

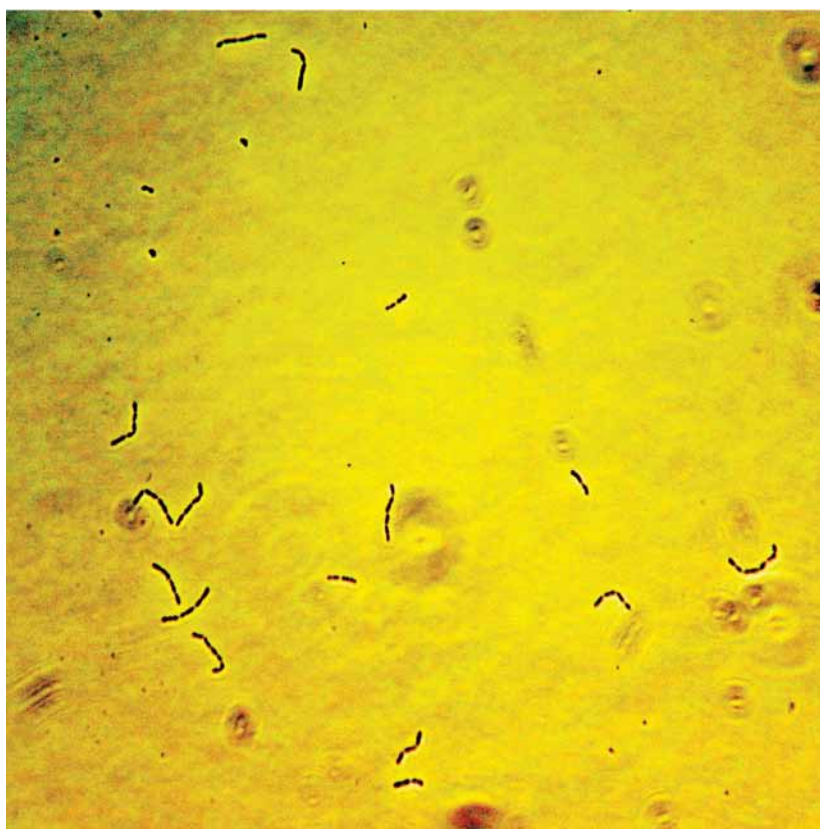
IL CONTROLLO MICROBIOLOGICO IN VINIFICAZIONE: I BATTERI

RIASSUNTO

La composizione e la qualità del vino sono influenzate da innumerevoli variabili intrinseche ed estrinseche, molte delle quali sono mediate da microrganismi. Un ruolo preminente viene svolto dai lieviti, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*, che conducono la fermentazione alcolica, e dai batteri lattici, che effettuano la fermentazione malolattica (FML). Durante la FML, *Oenococcus oeni* riduce l'acidità fissa, contribuisce alla complessità aromatica e migliora la stabilità microbica del vino. Tuttavia, non tutti i batteri sono positivi. Diversi batteri possono alterare il vino in vari modi e devono quindi essere attentamente controllati. Lo stesso *O. oeni* è causa di difetti quando sviluppa in vini dove la FML non è desiderata. Nel presente articolo sarà analizzata la componente batterica del microbiota associato alla filiera produttiva del vino, considerando sia i batteri positivi sia quelli causa di alterazioni, descrivendo alcuni metodi per il loro rilevamento e controllo.

INTRODUZIONE

La produzione di vino è un vero e proprio processo biotecnologico che ha origini remote (le tracce più antiche finora rinvenute vengono dalle giare di Shulaveri, attuale Georgia, circa 8000 a.C.). Nell'odierna industria enologica la trasformazione del mosto d'uva in vino è, fondamentalmente, un processo naturale non molto dissimile da quello condotto nell'antichità. Normalmente, tale trasformazione coinvolge due fermentazioni operate da specifici gruppi microbici: la **fermentazione alcolica (FA)** condotta dai lieviti, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*, e la **fermentazione malolattica (FML)** effet-



tuata da specifici **batteri lattici (LAB: Lactic Acid Bacteria)** adattati a vivere in ambienti enologici. Infatti, il mosto, nonostante sia un mezzo nutritivo relativamente completo, rappresenta un ambiente ostile per la maggior parte dei microrganismi in quanto il pH acido, l'elevata concentrazione di zuccheri e l'eventuale presenza di anidride solforosa (SO₂) esercitano una forte pressione selettiva sui microrganismi. In tali condizioni, solo i lieviti e poche specie di batteri acidofili possono sviluppare. Durante la FA l'ambiente diventa sempre più selettivo in quanto ai fattori citati per il mosto si sommano la crescente concentrazione di etanolo e la carenza nutrizionale nel vino. Ciononostante, le popolazioni microbiche presenti dall'u-

FIGURA 1. CELLULE DI *OENOCOCCUS OENI* A COPPIE O CATENELLE. IMMAGINE OTTENUTA AL MICROSCOPIO OTTICO IN CONTRASTO DI FASE CON UN INGRANDIMENTO 1000 X

va al vino finito possono essere anche molto variegata sia per la carica totale dei microrganismi, sia per la molteplicità delle specie e dei ceppi presenti. Pertanto, per ottenere un prodotto con caratteristiche organolettiche di pregio e stabile durante la conservazione, è necessario effettuare un attento controllo dei punti critici dell'intera filiera produttiva, quando i microrganismi possono moltiplicarsi. L'obiettivo dell'enologo è, quindi, quello di favorire i microrganismi utili e di minimizzare il po-

tenziale di crescita dei microrganismi indesiderati, per ottenere vini di qualità.

I MICRORGANISMI ASSOCIATI ALLA FILIERA DI PRODUZIONE DEL VINO

Nel mosto e nel vino è presente un'ampia collezione di lieviti e batteri che originano dal vigneto, dall'uva e dalle attrezzature di cantina. I lieviti di interesse enologico includono decine di generi e specie, ma quando la FA inizia e il livello di etanolo aumenta, *S. cerevisiae*, o altre specie del genere *Saccharomyces* come *Saccharomyces bayanus*, diventa la specie dominante.

I batteri tipicamente presenti includono LAB e **batteri acetici (AAC: Acetic Acid Bacteria)**. I ceppi di LAB isolati da vino appartengono a generi differenti, come *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Per quanto concerne gli AAC, sono stati rilevati i generi *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* e *Komagataeibacter*, un genere proposto nel 2012 a cui appartengono specie molto diffuse nell'ambiente enologico come *Komagataeibacter xylinus*, precedentemente nota come *Gluconacetobacter xylinus*.

Le specie di LAB e AAC di maggior interesse enologico sono riportate in Tabella 1.

Nell'ambiente enologico sono anche stati individuati sporadicamente altri batteri, come bacilli, clostridi, attinomiceti, e streptomyceti.

I batteri sono presenti sulle bacche e nel mosto in concentrazione variabile da 10^2 a 10^4 UFC (unità formanti colonia)/ml. Questa popolazione generalmente si riduce durante la FA e la specie dominante che sopravvive alle nuove condizioni è *Oenococcus oeni*. Tuttavia, in particolari condizioni, tra cui mosti e vini caratterizzati da scarsa acidità (es. pH superiore a 3,5), anche altri LAB possono permanere e sviluppare a livelli di 10^6 - 10^8 UFC/ml, formando metaboliti che possono pregiudicare la qualità del vino.

I BATTERI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

I LAB svolgono un ruolo essenziale in vinificazione in quanto sono responsabili della FML, che consiste nella decarbossilazione dell'acido L-malico in

acido L-lattico, catalizzata dall'enzima malolattico. La FML aumenta la stabilità microbiologica del vino, in quanto i LAB consumano in modo controllato i nutrienti che sarebbero altrimenti disponibili per altri microrganismi contaminanti. La FML ha importanti conseguenze anche sul profilo organolettico e sensoriale, in quanto la conversione di un acido bivalente come il malato, dal gusto relativamente aspro, con uno monovalente, come il lattato, diminuisce l'acidità e l'astringenza del vino e ne addolcisce il gusto. I LAB, inoltre, producono diversi composti aromatici, anche grazie alla presenza di enzimi come le esterasi e le glucosidasi, che modificano sensibilmente l'aroma, il profumo e il sapore del vino.

I BATTERI SONO PRESENTI SULLE BACCHE E NEL MOSTO IN CONCENTRAZIONE VARIABILE DA 10^2 A 10^4 UFC (UNITÀ FORMANTI COLONIA)/ML. QUESTA POPOLAZIONE GENERALMENTE SI RIDUCE DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA E LA SPECIE DOMINANTE CHE SOPRAVVIVE ALLE NUOVE CONDIZIONI È OENOCOCCUS OENI

Questi cambiamenti possono essere desiderati o meno a seconda del tipo di vino che si intende produrre. Infatti, la FML è interessante soprattutto per i vini rossi, specialmente quelli destinati all'invecchiamento, e per alcuni vini bianchi, particolarmente quelli prodotti in regioni a clima freddo o alcuni vini base spumante, che si desidera stabilizzare prima della loro rifermentazione. Qualora desiderata, per promuovere la FML è necessario considerare i parametri chimico-fisici che regolano la crescita dei LAB nel vino e cioè il pH, la temperatura a cui avviene il processo, l' SO_2 e il grado alcolico (Tabella 2), tenendo presente che tali parametri sono tra loro strettamente collegati.

La FML viene condotta soprattutto da *O. oeni*, riclassificato come tale nel 1995, mentre precedentemente era noto con il nome di *Leuconostoc oenos* (Figura 1). La FML può avvenire spontaneamente grazie ai LAB indigeni che contaminano gli acini di uva e le attrezzature di cantina. Tra i LAB, soprattutto nelle fasi finali della FA, dominano ceppi appartenenti alla specie *O. oeni*. La naturale selezione di ceppi di *O. oeni* durante la FA è dovuta alla loro capacità di adattamento alle condizioni sfavorevoli del vino. In realtà, il fatto che *O. oeni* abbia caratteristiche tali da consentirgli di dominare sugli altri batteri è bene accetto dai produttori di vino, in quanto questa specie garantisce FML di pregio con bassa produzione di acidità volatile. Tuttavia, le condizioni ostili per la sopravvivenza e la crescita batterica dell'ambiente vino possono rallentare la FML spontanea o ritardarne l'inizio, lasciando spazio a processi che alterano la qualità del vino. Quindi, per assicurare il buon andamento del processo fermentativo, nelle cantine, accanto all'ottimizzazione dei parametri di processo, è sempre più diffuso l'uso di colture starter commerciali, che solitamente sono inoculate in vino al termine della FA. Un'altra strategia che si è diffusa negli ultimi anni è il co-inoculo di LAB e *S. cerevisiae*. In questo caso tra i prodotti commerciali si possono trovare preparati a base di ceppi della specie *L. plantarum*, anche in coltura mista con *O. oeni*.

L'evoluzione della FML, in particolare la concentrazione di acido L-malico e acido L-lattico nei campioni di mosto e di vino, può essere monitorata grazie a metodi accessibili che abbinano reazioni enzimatiche a metodi colorimetrici per i quali è sufficiente disporre di uno spettrofotometro, oppure tramite metodiche analitiche più complesse e meno accessibili dal punto di vista economico, quali la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) o la spettroscopia nell'infrarosso abbinata alla Trasformata di Fourier (FT-IR). La sola comparsa di acido lattico, non accompagnata dalla stechiometrica diminuzione di acido L-malico, può essere un segnale di una alterazione in corso ad opera di LAB indesiderati.



L'enumerazione dei LAB responsabili della FML in mosto e vino può essere effettuata sia con metodi coltura-dipendenti che con metodi coltura-indipendenti. Per quanto concerne i primi, nel tempo sono stati sviluppati diversi mezzi di coltura specifici per enumerare in modo differenziale i diversi gruppi di microrganismi e sono stati descritti nel Codice Enologico Internazionale (CEI). Nel CEI sono codificati anche i protocolli necessari per valutare la vitalità e la purezza di preparati commerciali di starter per FML.

In questo contesto metodiche coltura-indipendenti, come la PCR-DGGE e la Real Time PCR (qPCR), consentono di valutare e quantificare (qPCR) anche la presenza di contaminanti in uno stato di "dormienza" (VBNC: *viable but not culturable*) in cui sono vitali ma non coltivabili nei comuni terreni di coltura.

Associando i metodi coltura-dipendenti con i metodi di caratterizzazione molecolare, grazie al sequenziamento di specifici marcatori genetici, è possibile confermare in modo preciso la specie di appartenenza di un isolato. I metodi molecolari sono molto utili per riconoscere la presenza di ceppi differenti della stessa specie, che sono nella maggior parte dei casi indistinguibili osservando solamente la morfologia di colonia e la morfologia cellulare.

I BATTERI DI ALTERAZIONE

I batteri presenti nel mosto e nel vino che, in alcuni casi possono essere utili, come i LAB, se sviluppano durante particolari fasi del processo di vinificazione possono diventare dannosi. In particolare, i LAB di alterazione sviluppano solitamente dopo la FA nei vini in cui la FML non è desiderata, oppure dopo la FML nei vini non completamente stabilizzati, con residuo zuccherino o di acido malico dando origine a problematiche diverse. In casi rari, essi possono moltiplicarsi nel mosto più velocemente dei lieviti sottraendo nutrienti e formando alte quantità di acido acetico, che è tossico per i lieviti. Questo può portare ad arresti di fermentazione e ad un'elevata acidità volatile. Una specie particolarmente

I METODI MOLECOLARI SONO MOLTO UTILI PER RICONOSCERE LA PRESENZA DI CEPPI DIFFERENTI DELLA STESSA SPECIE

te "virulenta", proposta nel 1998 ed emendata nel 2012, responsabile di tali problemi è *Lactobacillus kunkeei*, che comprende ceppi eterofermentanti obbligati caratterizzati da una

spiccata fruttosofilia. Al contrario, tutti gli AAB sono indesiderati.

L'alterazione del vino è sovente dovuta alla produzione di metaboliti volatili indesiderati, a livelli superiori alla soglia di percezione sensoriale. Tuttavia, questo è complicato dal fatto che la desiderabilità di certi composti nel vino dipende dalla loro concentrazione. Ad esempio, il diacetile (aroma di burro) è considerato positivo a concentrazione inferiore di 4 mg/l, mentre è negativo a livelli superiori.

Molti composti del vino (ad es. etanolo, zuccheri, polioli, acidi organici, amminoacidi) possono essere metabolizzati dai batteri enologici determinando una serie di "malattie", riprendendo il termine usato da Pasteur, conosciute da molto tempo, quali: acescenza, agrodolce, amaro, girato, filante, nota di geranio e "topo" (Tabella 3).

L'acescenza (spunto acetico) è dovuta allo sviluppo di AAB che, essendo aerobi stretti, possono sviluppare solo in presenza di ossigeno metabolizzando l'etanolo. L'acido acetico, l'acetaldeide e l'etilacetato sono i metaboliti che caratterizzano questa malattia. Il vino è ad alto rischio di alterazione da parte dei AAB durante l'affinamento prolungato in botte, se queste non sono ben colme e controllate regolarmente, ma anche durante la conservazione del vino rosso in bottiglia si può avere

Categoria	Morfologia e tipo di metabolismo	Specie	Caratteristiche
Batteri lattici	Bacilli eterofermentanti facoltativi	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. casei</i>	Cellule a bastoncino presenti nel mosto, anche usati come starter per co-inoculo
	Bacilli eterofermentanti obbligati	<i>L. hilgardii</i> <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i>	Coinvolti in alterazioni nel vino
		<i>L. fructivorans</i>	Fruttosofilo e capace di tollerare alte percentuali di alcol etilico
		<i>L. kunkeei</i> <i>L. nagelii</i>	Fruttosofili isolati da vini commerciali che presentavano rallentamento o blocco della fermentazione
	Cocchi omofermentanti	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. parvulus</i>	Cellule cocciche in tetradi presenti nel mosto e nei vini con alto pH e dopo FML
	Cocchi eterofermentanti	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Cellule cocciche in catene, presenti nel mosto
<i>Oenococcus oeni</i> (ex <i>Leuconostoc oenos</i>)		Usato come starter per la FML presenta cellule cocciche in catene di 2-20 cellule, resistenti all'etanolo e al basso pH	
Batteri acetici	Bacilli aerobi con ossidazione incompleta del substrato	<i>Acetobacter aceti</i> <i>A. pasteurianus</i> <i>Gluconacetobacter oxydans</i> <i>Komagataeibacter xylinus</i>	Indesiderati. Metabolizzano l'alcol etilico in acido acetico

TABELLA 1. BATTERI DI INTERESSE ENOLOGICO

sviluppo di *Acetobacter pasteurianus*. Il rilevamento di questi batteri non è sempre agevole dal momento che, in assenza di ossigeno, essi possono entrare nello stato di dormienza. Analogamente a quanto visto in precedenza per i LAB della FML, metodi alternativi come la qPCR e l'epifluorescenza si sono rivelati utili per monitorare la loro presenza nel vino.

L'azione di alcuni LAB sugli zuccheri e sui polioli può causare diverse alterazioni nel vino. La produzione di mannitolo da fruttosio è solitamente accompagnata da elevate concentrazioni di acido acetico, acido D-lattico, n-propanolo, 2-butanolo e da viscosità. Tale alterazione, denominata **agrodolce**, è dovuta a LAB eterofermentanti, incluso *O. oeni*.

L'**amaro**, che può colpire i vini rossi nobili, può derivare dalla fermentazione anaerobica del glicerolo da parte di ceppi del genere *Lactobacillus*. Il sapore amaro dei vini è associato alla presenza di acroleina che si combina con i polifenoli.

Il **filante** (*ropy*) è causato principal-

mente da pediococchi, in particolare *Pediococcus damnosus* e *P. parvulus*, anche se i geni responsabili di que-

RIENTRA TRA I DIFETTI DEL VINO ANCHE LA PRESENZA DI AMMINE BIOGENE, COMPOSTI AZOTATI TOSSICI PER L'UOMO PRODOTTI PER DECARBOSSILAZIONE MICROBICA DEGLI AMMINOACIDI

sto fenotipo sono stati ritrovati in alcuni ceppi della specie *O. oeni*. Questa malattia colpisce i vini con alto pH (>3,8), rendendoli torbidi, con un aspetto viscoso e untuoso. La viscosità è dovuta alla produzione di polisaccaridi extracellulari, quali β -glucani, che vengono codificati da geni presenti su plasmidi. Questi ceppi filanti sono particolarmente resistenti alle stressanti condizioni del vino e all'azione di composti antimicro-

bici, come il lisozima, rispetto a ceppi mutanti non filanti.

L'acido sorbico può essere usato come conservante per prevenire lo sviluppo di lieviti nei vini dolci in bottiglia. Tuttavia, diverse specie di LAB eterofermentanti, incluso *O. oeni*, possono ridurre l'acido sorbico a sorbinolo che, isomerizzando, forma 2-etossiesia-3,5-diene, che presenta un odore simile a quello delle foglie di geranio lacerate (malattia denominata "**nota di geranio**") ed ha una soglia di percezione sensoriale molto bassa (0,1 $\mu\text{g/l}$).

L'acido tartarico è considerato un composto stabile e generalmente non viene metabolizzato. Tuttavia alcuni lattobacilli eterofermentanti facoltativi e obbligati possono degradarlo secondo diverse vie metaboliche con produzione, in genere, di acido acetico, acido lattico e anidride carbonica. Nei vini rossi si ha precipitazione della materia colorante e questa malattia è denominata "**girato**". L'odore di topo (*mousiness*) è dato dall'azione di alcuni LAB eterofermentanti (*O. oeni* e *Lactobacillus spp.*) e, in misura minore, di lieviti *Bretta-*

nomycetes, sugli amminoacidi ornitina e lisina che porta alla formazione di composti odorosi molto sgradevoli appartenenti al gruppo delle tetrapiridine, come la 2-acetil tetraidropiridina.

Rientra tra i difetti del vino anche la presenza di ammine biogene (AB), composti azotati tossici per l'uomo prodotti per decarbossilazione microbica degli amminoacidi. In questo caso non si tratta di un'alterazione che influenza in modo rilevante la qualità organolettica del prodotto finito, ma può rappresentare un rischio per la salute del consumatore. La capacità di produrre AB, come istamina, tiramina, cadaverina e putrescina, è stata rilevata in alcuni ceppi enologici di *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ed *Oenococcus*. Infatti, questa caratteristica non è tipica di una specie, ma è ceppo-specifica. I ceppi produttori di AB possono essere rilevati rapidamente applicando saggi di PCR che evidenziano i geni codificanti gli enzimi amminoacido-decarbossilasi. Con questi test è possibile stimare il potenziale rischio di formazione di AB, prima ancora del loro accumulo in vino. Per prevenire la formazione di AB è importante inibire la popolazione lattica spontanea che può possedere attività decarbossilasica, mediante l'impiego di colture starter accuratamente selezionate per l'assenza di questo carattere. In modo analogo, l'uso di saggi di PCR può essere effettuato anche per escludere ceppi che possono manifestare il carattere "filante".

METODI DI CONTROLLO DEI BATTERI DI ALTERAZIONE

Nonostante gli aspetti biochimici e microbiologici della maggior parte delle malattie del vino siano stati chiaramente delineati, queste alterazioni batteriche, sebbene non molto comuni, possono ancora comparire. La cernita delle uve sane con l'eliminazione delle parti lesionate e una scrupolosa igiene dei locali e delle attrezzature durante tutti i processi di vinificazione, affinamento e imbottigliamento rappresentano punti fermi da cui partire per ottenere un vino di qualità. Questo tuttavia può non essere sufficiente e allora posso manifestarsi problemi.

Un vino che presenta caratteri di instabilità è predisposto ad "ammalarsi". Fattori che favoriscono l'insorgenza di

CATEGORIA	CONDIZIONI		
	Facili	Medie	Difficili
pH	> 3,4	3,1 - 3,4	< 3,1
Alcol (% vol)	< 13%	13% - 15%	> 15%
SO ₂ totale	< 30	30 - 50	> 50
Temperatura	18 - 22	14 - 18 e 22 - 26	> 26 e < 14

TABELLA 2. CONDIZIONI PER LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Tipo di alterazione	Batteri coinvolti	Substrato	Metabolita
Acescenza	Batteri acetici	Etanolo	Acido acetico Gliceraldeide Etilacetato
Agrodolce	<i>Leuconostoc</i> <i>O. oeni</i>	Glucosio Fruttosio	Mannite Acido acetico
Amaro	Lattobacilli Pediococchi	Glicerolo	Acroleina
Girato	Batteri lattici	Acido tartarico	Acido acetico Acido succinico Acido lattico
Filante	Pediococchi <i>O. oeni</i>	Glucosio	Glucani
Nota di geranio	Lattobacilli <i>O. oeni</i> Pediococchi	Acido sorbico	2-etossiesia 3,5-diene
Mousiness	Lattobacilli <i>O. oeni</i>	Etanolo Ornitina Lisina	2-acetil-tetraidropiridina
Produzione di ammine biogene	<i>O. oeni</i> <i>P. damnosus</i>	Istidina	Istamina
	<i>L. hilgardii</i> <i>L. brevis</i>	Tirosina	Tiramina

TABELLA 3. ALTERAZIONI DEL VINO INDOTTE DA BATTERI

problemi sono: basso grado alcolico (< 12°C), bassa acidità (pH > 3,5), residuo zuccherino, bassa concentrazione di SO₂, pochi tannini, elevata disponibilità di azoto assimilabile e fattori nutrizionali, conservazione a temperatura elevata.

Un utile strumento di prevenzione per una buona parte delle problematiche descritte, accanto ad un controllo del pH, è l'uso della SO₂ nelle diverse fasi di vinificazione. Tuttavia, è noto che l'assunzione di SO₂ provoca nei soggetti sensibili diversi effetti negativi, come mal di testa, intolleranze e allergie. Inoltre, il consumatore moderno è orientato verso prodotti sani privi di conservanti chimici di sintesi. Pratiche alternative alla solfitazione possono essere impiego di conservanti naturali, come lisozima e batteriocine, o ricorso a tecnologie basate su principi fisici, come l'irradiazione di luce nell'intervallo delle lunghezze d'onda ultraviolette (UV-C), trattamenti ad altissima pressione, ultrasuoni ad alta potenza e campi elettrici

ci pulsati. Molti di questi approcci innovativi sono stati applicati con successo in altri settori dell'industria alimentare e delle bevande.

Nostre sperimentazioni condotte in cantina con la tecnologia UV-C sviluppata da SurePure Ltd (Milnerton, Sud Africa), utilizzando diversi dosaggi di raggi UV-C su diversi tipi di mosti e vini bianchi e rossi hanno evidenziato la sua efficacia nel ridurre la popolazione di AAB e LAB. Si può quindi ipotizzare che questo innovativo metodo di sanificazione, al momento non previsto in Italia per il vino ma per molti altri prodotti alimentari (acqua, succhi etc.) possa consentire di ottenere una stabilizzazione microbiologica dei prodotti per lungo tempo.

Fabio Fracchetti, Giovanna Felis, Antonio Del Casale, Sandra Torriani

Dipartimento di Biotechnologie, Università degli Studi di Verona

Microbion s.r.l., spin-off dell'Università di Verona