

L'INOCULO SIMULTANEO DI LIEVITI E BATTERI. UNA PROMETTENTE ALTERNATIVA IN MOSTI CON GRAVI CARENZE AZOTATE

R. Guzzon⁽¹⁾, T. Roman⁽¹⁾, G. Nicolini^{(1)*}, R. Larcher⁽¹⁾

⁽¹⁾Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare, Centro di Trasferimento Tecnologico, Fond. Edmund Mach, Via Edmund Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

* giorgio.nicolini@fmach.it

RIASSUNTO

In questo lavoro è stata presa in considerazione la possibilità di applicare l'inoculo simultaneo di lieviti e batteri in mosti rossi che abbiano un contenuto in azoto molto basso come frequentemente osservato nell'area Mediterranea. Sono state condotte 48 microvinificazioni, confrontando i risultati chimici e microbiologici ottenuti da inoculi simultanei o sequenziali di lieviti e batteri. In nessun caso sono stati osservati arresti della FA, nonostante il contenuto di azoto drammaticamente basso dei mosti. Nelle prove di coinoculo la FML e la FA si sono svolte simultaneamente; nel caso di inoculi sequenziali il consumo di acido malico non si è concluso nei 66 giorni considerati. L'aumento medio di acido acetico è inferiore al 0.6 g/L, ma generalmente più elevato nelle prove a inoculo simultaneo; analogamente la durata di FA nelle prove coinoculo ha avuto 10-12 giorni di ritardo rispetto alle vinificazioni tradizionali.

In this work, we considered the possibility of the simultaneous yeast/bacteria fermentation to red must having a very low nitrogen content, as frequently observed in the Mediterranean area. 48 microvinification were carried out comparing, from the chemical and the microbiological point of view, wines obtained by simultaneous or sequential inoculums. No halting of AF was observed, despite the dramatically low nitrogen content of the must. In simultaneous inoculums tests MLF took place together with, or in some cases before AF, whereas in the case of sequential inoculums, the consumption of malic acid was not concluded within the time-period considered. The increase in acetic acid was below 0.6 g/L, but higher in the case of simultaneous inoculums of yeast and bacteria; furthermore, the duration of AF was higher in the case of simultaneous inoculums, with a 10-12 day delay as compared to traditional fermentation.

INTRODUZIONE

L'inoculo simultaneo di colture selezionate di lieviti e batteri, all'inizio della vinificazione, è stato recentemente proposto come un'interessante alternativa alle tradizionali fermentazioni sequenziali per ottenere una più rapida ed affidabile fermentazione malolattica (Zapparoli et al., 2009). Generalmente questa soluzione si applica a vini che, per la loro alta acidità o per l'elevata concentrazione di etanolo, si ritengono particolarmente ostili all'attività dei batteri lattici. Le ragioni che giustificano questo approccio sono diverse sostanzialmente legate all'aspettativa che i batteri possano adattarsi meglio all'ambiente di fermentazione in mosto, rispetto al vino, perché i fattori limitanti per il loro sviluppo (alcol, anidride solforosa, carenza di zuccheri, ecc.) aumentano progressivamente in funzione dell'evoluzione della fermentazione alcolica (Guzzon et al., 2009, Rosi et al., 2003). Attualmente, la fermentazione malolattica è applicata solo in mosti con un basso pH per evitare il rischio che il metabolismo

eterolattico, proprio di molte specie di batteri coinvolti nella fermentazione malolattica, possa portare ad accumuli significativi di acido acetico (Abrahamse e Bartowsky, 2012). In questo lavoro il coinoculo lieviti/batteri è stato utilizzato allo scopo di migliorare le performances di colture commerciali di batteri malolattici in vini rossi con un basso contenuto di azoto, una caratteristica spesso osservata negli ultimi anni, soprattutto nel bacino del Mediterraneo.

MATERIALI E METODI

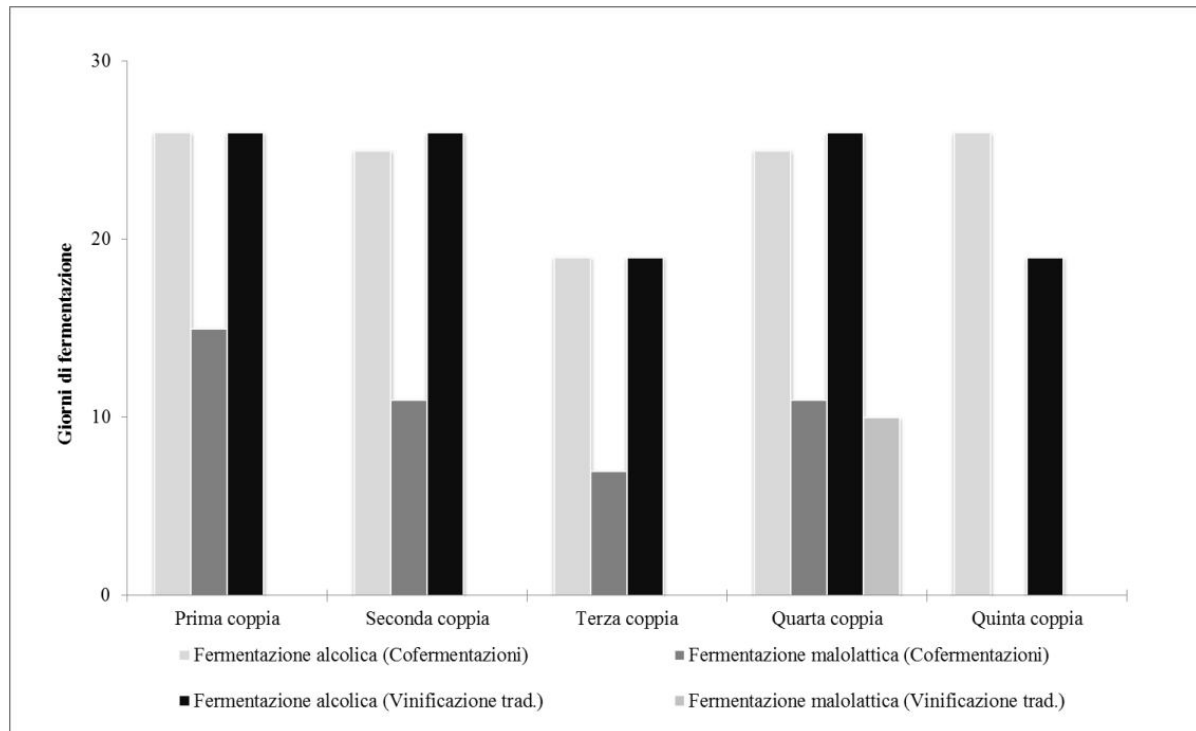
48 micro vinificazioni (50 litri per ogni prova) sono state svolte nella vendemmia 2011 presso la cantina sperimentale della Fondazione Edmund Mach (Trento, I) confrontando l'andamento di fermentazioni alcoliche e malolattiche eseguite sia con il coinoculo che con un protocollo di vinificazione tradizionale. Sono state considerate 5 coppie di colture commerciali di lieviti e batteri. Più precisamente sono stati utilizzati i seguenti lieviti secchi attivi: Mycoferm Cru 05 (Ever S.r.l., I), La Claire C58 (IOC Perdomini S.p.A., I), QD145, S6U e ICV254 (Lallemand Inc., CA). Tra i batteri lattici sono stati considerate le colture liofilizzate Extremo IT06 (Ever S.r.l., I), Malica (IOC Perdomini S.p.A., I), PN4, Vp41 e V22 (Lallemand Inc., CA). Tutti i microrganismi sono stati inoculati seguendo i protocolli suggerimenti dai produttori sia per quanto riguarda la dose di inoculo, sia per le modalità di reidratazione. 4 diversi mosti d' uva (*cv.* Cabernet Sauvignon, Merlot, Teroldego e Marzemino) sono stati impiegati per le fermentazioni; in tutti i casi il contenuto di azoto prontamente disponibile era inferiore ai 70 mg /L e la concentrazione dei zuccheri superava i 210 g/L. L'evoluzione delle fermentazioni alcoliche e malolattica è stata monitorata mediante analisi chimiche, utilizzando un metodo FT-IR (WineScan, FOSS, DK); le analisi microbiologiche (conteggio microscopico delle cellule di lievito e conta su piastra per la determinazione della carica di batteri lattici) sono state eseguite secondo i metodi OIV di riferimento (2012).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In Fig. 1 sono riportati i tempi (espressi in giorni) necessari a svolgere le fermentazioni alcolica e malolattica su mosti di uve Merlot. Questa uva era, fra le quattro utilizzate, caratterizzata dal peggior rapporto tra il contenuto di zuccheri (220 g/L) e la dotazione azotata (inferiore ai 30 mg/L), ed era quindi in grado di estremizzare gli effetti dello stress esercitati dalle condizioni ambientali sulla popolazione microbica (Bell and Henschke, 2005). Sono state osservate differenze tra le diverse coppie di lieviti e batteri sia in termini di percentuale di successo che di velocità della fermentazione malolattica. Queste evidenze confermano l'importanza di un'attenta selezione degli starter microbici per le fermentazioni enologiche non solo per quanto riguarda le prestazioni di ogni microrganismo, ma anche l'interazione tra specie diverse che operano nello stesso ambiente (Zapparoli et al., 2003). Nelle prove eseguite utilizzando le prime tre coppie di microrganismi non è stata osservata alcuna interferenza nell'evoluzione di AF dovuta all'inoculo dei batteri nel mosto. Infatti, la durata delle fermentazioni alcoliche, svolte utilizzando i coinoculi o la vinificazione tradizionale è risultata del tutto simile. Al contrario, i batteri lattici sono stati in grado di metabolizzare completamente l'acido malico solo nelle prove svolte utilizzando i coinoculi, mentre nelle vinificazioni tradizionali le fermentazioni malolattiche si sono arrestate prematuramente, lasciando significativi residui di acido malico (fino a 0.5 g/L). La quarta coppia lievito/batteri è stata la più efficiente dell'intera serie di test, perché l'acido malico è stato degradato fino a concentrazioni inferiori agli 0.2 g/L, sia nella prova di coinoculo che nella vinificazione tradizionale. La quinta coppia di microrganismi ha mostrato la più alta sensibilità alle

caratteristiche del mosto, particolarmente difficili per lo sviluppo batterico. La fermentazione alcolica ha mostrato un comportamento simile agli altri test ma la fermentazione malolattica si è arrestata sia nel coinoculo che nella vinificazione tradizionale.

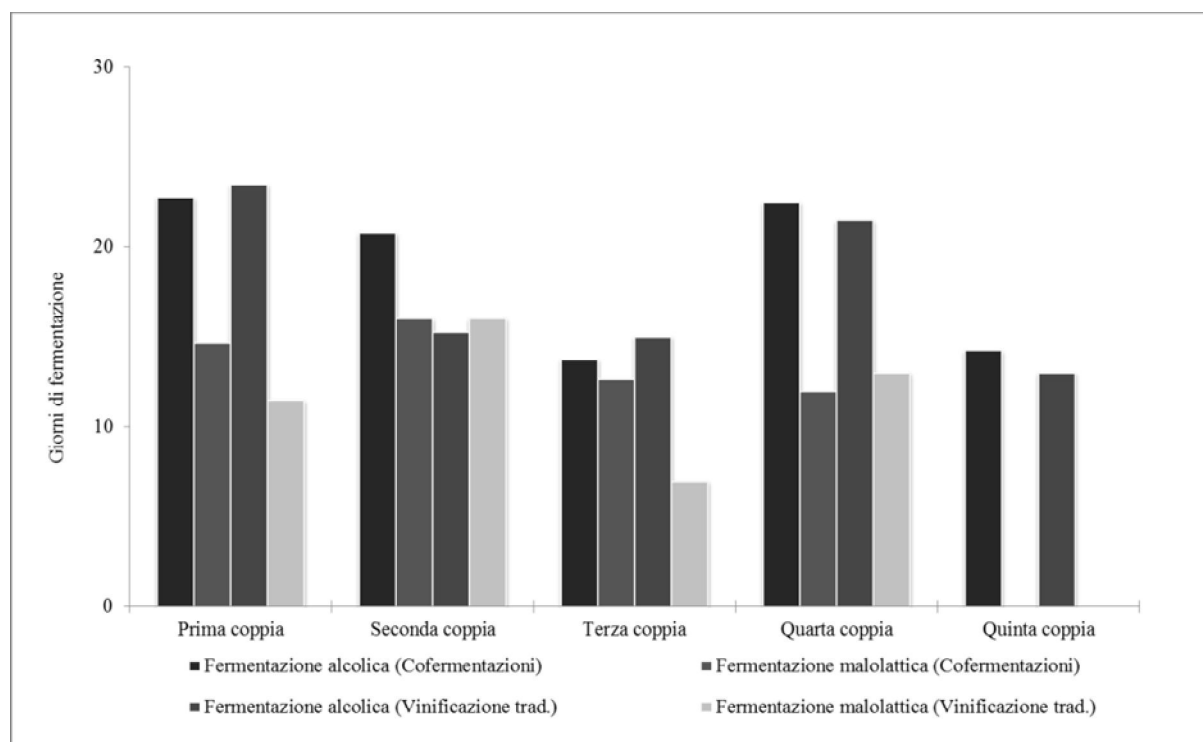
Figura 1. Durata delle fermentazioni enologiche svolte durante la vendemmia 2012 su mosto da uve Merlot, comparando 5 coppie di colture commerciali di lieviti e batteri.



Una sintesi dei dati dell'intero set di fermentazioni è riportato in Fig. 2. L'aggiunta di batteri ai mosti, durante la fermentazione alcolica, non ha aumentato la velocità della fermentazione malolattica ma piuttosto ha garantito una minore mortalità dei batteri e quindi una maggiore efficienza nella degradazione dell'acido malico. Nelle prove di fermentazione simultanea la fermentazione malolattica si è conclusa positivamente nella maggior parte dei campioni, con la sola eccezione dei mosti derivati da uve di Teroldego dove dopo 45 giorni dall'inoculo permanevano ancora residui di acido malico compresi tra 0.46 e 1.80 g/L. Tra le diverse coppie di colture starter utilizzate solo la quinta coppia non ha evidenziato un'attività soddisfacente nei diversi mosti non essendo in grado di realizzare la degradazione dell'acido malico in nessuna delle prove svolte. Per altro nelle vinificazioni tradizionali la stessa coppia lievito/batteri ha dato risultati ancora peggiori. Nelle prove svolte in mosto da uve Cabernet Sauvignon la fermentazione malolattica svolta con questa coppia di microrganismi si è arrestata dopo pochi giorni consumando solo 1.6 g/L di acido malico. Come osservato per i dati delle fermentazioni condotte su mosti ottenuti da uve Merlot, le differenze tra la durata della fermentazione alcolica svolta utilizzando l'inoculo simultaneo o sequenziale non sono tecnologicamente rilevanti. Questi risultati concordano precedenti lavori riguardanti le interazioni tra lieviti e batteri in ambito enologico e dimostrano una volta di più che il rischio di inibizione della fermentazione alcolica da parte dei batteri lattici è decisamente basso mentre, al contrario, è dimostrata da una abbondante bibliografia nella produzione di sostanze tossiche per i batteri da parte dei lieviti, anche appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* (Mendoza et al., 2010; Comitini et al., 2005). È interessante osservare la

correlazione tra l'evoluzione della fermentazione e la dotazione azotata iniziale dei mosti. Nonostante che le differenze tra le concentrazioni in azoto prontamente assimilabile dei 4 mosti fossero comprese in un intervallo di circa 10 mg/litro, e dunque decisamente limitate, è possibile trovare una correlazione tra l'attività fermentativa e la disponibilità di sostanze nutritive. Nel mosto da uve Teroldego (70 mg /L di azoto prontamente assimilabile), tutte le fermentazioni alcoliche si sono svolte completamente e non sono stati evidenziati residui zuccherini in vino. Nei mosti di Cabernet Sauvignon (Azoto prontamente assimilabile pari a 55 mg/L), Marzemino (Azoto prontamente assimilabile pari a 30 mg/L) e Merlot (Azoto prontamente assimilabile pari a 30 mg/L) dopo ben 45 giorni dall'avvio della fermentazione alcolica permanevano residui zuccherini significativi, intorno a valori di 1.5 g/L nei vini. In alcuni casi è stato addirittura osservato un vero e proprio arresto della fermentazione alcolica, come nel caso del test effettuato con la seconda coppia lievito/batteri in mosto da uve Marzemino e vinificazione tradizionale (6.6 g/L di zucchero residui dopo 45 giorni di fermentazione). Per concludere, la comparazione dell'evoluzione delle fermentazioni eseguite da lieviti e batteri utilizzando inoculi simultanei o protocolli di vinificazione tradizionali, hanno dimostrato l'importanza del monitoraggio delle caratteristiche chimiche del mosto per garantire un'evoluzione microbica affidabile, al di là delle caratteristiche specifiche di ciascun microrganismo.

Figura 2. Media delle durate delle fermentazioni svolte durante la vendemmia 2012 su 4 mosti, comparando 5 coppie di colture commerciali di lieviti e batteri.



I dati delle osservazioni microbiologiche (Tab. 1) forniscono un punto di vista alternativo ma complementare, che agevola la comprensione dello sviluppo delle fermentazioni e le interazioni tra lieviti e batteri. La misura delle cellule di lievito vive e morte, eseguite dopo 10 giorni, possono consentire di rilevare eventuali differenze di vitalità delle popolazioni di lievito dovute alla presenza di batteri lattici nelle prove svolte con inoculi simultanei. In

realtà, la concentrazione di cellule di lievito in questi test è stata sempre simile, o addirittura superiore, a quella osservata nelle vinificazioni tradizionali.

Tabella 1. Vitalità cellulare delle biomasse di lievito e accumulo di acido acetico nelle vinificazioni sperimentali condotte durante la vendemmia 2011.

Mosto	Coppia lievito batteri	Lieviti dopo 48 ore dall'inoculo (10^6 ufc/mL)				Acido acetico (g/L)	
		CF*	CF*	VT*	VT*	CF*	VT*
		Cell. vive	Cell. morte	Cell. vive	Cell. morte		
Teroldego	1	53.0	1.0	44.0	1.3	0.15	0.14
	2	51.0	2.3	41.0	1.8	0.24	0.12
	3	48.0	0.5	43.0	1.0	0.24	0.11
	4	61.0	0.8	49.0	1.0	0.34	0.22
	5	34.0	2.8	40.0	4.0	0.14	< 0.10
Marzemino	1	180.0	7.0	60.0	4.5	0.31	0.25
	2	130.0	13.0	75.0	1.0	0.31	0.52
	3	65.0	8.0	46.0	9.0	0.42	0.23
	4	110.0	5.0	56.0	6.0	0.51	0.49
	5	60.0	12.0	44.0	9.5	0.22	0.22
C. Sauvignon	1	27.0	8.5	29.0	6.5	0.71	0.56
	2	29.0	6.5	25.0	5.5	0.60	0.69
	3	28.0	5.5	70.0	3.0	0.53	0.38
	4	26.0	1.1	16.0	7.0	0.95	0.71
	5	32.0	5.5	24.0	4.0	0.37	0.52
Merlot	1	67.0	11.0	50.0	4.5	0.31	0.25
	2	61.0	10.0	38.0	9.5	0.31	0.52
	3	57.0	14.0	39.0	7.5	0.42	0.23
	4	800.0	5.6	43.0	3.0	0.51	0.49
	5	98.0	17.0	38.0	7.0	0.22	0.22

*CF : cofermentazioni. VT: vinificazione tradizionale.

La differenza tra i conteggi sembra essere più correlata al ceppo di lievito che al mosto utilizzato (Tab. 1). La concentrazione di batteri lattici inizialmente presente nei mosti era sempre piuttosto bassa, circa 10^2 ufc/mL, concordando con quanto osservato in precedenti

studi degli stessi autori riguardanti la microflora di uve e mosti freschi. Dopo il coinoculo la concentrazione dei batteri lattici è aumentata in tutte le prove fino a valori di circa 10^6 ufc/mL, con differenze limitate tra le diverse coppie, probabilmente dovute alle specifiche caratteristiche delle colture liofilizzate. Il punto di principale interesse è che nelle prove di conferma la concentrazione di batteri lattici è rimasta costante per diverse settimane, o in alcuni casi è aumentata fino a 10^7 ufc/mL, consentendo lo svolgimento di un'efficace fermentazione malolattica. Questo comportamento è caratteristico di fermentazioni malolattiche svolte su mosti in fermentazione ed è molto diverso dall'evoluzione della flora microbica osservata in vino, dove i fattori limitanti (pH, SO_2 , etanolo) spesso causano un rapido declino della carica batterica. Nonostante questi risultati promettenti, la fermentazione simultanea lieviti /batteri non è priva di criticità. L'accumulo di acido acetico al termine del processo fermentativo è stato generalmente maggiore nel caso delle fermentazioni simultanee; questa osservazione conferma il potenziale rischio di deterioramento del vino dovuto all'attività batterica in un ambiente ricco di zuccheri. Nelle prove svolte il pH dei mosti, vicino a 3.5, ha favorito il controllo dell'attività eterofermentativa dei batteri. Tuttavia, considerando che generalmente si assiste in questi ultimi anni ad un aumento del pH dei vini in molte regioni enologiche, il rischio di un eccessivo accumulo di acido acetico non deve essere sottovalutato.

CONCLUSIONI

Questo lavoro suggerisce che l'inoculo simultaneo di lieviti e batteri nel mosto può essere una promettente alternativa ai tradizionali approcci enologici per garantire un corretto svolgimento della fermentazione malolattica in mosti con gravi carenze nutrizionali o rilevanti fattori limitanti. Tuttavia, un attento controllo della composizione chimica e microbiologica delle uve deve rimanere la via principale di ottenere affidabili attività microbiologica nelle prime fasi della vinificazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamse CE., Bartowsky EJ., 2012. Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *Word J Microbiol Biotechnol* 28(1): 255-265.
- Bell SJ., Henschke PA., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes. fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res* 11(3): 242-295.
- Comitini F., Ferretti R., Clementi F., Mannazzu I., Ciani M., 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* 99(1): 105-111.
- Guzzon R., Poznanski E., Conterno L., Vagnoli P., Krieger-Weber S., Cavazza. A., 2009. Selection of a New Highly Resistant Strain for Malolactic Fermentation under Difficult Conditions. *S Afr J Enol Vitic* 30(2): 133-141.
- Zapparoli G. Tosi E. Azzolini M. Vagnoli P. Krieger S (2009) Bacterial Inoculation Strategies for the Achievement of Malolactic Fermentation in High-alcohol Wines. *S Afr J Enol Vitic* 30(1): 49-55
- Guzzon R., Widmann G., Settanni L., Malacarne M., Francesca N. Larcher R., 2011. Evolution of Yeast Populations during Different Biodynamic Winemaking Processes. *S Afr J Enol Vitic* 32(2): 242-250.
- Mendoza L. M., Manca de Nadra M. C., Farias M. E., 2010. Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance. Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts. *Food Res Int* 43(8): 1990-1998.
- OIV. 2012. Resolution OENO 17/2003 "Bacteriological Control". International Oenological Codex. OIV. Parigi (F).
- Rosi I., Fia G., Canuti V., 2003. Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Aust J Grape Wine Res.* 9: 194-199.
- Zapparoli G., Torriani S., Malacrino P., Suzzi G., Dellaglio F., 2003. Interactions between *Saccharomyces* and *Oenococcus oeni* strains from Amarone wine affect malolactic fermentation and wine composition. *Vitis* 42(2): 107-108.