

LE TAPPE DELLA MICROBIOLOGIA ENOLOGICA

Annibale Gandini

Storia dei lieviti vinari

La trasformazione del mosto d'uva in vino ha da sempre suscitato la curiosità e la fantasia dell'uomo, senza però che egli riuscisse a spiegare l'origine del processo.

Il merito di aver aperto il primo spiraglio di luce nelle tenebre che avvolgevano il fenomeno fermentativo spetta ad un geniale artigiano olandese, Antoni van Leeuwenhoek. Questi, nel 1680, con un microscopio semplice di sua costruzione (A) individuò in liquidi in fermentazione dei corpuscoli globulari, da lui disegnati e denominati "animalcula". Tale osservazione era così innovativa che fu ignorata per oltre un secolo dalla scienza ufficiale.

Il nostro Fabroni riconobbe la presenza, durante la fermentazione vinaria, di un "fermento albuminoide" responsabile del processo, anticipando Cagniard De La Tour e Schwann (1836) propugnatori della **teoria vitalistica** in contrapposizione a quella meccanicistica, sostenuta dai più prestigiosi chimici dell'epoca, Liebig in testa. Essi descrissero gli "animalcula" come cellule vegetali, capaci di moltiplicarsi per gemmazione ed in grado di trasformare gli zuccheri in alcol e perciò denominati saccaromiceti.

È merito di **Louis Pasteur**, unanimemente considerato il fondatore della microbiologia enologica, l'aver dimostrato sperimentalmente ed inconfutabilmente, fra il 1850 ed il 1866, la natura microbiologica sia della fermentazione vinaria che delle malattie dei vini, tutte opera di "microscopiche vegetazioni parassitarie".



(A) - Miscopio di Leeuwenhoek in un disegno di Henry Baqker

Le teorie, apparentemente contrapposte, trovarono un'integrazione reciproca ad opera dei fratelli Buchner (1897), i quali estrassero dalle cellule di lievito un principio attivo, che chiamarono **enzima**, capace di provocare la fermentazione alcolica anche in assenza di cellule viventi.

Al danese Christian Hansen (1880) va riconosciuta non solo la messa a punto dei primi metodi di isolamento in coltura pura, ma anche l'introduzione nella produzione della birra di **lieviti selezionati** in laboratorio per le loro proprietà tecnologiche.

Ben presto anche l'industria del vino si avvantaggiò dei risultati delle ricerche di Hansen: risale al 1894 la fondazione della Stazione per la produzione di lieviti selezionati di **Geisenheim** in Germania. Nello stesso anno ad **Asti**, Zecchini e Ravizza pubblicarono una memoria sull'utilità dei "fermenti puri" in

vinificazione e poco dopo Passerini selezionò ceppi di lieviti, messi in commercio dall'**Istituto Zimotecnico di Scandicci** (FI), allo scopo di ottenere prontamente vini di caratteristiche migliori e più serbevoli.

Müller-Thurgau, a fine '800, osservò che nei mosti la fermentazione era iniziata da lieviti di forma **apiculata** più o meno rapidamente sostituiti da saccaromiceti

ellittici. Lo stesso autore, realizzando fermentazioni in purezza o associate delle due tipologie di lieviti, mise in evidenza la superiore capacità alcoligena e purezza fermentativa del **Saccharomyces ellipsoideus**. Nel 1911 Carpentieri rese noti i risultati di una serie di prove collegiali sull'uso in vinificazione dell'**anidride solforosa**, che in seguito si diffonderà con ritmo crescente grazie alle sue proprietà antisettiche e selettive nei confronti della microflora dei mosti.

Sempre all'inizio del secolo scorso numerose ricerche hanno dimostrato che i lieviti si trovano sulla superficie degli acini, provenienti dall'atmosfera, dal terreno o veicolati da insetti e passano nel mosto in seguito alla pigiatura. Da allora ha preso avvio un'imponente attività di selezione massale e clonale



Antoni van Leeuwenhoek



Theodor Schwann



da migliaia di mosti in fermentazione naturale. L'indagine fu iniziata negli anni '20 da De Rossi, proseguita dai suoi successori (da Castelli a Martini) e poi estesa, con la stessa tecnica, a quasi tutte le plaghe vitivinicole del mondo. È stato universalmente confermato che i principali agenti delle fermentazioni vinarie sono *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae*, ai quali si affiancano o succedono, a seconda delle zone, altre specie "secondarie". Ricerche più recenti, condotte dall'Università di Perugia, hanno dimostrato l'apporto rilevante di buoni fermentatori da parte dell'ambiente di cantina in cui peraltro si riscontrano pure dannosi lieviti a metabolismo ossidativo.

Come prevedibile non è stato ottenuto il fantastico super-lievito capace di trasformare qualsiasi mosto in un vino di qualità, in compenso sono stati individuati ceppi particolarmente adatti alle varie tipologie di mosti o condizioni di vinificazione. L'elenco dei criteri di selezione dei lieviti vinari è in continua evoluzione. Accanto al possesso di caratteristiche fondamentali, tecnologiche e di qualità, ed all'assenza di influenze negative (l'ultima, studiata, la produzione di fenoli volatili) è oggetto di indagine l'espressione di caratteri non convenzionali come attività enzimatiche, idrolitiche o disacidificanti e la capacità di cedere al mezzo macromolecole di origine parietale. Del tutto recentemente l'interesse del mondo scientifico si è rivolto allo studio della correlazione fra

lievito vinario e polifenoli. Altro tema di viva attualità è la ricerca di lieviti in grado di ridurre i livelli di **ocratossina A** prodotta da muffe che possono svilupparsi sulle uve.

Negli ultimi decenni gli studi genetici sul lievito, iniziati nel 1938 da Winge e Lausten, sono andati incontro ad una vera rivoluzione grazie alla combinazione fra genetica classica ed **ingegneria genetica**. Nel nostro Paese è di rilievo il contributo della Scuola di Zambonelli.

Con il trascorrere degli anni sono evolute le tecniche di classificazione dei lieviti, passate dai semplici criteri morfologici e colturali di Rees (1870) ai saggi fermentativi di Christian Hansen, al



rilievo dei caratteri sessuali introdotto da Guillemond (1912). Negli anni '30 del secolo scorso è stato realizzato dai ricercatori del Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn (Olanda) il primo trattato completo di sistematica dei lieviti al quale ne sono seguiti, con cadenza circa ventennale, altri quattro, sempre più corposi in quanto con l'aumentare dei caratteri presi in considerazione cresceva il numero delle specie descritte. Oggi il testo di riferimento è l'opera **"The yeasts"** in tre volumi di Kurtzman,

Fell e Boekhout (2005). L'applicazione dell'analisi delle sequenze geniche ha portato alla descrizione di circa **1500 specie**. Quelle di una certa importanza enologica sono poco più di una ventina.

La biologia molecolare ha dimostrato che quasi tutte le numerose specie di *Saccharomyces* di origine enologica descritte in passato rientrano in **S. cerevisiae**, così denominato nel 1838 da Meyen. Esso è probabilmente l'organismo vivente più studiato dal punto di vista morfologico, fisiologico, genetico e biotecnologico.

Tornando ai lieviti selezionati, va notato che mentre la pratica si è diffusa rapidamente ed universalmente nelle industrie birrarie non altrettanto è avvenuto nelle cantine. Anzitutto per le spesso modeste dimensioni delle stesche nonché per la scarsa preparazione degli operatori, fra l'altro sconcertati da una pubblicità talora scorretta e dai discordi pareri del mondo tecnico-scientifico. Non si può in effetti negare che nelle zone di antica tradizione vitivinicola nelle annate favorevoli si possono ottenere pregevoli vini con il solo intervento della blastoflora autoctona. Di fatto sino a metà Novecento i lieviti selezionati hanno trovato impiego solo in una parte delle cantine più attrezzate e nei processi di rifermentazione, in particolare per la produzione di vini spumanti. Un notevole passo avanti è stato compiuto da quando, intorno al 1965, in California sono stati immessi sul mercato i lieviti secchi attivi, i quali non necessitano di premoltiplicazione a differenza dei tradizionali allestimenti su





Hermann Müller-Thurgau

agar, in sospensione o liofilizzati.

Inizialmente il numero di ceppi disponibili era limitato, ma oggi l'offerta è estremamente variegata e comprende anche lieviti provenienti da specifiche zone vitivinicole. Permane l'obiezione che utilizzando un unico stipite si otterrebbero vini standardizzati, privi di quei caratteri di tipicità, risultato dell'attività della composita popolazione lievitifforme spontanea. Quasi tutti gli stipiti in commercio sono *S. cerevisiae*, ma da qualche anno si sperimentano altri generi le cui peculiari caratteristiche potrebbero renderli interessanti in fermentazioni miste. Per certi aspetti si tratta di aggiornare una tecnica proposta da Verona e da Castelli a metà '900 mirata al contenimento dell'acidità volatile.

I batteri del vino

Per Pasteur tutti i batteri venivano considerati pericolosi nemici del vino e tale giudizio fu mantenuto per tutto il XIX secolo.

Nel 1891 Müller-Thurgau avanzò l'ipotesi che la demolizione dell'acido malico fosse un processo di natura batterica e Koch, nel 1900, ne diede la dimostrazione riproducendo il fenomeno mediante l'inoculo di un vino con i batteri da lui isolati da un altro che aveva appena subito la degradazione malica. Nel 1913 ancora Müller-Thurgau ed Osterwalder pubblicarono una cor-

posa memoria sui **lattobatteri** dei vini e descrissero il *Bacterium gracile* come il più efficiente e diffuso dei batteri disacidificanti. Appena un anno dopo Mensio e Garino-Canina, della **Stazione Enologica di Asti**, rivendicavano l'importanza fondamentale della fermentazione malolattica per l'affinamento dei grandi vini rossi piemontesi.

Dobbiamo però attendere la metà del '900 per assistere, in quasi tutti i paesi vitivinicoli, ad una vera esplosione di studi sull'ecologia, la sistematica, il biochimismo dei batteri malolattici nonché sui fattori che ne condizionano lo sviluppo e l'attività al fine di



Robert Koch

gestire il processo. Si devono alla collaborazione fra la Stazione Enologica Sperimentale di Asti e l'Università di Torino le prime indagini italiane sull'identificazione degli agenti e le modalità di induzione del fenomeno malolattico.

Attualmente le specie più studiate in vista delle applicazioni pratiche sono *Oenococcus oeni* (Dicks, 1995) e *Lactobacillus plantarum* inseriti nell'ordine *Lactobacillales* del **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (2011), la "Bibbia" dei batteri, che viene pubblicato e ovviamente aggiornato dal 1923.

Sulla scorta delle esperienze acquisite con i lieviti, dagli anni intorno al 1960 si sono susseguite, dall'Europa

alla California (Kunkee), proposte di impiego di colture, pure o associate, di batteri malolattici opportunamente selezionati e in varie forme. Il successo a livello di cantina, a causa della sensibilità dei batteri in parola in un mezzo per loro assai poco favorevole, non è sempre scontato. Suggestive risultano le ricerche, condotte dal 1982 da Spetoli e Zamorani, sull'impiego di cellule batteriche immobilizzate.

In epoca recente sono stati realizzati rilevanti progressi nella tecnologia dei preparati commerciali: accanto ad allestimenti che richiedono una preventiva riattivazione vengono proposti starter, le cui cellule sono state sottoposte a stress prima della liofilizzazione, inoculabili direttamente nel vino (Guzzo). Costituisce recente motivo di preoccupazione la segnalazione di Sozzi e collaboratori della presenza in cellule di batteri malolattici di virus batteriofagi.

Nel 1990 è stato emanato un Regolamento CE (3220) che disciplina il settore degli starter malolattici per i quali sono previsti controlli chimici e microbiologici, modalità di impiego e di conservazione.

I batteri agenti di alterazioni, che sino ad un passato neppure troppo remoto costituivano la maggiore preoccupazione del mondo del vino, grazie agli studi di Pasteur e dei suoi successori e al progressivo miglioramento della gestione delle cantine (dai procedimenti di stabilizzazione biologica all'igiene di locali, vasi vinari ed



Ettore Garino-Canina

attrezzature) hanno fortunatamente perso gran parte della loro importanza. I batteri nocivi non sono però scomparsi e, se il vinificatore abbassa la guardia, possono dar luogo ad inconvenienti (intorbida-menti, sapori e/o odori anomali, amine biogene, eccessi di acidità volatile...) anche ai giorni nostri. È significativa al riguardo la ripresa degli studi (citiamo per tutti Asai, 1968) sui batteri acetici, prevalentemente in funzione del loro intervento nella produzione industriale di aceti.

Interesse per i funghi

Certamente con minore rilevanza generale, tuttavia anche i funghi filamentosi hanno suscitato l'attenzione degli studiosi del vino. Inizialmente sono state prese in esame le modifiche indotte nella composizione del mosto e le interferenze sull'andamento del processo fermentativo da parte dei patogeni e dei saprofiti della vite.

Risalgono a metà Novecento i fondamentali studi sul "marciume nobile" da *Botrytis cinerea* condotti dalla Scuola enologica di Bordeaux.

Alla fine del secolo scorso sono state dimostrate le correlazioni fra la produzione di **triclороанисоли** da parte di varie muffe e il famigerato odore-sapore di tappo. Nel 1996, infine, è stata segnalata la presenza in alcuni vini da tavola dell'ocratossina A, prodotta da diverse specie di *Aspergillus* e di *Penicillium*.

Stabilizzazione microbiologica

Già nel 1794 Appert aveva proposto la conservazione dei prodotti alimentari previo riscaldamento in contenitori ermetici, ma fu Pasteur (1866) che spiegò il motivo di tale risultato mettendo a punto il trattamento termico dei vini, in massa od in bottiglia, denominato, in suo onore, **pasteurizzazione**. I procedimenti furono nel tempo perfezionati grazie alla messa a punto degli scambiatori a piastre, dei pastorizzatori a pioggia e dell'imbottigliamento a caldo (Baillot d'Estivaux, 1958).

Alternativi all'impiego del calore per l'eliminazione dei microrganismi indesiderati sono stati i cartoni sterilizzanti, proposti da Schmittener nel 1917 e, più recentemente, le **membrane microporose**.

VITENDA 2016, (XXI)



Sarebbe lunghissima l'elencazione dei prodotti chimici sperimentati per l'inibizione del microbioma dei vini. Ci limitiamo a quelli attualmente autorizzati: la storica anidride solforosa, il sorbato di potassio, il lisozima.

Le analisi microbiologiche

Per l'osservazione dei microrganismi di interesse enologico si è passati dal microscopio semplice di Leeuwenhoek al microscopio composto, utilizzato da Pasteur, successivamente dotato di contrasto di fase e dispositivi per **epifluorescenza**, sino ai moderni microscopi elettronici a trasmissione od a scansione. Grazie a quest'ultimo Belin (1972) ha documentato la presenza di cellule lievitiformenti sulle varie parti del grappolo.

Per il conteggio diretto della carica totale dopo le camere contaglobuli sono entrati nell'uso il coulter counter, la citometria a flusso, la bioluminescenza.

La conta delle cellule viventi previa disseminazione in piastra su substrato solidificabile è stata descritta da Koch



(1881) e poi perfezionata con la messa a punto di una vastissima gamma di mezzi selettivi e condizioni di incubazione utili a discriminare i singoli gruppi microbici. Dagli anni '60 del secolo scorso ne è stata accresciuta la sensibilità con i metodi per filtrazione attraverso membrane microporose.

Il metodo per piastramento è tuttora il prevalente per l'isolamento in coltura pura, mentre il ricorso ai micromanipolatori è riservato alle ricerche genetiche.

Le tradizionali attrezzature in vetro, che richiedono lunghi e costosi trattamenti di sterilizzazione, sono state sempre più spesso sostituite da scatole Petri, pipette, anse e contenitori vari monouso in materiali plastici presterilizzati.

L'attuale crescente diffusione delle tecniche di manipolazione degli acidi nucleici (amplificazione, restrizione, sequenziamento) ha rivoluzionato l'approccio all'identificazione e alla tipizzazione dei microrganismi e reso molto più rapida, sicura e sensibile la rilevazione dei contaminanti. Purtroppo l'applicazione di tali metodi richiede personale specializzato e specifiche e costose apparecchiature per cui è generalmente confinata nei centri di ricerca e difficilmente, almeno per ora, trasferibile nei laboratori delle cantine.

Mi piace concludere con le parole di Carlo Zambonelli: "La microbiologia enologica dispone attualmente di un patrimonio di conoscenze che, se applicate, potrebbero contribuire in maniera determinante al miglioramento della qualità dei vini."

N.B. L'argomento di questa breve nota avrebbe richiesto uno sviluppo molto più ampio. Per chi desiderasse approfondire tematiche appena accennate suggerisco, fra i numerosi e pregevoli testi:

- Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. (2005) - *Microbiologia del vino*. - Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Zambonelli C. (2003) - *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. - Edagricole, Bologna.

Annibale Gandini
Fondazione Giovanni Dalmasso

Rispettiamo il volere dell'autore che, pur avendo contribuito in misura notevole ai progressi della microbiologia enologica moderna, non si è mai citato. Ci permettiamo però di segnalare che sul sito vitenet, sono indicati importanti lavori pubblicati da Annibale Gandini.