

Impiego di colture di batteri lattici selezionati in vinificazione: inoculo diretto o riattivazione?

Lactic acid bacteria starter cultures in oenology: direct-vat inoculation or reactivation?

A. Cavazza, G.L. Vavassori*, G. Volonterio*

Istituto Agrario di S. Michele - Via Mach, 1 - 38010 S. Michele all'Adige (Trento) - Italia

e-mail: agostino.cavazza@ismaa.it

* DISTAM - Sezione Industrie Agrarie - Via Celoria, 2 - 20133 Milano

e-mail: volont@imiucca.csi.unimi.it

(ricevuto il 02.11.98, accettato il 14.01.99)

Riassunto

Con questo lavoro abbiamo inteso valutare le prestazioni enologiche di uno starter in funzione delle modalità del suo impiego.

Abbiamo seguito l'andamento della fermentazione malolattica in una serie di vinificazioni, di volume compreso fra 60 e 150 hL. Il comportamento della coltura inoculata direttamente è stato messo a confronto con quello della stessa sottoposta ad una preventiva riattivazione in mosto, e mantenuta in moltiplicazione mediante rinnovo continuo del vino, secondo un protocollo messo a punto da noi.

Tali procedure sono state confrontate con l'inoculo tradizionale, che avviene mediante taglio con partite di vino in malolattica, e con la fermentazione malolattica spontanea.

L'inoculo diretto di colture di batteri lattici liofilizzati non si è dimostrato sempre efficace, al contrario un protocollo di riattivazione/ambientamento in mosto sembra dare maggiori garanzie di successo dell'inoculo.

Alla luce dei nostri risultati l'inoculo con una coltura starter di *O. oeni*, propagata secondo il protocollo da noi seguito, ha consentito una drastica riduzione dei tempi sia rispetto ai testimoni non inoculati, che in rapporto agli altri sistemi di inoculo, in particolare all'inoculo diretto.

Summary

We tested the performances of a commercial freeze-dried malolactic starter culture and their dependence on the reactivation procedures.

We monitored the malolactic fermentation in a set of industrial vinifications (60-150 hL each), in order to compare the induction of malolactic fermentation by a direct-vat inoculum with the induction by a grape must precultured starter. Such a culture was prepared by inoculating a small amount of freeze-dried culture in 20 L 1:1 water diluted grape must, subsequently expanded to a 400-L and then a 4000-L grape must cultures.

Aliquots (5-30 hL) of this culture were used to inoculate wines, and refreshed by adding the same amount of must.

These procedures were also compared with the traditional way of inoculate wines for MLF, that is performed by adding a 10% wine undergoing MLF, and with non-inoculated wines.

The performance of direct-vat inoculum was not always satisfactory. On the contrary the preculture starter was very effective and gave rise to quick and complete malolactic fermentation.

Only the precultivation of a starter culture seems to give reliable results regarding the MLF speed, better than the other inoculation procedures.

Parole chiave: fermentazione malolattica, *Oenococcus oeni*, colture starter, inoculo diretto.

Key words: Malolactic Fermentation (MLF), *Oenococcus oeni*, starter cultures, direct-vat inoculation.

Introduzione

Il controllo della fermentazione malolattica può essere attuato mediante tre sistemi (Lafon-Lafourcade, 1983, Wibowo *et al.*, 1985).

- 1) Mantenere nel corso della vinificazione condizioni che favoriscano la microflora malolattica naturalmente presente nel vino. Ciò si può ottenere mantenendo bassa la concentrazione di SO₂ (Kunkee, 1974), allungando il tempo di contatto con le fecce e conservando il vino a temperature comprese tra 15 e 26 °C (Beelman and Gallander, 1979; Kunkee *et al.*, 1974).
- 2) Inoculare il vino che deve subire la fermentazione malolattica con un altro in cui è già avvenuta o è in corso: questa è la pratica più diffusa.
- 3) Inoculare colture di batteri malolattici selezionati: questo sistema permette di accorciare notevolmente la lunga fase di latenza che *Oenococcus oeni* presenta prima di iniziare la fermentazione malolattica, ma non sempre il successo è garantito.

L'inoculo con batteri lattici selezionati è ampiamente descritto in letteratura, e protocolli di riattivazione ed utilizzo sono stati messi a punto da Delfini e Climent (1987), Prah *et al.* (1988), Costello (1993), Lonvaud-Funel *et al.* (1993), Krieger (1993), Valade e Laurent (1994) e Pilone (1995). Tuttavia non esiste ancora un protocollo che sia allo stesso tempo semplice da realizzare, pratico da utilizzare e sicuramente efficace. Le nuove produzioni di batteri malolattici utilizzabili per inoculo diretto (Pilone, 1995), sembrano aver risolto solo in parte il problema, poiché, se presentano notevoli vantaggi dal punto di vista della praticità d'uso, non danno una garanzia assoluta quanto alla riuscita del processo. Quest'ultimo fattore e il costo ancora molto elevato, sembrano essere le cause limitanti la diffusione delle colture malolattiche ad inoculo diretto.

Scopo del presente lavoro era di valutare la possibilità di introdurre in una cantina di grandi dimensioni nella zona del Chianti Classico (Toscana, Italia), una procedura di gestione della fermentazione malolattica consistente in due fasi successive: a) un protocollo iniziale di riattivazione di batteri lattici utilizzato per dare origine ad una coltura starter continuamente rinnovata; b) il suo impiego per l'inoculo delle partite di vino rosso durante tutto il periodo della vendemmia.

Tale coltura starter è stata impiegata in vini ottenuti da uve della varietà Sangiovese, che hanno sempre mostrato maggiori difficoltà nel subire tale fermentazione rispetto ad altre varietà coltivate nella zona, come il Cabernet o il Merlot (Tachis, 1991).

Materiali e metodi

Composizione dei mosti usati nella preparazione degli starter

Per le prime fasi della preparazione degli starter si sono usati mosti di uve bianche (Chardonnay o Trebbiano) la cui composizione era compresa tra i seguenti valori: acidità titolabile 4,50-6,90 g/L; pH 3,31-3,60; acido L-malico 1,44-2,88 g/L.

Per le fasi finali sono stati usati mosti di uve rosse così composti: acidità titolabile 6,28-8,77 g/L; pH 3,24-3,45; acido L-malico 2,14-3,16 g/L.

Composizione dei mosti vinificati

I mosti utilizzati in questa sperimentazione erano ottenuti da uve Sangiovese vinificate in rosso secondo il disciplinare di produzione del Chianti Classico.

I principali parametri chimici erano compresi nei range di seguito riportati: acidità titolabile: 6,16-8,48 g/L; pH: 3,21-3,66; acido L-malico: 1,63-3,66 g/L; grado Babo 18-22,3. La quantità di SO₂ aggiunta era compresa tra 29 e 51 mg/L come SO₂ totale e tra 13 e 20 mg/L come SO₂ libera.

Microorganismi impiegati nelle vinificazioni

Per la fermentazione di tutti i mosti impiegati in queste prove si è utilizzato il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin 7303. Le modalità di reidratazione e di inoculo sono state quelle indicate dal produttore.

Per la fermentazione malolattica i vini sono stati inoculati con il ceppo di *Oenococcus oeni* DSM 7008 (CHR Hansen's), impiegato secondo il protocollo descritto più oltre oppure secondo le istruzioni del produttore.

La fermentazione malolattica spontanea è stata seguita in alcune partite di vino non sottoposte ad inoculo.

Conteggio dei microrganismi

La conta dei batteri lattici è stata fatta per semina su MRS Agar modificato, contenente il 20% di succo di mela e 4 mg/L di cicloesimide.

Le piastre sono state incubate in anaerobiosi a 30 °C per 10 giorni. Sono state contate come batteri lattici le colonie traslucide e puntiformi negative al test della catalasi.

Analisi chimiche

Tutte le analisi chimiche di mosti e vini sono state eseguite con metodi ufficiali; il contenuto di acido L-malico è stato determinato con metodo enzimatico Boehringer cod. 139068, l'acido acetico è stato determinato con metodo enzimatico Boehringer cod. 148621.

Inoculo dei batteri in vinificazione

Per valutare il comportamento delle colture starter sono stati messi a confronto una serie di vini inoculati con esse o con altre procedure. Sono state pertanto allestite quattro serie di prove, su partite di volume variabile tra 60 e 250 hL, di mosti o vini ottenuti da uve Sangiovese, così suddivise: 1) inoculo del mosto con starter; 2) inoculo diretto del preparato liofilizzato secondo le direttive del produttore; 3) inoculo del vino per taglio con altro vino già in fermentazione malolattica; 4) fermentazione malolattica spontanea in una serie di testimoni non inoculati.

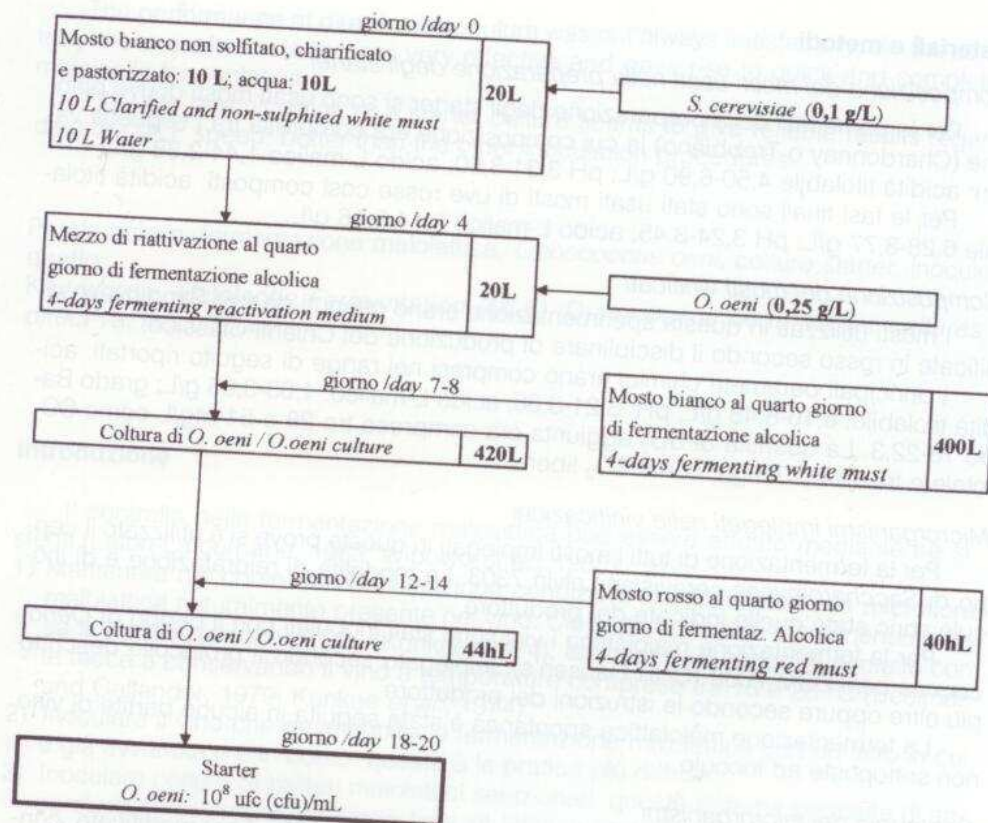


Fig. 1: Schema del metodo di preparazione della coltura starter con riattivazione su mosto al quarto giorno di fermentazione.

Fig. 1: Production scheme of malolactic starter culture reactivated in a 4-day fermenting must.

Risultati e discussione

Parte 1: procedura di preparazione degli starter e modalità di utilizzo

Il primo obiettivo di questo studio, come detto, era quello di allestire una coltura starter piuttosto che usare i batteri per inoculo diretto. Per questo si è usato come riferimento il protocollo messo a punto nella Champagne dal CIVC (Valade e Laurent, 1994) per la prima fase di adattamento e moltiplicazione della coltura. Una volta raggiunta una quantità sufficiente di biomassa, la coltura è stata mantenuta in moltiplicazione e continuamente rigenerata secondo il protocollo messo a punto da Pilone (1995).

La procedura di preparazione degli starter ha previsto tre passaggi (fig. 1).

Fase 1: 20 litri (7-8 giorni)

Il mezzo di riattivazione era costituito da mosto, contenente almeno 4 g/L di acido malico, diluito al 50% con acqua, pastorizzato a 70 °C per 10 minuti ed inocula-

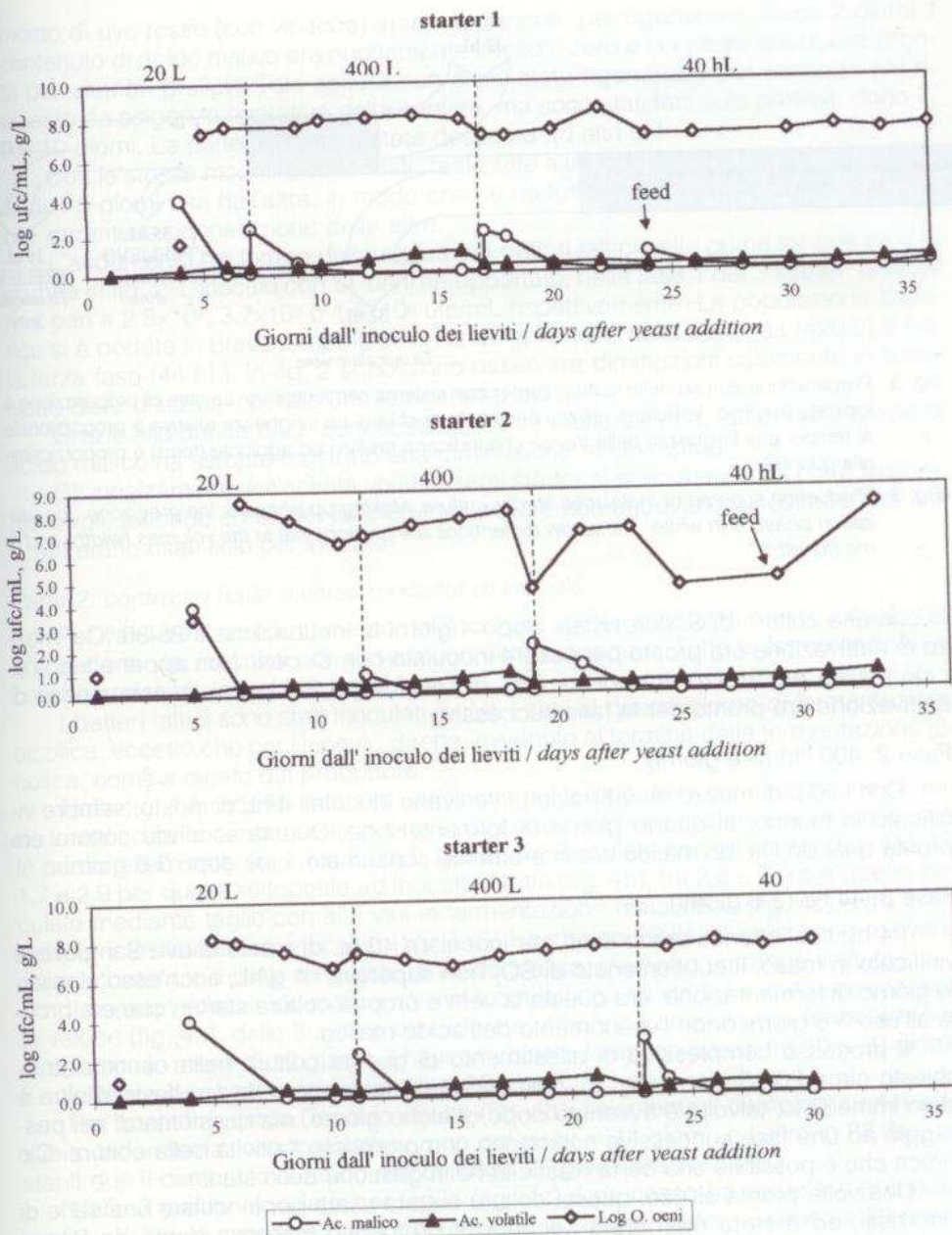


Fig. 2: Evoluzione della popolazione di *O. oeni*, del tenore di acido malico e di acidità volatile nei successivi passaggi di preparazione degli starter. I punti singoli indicano la carica naturale di *O. oeni* prima dell'inoculo.

Fig. 2: *O. oeni* growth, malic acid consumption and acetic acid increase during the starter preparation. Single points show natural *O. oeni* amount before the inoculum addition.

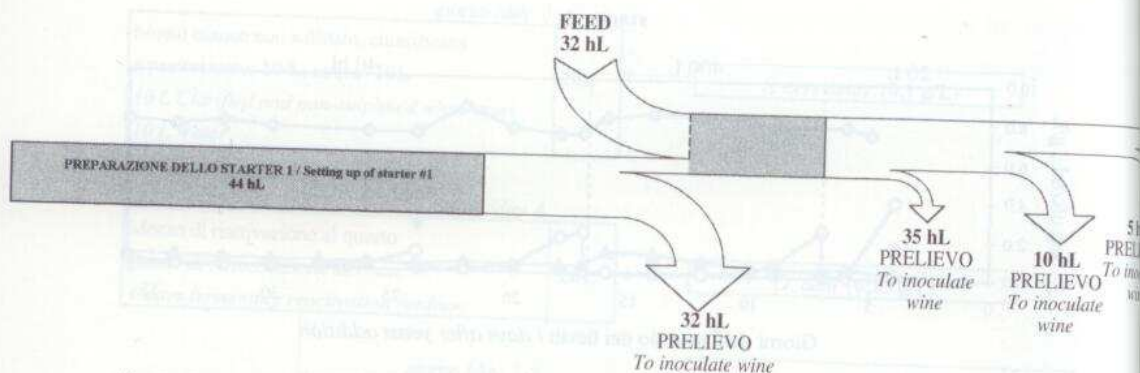


Fig. 3: Preparazione ed uso della coltura starter con sistema semicontinuo. La fase di preparazione è indicata in grigio, la fase di utilizzo è indicata in chiaro. La lunghezza relativa è proporzionale al tempo, e la larghezza delle frecce che indicano prelievi ed aggiunte (feed) è proporzionale alle quantità.

Fig. 3: Production scheme of malolactic starter culture. Making up phase is the grey zone, the utilization phase is in white. The arrow dimensions are proportional to the volumes (width) and time (length).

to con una coltura di *S. cerevisiae*. Dopo 4 giorni di incubazione a 25-30 °C il mezzo di riattivazione era pronto per essere inoculato con *O. oeni*. Non appena tutto l'acido malico del mezzo era consumato, di solito dopo 2-4 giorni, questo mezzo di riattivazione era pronto per la fase successiva.

Fase 2: 400 litri (3-6 giorni)

Con i 20 L di mezzo di riattivazione venivano inoculati 4 hL di mosto, sempre vinificato in bianco, al quarto giorno di fermentazione. Questa seconda coltura era pronta quando l'acido malico era interamente consumato, cioè dopo 3-6 giorni.

Fase 3: 44 hL (3-6 giorni).

I 4 hL così ottenuti erano usati per inoculare 40 hL di mosto di uve Sangiovese vinificato in rosso, il cui contenuto di SO_2 non superava i 4 g/hL, anch'esso al quarto giorno di fermentazione: era questa la vera e propria coltura starter, che era pronta all'uso 3-6 giorni dopo l'esaurimento dell'acido malico.

Il processo complessivo di allestimento di questa coltura nella cantina ha richiesto circa 20-25 giorni (fig. 2). Non sempre il passaggio da una fase all'altra è stato immediato, talvolta è avvenuto dopo qualche giorno, ma questi ritardi nel passaggio ad una fase successiva non hanno compromesso l'attività della coltura. Ciò indica che è possibile una certa elasticità nella gestione dello starter.

Una volta pronta all'uso, questa coltura è stata usata per inoculare una serie di vini rossi, ed è stata rigenerata secondo il protocollo messo a punto da Pitone (1995). Da essa sono state prelevate diverse aliquote in tempi successivi, di volta in volta sostituite con pigiato fresco di uve rosse. La coltura così rigenerata era nuovamente pronta non appena l'acido malico era consumato.

Nel corso dell'intera vendemmia sono state allestite in questo modo tre colture starter. In fig. 3 è schematizzato il ciclo di prelievi con rigenerazione della prima di esse.

La prima coltura starter ha richiesto 20 giorni di preparazione, al ventiquattresimo giorno (fig. 2 e 3) si sono prelevati 32 hL, che sono stati sostituiti con 32 hL di

mosto di uve rosse (con vinacce) in fermentazione, per rigenerarla. Dopo 2 giorni il contenuto di acido malico era nuovamente sceso a zero e la coltura era quindi pronta per ulteriori prelievi. Tale coltura non è più stata rigenerata, non essendo più richiesto da esigenze operative della cantina, ma sono stati fatti solo prelievi, dopo 7, 9 e 10 giorni. La parte restante è stata destinata ad altri usi.

Con le stesse modalità sono state realizzate altre due colture starter, scaglionate di 4-5 giorni una dall'altra, in modo che ce ne fosse sempre almeno una disponibile durante la rigenerazione delle altre.

L'andamento nel tempo della carica dei batteri lattici nelle prime tre colture è riportata in fig. 2. L'inoculo con *O. oeni* ha apportato, nella fase 1 dei 3 starter, una carica pari a $2,8 \times 10^7$, $3,7 \times 10^8$ e $1,6 \times 10^8$ ufc/mL rispettivamente. La popolazione batterica si è portata in breve tempo a valori analoghi anche nella seconda (420 L) e nella terza fase (44 hL). In fig. 2 si possono osservare diminuzioni solamente in occasione delle diluizioni operate con le rigenerazioni.

Grazie alla carica di *O. oeni* costantemente molto elevata, la concentrazione di acido malico ha sempre mostrato una diminuzione molto rapida.

Gli innalzamenti dell'acidità volatile negli starter si sono mantenuti entro limiti ragionevoli, tenendo conto del fatto che tali colture non andavano a costituire vini finiti, ma erano usati solo per inoculo.

Parte 2: confronto fra le diverse modalità di inoculo

Per valutare il comportamento delle colture starter sono stati messi a confronto una serie di vini inoculati con esse o con altre procedure. Tutte le fermentazioni alcoliche sono state regolari e complete.

I batteri lattici sono stati inoculati in tutti i casi al quarto giorno di fermentazione alcolica, eccetto che per l'inoculo diretto, avvenuto al termine della fermentazione alcolica, come indicato dal produttore.

Nella fig. 4 è rappresentata la variazione nel tempo della concentrazione di acido L-malico nelle quattro serie di prove. La concentrazione iniziale era variabile, nelle partite esaminate, fra 1,7 e 3,0 g/L per quelle inoculate con gli starter (fig. 4a), fra 1,7 e 2,9 per quelle sottoposte ad inoculo diretto (fig. 4b), tra 2,6 e 2,9 per quelle inoculate mediante taglio con altri vini in fermentazione malolattica (fig. 4c) e tra 1,7 e 2,8 per i testimoni non inoculati (fig. 4d). I campioni delle diverse serie avevano quindi contenuto iniziale differente di acido malico, ma entro un range limitato.

Il consumo dell'acido malico nei vini inoculati con gli starter è stato sempre molto veloce (fig. 4a): delle 8 partite considerate, 4 hanno completato la fermentazione malolattica in meno di 10 giorni, 2 hanno richiesto tempi compresi fra 10 e 20 giorni, e solamente due hanno richiesto più di 20 giorni.

Per quanto riguarda l'inoculo diretto (fig. 4b), solamente 2 campioni su 4 hanno subito la fermentazione malolattica, uno dei quali in 14 giorni, e l'altro in 28. Nei restanti due il contenuto di acido malico dopo 28 giorni era invariato.

Nelle 3 partite inoculate per taglio (fig. 4c) il processo ha avuto tempi mediamente più lunghi rispetto a quelli inoculati con le colture starter, superiori a 20 giorni.

Nei testimoni non inoculati (fig. 4d) la fermentazione malolattica ha avuto luogo solamente in un campione su tre, ed in tempi molto lunghi (39 giorni).

L'evoluzione della carica di batteri lattici nelle medesime prove è riportata in figura 5: generalmente nei campioni inoculati con lo starter malolattico la carica di *O. oeni* è sempre stata elevata (fig. 5a), e ciò spiega la rapidità osservata nelle fermentazioni malolattiche in questa serie di partite. Nelle partite inoculate direttamente (fig. 5b), nonostante la carica iniziale fosse sempre superiore a $6,0 \times 10^6$ ufc/mL, abbiamo osservato diminuzioni drastiche già dopo 24 ore, con una sola eccezione,

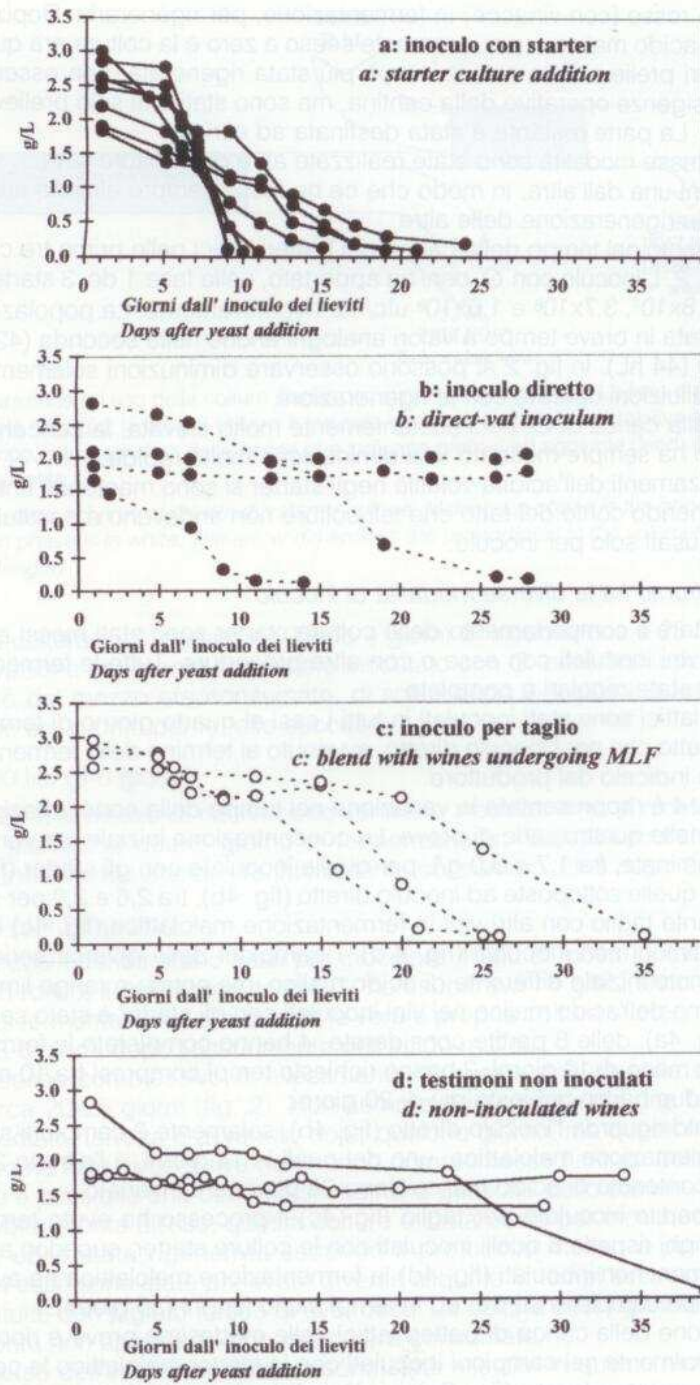


Fig. 4: Variazione della concentrazione di acido malico nei vini in funzione della modalità di inoculo dei batteri

Fig. 4: Malic acid decrease in wines with different inoculum procedures.

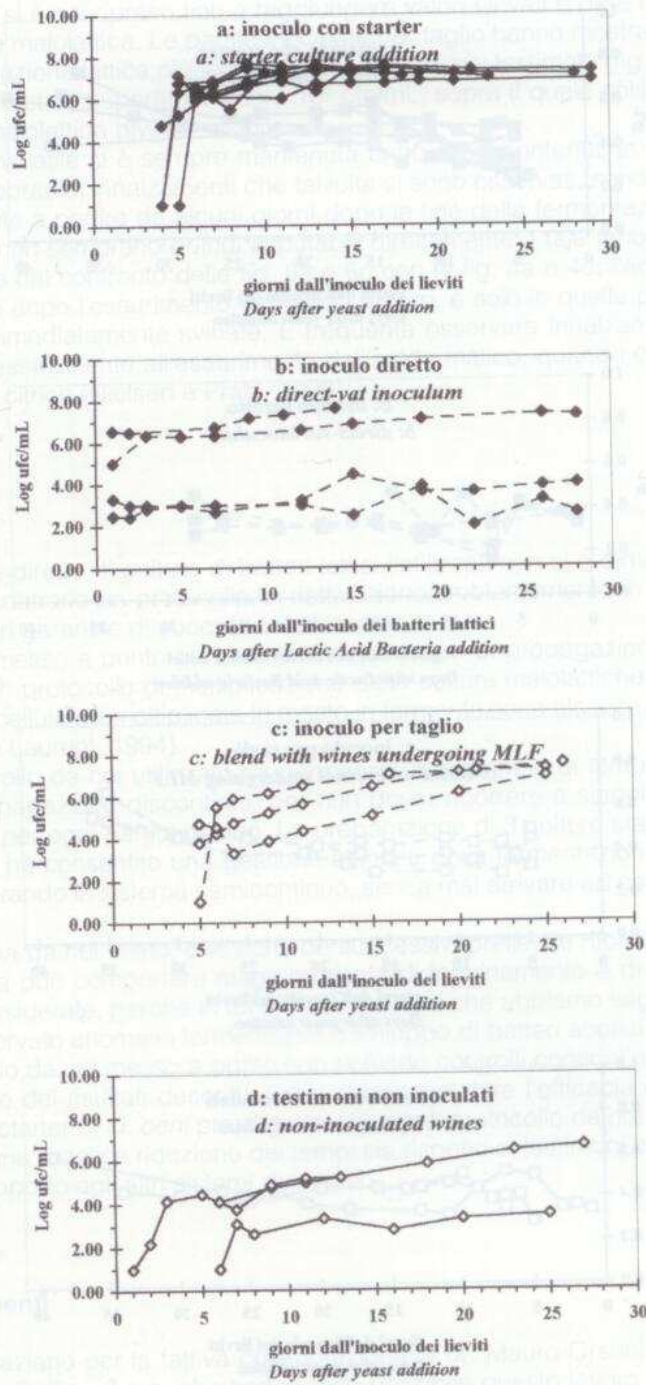


Fig. 5: Evoluzione della popolazione di *O. oeni* in funzione della modalità di inoculo dei batteri.
Fig. 5: *O. oeni* growth in wines with different inoculum procedures.

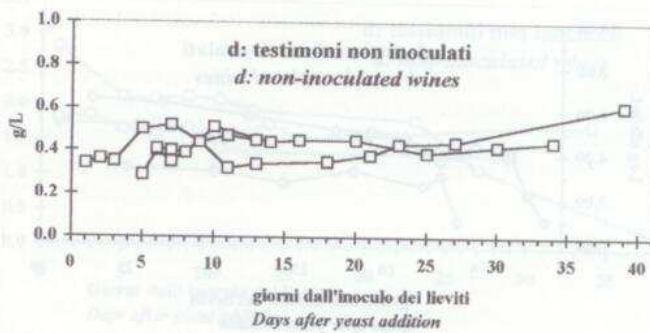
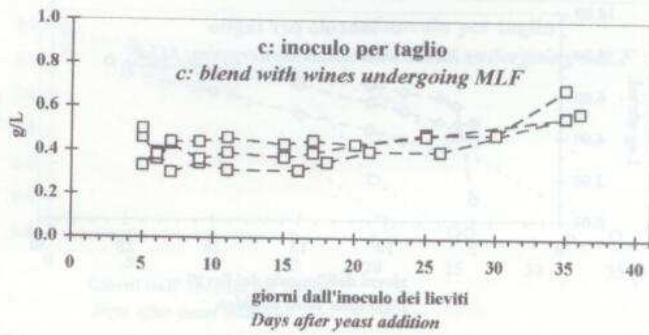
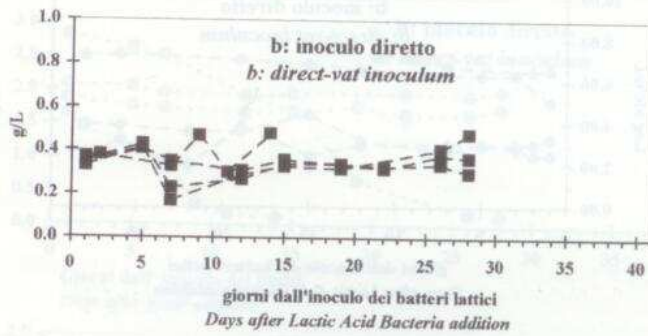
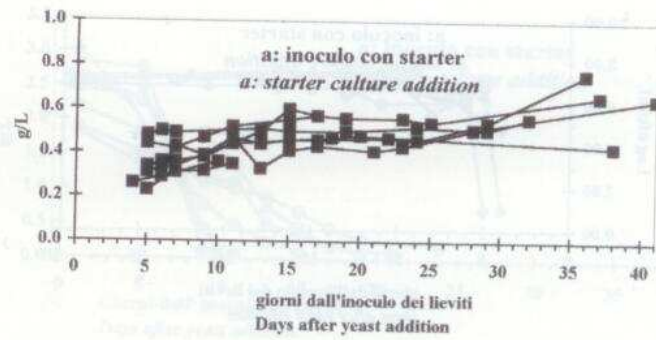


Fig. 6: Variazione dell'acidità volatile in funzione della modalità di inoculo dei batteri.
Fig. 6: Acetic acid increase in wines with different inoculum procedures.

in cui *O. oeni* si è poi ripreso fino a raggiungere valori elevati e dare origine ad una fermentazione malolattica. Le partite inoculate per taglio hanno mostrato una crescita della popolazione lattica più lenta (fig. 5c), mentre nei testimoni (fig. 5d) solamente in un caso è stato superato il valore 10^6 ufc/mL, sopra il quale solitamente la fermentazione malolattica diventa visibile.

L'acidità volatile si è sempre mantenuta entro livelli contenuti in tutte le partite seguite; gli sporadici innalzamenti che talvolta si sono osservati, sono stati registrati esclusivamente a partire da alcuni giorni dopo la fine della fermentazione malolattica (fig. 6), e non sembrano quindi imputabili direttamente a tale fenomeno. Ciò appare evidente dal confronto delle fig. 6a e 6c con le fig. 4a e 4c: l'acidità volatile è salita sempre dopo l'esaurimento dell'acido malico, e solo in quelle partite che non sono state immediatamente svinate. È frequente osservare innalzamenti di acidità volatile successivamente all'esaurimento dell'acido malico, quando cioè *O. oeni* attacca l'acido citrico (Nielsen e Prahl, 1996).

Conclusioni

L'inoculo diretto di colture di batteri lattici liofilizzati non si è dimostrato sempre efficace, al contrario un protocollo di riattivazione/ambientamento in mosto sembra dare maggiori garanzie di successo dell'inoculo.

È stato messo a punto un sistema semicontinuo di propagazione della coltura utilizzando un protocollo di moltiplicazione delle colture malolattiche (Pilone, 1995), a partire da cellule premoltiplicate in mosto in fermentazione alcolica, anziché sul vino (Valade e Laurent, 1994).

Il protocollo da noi utilizzato ha permesso un risparmio di tempo rispetto ai sistemi di propagazione discontinui, per non dover ricorrere a singole procedure di riattivazione per ogni partita di vino. La preparazione di 3 colture starter ad intervalli di 4 giorni ha consentito una gestione ottimale della fermentazione malolattica in cantina, operando in sistema semicontinuo, senza mai arrivare ad esaurimento degli starter.

Il sistema da noi usato, che richiede successivi prelievi e rifornimenti di mosto, solo in teoria può comportare maggiori rischi di inquinamento e di sviluppo di microflora indesiderate, perché in tutte le vinificazioni che abbiamo seguito non abbiamo mai osservato anomalie fermentative o sviluppo di batteri acetici. L'applicazione del protocollo da noi messo a punto non richiede controlli continui né particolari.

Alla luce dei risultati descritti si è potuta constatare l'efficacia dell'inoculo con una coltura starter di *O. oeni* propagata secondo il protocollo da noi seguito, che ha consentito una drastica riduzione dei tempi sia rispetto ai testimoni non inoculati, ma anche in rapporto agli altri sistemi di inoculo.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la fattiva collaborazione: il dr. Mauro Orsoni e il dr. Pierluca Freddi della Ruffino S.p.a. che hanno reso possibile questo lavoro sperimentale, la dr.ssa Maria Letizia Melandri ed il dr. Angelo Bardi.

Bibliografia

1. BEELMAN R.B., GALLANDER J.F. (1979). *Wine deacidification*. Adv. Food. Res., (25): 1-53.
2. COSTELLO P.J. (1993). *Induction procedures for malolactic fermentation*. Wine Ind. J., (2): 51-56.
3. DELFINI C., CLIMENT D. (1987). *Esperimenti di induzione della fermentazione malolattica durante e dopo la fermentazione alcolica mediante colture batteriche liofilizzate*. Vignevini, (11): 35-38.
4. LAFON-LAFOURCADE S., CARRE E., RIBÉREAU-GAYON J. (1983). *Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines*. Appl. Environ. Microbiol., (46): 874-880.
5. KRIEGER S.A. (1993). *The use of active dry malolactic starter cultures*. Aust. NZ Wine Ind. J., (8): 56-62.
6. KUNKEE R.E. (1974). *Malo-lactic fermentation and winemaking*. In: *Chemistry of Winemaking*. A.D. Webb (Ed.). Adv. Chem. Ser., (137): 151-170. American Chemical Society, Washington, DC.
7. KUNKEE R.E. (1991). *Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in Wine making*. FEMS Microbiol. Rev., (88): 55-72.
8. NIELSEN J.C., PRAHL C. (1996). *Metabolism of citric acid by Leuconostoc oenos in direct inoculation, effect on wine flavour*. In: A. Lonvaud-Funel. *Oenologie 95: 5^a Symposium international d'oenologie*. Lavoisier, 317-320.
9. PILONE G.J. (1995). *A New Zealand experience in direct-vat inoculation for malolactic fermentation*. Wine Ind. J., (10): 169-173.
10. PRAHL C., LONVAUD-FUNEL A., KORSGAARD S., MORRISON E., JOEUX A. (1988). *Etude d'un nouveau procédé de déclenchement de la fermentation malolactique*. Conn. Vigne Vin., (22): 197-207.
11. TACHIS G. (1991). *Esperienze di fermentazione malolattica in cantina*. Vini It. XXXIII, (3) maggio-giugno.
12. VALADE M., LAURENT M. (1994). *La gestione della malolattica nella Champagne*. Vignevini, (4): 52-57.
13. WIBOWO D., ESCHENBRUCH R., DAVIS C.R., FLEET G.H., LEE T.H. (1985). *Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review*. Am. J. Enol. Vitic., (36): 302-313.