



Strumenti per una corretta gestione della fermentazione malolattica

RAFFAELE GUZZON

Centro di Trasferimento Tecnologico - Fondazione Edmund Mach (San Michele all'Adige, TN)

Il vino è un mezzo complesso che contiene migliaia di composti con effetti molto diversi sulla flora microbica.

Se questa condizione è nota per i lieviti, lo è ancora di più per i batteri lattici, tanto che la fermentazione malolattica è considerata un fenomeno piuttosto

capriccioso, la cui evoluzione dipende da fattori non sempre chiari e quindi gestibili. Ancora oggi in molte cantine la fermentazione malolattica avviene in maniera definita *spontanea*, dove la scelta di non utilizzare colture selezionate di batteri lattici non è dettata, come nel caso dei lieviti, da precise impostazioni aziendali ma dalla constatazione che spesso neanche l'uso di

microrganismi selezionati garantisce fermentazioni malolattiche rapide e riproducibili. Ovviamente quest'approccio non è accettabile ma per poterlo superare occorre che gli addetti ai lavori considerino l'evoluzione della popolazione di batteri lattici nel suo complesso, comprendendo il ruolo dei numerosi fattori, chimici e microbiologici, che concorrono alla definizione dei risultati della fermentazione malolattica. Questa nota vuole ripercorre le principali variabili, tecniche e biologiche, che giocano un ruolo nella gestione di questo processo.

Il vino, una successione di generi microbici

Per iniziare a comprendere meglio le dinamiche che influenzano la fermentazione malolattica occorre partire dalla considerazione che l'uva, il mosto e il vino sono ambienti in cui si evolve una complessa flora microbica, costituita da forme sia eucariotiche sia procariotiche. Già sulle uve è possibile rintracciare diverse specie di lieviti e batteri, questi ultimi prevalentemente acetici e appartenenti al genere *Gluconobacter*, più affine agli zuccheri che all'etanolo. I batteri lattici, in particolare *Oenococcus oeni*, non sono facilmente riscontrabili in campagna perché le concentrazioni molto basse, nell'ordine di qualche centinaio di cellule per grammo d'uva, sono oscurate, dal punto di vista analitico, da altri microrganismi più vigorosi e numerosi. È invece convinzione comune, anche se i dati scientifici in merito non sono molti, ritenere che le specie di batteri lattici più adattate all'ambiente enologico, come *Oenococcus oeni*, permangano latenti in cantina, sulle attrezzature e negli ambienti, per poi tornare a crescere quando siano presenti nuovi mosti e vini freschi, con la conseguente dote di nutrienti a disposizione dei microrganismi. È l'arrivo di nuovi mosti il fattore scatenante per la crescita della carica di batteri lattici in cantina, sebbene all'inizio della fermentazione alcolica si assista a concentrazioni ancora molto basse, inferiori alle

tre unità logaritmiche, e caratterizzate da una notevole varietà di generi e specie come *Pediococcus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, oltre che ovviamente *Oenococcus oeni*. La presenza di tutte queste specie non deve stupire poiché sono batteri prevalentemente dotati di un carattere eterofermentante, e quindi in grado di consumare gli zuccheri esosi e pentosi presenti nei mosti. È poi l'avvio della fermentazione alcolica, con la rapida scomparsa degli zuccheri e l'accumulo di etanolo e di altri fattori tossici, che vedremo in seguito approfonditamente, a selezionare naturalmente la microflora lattica, portando alla sola presenza di *Oenococcus oeni*. Questa specie è dotata di una buona resistenza all'etanolo, caratteristica che condivide con il genere *Pediococcus*, ma soprattutto di una spiccata resistenza ai bassi pH, uno dei principali fattori limitanti presenti nei vini. Quando ciò non dovesse avvenire, ad

esempio a causa di arresti di fermentazione, aumentano i rischi di alterazioni del vino proprio per la mancata eliminazione di specie di batteri lattici dannose. *Oenococcus oeni* è quindi la sola specie di batteri lattici che deve permanere nei vini al termine della fermentazione alcolica, sempre che si voglia portare a termine la fermentazione malolattica. A questo punto, se nel vino i numerosi fattori limitanti si sono mantenuti in un intervallo accettabile, si dovrebbe osservare la crescita della popolazione di *Oenococcus oeni* fino a concentrazioni superiori al milione di cellule per millilitro, con la conseguente degradazione delle fonti carboniose residuali, come l'acido malico, e quindi la fermentazione malolattica.

Perché le colture selezionate?

Se questa è la normale evoluzione della microflora lattica, qual è la funzione delle colture selezionate? Molte informazioni a ri-

guardo sono riportate in altri contributi, presentati anche sulle pagine di questa rivista. Ci limitiamo a considerare che l'utilizzo di batteri lattici selezionati risponde sostanzialmente a due funzioni: la prima è quella di poter eliminare con trattamenti in pre-fermentazione alcolica, quindi direttamente sui mosti, buona parte della microflora indigena, che abbiamo visto essere potenzialmente dannosa; la seconda ragione, direttamente collegata alla precedente, è quella di poter disporre nel vino, al termine della fermentazione alcolica, di una carica microbica sufficientemente alta per permettere la rapida degradazione dell'acido malico. Sono quindi abbastanza semplici le ragioni che spingono all'impiego di colture selezionate di batteri lattici ed escludono generalmente effetti secondari sul vino, simili a quelli ottenibili con l'utilizzo di alcuni ceppi di lievito, ovvero l'esaltazione di aromi specifici legati al ceppo microbico.

FATTORI LIMITANTI PER IL CORRETTO SVOLGIMENTO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Fattori limitanti	Intervallo di accettabilità per i batteri lattici	Descrizione
pH	3,0 - 3,8	Il valore di pH influenza gli scambi chimici tra il citoplasma e l'ambiente. Il rendimento della fermentazione malolattica è fortemente influenzato dal grado di dissociazione degli acidi organici e trova il massimo di efficacia a pH 3,5. Un'eccessiva acidità può indurre diversi stress sia a carico della membrana sia di componenti citoplasmatiche, compromettendone di fatto l'attività.
Temperatura	15 - 30°C	I batteri lattici sono tipicamente mesofili. Sotto ai 15°C tendono a bloccare la loro attività, senza tuttavia morire. Temperature eccessive possono causare una mortalità sia diretta sia indotta, aumentando i danni dovuti alla presenza di etanolo.
Anidride solforosa	> 50 mg/l (come SO ₂ totale)	L'anidride solforosa ha un effetto batteriostatico alle concentrazioni normalmente riscontrabili in vino, durante il processo di vinificazione. Esplica un effetto letale a valori superiori agli 80 mg/l. La sua attività, essenzialmente a carico dei metabolismi energetici cellulari, è fortemente influenzata da diversi fattori ambientali tra cui pH, temperatura, presenza di acetaldeide ecc.
Etanolo	< 14% vol/vol	L'etanolo ha un forte potere solvatante a carico delle membrane cellulari, compromettendone l'integrità e quindi la vita della cellula. La sua azione è influenzata dalla temperatura; le cellule possono aumentare la loro resistenza in virtù di fenomeni di adattamento, grazie a concentrazioni di etanolo gradualmente crescenti e alle modalità di accrescimento della biomassa.
Tannini	Variabile	Diversi studi hanno descritto l'influenza degli acidi fenolici sui batteri lattici. Tra gli acidi fenolici con un'azione negativa verso i batteri lattici troviamo l'acido ferulico e l'acido p-cumarico.
Residui di lisozima o agrofarmaci	Variabile	La rimozione del lisozima dopo i trattamenti sui mosti può rivelarsi complessa, con il rischio di residualità nel vino. Analoghi fenomeni possono essere osservati anche per gli agrofarmaci. Per favorire l'eliminazione può essere sfruttato il potere adsorbente delle fecce di lievito mediante rimescolamenti del vino.
Contenuto di acido malico	< 1 g/l	Indurre la fermentazione malolattica in vini con livelli di acido malico molto bassi può rivelarsi un problema a causa della scarsità di fonti energetiche. In questi casi può rivelarsi utile ricorrere a ceppi con un'elevata attività malato permeasica.
Acidi grassi	Variabile	L'acido oleico è un importante cofattore di sviluppo per i batteri. Alcune pratiche, come chiarificazioni troppo spinte, possono ridurne i contenuti nei mosti, con effetti deleteri. Al contrario gli acidi grassi a catena media possono avere un impatto negativo sul corso della fermentazione malolattica e questo potrebbe essere uno dei meccanismi di antagonismo tra lieviti e batteri.

FATTORI NUTRIZIONALI ESSENZIALI PER LO SVILUPPO DEI BATTERI LATTICI IN VINO

Fattore nutrizionale	Descrizione
Fonti di carbonio	I batteri lattici possono adattarsi a basse concentrazioni di zuccheri esosi, garantendo il mantenimento della propria attività metabolica, quindi i pochi residui zuccherini presenti nel vino possono essere sufficienti a garantire la fermentazione malolattica. Quasi tutti i ceppi di batteri malolattici hanno carattere fruttosifilo e possono convertire parte del fruttosio in mannitolo, ottenendo una maggiore resa energetica. In generale i batteri lattici possono utilizzare i pentosi residuati nel vino, con il rischio però di aumento dell'acidità volatile e d'insorgenza di gusti amari. È stato invece dimostrato l'effetto positivo di polisaccaridi prodotti dai lieviti (mannoproteine) sull'insorgenza e la velocità della fermentazione malolattica.
Acido malico	L'acido malico è naturalmente presente nel vino nella forma isomerica L. L'acido D-malico non è naturalmente presente nel succo d'uva e non è metabolizzato dai batteri lattici. L'acido L-malico stimola la crescita e la produzione di biomassa di <i>Oenococcus oeni</i> che ne ricava un contributo energetico, sfruttando il gradiente protonico che si viene a creare tra la cellula e l'ambiente. Tale attività è massima a pH bassi, inferiori a 3,5.
Acido citrico	La degradazione dell'acido citrico da parte di <i>Oenococcus oeni</i> è stata correlata con la sintesi di acido acetico, di acetile e di acetoino. <i>Oenococcus oeni</i> non è in grado di crescere utilizzando l'acido citrico come unica fonte di carbonio e di energia, ma la sua presenza stimola il tasso di crescita e la produzione di biomassa. Solitamente il consumo batterico dell'acido citrico è ritardato rispetto alla degradazione dell'acido malico.
Acido tartarico	Lievi diminuzioni della concentrazione di acido tartarico sono osservate durante la fermentazione malolattica. Questi cambiamenti sono dovuti sia alla variazione della solubilità dell'acido sia alla parziale degradazione da parte di batteri. Se eccessiva, quest'attività può rivelarsi dannosa.
Fonti azotate	I batteri lattici richiedono un mix complesso di fonti azotate - aminoacidi, purine, pirimidine, vitamine e azoto minerale - che difficilmente sarà presente nel vino. <i>Oenococcus</i> e <i>Pediococcus</i> possono richiedere fino a 16 differenti aminoacidi, di cui alcuni essenziali, ma non possono utilizzare fonti di azoto inorganiche, come il fosfato biammonico. È invece nota la possibilità di metabolizzare proteine e peptidi, derivati dalla lisi cellulare dei lieviti. Quest'attività permette di coprire buona parte del fabbisogno dei batteri. Tuttavia un'integrazione in vini <i>difficili</i> può essere utile, utilizzando prodotti specifici.
Vitamine, minerali, fattori di crescita	Le vitamine giocano un ruolo importante nell'attività batterica in vino. Adenina, xantina, guanina e uracile hanno un effetto stimolante sulla crescita dei batteri, così come diverse vitamine del gruppo B tra cui l'acido folico, l'acido nicotinico e l'acido pantotenico. Potassio, sodio, magnesio e quantità relativamente elevate di manganese sono necessari per la crescita batterica. Quest'ultimo poi gioca un ruolo essenziale come cofattore dell'enzima malolattico. Tuttavia le concentrazioni di tutti questi ioni nel vino sono generalmente sufficienti per sostenere la crescita e il metabolismo dei batteri lattici.

Purtroppo però i batteri lattici devono svilupparsi nel vino, un ambiente non adatto allo sviluppo microbico a causa della presenza di numerosi fattori limitanti, che devono essere monitorati per poter scegliere le colture selezionate più adatte ad ogni singolo vino. Per monitorare questi fattori occorre tuttavia conoscerli.

Gli ostacoli allo sviluppo dei batteri lattici

Come abbiamo già accennato, alcune caratteristiche chimiche dei vini possono creare seri ostacoli allo sviluppo dei batteri lattici. Il vino è un prodotto già fermentato, dove molte fonti nutrizionali sono state consumate da altri generi microbici e che quindi si presenta piuttosto stabile, in altre parole difficile da colonizzare per i batteri. A ciò si aggiunga che alcune pratiche di cantina possono avere riflessi negativi sulla microflora, sebbene non siano state direttamente attuate per controllare lo sviluppo dei bat-

teri lattici. Generalmente la concentrazione di anidride solforosa, la presenza di alcol, i bassi pH e le basse temperature si ritengono essere i quattro fattori limitati per lo sviluppo microbico presenti nel vino. Questo è senz'altro vero, dato che ognuno di questi fattori può, da solo, bloccare lo sviluppo microbico se venisse posto al di fuori dei limiti di sopravvivenza, descritti nella tabella dedicata (pagina precedente). Tuttavia, accade di frequente di osservare problemi nel consumo dell'acido malico, anche quando questi fattori sono mantenuti in un intervallo accettabile. La scienza ha quindi approfondito negli anni lo studio dell'ambiente vino, e della sua influenza sullo sviluppo della microflora lattica, andando a individuare altri fattori limitanti meno noti ma altrettanto fondamentali. Anche in questo caso una descrizione dettagliata è riportata nella già citata tabella. Da quanto riportato è evidente come nella maggioranza dei casi, ad esempio nel caso dei tan-

nini, del ceppo di lievito e dei conseguenti metaboliti, nella composizione nutrizionale del vino, siano state le scelte dell'enologo a determinare l'attitudine alla fermentazione malolattica di uno specifico vino. È quindi essenziale pianificare lo svolgimento della fermentazione malolattica sin dall'inizio del processo di vinificazione, in modo da ridurre il rischio di un accumulo di fattori limitanti. Assieme a questi ultimi occorre poi considerare anche le esigenze nutrizionali proprie dei batteri lattici. Questi microrganismi si trovano a crescere in un mezzo già pesantemente colonizzato dai lieviti e quindi può rivelarsi necessaria l'integrazione di alcune delle principali fonti nutrizionali. Se, ovviamente, l'apporto di fonti carboniose può essere assicurato solo dagli acidi organici presenti nei vini, e in particolare dall'acido malico, è da valutare l'integrazione di fonti azotate, vitamine e altri fattori nutrizionali minori, descritti dettagliatamente nella tabella qui sopra.

Approcci tecnici alla fermentazione malolattica

Sulla base di quanto detto, e della esaustiva bibliografia tecnica e scientifica disponibile sull'argomento, è possibile individuare un corretto approccio alla fermentazione malolattica.

Tale approccio non può esulare, come già accennato, da un'impostazione della fermentazione malolattica fin dalla vendemmia, andando a ricercare nei mosti i **fattori limitanti** prima descritti, per verificare che questi si mantengano in un intervallo di accettabilità per i batteri lattici. Anche alcune **pratiche pre-fermentative**, come le chiarifiche spinte o la flottazione, possono avere un impatto sulla flora batterica, sia diretto (abbattendone la concentrazione), sia indiretto, in quanto possono indurre fenomeni di stress nel lievito e con essi la produzione di molecole tossiche per i batteri. Riguardo alle **aggiunte di anidride solforosa**, è utile rimarcare l'importanza di una accorta valutazione delle aggiunte di questo antisettico in funzione del pH del vino e del ceppo di lievito utilizzato, ricordando che i batteri lattici sono sensibili anche alla frazione legata dell'anidride solforosa. Il **ceppo di lievito** è poi, insieme

al **momento dell'inoculo** (di cui discuteremo in seguito), il fattore principale in grado di influenzare la fermentazione malolattica. Se è ormai accertato che in condizioni corrette i batteri lattici non sono in grado di influenzare negativamente l'evoluzione della fermentazione alcolica, è altrettanto vero il contrario. Il ceppo di lievito è, infatti, in grado di espletare diverse azioni di antagonismo nei confronti dei batteri lattici. Numerosi ceppi di lievito, anche selezionati, sono in grado di produrre rilevanti dosi di anidride solforosa che, sommata a quella aggiunta per motivi tecnologici, può facilmente superare il limite di sopravvivenza dei batteri lattici. Anche la parziale demalicazione del vino messa in atto dai lieviti può compromettere l'attecchimento dei batteri, perché va a ridurre una delle poche fonti carboniose presenti nei vini. Esistono poi evidenze sperimentali del fatto che alcuni lieviti siano in grado di sintetizzare altre molecole, ad esempio acidi grassi, che possono risultare tossiche per i batteri. Da queste considerazioni consegue che un corretto abbinamento tra ceppo di lievito e ceppo di batteri lattici sia essenziale per una corretta gestione della fermentazione malolattica.

Il coinoculo, non per tutti

L'ultimo, ma forse più importante, punto da tenere presente riguarda il momento dell'inoculo dei batteri lattici. Si è visto nel primo paragrafo che i batteri lattici indigeni, naturalmente presenti nei mosti, possono rimanere latenti durante la fermentazione alcolica per poi attivarsi nelle successive fasi di affinamento del vino. Da quest'osservazione deriva la pratica più comune, quella di inoculare i batteri lattici al termine della fermentazione alcolica, magari dopo il primo travaso del vino. Tale approccio ha indiscutibili vantaggi ma anche altrettanti limiti. I vantaggi stanno nella sicurezza di un inoculo di batteri in vino, un mezzo privo di zuccheri. In quest'ambiente i batteri possono disporre solo dell'acido malico come fonte energetica, riducendo il rischio di alterazioni organolettiche dei vini date dalla fermentazione eterolattica a carico degli zuccheri. È però vero che i batteri non hanno in questo modo il tempo di adattarsi ad un ambiente così difficile, da cui i numerosi problemi osservati nello svolgimento della fermentazione malolattica anche con colture selezionate di batteri. In vini particolarmente difficili saranno quindi da prendere in conside-

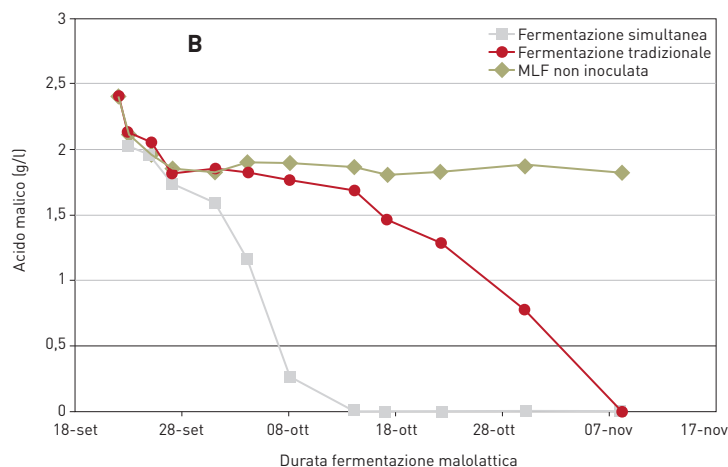
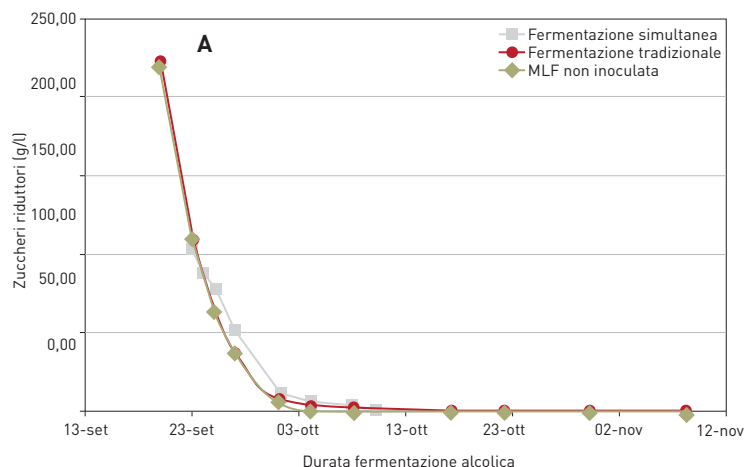
METODI DI INOCULO A CONFRONTO

Andamento della fermentazione alcolica (A) e malolattica (B) in vini bianchi prodotti con tre diversi protocolli di inoculo

degli starter enologici: inoculo simultaneo dei lieviti e dei batteri lattici in mosto, inoculo tradizionale dei batteri al termine

della fermentazione alcolica e vinificazione senza inoculo dei batteri lattici. Non si osservano alterazioni dell'andamento

della fermentazione alcolica ma nell'inoculo simultaneo si ottiene un deciso aumento della velocità della fermentazione malolattica.



SE AD ESSERE FERMENTATO NON È L'ACIDO MALICO

A riguardo dei batteri lattici è noto che, oltre all'acido malico, questi microrganismi possono consumare l'acido citrico e residui di aminoacidi presenti nel mosto: da questi metabolismi derivano diverse molecole dannose, come l'acido acetico, eccessive dosi di acido lattico, di diacetile, di acetoio, le ammine biogene e altri composti elencati nella tabella a fianco, dove sono riportate le principali alterazioni derivate dallo sviluppo non controllato dei batteri lattici. Un pronto controllo dell'evoluzione della microflora lattica è quindi essenziale e oggi può essere condotto sia mediante monitoraggi della concentrazione dell'acido malico, ottenibili anche con metodi enzimatici rapidi o con la spettrometria FT-IR, o mediante le analisi microbiologiche. Tra queste riveste sicuro interesse la citometria di flusso che, oltre a dare risultati in tempi molto brevi, riesce a evidenziare chiaramente la popolazione di cellule vive ma che non possono svilupparsi nelle tradizionali conte su Piastra Petri perché danneggiate da trattamenti chimico/fisici operati nei vini.

Alterazione	Molecole coinvolte	Descrizione
Torbidità, aumento acidità volatile, perdita di colore	Acido tartarico	Degradazione eccessiva da parte di <i>Oenococcus</i> , <i>Pediococcus</i> e <i>Lactobacillus</i> in vini ad alto pH e bassa concentrazione di etanolo (es. torchiati).
Amaro, aumento acidità volatile	Glicerina	Degradazione da parte di diverse specie di <i>Lactobacillus</i> in vini ad alto pH e bassa concentrazione di etanolo (es. torchiati).
Aumento acidità volatile	Zuccheri pentosi	Vini <i>secchi</i> con alto pH e basse dosi di anidride solforosa.
Mousiness	Aminoacidi, soprattutto Lisina e Ornitina	Degradazione da parte di <i>Oenococcus</i> e <i>Lactobacillus</i> in vini ad alto pH e condizioni ossidative.
Ammine biogene	Aminoacidi	Attività di degradazione legata a specifici ceppi, anche di <i>Oenococcus oeni</i> . Dovrebbe rappresentare un carattere discriminante nella selezione di starter commerciali. Fenomeno correlato a pH elevati e scarso controllo microbico.
Etilcarbammato	Aminoacidi in presenza di urea	Accumulo legato alla produzione di ammine biogene dall'arginina, in vini ad alti livelli di pH e etanolo.

razione colture batteriche che prevedano un adattamento preventivo in una miscela di vino e di nutrienti, una procedura sicuramente più complessa dell'inoculo diretto ma valida in casi, appunto, molto limitanti. Una strada alternativa è quella dell'inoculo simultaneo, o più precisamente a distanza di 24/48 ore, di lieviti e batteri nel mosto. Si vuole così consentire un adattamento graduale dei batteri nel mosto/vino ove i fattori limitanti, ad esempio l'etanolo e l'anidride solforosa, crescono gradualmente. Questo approccio va a stimolare nella microflora lattica forme di resistenza che, ormai è stato accertato, i batteri posseggono. Il rischio di tale sistema di gestione della fermentazione malolattica è legato alla presenza di zuccheri nel mezzo di fermentazione. Tuttavia l'uso di colture selezionate specificatamente e l'impiego di questa tecnica solo in vini dotati di una buona acidità, sotto pH 3,5, garantisce buoni risultati in termini di andamenti fermentativi e scarso rischi di alterazioni del vino. Il coinoculo non è quindi un approccio *per tutti*. Si adatta molto bene a vini a forte acidità e che abbiano tempi di produzione

contingentati, per le più svariate esigenze tecniche. Rientrano in questa casistica, ad esempio, le basi spumante o i vini novelli e più in generale i vini bianchi. Lo stesso approccio può essere adottato nei vini rossi, seppur con maggiore cautela e monitorando attentamente l'andamento di parametri critici come l'acidità volatile.

E dopo la fermentazione malolattica?

Una volta che lo sviluppo della microflora batterica è stato sufficiente per dare avvio alla fermentazione malolattica non è però possibile abbassare la guardia. Occorre monitorare con analisi periodiche il processo di degradazione dell'acido malico, in modo da non lasciare spazio a proliferazioni batteriche incontrollate al termine della fermentazione malolattica. È questo uno dei momenti più delicati del processo di vinificazione. Il vino si trova in questa fase privo di agenti protettivi come l'anidride solforosa, proprio per consentire ai batteri lattici un regolare sviluppo, e ricco di microrganismi: in primis i batteri lattici ma possono essere presenti diverse specie di lieviti. Si può assistere a repentine alterazioni dovute

te sia ai batteri lattici sia ad altre forme microbiche, come il *Brettanomyces*.

Monitorare e valorizzare

La fermentazione malolattica è un processo complesso da interpretare e da gestire a causa delle numerose variabili che concorrono a determinarne la buona riuscita. Fortunatamente oggi abbiamo numerose conoscenze, tecniche e scientifiche, per comprendere i fattori in gioco e prevederne l'azione sulla microflora. Sia che si faccia affidamento sulle forme batteriche indigene, sia che si ricorra a starter, la fermentazione malolattica deve essere attentamente pianificata, evitando le pratiche che possono complicarne l'evoluzione. Un preciso controllo, chimico o microbiologico, della sua evoluzione consentirà poi di eliminare tempestivamente i batteri lattici, preservando il vino da alterazioni di diversa natura e garantendo appieno la valorizzazione delle diverse produzioni enologiche. ■

© RIPRODUZIONE RISERVATA



www.vitevinoqualita.it/SJ9Rq