a più di 300 mg N/l), la carenza di azoto assimilabile può non solo rallentare il decorso globale della fermentazione, ma provocare un arresto precoce della stessa.

È stato, altresì, ben stabilito come l'ossigeno possa giocare un ruolo importante nell'andamento fermentativo (non al livello di un metabolismo respiratorio ma al livello della sintesi dei costituenti la biomassa). Se i meccanismi di azione sono ben conosciuti e

De nombreux paramètres sont susceptibles d'influencer le déroulement de la fermentation alcoolique en conditions oenologiques et, même si la plupart d'entre eux sont bien identifiés, il n'est malheureusement pas question de décrire avec précision leur importance relative lors de chaque fermentation. Malgré tout, il en est certains qui apparaissent particulièrement importants. C'est indiscutablement le cas de l'azote assimilable et de l'oxygène.

Il est maintenant bien établi que l'azote assimilable (composée essentiellement d'azote ammoniacal et a aminé) est, dans les conditions de l'oenologie, le nutriment qui influe le plus sur la cinétique fermentaire. Il existe, en effet, une bonne corrélation entre sa teneur et la vitesse de fermentation (notamment la vitesse maximale, obtenue en début de fermentation) et ce, dans la quasi-totalité de la gamme de concentrations observée dans les moûts (d'environ 50 mg N/l jusqu'à plus de 300 mg N/l). Dans le cas des moûts les plus carencés (teneur inférieure à 150 mg N/l), le manque d'azote assimilable peut non seulement ralentir le déroulement global de la fermentation, mais aussi entraîner un arrêt prématuré.

Il est, aussi, bien établi que l'oxygène peut jouer un rôle important sur la fermenta-

se i bisogni massimali sono stati quantificati (da 10 a 20 mg O₂/l per una fermentazione), il ruolo esatto dell'ossigeno per le fermentazioni alcoliche è più difficile da decifrare rispetto a quello dell'azoto assimilabile.

In effetti, i bisogni sono molto variabili in funzione di parametri difficili da valutare.

tion (non pas au niveau d'un métabolisme respiratoire mais au niveau de la biosynthèse de constituants de la biomasse). Même si les mécanismes d'action sont bien connus et si les besoins maximaux ont été quantifiés (10 à 20 mg O₂/l pour une fermentation), le rôle exact de l'oxygène lors des fermentations alcooliques est plus difficile à décrire que celui de l'azote assimilable.

En effet, les besoins très variables suivant les moûts sont fonction de paramètres difficiles à évaluer (notamment la teneur en facteurs anaérobies de croissance). ■

L'EFFETTO DELLA COMPOSIZIONE AZOTATA DEL MEZZO E DELLO STIPITE DI LIEVITO SULLA FORMAZIONE DI ETILCARBAMMATO

THE EFFECT OF JUICE NITROGEN COMPOSITION AND YEAST STRAIN ON THE FORMATION OF ETHYL CARBAMATE

THOMAS HENICK-KING and INGA-MAI LARSSON
Cornell University, Department of Food Science and Technology, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY, USA

L'etilcarbammato (E.C.) è una potenziale sostanza cancerogena e può formarsi durante la fermentazione alcolica del vino. Uno studio condotto su 15 differenti varietà di uva ha mostrato che il mosto contiene precursori che possono formare E.C. in presenza di etanolo prodotto dai lieviti durante la fermentazione.

Nei mosti analizzati sono stati trovati precursori che con la aggiunta del 12% di etanolo e dopo riscaldamento a 70°C per 48 ore formano dai 19 ai 54 ug/l di E.C.

La citrullina contenuta nel mosto è stata identificata come uno di questi.

Il lievito può metabolizzare dall'arginina urea, da cui si forma E.C. Studi condotti con diversi stipiti di lievito, addizionati a mezzi sintetici e mosto naturale, dimostrano che con basse concentrazioni di azoto assimilabile essi non producono ulteriori precursori di E.C. Questi ultimi invece vengono

Ethyl carbamate (EC) is a potential human carcinogen and may be formed during alcoholic fermentation of wine. A study of 15 different grape varieties showed that grape juice contains precursors which can form EC in the presence of ethanol produced by the yeast during fermentation. The grape juices contained precursors which with the addition of 12% ethanol and after heating at 70°C for 48 hours formed between 19 and 54 ug/l EC. One of the identified precursors in the juice is citrulline. Yeast can contribute urea as EC precursor from the metabolism of arginine. Several studies with various yeast strains in defined, synthetic media and in grape juice showed that in juices with low concentrations of available nitrogen, yeast do not produce additional EC precursors. Yet in juices of large free amino acid content with an arginine concentration of more than 0.3 g/l, yeast can produce additional EC precursors. In nitrogen poor juices, the yeast may

prodotti, qualora il mosto contenga una notevole quantità di amminoacidi liberi e la concentrazione di arginina sia superiore a 0,3 g/l.

In un mosto povero di azoto, il lievito può utilizzare alcuni dei precursori di E.C. e quindi ridurre la quantità finale nel vino. In base a questi studi è risultato che la quantità di essi, che sono prodotti o consumati dal lievito durante la fermentazione alcolica è condizionata dalla composizione azotata del mezzo.

In un mosto ricco di azoto la concentrazione di precursori di E.C. è in parte influenzata dalla differenza del metabolismo azotato esistenti tra i diversi stipiti di lievito, nonché dalla liberazione nel mezzo di precursori di origine cellulare.

rather utilize some of the EC precursors and thus reduce the final amount of EC potentially formed in the wine. These studies indicate that the amount of EC precursors generated or consumed by yeast during alcoholic fermentation is governed mainly by the nitrogen composition of the juice. In nitrogen rich juices the concentration of EC precursors is modified to some extent by yeast strain specific differences of nitrogen metabolism and leakage of precursors from the cell.

LE SOSTANZE VOLATILI PRODOTTE DAI LIEVITI

THE VOLATILE SUBSTANCES PRODUCED BY YEASTS

L. USSEGLIO-TOMASSET
Istituto Sperimentale per l'Enologia, ASTI

Da tutto quello che si è detto si può concludere che i lieviti producono numerosi composti volatili i quali hanno certamente un significato organolettico.

Per alcuni di questi composti la produzione dipende dalla specie, soprattutto dal punto di vista quantitativo, tanto che dalla quantità di qualche composto si può dedurre l'intervento di una specie di lievito particolare.

Per la maggior parte dei composti volatili tuttavia, si osserva non soltanto una grande variabilità quantitativa nell'ambito della specie, ma anche una notevole variabilità nell'ambito dello stesso stipite, nel senso che a parità di substrato e nelle stesse condizioni, lo stesso stipite fornisce risultati diversi in una serie di ripetizioni.

La temperatura ha un'importanza notevole sulla produzione di sostanze volatili ad

From the experiences we did, we found possible to say that yeasts produce numerous volatile compounds which have an organoleptic importance.

For a few of these compounds the production depends on the species, especially from the quantitative point of view, infact we can deduce the intervention of a particular kind of yeasts from the quantity of some compounds.

But, for most of the volatile compounds, we saw a great quantitative variability of the species and also of the strain, in the sense that, with the same substratum and in the same conditions, the same strain gives different results in a series of repetition.

Temperature has a great importance upon volatile substances production done by yeasts. Moreover, temperature seems to be the cause of organoleptic differences with a lower tempera-

opera dei lieviti, non solo, ma la temperatura sembra essere la causa di differenze organolettiche a favore dei vini ottenuti a temperatura più bassa, che non dipendono tuttavia dalle differenze nel contenuto di questa serie di circa 40 composti volatili che sono stati determinati.

Sembra che il gran numero di composti volatili prodotti dai lieviti sia alla base del generale e generico carattere "vinoso", ma che essi non siano responsabili della qualità tipica e specifica di ogni vino.

These organoleptic differences do not depend upon those in contents of that 40 volatile compounds series which have been determined. It seems that the great number of volatile compounds produced by yeasts is at the basis of the common and generic "vinous" character; but it does not seem that these compounds are responsible for the typical and specific quality of each wine.

CARATTERIZZAZIONE DEGLI AROMI DI FERMENTAZIONE, EFFETTI DELLO STIPITE DEL LIEVITO E DELLA COMPOSIZIONE DEL MOSTO. UN APPROCCIO ANALITICO

CARACTERISATION DES AROMES DE FERMENTAZIONE EFFETS DE LA SOUCHE DE LEVURE ET DE LA COMPOSITION DU MOUT. UNE APPROCHE ANALYTIQUE

D. DELTEIL et J.M. JARRY
Institut Cooperatif du Vin. La Jasse de Maurin, 34978 Lattes, France

I risultati presentati in questa sede provengono da due studi effettuati su Chardonnay presso il laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Cooperativo del Vino. L'oggetto delle ricerche era la valutazione degli effetti della composizione del mosto e dello stipite di lievito sulla concentrazione di composti volatili originatesi nel corso della fermentazione alcolica. Il primo studio, realizzato tramite una sperimentazione fattoriale, ha permesso di valutare i fattori composizione del mosto e ceppo di lievito combinati a tre mezzi naturali differenti e due stipiti commerciali (ICV K1 Marcato e ICV D47) con due ripetizioni. La determinazione dei composti volatili è stata realizzata mediante cromatografia in fase gassosa. L'analisi statistica dei risultati sperimentali è stata effettuata con analisi della varianza e analisi nelle componenti principali (ACP). Fra i 28 composti volatili analizzati, tre di essi hanno evidenziato, dif-

Les résultats présentés ici proviennent de deux études menées sur le cépage Chardonnay au laboratoire de Microbiologie de l'Institut Coopératif du Vin. Ces deux études ont pour objet d'évaluer les effets respectifs de la composition du moût et de la souche de levure sur la concentration des composés volatils formés au cours de la fermentation alcoolique.

La première étude, bâtie sur un plan factoriel d'expérience, a permis d'étudier les facteurs composition du moût et souche de levure en combinant trois moûts naturels différents et deux souches commerciales (ICV K1 Marquée et ICV D47) avec deux répétitions. Le dosage des composés volatils a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse. Le traitement statistique des résultats expérimentaux a été effectué par analyse de variance et analyse en composantes principales (ACP). Parmi les 28 composés volatils analysés, 3 d'entre eux ont montré un effet significatif de la souche de

ferenze significative in relazione allo stipite di lievito; sette una differenza significativa dovuta alla composizione del mosto e 10 una differenza significativa rapportabile contemporaneamente allo stipite di lievito e alla composizione del mosto.

La rappresentazione grafica ottenuta con ACP sui composti dipendenti dal fattore lievito o dai due fattori contemporaneamente (13 composti) permette di ben visualizzare i due gruppi di vini fermentati con l'uno o l'altro stipite. I vini Chardonnay fermentati con lo stipite KIM sono caratterizzati da concentrazioni superiori in acetato di isoamile, laurato di etile e esteri totali, ciò senza sostanziale influenza del mosto di origine. I vini fermentati con lo stipite D47 sono caratterizzati da più elevate concentrazioni di capronato e caprilato di etile ma questi livelli sono correlati al mosto. Le diversità analitiche trovano riscontro anche alla degustazione: una forte intensità aromatica conferisce una tonalità di banana e di agrumi per il vino fermentato dallo stipite KIM; una migliore espressione del ceppo con tonalità dominanti di ananas e spezie per i vini fermentati da D47.

Un secondo studio condotto con un solo stipite di lievito ha permesso di valutare gli effetti del profilo di azoto assimilabile (equilibrio fra aminoacidi) e livello in azoto assimilabile sulla concentrazione degli stessi composti volatili, combianando due profili di aminoacidi e due livelli di azoto con due ripetizioni. Lo studio è stato condotto su mosti sintetici elaborati tenendo conto dei dati bibliografici circa la composizione azotata del mosto Chardonnay. Lo stesso metodo di analisi statistica è stata applicata ai risultati dell'analisi cromatografica. L'effetto del fattore profilo azotato è significativo per due composti; l'effetto del fattore livello di azoto per 5 composti e l'effetto simultaneo dei due fattori per 10 composti. La rappresentazione grafica ottenuta dall'ACP basata sui composti dipendenti dal fattore livello azoto o dai due fattori simultaneamente (15 composti) permette di differenziare bene i due

levure; 7, un effet significatif de la composition du moût et 10, un effet significatif simultané de la souche de levure et de la composition du moût. La représentation graphique issue de l'ACP portant sur les composés dépendant du facteur souche ou des deux facteurs simultanément (13 composés) permet de bien visualiser les deux groupes de vins fermentés avec l'une ou l'autre souche. Les vins de Chardonnay fermentés avec la souche KIM sont caractérisés par des concentrations supérieures en acétate d'isoamyle, laurate d'éthyle et esters totaux et ce, sans influence notable du moût d'origine. Les vins fermentés avec la souche D47 sont, eux, caractérisés par des concentrations plus fortes en caproate et caprylate d'éthyle mais ces niveaux sont très dépendants du moût. Ces différences analytiques se retrouvent a la dégustation: une forte intensité aromatique dans un style où dominant la banane et les agrumes pour les vins de KIM; une meilleure expression du cépage dans un style où dominant l'ananas et les épices pour les vins de D47.

Une deuxième étude menée avec une seule souche a permis d'évaluer les effets respectifs des facteurs profil d'azote assimilable (équilibre relatif entre les acides aminés) et niveau en azote assimilable (quantité globale respectant les profils) sur la concentration des mêmes composés volatils en combinant deux profils d'acide aminés et deux niveaux d'azote avec deux répétitions. De par ses objectifs, cette étude a dû être menée sur des moûts synthétiques élaborés à partir de données bibliographiques sur des compositions azotées de moûts de Chardonnay. Le même type d'analyse statistique a été appliquée aux résultats de l'analyse chromatographique. L'effet du facteur profil azote est significatif pour 2 composés; l'effet du facteur niveau azote, pour 5 composés; et l'effet simultané des deux facteurs, pour 10 composés. La représentation graphique issue de l'ACP portant sur les composés dépendant du facteur niveau azote ou des deux facteurs simultanément (15 composés) permet de bien différencier les deux groupes de vins. Les vins issue de moûts à forte teneur en azote sont caractérisés

gruppi di vino. I vini ottenuti da mosti a forte tenore d'azoto sono caratterizzati da una maggiore concentrazione in acetati, esteri totali e isobutanolo. All'olfatto, questi vini sono stati giudicati più florali e più fruttati, ciò che corrisponde all'effetto aromatico degli acetati. Il primo impatto all'odorato è prolungato da una nota di crosta di pane e di speziato per la presenza di butan-diolo, caprilato e lattato di etile sono i più elevati, composti dipendenti dal profilo di azoto nel mosto.

par des concentrations supérieures en acétates, esters totaux et isobutanol. A l'olfaction, ces vins sont jugés plus floraux et plus fruités, ce qui correspond aux effets aromatiques connues des acétates. Ce premier nez est prolongé par des notes grillées et épicées dans les vins où les concentrations en butanediols, caprylate et lactate d'éthyle sont les plus élevées, composés dépendant, eux, du profil azoté des moûts.

REALIZZAZIONE E PROSPETTIVE DEL MIGLIORAMENTO GENETICO DEGLI STIPITI DI LIEVITO

REALISATIONS ET PERSPECTIVES DE L'AMELIORAZION GENETIQUE DES SOUCHES DE LEVURES

F. VEZINHET

I.N.R.A. - Institut des Produits de la Vigne 2, place Viala 34060 Montpellier Cedex 1, France

Nel caso di una fermentazione alcolica in purezza si può prospettare la modificazione del patrimonio genetico dello stipite al fine di migliorare o adattare le sue proprietà tecnologiche. Questa modificazione può avere per oggetto la soppressione di un difetto o l'acquisizione di una proprietà o la regolazione di una proprietà esistente. Il miglioramento genetico è condizionato alla conoscenza dello stipite e soprattutto alla caratterizzazione precisa della proprietà da modificare. Il livello di definizione biochimica di questa proprietà consente di orientare la scelta della tecnica genetica da adottare. L'intervento sarà tanto più preciso quanto migliore sarà la definizione della proprietà da modificare.

Alcune realizzazioni del programma in corso che prevedano l'applicazione delle differenti tecniche genetiche saranno discusse.

L'utilizzazione della mutazione per ottenere stipiti marcati, o mutanti produttori meno alcoli superiori o produttori aroma di moscato.

Dans le cadre d'une fermentation alcoolique en souche pure, on peut envisager la modification du patrimoine génétique de la souche afin d'améliorer ou d'adapter ses propriétés technologiques. Cette modification peut avoir pour objectif la suppression d'un défaut, l'acquisition d'une propriété nouvelle ou la régulation d'une propriété existante. L'amélioration génétique est conditionnée par la connaissance de la souche mais surtout par la caractérisation fine de la propriété à modifier. Le niveau de définition biochimique de cette propriété va orienter le choix de la technique génétique à mettre en oeuvre. L'intervention sera d'autant plus précise que la propriété à modifier sera mieux définie.

Quelques réalisations ou programmes en cours mettant en oeuvre les différentes techniques génétiques disponibles seront exposées.

L'utilisation de la mutation pour l'obtention de souches marquées, de mutants produisant moins d'alcools supérieurs ou de mutants produisant des arômes de muscat.

L'utilizzazione dell'ibridazione per ottenere stipiti flocculanti e non produttori di idrogeno solforato (H_2S).

L'utilizzazione della fusione di protoplasti per costruire ibridi fra *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*.

L'utilizzazione della citoduzione per trasferire un solo cromosoma e ottenere così ceppi flocculanti.

L'utilizzazione di transfert di geni per ottenere uno stipite avente la doppia attività killer K1 e K2 o uno stipite che ha acquisito il gene batterico dell'enzima malolattico.

In avvenire, le tecniche poco precise quali la mutazione o l'ibridazione resteranno utilizzabili a complemento della selezione naturale per un miglioramento poco mirato degli stipiti dei lieviti enologici. Per conto, per tutti gli obiettivi ben definiti che possono ridursi a uno solo o a pochi geni da modificare, le tecniche di biologia molecolare dovranno apportare, in avvenire, un significativo contributo al miglioramento genetico degli stipiti enologici.

L'utilisation de l'hybridation pour l'obtention de souches flocculantes et ne produisant pas d'hydrogène sulfureux (H_2S).

*L'utilisation de la fusion de protoplastes pour construire des hybrides entre *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*.*

L'utilisation de la cytoduction pour transférer un seul chromosome et ainsi obtenir des souches flocculantes.

L'utilisation du transfert de gènes pour obtenir une souche ayant la double activité killer K1 et K2 ou une souche ayant acquis le gène de l'enzyme malolactique bactérien.

Dans l'avenir, les techniques peu précises telles que mutation ou hybridation resteront utilisables, en complément de la sélection naturelle pour une amélioration peu ciblée des souches de levures oenologiques. Par contre, pour tous les objectifs bien définis et pouvant se ramener à un seul ou à un petit nombre de gènes à modifier, les techniques de biologie moléculaire devraient apporter dans l'avenir une contribution significative à l'amélioration génétique des souches oenologiques. ■

PROPOSTA DI UN METODO DI IDENTIFICAZIONE DI STIPTI DI LIEVITI CON CARATTERISTICHE ENOLOGICHE

PROPOSITION D'UNE METHODOLOGIE D'IDENTIFICATION DE SOUCHES DE LEVURES A CARACTERISTIQUES OENOLOGIQUES

FRANÇOIS LAVALLÉE

Lallemand Inc., 6100 Royalmount, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2

La caratterizzazione di stipiti di lieviti con caratteristiche enologiche pone un problema particolare; in effetti la stragrande maggioranza di questi stipiti fa parte della stessa specie di lievito, *Saccharomyces cerevisiae*. Sebbene certi stipiti siano facilmente identificabili mediante le tecniche classiche della microbiologia, parecchi manifestano gli stessi comportamenti e caratteristiche. Dopo l'avvento e la messa in commercio dei lieviti specifici, comprendenti fra loro lieviti di tipo

*La caractérisation des souches de levures à caractéristiques enologiques pose un problème particulier. En effet, la vaste majorité de ces souches fait partie de la même espèce de levure, soit les *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que certaines de ces souches soient facilement identifiables par les techniques classiques de la microbiologie, plusieurs affichent les mêmes comportements et caractéristiques entre elles. Depuis l'avènement et la mise en marché des levures dites de spécialité, regroupant entre*

enologici, è imperativo applicare nuove metodologie che permettano un più grande potere discriminante fra gli stipiti di lieviti.

L'avvento della biologia molecolare e delle tecniche ad essa associata ha permesso l'elaborazione di analisi sofisticate per lo studio degli organismi attraverso gli intermedi del loro materiale genetico. Lo studio del materiale genetico per l'identificazione di stipiti di lieviti comporta diversi vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali: stabilità del materiale, riproducibilità dei risultati indipendentemente dalle condizioni di fermentazione nonché rapidità di esecuzione. Gli stipiti sono identificati attraverso la formazione di profili unici di tipo "codice a barre" generalmente chiamati impronte genetiche. Questi profili o impronte sono successivamente analizzate grazie ad un apposito programma di trattamento delle immagini che digitalizza i risultati, li immagazzina su disco rigido e ne fa l'analisi comparativa. Siamo in grado pertanto di identificare lo stipite e di compararlo ad altri campioni o con la banca di stipiti in nostro possesso. Nel corso della trattazione verrà analizzata una delle recenti metodologie basata sulle impronte genetiche per RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Saranno altresì elaborate le applicazioni della tecnica come pure le procedure di analisi informatica.

autres les levures de type conologiques, il était impératif de mettre en application de nouvelles méthodologies qui permettraient un plus grand pouvoir de discrimination entre les souches de levures.

L'apparition de la biologie moleculaire, et des techniques y étant associées, a permis l'élaboration d'analyses de pointe pour l'étude des organismes par l'intermédiaire de leur matériel génétique. L'étude du matériel génétique pour l'identification des souches de levures comporte plusieurs avantages par rapport aux techniques traditionnelles: stabilité du matériel, reproductibilité des résultats indépendamment des conditions de fermentation et rapidité d'exécution. Les souches sont identifiées par la génération de profils uniques de type "bar code" généralement appelés empreintes génétiques. Ces profils ou empreintes, sont par la suite étudiés grâce à un logiciel de traitement d'image qui digitalise les résultats, les emmagasine sur disque dur et en fait l'analyse comparative. Nous sommes donc en mesure d'identifier les souches et de les comparer aux échantillons testés précédemment ou à la banque de souches en notre possession.

La présentation portera sur une de ces récentes méthodologies, soit les empreintes génétiques par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). La technique et ses applications, ainsi que la procédure d'analyse informatique seront élaborés. ■

CONTROLLO DELLA PUREZZA FERMENTATIVA: RICONOSCIMENTO DEI CEPPI DELLA SPECIE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

THE FERMENTATION PURITY CONTROL: SACCHAROMYCES CEREVISIAE STRAINS IDENTIFICATION

M. STELLA GRANDO e A. CAVAZZA

Istituto Agrario, Via Mach, I-38010, San Michele all'Adige Trento, Italy

Nel corso dell'ultima vendemmia, sono state seguite numerose vinificazioni, condotte in cantine del Trentino, mediante prelievi di mosto in diverse fasi del processo tecnologico-fermentativo.

During the last vintage a number of vinifications, carried out in cellars of Trentino, have been controlled through the taking of must samples in different phases of the technological-fermentative process.

Nel 30% dei casi esaminati è stata riscontrata la presenza di lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae* nei mosti, prima dell'inoculo con ceppi selezionati.

Per valutare la composizione dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* presenti in vari momenti della fermentazione, gli isolati sono stati caratterizzati in base al loro cariotipo elettroforetico.

Per tale analisi, le cellule sono state prelevate da singole colonie, ottenute direttamente dai mosti, dopo 48 ore di coltura su terreno WL Agar, con una buona riduzione dei tempi di preparazione dei campioni.

L'opportunità di impiegare questo metodo per un controllo delle fermentazioni viene presentata con alcuni esempi di applicazione.

Saccharomyces cerevisiae yeasts were found in the 30% of checked cases before inoculation with selected strains.

To evaluate the composition of the Saccharomyces cerevisiae strains during the fermentation, the isolated yeasts were characterized by electrophoretic chromosome karyotyping.

For such analysis the cells were taken from single colonies directly isolated from the musts, after 48 hours of culture on WL Agar, with an important decrease in the samples preparation time.

The suitability of this method in the fermentations control is shown with some application examples.

ANALISI DI FRAMMENTI DI RESTRIZIONI DEL DNA MITOCONDRIALE DI ALCUNI CEPPI DI LIEVITO

RESTRICTION FRAGMENTS ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA OF SOME YEAST STRAINS

C. COLELLA, A. NEPI, M. POLSINELLI

Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze

L'analisi dei profili di restrizione del DNA mitocondriale può essere utilizzata per una caratterizzazione molecolare di ceppi di lievito. Questo tipo di analisi è stata applicata a ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Zygosaccharomyces florentinus*, *Saccharomyces ludwigii*, utilizzando diversi enzimi di restrizione.

The electroforetic pattern of mitochondrial DNA cut with restriction endonucleases can be used to characterize molecularly yeast strains. This type of analysis has been performed on strains of Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus, Zygosaccharomyces florentinus, Saccharomyces ludwigii after digestion of their mitochondrial DNA with a number of restriction enzymes.

IL SISTEMA DELLE ALCOL DEIDROGENASI (ADH) IN LIEVITI DI SPECIE DIVERSE THE ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH) SYSTEM IN DIFFERENT YEAST SPECIES

CLAUDIO FALCONE

Dip. Biologia Cellulare e Sviluppo. Università di Roma "La Sapienza", Piazzale A. Moro - 000185 ROMA

La produzione di etanolo nei lieviti dipende, tra i vari fattori che l'influenzano, dal-

Ethanol production in yeast cells is dependent, beside other parameters, on the fer-

le capacità fermentative dello stipite. Le alcol deidrogenasi (ADH) svolgono un ruolo chiave nella fermentazione in quanto catalizzano l'interconversione tra l'aldeide acetica e l'etanolo.

Il numero degli isoenzimi ADH presenti nella cellula di lievito varia al variare della specie considerata. In *Saccharomyces cerevisiae* sono presenti tre geni che codificano per attività alcol deidrogenasiche mentre un solo gene è presente nello *Schizosaccharomyces pombe*.

Noi abbiamo identificato quattro geni ADH nel lievito *Kluyveromyces lactis*. Questi geni sono stati caratterizzati a livello molecolare e sono risultati essere tutti attivi all'interno delle cellule.

Il numero dei geni ADH non sembra essere direttamente correlato alla capacità fermentativa dei lieviti dal momento che il *Kluyveromyces lactis*, pur possedendo quattro geni, è normalmente uno scarso produttore di etanolo.

Abbiamo studiato la regolazione dell'espressione di questi geni in cellule di *K. lactis* cresciute su fonti di carbonio fermentabili e non fermentabili.

I risultati della nostra analisi hanno mostrato che mentre in *S. cerevisiae* la regolazione dell'espressione dei geni ADH consente l'accumulo di etanolo, nelle cellule di *K. lactis* le attività ADH potrebbero essere responsabili dell'utilizzazione aerobica dell'etanolo prodotto durante la fermentazione.

mentative properties of strains. Alcohol dehydrogenases (ADH) are key enzymes in alcohol production in that interconvert acetaldehyde to ethanol.

The number of the ADH isozymes present in the cell is variable among yeasts belonging to different species. Three genes encoding alcohol dehydrogenase activities are present in Saccharomyces cerevisiae while only one gene is present in Schizosaccharomyces pombe. We have found four ADH genes in the yeast Kluyveromyces lactis. These genes have been isolated and characterized at the molecular level and we demonstrated that all the four genes are active within the cell.

The number of the ADH genes seems not related to the fermentative capacity of yeasts since Kluyveromyces lactis is a poor ethanol producer.

We investigated the regulation of the expression of these genes in K. lactis cells growing on fermentable and non-fermentable carbon sources.

The results of our analysis indicated that while in S. cerevisiae the regulation of the expression of the ADH genes allows the accumulation of ethanol, in K. lactis cells the ADH activities could be responsible for the aerobic utilization of the ethanol produced by fermentation.

IL METABOLISMO DEGLI ACIDI ORGANICI DA PARTE DEI LIEVITI THE YEAST METABOLISM OF ORGANIC ACIDS

FERDINAND RADLER

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Postfach 3980, D6500 Mainz, Germany

Il metabolismo degli acidi organici dipende dallo stipite di lievito e dalle condizioni di fermentazione; lieviti del genere *Sac-*

Depending on the yeast strain and the conditions of fermentation, yeasts of the genus Saccharomyces do not only utilize sugars but

charomyces non solo utilizzano lo zucchero ma mostrano anche un significativo metabolismo degli acidi organici.

Si formano diversi acidi carbossilici, l'acido succinico è prodotto attraverso la via ossidativa in presenza di glutammato. Alte concentrazioni di zucchero e limitate concentrazioni dei composti dell'azoto portano alla formazione del malato, reazione che è probabilmente catalizzata da una carbossilasi piruvato biotina-dipendente.

Vari stipti di lieviti mostrano grandi differenze nella produzione anaerobica dello acido acetico, in funzione della concentrazione di zuccheri, della sorgente di azoto e del pH. L'attività dell'aldeide deidrogenasi NADP-dipendente evidenzia una correlazione con la formazione di acido acetico mediante differenti stipti di lieviti. Un singolo stipte di lievito appartenente alla specie *Torulopsis pretoriensis* forma acido lattico dalla riduzione del piruvato. Ossi e idrossi acidi come il piruvato, 2-ossiglutarato e altri vengono considerati come metaboliti del metabolismo degli aminoacidi. La loro formazione è favorita quando la quantità dell'azoto è al disotto del valore ottimale. I lieviti del vino del genere *Saccharomyces* sono capaci di metabolizzare il malato durante la fermentazione ma, normalmente, solo piccole quantità sono degradate, quindi si ha solo una limitata variazione di acidità. Il malato è decarbossilato ossidativamente a piruvato per mezzo di un enzima malico NAD-dipendente. Il piruvato è decarbossilato ad acetaldeide che a sua volta è ridotta ad etanolo. Lieviti di differenti generi posseggono enzimi malici con differenti affinità per il substrato e differenti sistemi di trasporto. Non sono stati molto soddisfacenti i tentativi volti a sviluppare lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae* con abilità a fermentare malato.

Nel vino, gli acidi organici contribuiscono significativamente al sapore e quasi tutti gli acidi hanno origine dai lieviti secondo diverse vie metaboliche.

*also show a significant metabolism of organic acids. Several carboxylic acids are formed. Succinic acid is mainly formed by the oxidative pathway in the presence of glutamate. High sugar concentrations and limiting concentrations of nitrogen compounds lead to malate formation that is probably catalyzed by a biotin-dependent pyruvate carboxylase. Various yeast strains show great differences in the anaerobic production of acetic acid depending on the sugar concentration, the nitrogen source and the pH. The activity of the NADP-dependent aldehyde dehydrogenase shows a correlation with the formation of acetic-acid by different yeast strains. Strains forming high amounts of acetic acid are not likely to be suitable for wine fermentation. Single yeast strains belonging to the species *Torulopsis pretoriensis* form lactic acid by reducing pyruvate. Oxo and hydroxy acids like pyruvate, 2-oxoglutarate and others are regarded as metabolites of the amino acid metabolism. Their formation is favoured at suboptimum nitrogen supply. - Wine yeasts of the genus *Saccharomyces* are capable of metabolizing malate during fermentation, but usually only small amounts are degraded, therefore only a minor change in acidity is caused. Malate is oxidatively decarboxylated to pyruvate by a NAD-dependent malic enzyme. Pyruvate is decarboxylated to acetaldehyde which is reduced to ethanol. Yeasts of different genera possess malic enzymes with different substrate affinities and very different transport systems. So far, attempts to employ yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* with an ability to ferment malate have not been very satisfactory. In wine, organic acids contribute significantly to the taste and almost all acids are affected by yeasts in various ways.*

CONTRIBUTI SPERIMENTALI SUI FATTORI METABOLICI E TECNOLOGICI
CHE AGISCONO SULLA PRODUZIONE DI AC. ACETICO DA PARTE DEI LIEVITI
DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

STUDY ON METABOLIC AND TECHNOLOGICAL FACTORS CAUSING PRODUCTION
OF LARGE AMOUNTS OF ACETIC ACID BY YEASTS DURING
ALCOHOLIC FERMENTATION

C. DELFINI

Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

Sono stati valutati gli effetti delle operazioni tecnologiche, dei coadiuvanti la fermentazione alcolica, di chiarifica e di filtrazione, sulla produzione di acido acetico da parte dei lieviti. Alla luce dei risultati ottenuti è possibile affermare che nei mezzi naturali esistono fattori nutritivi agenti sulla produzione di acido acetico da parte del lievito nel corso della fermentazione alcolica.

Gli effetti esaltanti sulla produzione di ac. acetico delle chiarifiche con coadiuvanti antiproteici, del riscaldamento delle uve a 90 °C e dell'acidificazione dei mosti supportano l'ipotesi di un'interazione del fattore nutritivo con fattori di natura proteico-enzimatica del mosto e/o del lievito sui componenti del mosto stesso.

Wine yeast strains produce acetic acid (Ac.) in different amounts and they can be distinguished into two groups when they are cultivated in a synthetic nutritive medium (MNS): low Ac.-producers (L-Ac.) and high Ac.-producers (H-Ac.). Generally, strains belonging to S. cerevisiae v. uvarum are very L-Ac. However, in musts coming from white or red grapes, particularly if they are rapidly separated from the skins, both groups can be strongly influenced by previous clarification (cl) and filtration (fi) or separation of the limpid supernatant (defecation) (de). Clarification using silica gel and

gelatine (24 g/hl and 12 g/hl respectively added) followed by filtration through diatom powder produced the highest amounts of acetic ac.

"Super" flower defecated grape must cause higher production of acetic ac. than (in decreasing order) first pressure must, second pressure must, on skin macerated must and third pressure must. Clarification with silica gel and gelatine without taking off the deposit did not increase the Ac. formation. Must obtained from grapes heated at 90 °C for 30 minutes before crushing, defecated or not, induced a higher production of acetic ac. particularly with yeast strains H-Ac. A pH of 2.9 increased the production of acetic ac. particularly in clarified and defecated fresh musts, or in those coming from heated grapes.

Vitamins B1 and pantothenic ac. and nitrogen content did not affect significantly the production of acetic ac. if the covariates alcohol and cell mass productions are taken into account.

Tween 80 (polyoxyethylenesorbitan monoleate) decreased the production of acetic ac. in MNS.

The addition to the clarified with gelatine and silica gel and centrifuged must Inert material (as quartz powder, glass beads, talc) or oenological coadiuvants for clarification (as charcoal, bentonite and diatom powder's) did not influence the acetic acid production. The addition, instead, of 10% of a clarification deposit, obtained by gelatine and silica gel, decreases consistently the production of acetic acid.

Thus the existence of a nutritive factor/s that acts on the acetic ac. production by yeasts during alcoholic fermentation is demonstrated.

The standing out effects on acetic ac. production of clarifications with antiproteic coad-

juvants, heating treatments of grapes and acidifications of musts support the hypothesis about an interaction between nutrient factors and enzymatic factors of the must and/or of the yeast on the same must components. ■

IL METABOLISMO DELL'ACIDO ACETICO AD OPERA DI LIEVITI DI SPECIE DIVERSE NEL CORSO DI RIFERMENTAZIONI ALCOLICHE

THE METABOLISM OF ACETIC ACID DUE TO A THE YEASTS OF VARIOUS SPECIES IN THE PROCESS OF REFERMENTATION

PIRACCI A., LOVINO R., CIOLFI G.
Istituto Sperimentale Enologia S.O.P. Barletta

È stata condotta una rifermentazione con lieviti di specie diverse (*Saccharomyces cerevisiae* r.f. *Bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum*, *Schizosaccharomyces japonicus*) su mezzo addizionato di acido acetico in presenza di differenti condizioni nutrizionali.

Si è indagato sulle vie metaboliche secondo le quali viene riciclato l'acido acetico nel mezzo in rifermentazione.

È stata osservata la modificazione degli equilibri cellulari interni indotti dall'acido acetico come pure la buona attività dell'estratto cellulare a freddo al fine di apportare correzioni nutrizionali.

Si è infine rilevato come *Saccharomyces r.f. uvarum* sia meno sensibile della r.f. *cerevisiae* agli squilibri nutrizionali del mezzo.

We conducted a refermentation with Saccharomyces cerevisiae r.ph. bayanus, Saccharomyces cerevisiae r.ph uvarum and with Schizosaccharomyces japonicus on a medium added with acetic acid at the presence of different nutritional conditions.

We investigated the metabolic ways by which the acetic acid is recycled in the medium in refermentation.

We observed the change in the internal cellular equilibriums brought by acetic acid.

We saw confirmed the action of the cellular extract, obtained by cold, in order to bring nutritional corrections.

In the end we saw how Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum is less sensitive to nutritional packs of equilibrium of the medium.

INDAGINE SULL'IMPORTANZA DI ALCUNI FATTORI PER IL CONSEGUIMENTO DI ELEVATE GRADAZIONI ALCOLICHE CON MOSTI DA UVE PASSITE.

STUDY ON THE IMPORTANCE OF SOME FACTORS ON THE ACQUISITION OF HIGH ALCHOL CONTENT EMPLOYING MUSTS FROM PARTIALLY DRIED GRAPES

MARIO CASTINO

Istituto Sperimentale per l'Enologia di Asti. Sezione di Tecnologia Enologica.

I vini liquorosi possono venir elaborati con svariate tecnologie; in particolare l'elevata gradazione viene spesso ottenuta per aggiunta di alcole o di distillati di vino. Nondimeno molti considerano il liquoroso ideale quello che origina dalla fermentazione naturale di un mosto di adeguata composizione. Il notevole tenore zuccherino necessario per conseguire il grado desiderato, è ottenuto quasi sempre con l'appassimento delle uve. Questo processo peraltro comporta la trasformazione dell'azoto in forme meno facilmente assimilabili dai lieviti. Di conseguenza possono insorgere difficoltà per quanto riguarda l'andamento della fermentazione.

Considerate tali premesse, si è voluto accertare se determinati interventi volti a migliorare la composizione edafica dei mosti (addizione di tiamina e di azoto ammoniacale) potessero migliorare l'andamento fermentativo e il tenore alcolico raggiunto. Si è inoltre sperimentato un processo fermentativo proposto di recente per favorire la fermentazione di mezzi ad elevato contenuto zuccherino e che consiste nell'addizione ad un'aliquota in fermentazione di successive porzioni del mezzo stesso. Le prove sono state condotte su tre mosti ottenuti da partite di uve appassite (due di Moscato bianco; una di Erbaluce). La temperatura è stata mantenuta a 17-18° C. Per l'inoculo si sono utilizzati normali lieviti secchi attivi del commercio.

I risultati osservati hanno posto in luce alcune interessanti particolarità. La tecnica delle aggiunte successive, come pure le addizioni di tiamina e di azoto assimilabile non hanno conseguito risultati significativi per quanto concerne la gradazione alcolica rag-

Dessert wines form a family of related but diverse type, derived from the method of production. Whilst some of these wines are fortified with spirit or brandy, there are numbers of technicians who thinks that many good dessert wines are obtained from fermentation of naturally high percent sugar musts. To achieve a sufficiently high degree of sugars to produce the wanted percent of alcohol, the grapes are often partially dried. Such a process yet generates musts with inadequate nitrogen sources utilisable by yeasts. As a consequence, lacking or stuck fermentation might arise.

In view of the above, it seemed convenient to ascertain whether some interventions (addition of thiamine and ammonium nitrogen) aimed to improve the edaphic composition of musts would help the fermentation so increasing the alcoholic degree as well. A new fermentation procedure favouring the fermentation of media with a high sugar content, in which amounts of the must are continuously added to a fermenting part, has been tested. The tests have been carried out on 3 musts from partially dried grapes (2 from White Muscat, one from Erbaluce). The temperature was kept at 17-18° C. The media were inoculated with active dried yeasts from the market.

The observed results points to the conclusion that neither the method of successive additions, nor supplementation with thiamine and ammonium salts are contributing factors for the thiamine and ammonium salts are contributing factors for the thiamine and ammonium salts are contributing factory for the reached alcoholic content. Nevertheless it is questionable if such a result might be ascribable to some extent to the low fermentation

giunta. Si può supporre che a temperature più elevate e quindi meno favorevoli, la situazione a tale proposito potrebbe modificarsi. Molto interessante è invece l'accertamento del fatto che la tecnica delle aggiunte successive ha provocato una netta diminuzione dell'acidità volatile, particolare molto interessante soprattutto per determinati prodotti. Anche il glicerolo formato è diminuito in media del 31%, indice che il metabolismo della fermentazione in tali condizioni viene profondamente modificato. Sembra quindi interessante proseguire l'indagine su scala semindustriale per accertare eventuali conseguenze sulle caratteristiche sensoriali dei vini ottenuti.

temperature. The most important facts to recognize are the decrease in the volatile acidity and glycerol content. Even if the first ascertainment is of noticeable practical interest, more detailed studies on the metabolism induced by such a method of fermentation as well as on the sensory properties of produced wines remains a goal for future work.

INDAGINE PRELIMINARE SULL'IDONEITÀ ENOLOGICA DI ZYGOSACCHAROMYCES

PRELIMINARI CHARACTERIZATION OF ZYGOSACCHAROMYCES FOR OENOLOGICAL PURPOSE

PATRIZIA ROMANO e GIOVANNA SUZZI

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, sezione Microbiologica, Università di Bologna, Via F.lli Rosselli 107, Coviolo, Reggio Emilia, Italia.

Cinquanta ceppi di *Zygosaccharomyces*; isolati da mosti provenienti da zone diverse dell'Italia, sono stati identificati a livello di specie, risultando per la maggior parte *Zygosacch. bailii* e *fermentati*. Questi sono stati saggiati per alcuni caratteri di interesse enologico. Nei riguardi del tipo di sviluppo, il 50% dei ceppi ha mostrato capacità di flocculare e di questi la maggior parte appartiene alla specie *Zygosacch. bailii*. La capacità di formare schiume alte e persistenti durante la fermentazione è stata riscontrata solo nella specie *Zygosacch. fermentati*. I ceppi di *Zygosacch. fermentati* hanno mostrato una migliore energia fermentativa rispetto ai ceppi di *bailii* e pressoché allo stesso livello dei migliori ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*. Il vigore fermentativo in presenza di anidride

Fifty strains of Zygosaccharomyces from different Italian musts were identified by a large majority as Zygosacch. bailii and fermentati. These strains were tested for some oenological characteristics. About 50% of strains showed flocculation capacity and most of these were Zygosacch. bailii. Foaming ability during must fermentation was shown only by Zygosacch. fermentati. The strains of Zygosacch. fermentati exhibited a better fermentation vigour than bailii strains and on the same level as the more vigorous strains of Saccharomyces cerevisiae. Sulfur dioxide (100 mg/l) affected considerably culture fermentation vigour in Zygosacch. bailii, whereas fermentati strains showed a good resistance. Generally, the strains of both species produced consistent amounts of SO₂ within 10 mg/l. Regarding pro-

solforosa (100 mg/l) è risultato particolarmente ridotto in *Zygosacch. bailii*. Maggiore resistenza è stata osservata in *Zygosacch. fermentati*. La produzione di anidride solforosa nelle due specie è risultata generalmente uniforme e compresa nei 10 mg/l. Notevoli differenze tra le due specie esaminate si riscontrano, invece, nella produzione di idrogeno solforato, acido acetico ed altri composti. Significative differenze sono state notate inoltre nel metabolismo dell'acido malico.

duction of H₂S, acetic acid and other compounds considerable differences were found between the species. In addition, significative differences were noticed in the metabolism of malic acid.

L'ORIGINE DEGLI ESTERI INDESIDERATI NEL VINO

THE ORIGIN OF THE ESTER TAINT IN WINE

W.R. SPONHOLZ

Microbiology and Biochemistry Forschungsanstalt, D 6222 Geisenheim, Germany

Il lievito *Hanseniaspora uvarum* (H.u.) è sempre coinvolto all'inizio della fermentazione e può causare inconvenienti indesiderati nel vino quando l'acetato di etile viene prodotto in quantità maggiore di 180 mg/l. Nel corso delle ricerche è stato isolato uno stipite killer di H.u. e uno stipite sensibile di *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.). Sono state inoculate combinazioni di uno stipite killer e neutro di H.u. con uno stipite sensibile e neutro di S.c.; quindi è stata seguita sia la riproduzione di cellule dei vari stipiti, sia la formazione di esteri.

I lieviti H.u. influenzano negativamente lo sviluppo di S.c.; la formazione degli esteri dipende molto dalla abilità di H.u. a fermentare. Il maggior numero di H.u. causa una maggiore quantità di esteri ancora prima che S.c. prenda il sopravvento.

Anche se lo stipite non killer forma una più alta quantità di esteri durante la cofermentazione con piccole percentuali di S.c., lo stipite killer viene preferito.

The yeast Hanseniaspora uvarum (H.u.) is always involved in the beginning of the fermentation. It is causing a taint in wine, when acetic acid ethyl ester in amounts higher than 180 mg/l is produced. A killer strain of H.u. against a sensitive strains of Saccharomyces cerevisiae (S.c.) was isolated. Combinations of a killer and a neutral strain of H.u. with a sensitive and a neutral strain of S.c. were inoculated.

The cell formation and the production of the ester was analysed. H.u. influences the development of S.c., reducing the cell numbers formed. The formation of the ester is very dependend on the ability of H.u. to ferment. High numbers of H.u. cause high amounts of the ester, before it is overgrown by S.c. and dies out.

Wether the non killer-strain is also forming high amounts of the ester during cofermmentation with small numbers of S.c., the killer-strain is more important. To prevent wines to be spoiled by the ester, the use of a strong S.c.

Per avere un ottimo prodotto, il vino deve possedere bassi tenori in esteri non desiderati per cui viene raccomandato l'uso di colture adeguate di S.c., l'aggiunta di anidride solforosa quando il clima è piuttosto caldo e quando si utilizza uva poco sana.

culture, or the addition of SO₂, mainly for warm climates and when using infected grapes, is recommended.



Sono stati presentati i seguenti posters:

CONTROLLO DELLA PUREZZA FERMENTATIVA: RICONOSCIMENTO DELLE SPECIE DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES

THE FERMENTATION PURITY CONTROL: DETECTION OF THE NON-SACCHAROMYCES YEASTS

AGOSTINO CAVAZZA, MARIA STELLA GRANDO e CINZIA ZINI
Istituto Agrario, Via March, 1 - 38010 San Michele all'Adige - Trento

RIFERMENTAZIONI DI DIFFERENTI SUBSTRATI AD OPERA DI SPECIE DI LIEVITI DIVERSI IN PRESENZA DI ELEVATI TENORI DI ACIDO ACETICO

REFERMENTATIONS OF SOME MEDIUM, INCLUDED HIGH AMOUNT OF ACETIC ACID, BY DIFFERENT YEASTS STRAINS

LOVINO R., PIRACCI A., SCAZZARIELLO M.
Istituto Sperimentale Enologia S.O.P. Barletta

INFLUENZA DEI TRATTAMENTI ANTIPARASSITARI SULLA DISTRIBUZIONE DELLA MICROFLORA DELLE UVE

INFLUENCE OF FUNGICIDES APPLICATIONS ON GRAPE MICROORGANISMS DISTRIBUTION

GAIA P., DELFINI C., PAGLIARA A.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

STUDIO BIOMETRICO SULLA PRODUZIONE DI ACIDI GRASSI C₈, C₁₀, C₁₂ E LORO ESTERI ETILICI DA PARTE DEI LIEVITI NEL CORSO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA

BIOMETRIC STUDY ON PRODUCTION OF FATTY ACIDS C₈, C₁₀, C₁₂ AND THEIR ETHYLIC ESTES BY WINE YEASTS DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

RAVAGLIA S., DELFINI C.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

PRODUZIONE, MIGLIORAMENTO GENETICO E DIFFUSIONE DI LIEVITI SELEZIONATI PER L'INDUSTRIA ENOLOGICA. PROGETTO "COLLEZIONE NAZIONALE DEI LIEVITI E DEI BATTERI SELEZIONATI DEL VINO" - MINISTERO AGRICOLTURA E FORESTE

PRODUCTION, GENETIC IMPROVEMENT AND DIFFUSION OF SELECTED WINE YEAST. PROJECT "NATIONAL COLLECTION OF SELECTED WINE YEASTS AND BACTERIA". AGRICULTURAL AND FORESTAL MINISTER

BARDI L., DELFINI C.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

CRITERI METODOLOGICI SEGUITI. RISULTATI OTTENUTI E PROSPETTIVE NELLA SELEZIONE DI LIEVITI PER USO ENOLOGICO

METHODOLOGY FOLLOWED RESULTS OBTAINED AND PROSPECTIVES IN THE SELECTION OF YEASTS FOR OENOLOGICAL USE

DELFINI C.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

PRODUZIONE DI BENZALDEIDE E ACIDO BENZOICO DA PARTE DI LIEVITI ISOLATI DA VINO E *BOTRYTIS CINEREA* CON E SENZA AGGIUNTA DI ALCOL BENZILICO

PRODUCTION OF BENZALDEHYDE AND BENZOIC ACID BY WINE YEASTS AND BOTRYTIS CINEREA WITH AND WITHOUT BENZYL ALCOHOL ADDED

DELFINI C., GAIA P., BARDI L., MARISCALCO G., CONTIERO M. e PAGLIARA A.
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sezione di Microbiologia, Asti

