

# GLI STARTER PER LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Antonella Costantini, Enrico Vaudano, Filippo Spanu, Laura Pulcini, Francesca Patrucco, Maria Carla Cravero, Emilia Garcia-Moruno

La fermentazione del vino rappresenta forse uno dei primi esempi di applicazione della biotecnologia che prevede l'utilizzo di organismi viventi per condurre i processi di trasformazione.

Il ruolo dei microrganismi è infatti fondamentale in enologia in quanto la qualità finale del vino dipende, in buona misura, dalla selezione e dall'impiego dei microrganismi più adatti e dal controllo delle condizioni delle fermentazioni. Il discorso vale non solo per la fermentazione alcolica (FA) operata dai lieviti, ma anche per la fermentazione malolattica (FML) condotta dai batteri lattici (LAB), tanto che l'impiego di colture batteriche starter è entrata nella comune pratica enologica per lo svolgimento di questa seconda fermentazione.

La FML non rappresenta soltanto una disacidificazione biologica, ma anche un processo che determina l'evoluzione organolettica del vino. Di qui la necessità di studiare i LAB autori di questo processo biochimico e selezionare quelli che sono in grado di apportare delle caratteristiche pregevoli conformi ad un dato obiettivo enologico.

Una FML spontanea ha un impatto imprevedibile sulla qualità del vino, mentre una FML condotta da starter batterici garantisce un processo più controllato e sicuro e permette di definire in modo favorevole il profilo sensoriale del vino, in funzione del ceppo selezionato.

Per originare questo processo fermentativo i LAB devono raggiungere una carica di cellule di almeno  $10^6$  cellule/mL e il tempo che precede il raggiungimento di tale concentrazione può durare alcuni giorni o non verificarsi affatto. Questo lasso di tempo rappresenta una fase di rischio nel processo produttivo in quanto il vino può venire colonizzato da microrganismi indesiderati. L'inoculo di batteri selezionati permette di evitare questa fase di stasi e di conseguenza prevenire

il deprezzamento dei vini dovuto all'eventuale sviluppo di contaminanti.

I principali parametri che vengono valutati nel corso della selezione di LAB sono indicati in (A) (Torriani et al., 2011).

Nell'attività di selezione dei batteri bisogna inoltre tenere in considerazione il fatto che i fattori chimico-fisici agiscono in sinergia nel determinare la capacità di adattamento dei batteri. I numerosi studi effettuati sull'influenza di questi fattori sulla vitalità e sull'attività malolattica delle popolazioni hanno permesso di definire intervalli di valori, nei quali il vino può presentare condizioni favorevoli, difficili o inibenti per lo svolgimento della FML, come illustrato in (B) (Rosi e Nannelli, 2005).

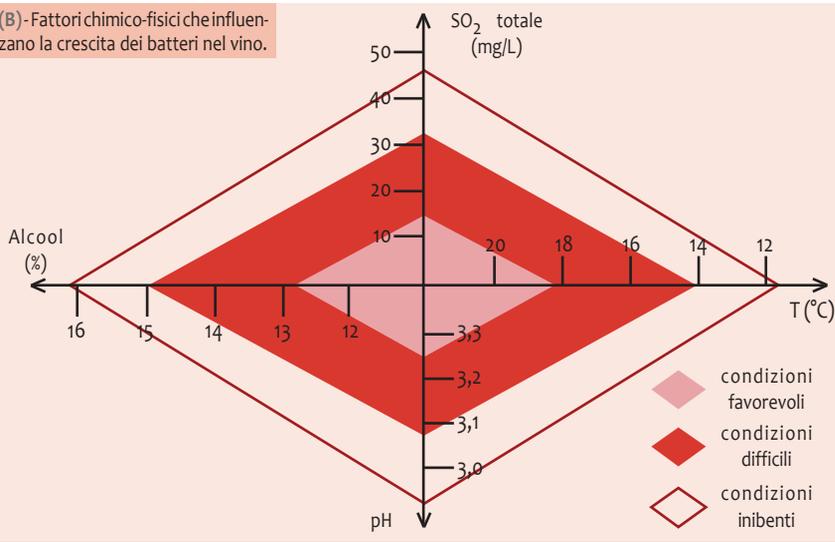
I batteri lattici più comunemente usati come starter appartengono alla specie *Oenococcus oeni* (C). Questa specie risulta la più idonea a condurre la FML perché, grazie a meccanismi molecolari che gli permettono di rispondere agli stress, tollera valori di pH bassi e concentrazioni di etanolo abbastanza elevate.

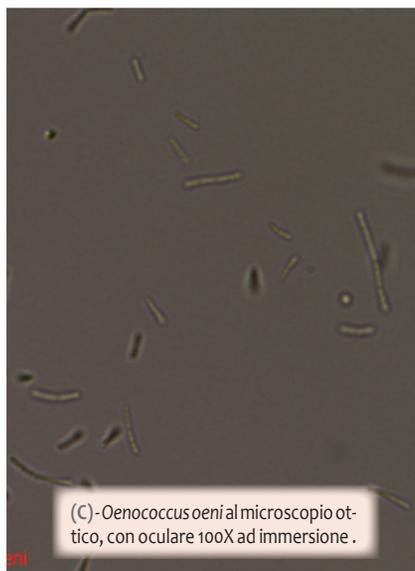
(A) - Criteri di selezione dei LAB.

Categorie	Proprietà
Resistenza allo stress	Resistenza ad alti livelli di etanolo (14% v/v) Tolleranza a pH 3,0 Resistenza ad alte concentrazioni di SO <sub>2</sub> Resistenza alle basse temperature Resistenza ai batteriofagi
Caratteristiche tecnologiche	Alta attività malolattica Abilità di eseguire FML in diversi tipi di vino Crescita soddisfacente in un mezzo sintetico Produzione di aromi desiderabili o miglioramento degli aromi fruttati Bassa produzione di acido acetico al pH del succo d'uva e del vino Nessuna produzione di polisaccaridi Compatibilità con il lievito usato per la FA Resistenza alla liofilizzazione
Aspetti relativi alla sicurezza	Nessuna produzione di ammine biogene Nessuna produzione di etilcarbammato Inabilità di trasmettere gene di resistenza agli antibiotici

Ultimamente però la tendenza alla raccolta di uve molto mature e l'innalzamento globale delle temperature si sono tradotti in vini con un pH più alto, creando un ambiente più favorevole allo sviluppo dei batteri naturalmente presenti nel vino a discapito di *O. oeni* che non prevale necessariamente in queste condizioni. Quindi questi vini sembrano essere adatti all'uso di specie batteriche alternative. Ad esempio, *Lactobacillus* spp. può rappresentare un'alternativa interessante come starter per la FML, soprattutto nella ricerca di nuovi attributi che potrebbero esse-

(B) - Fattori chimico-fisici che influenzano la crescita dei batteri nel vino.

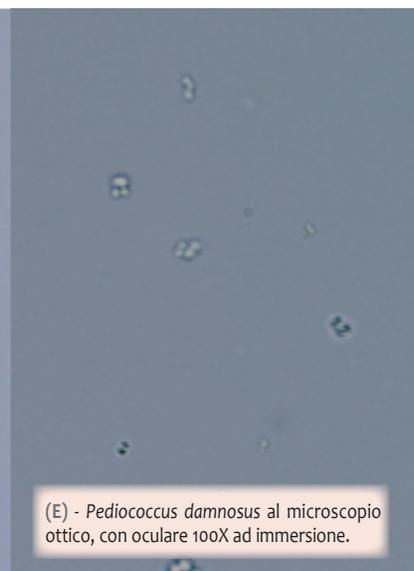




(C) - *Oenococcus oeni* al microscopio ottico, con oculare 100X ad immersione.



(D) - *Lactobacillus plantarum* al microscopio ottico, con oculare 100X ad immersione.



(E) - *Pediococcus damnosus* al microscopio ottico, con oculare 100X ad immersione.

re utili da un punto di vista sensoriale (Du Toit *et al.*, 2011; Bravo-Ferrada *et al.*, 2013). *Lactobacillus plantarum* (D) si è dimostrato un LAB promettente da utilizzare come inoculo nei vini ad alto pH ed esistono ceppi starter di *L. plantarum* già in commercio.

Un discorso analogo vale anche per i batteri del genere *Pediococcus* (E); sebbene la crescita di alcune specie di questo genere nei vini non sia auspicabile, è però possibile che lo sviluppo di alcuni ceppi particolari possa effettivamente arricchire il vino dal punto di vista organolettico.

Questa possibilità è stata descritta da Juega *et al.* (2014): nel loro studio gli autori hanno individuato due ceppi di *Pediococcus damnosus* capaci di portare a termine la FML in vini bianchi Caiño e Albariño senza apportare caratteristiche indesiderate ai vini.

Questi ceppi non producono né esopolisaccaridi né ammine biogene e presentano una serie di vantaggi rispetto agli *O. oeni* comunemente utilizzati come starter malolattici. Questi batteri isolati sono particolarmente adatti nel caso di vini, come “Caiño” e “Albariño”, che sono caratterizzati da pH elevati; in queste condizioni di pH *O. oeni* può produrre alte quantità di acido acetico, con il conseguente deprezzamento del vino. In più, i ceppi di *Pediococcus* crescono molto più rapidamente di quelli di *O. oeni*, facilitando l’ottenimento di biomassa per l’inoculo.

Juega *et al.* (2014) hanno anche condotto dei test sensoriali per valutare l’impatto organolettico di questi ceppi di *Pediococcus damnosus* sul vino.

VITENDA 2019, (XXIV)

I risultati hanno mostrato che la FML ha dato nuove caratteristiche ai vini senza alterare gli altri descrittori. In (F) è mostrato il confronto tra il vino che ha condotto la FML con *Pediococcus* e il vino che non ha fatto la FML. Sono risultate differenze statisticamente significative sia sull’aroma che sul gusto. Dopo la FML il vino è risultato avere oltre ad una minore acidità derivante dalla trasformazione dell’acido malico in acido lattico, anche maggiori note di miele e una minore intensità di erbe aromatiche.

### Il tempo di inoculo

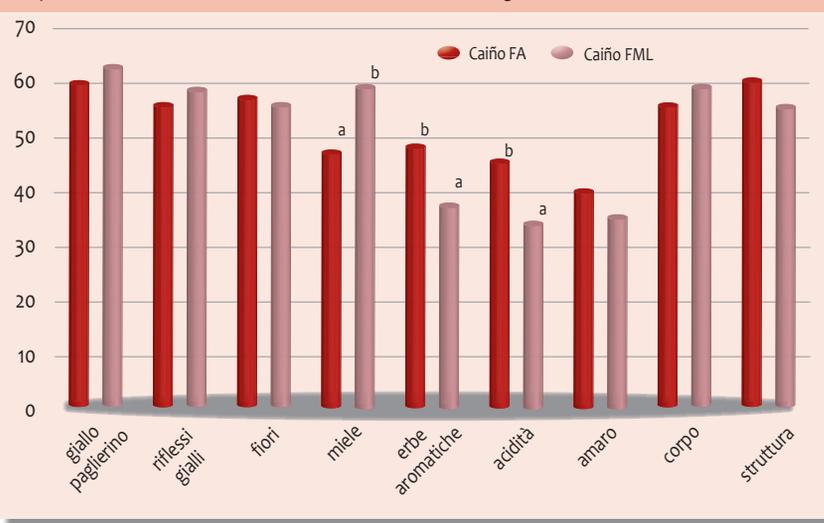
Il tempo di inoculo dei LAB merita un’attenta considerazione perché influenza lo stile e la qualità del vino.

I LAB naturalmente presenti nei mosti durante la fermentazione alcolica rimangono in basse concentrazioni

e, al termine di questa fermentazione, iniziano a moltiplicarsi e ad avviare la FML, se le condizioni del vino lo permettono. Proprio da questo naturale andamento, si è sempre pensato ad un inoculo sequenziale di batteri malolattici. Il vantaggio di questa pratica è che i batteri si trovano in un mezzo privo di zuccheri e hanno come unico substrato l’acido malico, di conseguenza non c’è il rischio che producano acido acetico.

Tuttavia da qualche decina di anni si assiste ad un crescente interesse nell’applicazione della pratica del co-inoculo. La pratica consiste nell’inoculo dei batteri selezionati in uno stadio precoce del processo di vinificazione (24 - 48 ore dopo l’inoculo del lievito). Si tratta di una tecnica sempre più utilizzata perché presenta diversi vantaggi: riduzione dei tempi, riduzione dei rischi e contributo sul profilo aromatico.

(F) - Confronto tra i descrittori comuni individuati da un panel di assaggiatori del CREA-VE su vino Caiño prima e dopo la FML. Le lettere indicano le differenze statisticamente significative.



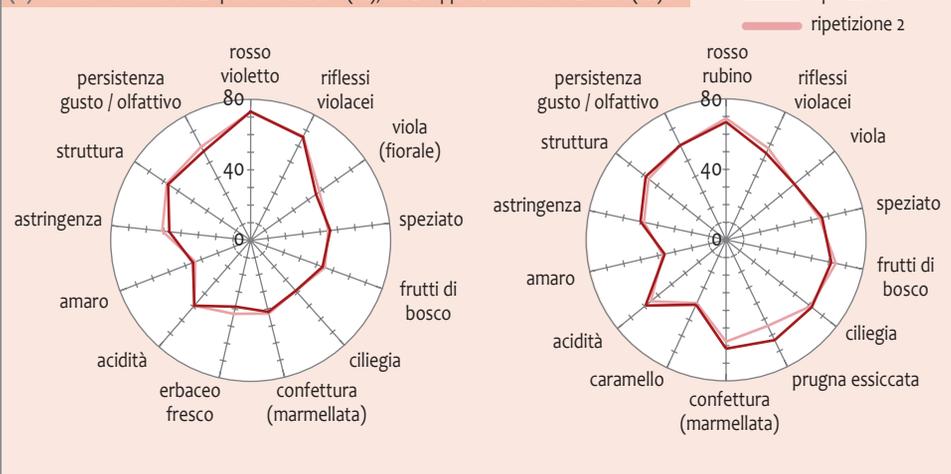
Prima di tutto i batteri malolattici si vengono a trovare in un ambiente più favorevole alla loro crescita, dal momento che il mosto, rispetto al vino, presenta concentrazioni di etanolo inferiori ed una maggiore disponibilità di nutrienti. Inoltre la presenza dei batteri non influisce sull'attività del lievito, ma questa co-presenza favorisce l'acclimatazione dei batteri ai crescenti livelli di alcol e di conseguenza facilita lo svolgimento della FML.

I tempi per la FML risultano pertanto più brevi rispetto all'inoculo sequenziale. Questo significa che l'aggiunta della SO<sub>2</sub> può avvenire in tempi molto precoci ed il rischio di potenziali contaminazioni microbiche è ridotto. Inoltre, il coinoculo comporta un migliore impianto del ceppo inoculato con maggiori probabilità di dominare efficacemente la FML.

Per queste ragioni, questa pratica può contribuire a evitare lo sviluppo di microrganismi non desiderati, spesso associati alla formazione di aromi sgradevoli o alla produzione di molecole indesiderate. Per quanto riguarda il profilo aromatico, la minor produzione di diacetile e la maggiore concentrazione di alcuni esteri etilici e acetati agiscono da importante modulatore nello sviluppo sensoriale e concorrono alla produzione di vini dal carattere maggiormente fruttato.

Ci sono ormai numerosi studi in bibliografia che riguardano questo argomento. Recentemente Lasik-Kurdys et al. (2017) hanno confrontato quattro scenari di vinificazione: solo fermentazione alcolica (FA), coinoculo, fermentazione malolattica indotta al termine della fermentazione alcolica e fermentazione malolattica spontanea. I dati, confermati in tre stagioni vinicole indipendenti, hanno mostrato che i migliori risultati, espressi come la maggiore dinamica ed efficienza nella disacidificazione, sono stati osservati quando la fermentazione alcolica e malolattica erano simultanee (riduzione di 83,97-94,84% di acido malico). Nel coinoculo, il tempo di fermentazione era significativamente ridotto, non vi era alcun

(G) - Profili sensoriali: FML spontaneamente (sx), FML ceppi autoctoni selezionati (dx).



aumento nell'acidità volatile e si osservavano le concentrazioni di zucchero residuo più basse. I tempi dell'inoculo di batteri malolattici non hanno avuto alcun effetto su metaboliti secondari come l'acido citrico e l'acido acetico nonché sulla concentrazione finale di etanolo e glicerolo.

Il coinoculo di lieviti e batteri può essere una tecnica utile nel processo di produzione di vino in zone climatiche fresche e può anche essere applicato per mosti molto acidi.

### La nuova tipologia di starter

Negli ultimi anni, per esaltare le peculiarità di un determinato vino, è stato proposto l'impiego di ceppi di lieviti selezionati nella specifica area di produzione indicati come "lieviti ecotipici". La stessa idea può essere estesa ai batteri per la FML.

Presso il CREA-VE di Asti, oltre alla selezione di lieviti ecotipici, sono stati svolti anche studi sulla selezione di batteri autoctoni. In un progetto finanziato dalla Regione Piemonte sono stati caratterizzati *O. oeni* autoctoni isolati da 10 vini piemontesi. In seguito ai diversi saggi effettuati, è stato possibile selezionare 6 ceppi con buone caratteristiche fermentative.

Questo pool di ceppi è stato in grado di crescere e di condurre a termine la FML nei diversi vini in studio, anche se diversi da quello in cui erano stati isolati. Lo studio microbiologico è stato completato anche dall'analisi sensoriale dei vini ottenuti.

La figura (G) mostra una comparazione in vino Barbera tra i profili sensoriali ottenuti da FML spontanea e

da FML svolta dai batteri selezionati; si evidenzia come i batteri selezionati apportino una maggiore intensità delle note fruttate e speziate al vino, risultando nel complesso preferibili al panel di degustazione rispetto alla tesi con fermentazione spontanea.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'inoculo con i ceppi selezionati non ha alterato le caratteristiche dei vini e spesso le ha migliorate, apportando maggior intensità olfattiva, morbidezza e struttura.

I batteri autoctoni selezionati, utilizzati in coltura fresca e non liofilizzati, possono essere, quindi, una valida alternativa agli starter commerciali nell'induzione della FML. Infatti tutelano le caratteristiche tipiche del vino e nel contempo assicurano la presenza esclusiva di batteri positivi, i quali non apportano eventuali difetti al vino e ne garantiscono il legame con il territorio.

Vi è un crescente interesse per la ricerca sulla FML e sullo sviluppo di strategie che possono essere utilizzate per migliorare l'identità regionale dei vini. La provenienza o il senso di territorialità del vino sta diventando sempre più importante per differenziare il prodotto sul mercato. La selezione e l'utilizzo di ceppi batterici autoctoni può contribuire notevolmente a migliorare l'identità regionale di un vino, e questo aspetto potrà avere un impatto positivo sul prodotto, aumentandone potenzialmente il valore di mercato.