

18 ANNI DI RICERCA SUI BATTERI LATTICI (2003-2021)

Lo stato dell'arte SULLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

>> **Raffaele Guzzon**

Il ruolo dei batteri lattici in enologia e le soluzioni tecnologiche per meglio gestire la fermentazione malolattica rappresentano uno degli ultimi campi di ricerca, in termini temporali, che hanno attratto l'attenzione di ricercatori

e tecnologi. Sebbene la fermentazione malolattica sia un processo noto da tempo è interessante notare come la corretta classificazione genetica del microrganismo maggiormente coinvolto in questa trasformazione, *Oenococ-*

cus oeni, risalga al 1995 (punto 1 del riquadro Approfondimenti). Anche la caratterizzazione della molecola chiave nella degradazione dell'acido malico da parte dei batteri, l'enzima malolattico, e la comprensione delle ragioni energetiche della fermentazione malolattica sono risultati acquisiti a cavallo degli anni '80 e '90 del secolo scorso (punto 2 del riquadro Approfondimenti). Queste scoperte scientifiche hanno portato a sviluppare linee di ricerca applicative volte sia alla comprensione dei caratteri e delle

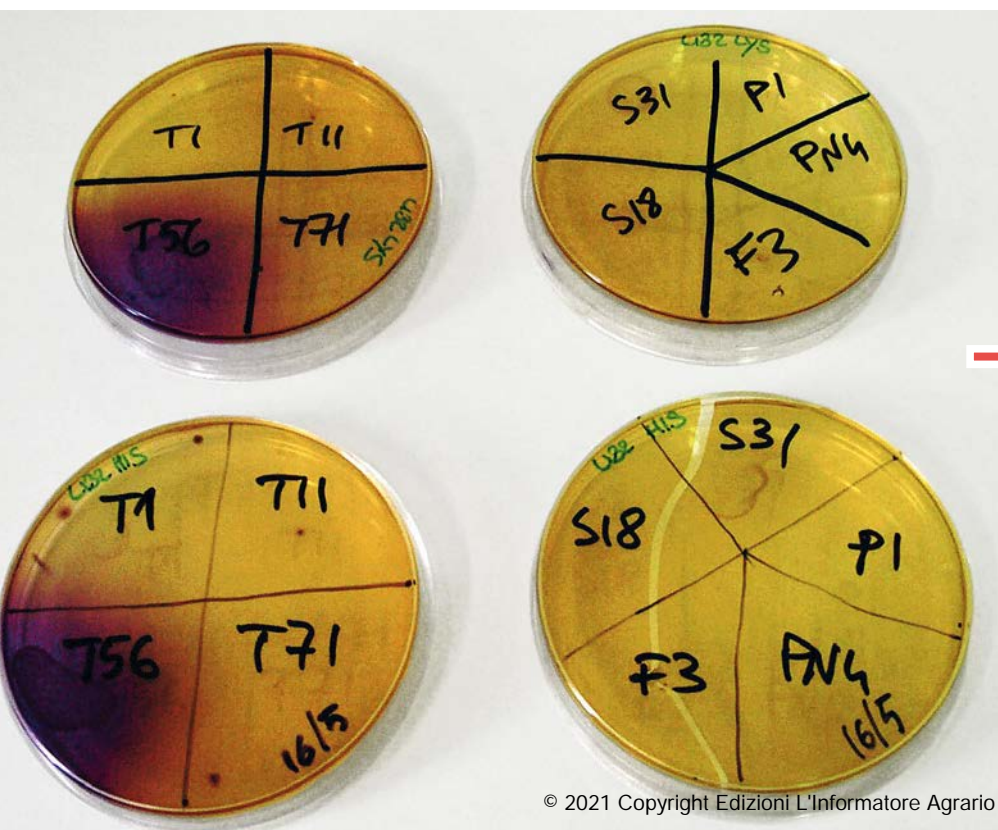


FOTO 1: IL TERRENO DI SVILUPPO CONTIENE UN SOLO AMINOACIDO (ISTIDINA), SE IL MICRORGANISMO È IN GRADO DI PRODURRE AMMINE BIOGENE INDICE UNA VARIAZIONE DI pH, VISUALIZZATA DALL'INDICATORE COLORIMETRICO DISCIOLTO NEL TERRENO (ALONE VIOLA).

esigenze dei batteri lattici coinvolti nella fermentazione malolattica, sia alla selezione di ceppi batterici per la gestione di questa importante trasformazione enologica. All'inizio degli anni 2000 anche presso la Fondazione Mach di San Michele all'Adige (Trento) si è inteso proporre soluzioni alla gestione della fermentazione malolattica, rispondendo alle sollecitazioni che venivano dal settore enologico regionale. Per far questo è stato attivato un programma di ricerca in collaborazione con Lallemand, una delle principali aziende che si occupano di soluzioni biotecnologiche

La gestione della fermentazione malolattica è un punto cruciale nella realizzazione del prodotto finito. Facciamo il punto su quanto è stato fatto attraverso una review sulle pubblicazioni scientifiche della Fondazione E. Mach

per il settore enologico, che nei successivi anni ha saputo dare diversi risultati, oltre ad accumulare un notevole bagaglio di conoscenze.

PN4, OENOCOCCUS OENI MADE IN TRENTINO

Il primo obiettivo della ricerca sui batteri lattici è stato quello di mettere a disposizione degli addetti ai lavori ceppi efficienti di batteri lattici selezionati per la gestione della fermentazione malolattica, soprattutto in vini «difficili» per la loro composizione chimica, ad esempio le basi spumante ricche di acidità, o vini rossi con tenori di anidride solforosa e alcol piuttosto alti, o in processi di vinificazione particolarmente rapidi, come la produzione di vini novelli, in voga nei primi anni 2000. Sebbene la pubblicazione dei risultati riguardanti il lavoro di selezione sia del 2009, già dal 2003 è stata intrapresa un'attività di selezione di batteri lattici.

Il progetto ha preso il via con il campionamento di numerosi vini in fermentazione malolattica spontanea, limitanti per le loro caratteristiche chimiche. Isolati più di 100 individui batterici questi sono stati testati, dapprima in laboratori e poi in cantina, in microvinificazioni, per verificarne la resistenza

T.1 CONFRONTO TRA LA DURATA DI FERMENTAZIONI MALOLATTICHE CONDOTTE CON IL CEPP0 BATTERICO PN4, DAL 2004 AL 2007, CON ALTRI CEPP0 COMMERCIALI, IN DIFFERENTI DISTRETTI ENOLOGICI MONDIALI (MODIFICATO DA GUZZON ET AL., 2009)

Nazione	Tipologia di vino	Grado alcolico (% vol./vol.)	pH	Anidride solforosa totale SO ₂ (mg/L)	Esito e durata della fermentazione malolattica (giorni) (¹)			
					Ceppo PN4	Ceppo Com1	Ceppo Com2	Spontanea
Germania	Riesling	12,0	3,05	<30	OK (19)	NO	NO	NO
Germania	Pinot Nero	13,2	3,37	<30	OK (12)	OK (16)	NO	16
Germania	Pinot Nero	13,1	3,40	40	OK (8)	OK (10)	NO	10
Germania	Lemberger	13,5	3,30	<30	OK (17)	OK (17)	NO	NO
USA	Merlot	14,0	3,27	60	OK (28)	NO	OK (32)	NO
USA	Merlot	14,2	3,50	60	OK (13)	NO	NO	NO
Italia	Garganega	13,2	3,25	<30	OK (18)	OK (25)	NO	OK (28)
Italia	Sangiovese	14,0	3,33	<30	OK (21)	OK (21)	NO	NO
Italia	Sangiovese	14,9	3,21	60	OK (59)	NO	NO	NO
Italia	Sangiovese	15,8	3,50	20	OK (49)	NO	NO	NO
Italia	Chardonnay	11,6	3,00	40	OK (25)	NO	NO	NO
Italia	Lagrein	13,5	3,62	30	OK (19)	NO	NO	NO
Italia	Merlot	12,4	3,30	30	OK (18)	OK (18)	NO	NO
Italia	Rebo	13,4	3,76	20	OK (30)	NO	NO	NO
Italia	Rebo	14,6	3,70	60	OK (22)	OK (31)	NO	NO
Italia	Teroldego	12,6	3,63	40	OK (11)	NO	NO	NO
Italia	Teroldego	12,6	3,62	50	OK (15)	NO	NO	NO

(¹) NO = incompleta degradazione dell'acido L-malico presente nel vino dopo 60 giorni dal termine della fermentazione alcolica.

F.1 SCHEMA DELLA STRUTTURA DELLE MICROSFERE IN SILICE/ALGINATO



DA SINISTRA, SCHEMA DELLA STRUTTURA DELLE MICROSFERE IN SILICE/ALGINATO PER L'IMMOBILIZZAZIONE CELLULARE; MICROSFERE APPENA PRODOTTE; OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO SEM DI SFERE DI ALGINATO RIVESTITE IN SILICE PER L'IMMOBILIZZAZIONE DI BATTERI LATTICI DI INTERESSE ENOLOGICO

una base spumante da uve Pinot Nero, si è rivelato particolarmente versatile nella capacità di adattarsi a vini di diversi distretti mondiali (tabella 1) e al contempo capace di dare fermentazioni malolattiche con un profilo aromatico integro e complesso, senza eccessi nei sentori lattici. Questo microrganismo, oggi in commercio, è stato poi uno dei candidati ideali per le successive sperimentazioni.

ai fattori limitanti e i caratteri enologici. Da un primo screening sono così emersi 6 ceppi di *Oenococcus oeni* che, successivamente, sono stati testati per

verificarne l'assenza di caratteri alterativi come la produzione di ammine biogene (foto 1). Uno di questi ceppi, denominato PN4 dato il suo isolamento in

Approfondimenti

I BATTERI LATTICI IMMOBILIZZATI, UNO STRUMENTO INNOVATIVO

Non solo ceppi selezionati efficienti, anche le modalità di impiego di questi microrganismi sono state prese in considerazione. A oggi i microrganismi sono utilizzati in enologia in forma dispersa, libera nel mosto o nel vino. Ciò comporta che i processi di fermentazione siano per forza discontinui, vista l'impossibilità di recuperare i microrganismi rapidamente dal mezzo di fermentazione, e la proliferazione microbica possa essere controllata solo indirettamente, agendo sui parametri fisici e chimici. Un'interessante alternativa è l'immobilizzazione, ovvero l'inclusione delle cellule microbiche in strutture fisiche che consentano lo scambio con l'esterno, e dunque le fermentazioni, ma confini le cellule stesse. L'idea non è nuova, le prime sperimentazioni risalgono agli anni '80, ma non ha mai trovato ampia diffusione per limiti nelle caratteristiche dei materiali utilizzati. Con l'avvio di un dottorato di ricerca presso l'Università di Trento nel 2006 si è inteso sviluppare un sistema di immobilizzazione efficiente di batteri lattici, sia per consentire una migliore gestione dell'inoculo dei batteri nel vino, sia per aumentarne l'efficienza fermentativa dato che, su questo molti autori sono concordi, l'immobilizzazione impendendo alle cellule di accrescersi le induce a ottimizzare l'attività metabolica e dunque la fermentazione. La soluzione sviluppata presso l'Università di Trento è stata quella di includere i batteri in una matrice mista, composta da silice e alginato, ottenendo microsfele porose, ma molto resistenti (figura 1). I test di laboratorio, pubblicati nel 2007, hanno dimostrato come i microrganismi immobilizzati abbiano una attività biologica comparabile a quella di una coltura libera,

1

Fino al 1995 *Oenococcus oeni* era classificato all'interno del genere dei *Leuconostoc*, denominato appunto *Leuconostoc oenos*. L'analisi genetica introdotta in quegli anni sui microrganismi di interesse enologico portò alla creazione del nuovo genere microbico di cui a oggi si conoscono solamente tre specie, tutte isolate da bevande acide ottenute mediante fermentazione alcolica (vino, sidro e sakè).

2

Per molto tempo si è ritenuto che i batteri lattici degradassero l'acido malico per ridurre l'acidità del vino. Alla metà degli anni '90 del secolo scorso si è compreso che i batteri lattici ottengono energia dalla fermentazione malolattica, in un ambiente privo di zuccheri, grazie al flusso protonico che accompagna la decarbossilazione intracellulare dell'acido malico e l'uscita dalla cellula del risultante acido lattico.

3

Un possibile rischio correlato al coinoculo è l'innalzamento dell'acidità volatile dovuto al consumo di zuccheri da parte di batteri lattici eterofermentanti, come *Oenococcus oeni*. Per scongiurare questo rischio occorrono tre condizioni: un ceppo selezionato di batteri lattici che abbia una ridotta attività eterofermentante, un lievito capace di condurre una vigorosa fermentazione alcolica e un pH inferiore a 3,50, dato che in ambiente acido la resa energetica della fermentazione malolattica è maggiore e dunque è scoraggiato il consumo di zuccheri da parte dei batteri lattici.

4

I batteri lattici assorbono simultaneamente l'acido malico e l'acido citrico, producendo da quest'ultimo il diacetile e l'acetoino, le principali molecole responsabili degli aromi burrosi tipici della fermentazione malolattica. Tuttavia, l'assorbimento dell'acido malico è più rapido, dunque se la fermentazione malolattica è rapida, come nel caso dell'inoculo simultaneo in mosto, vi sarà un minor sviluppo aromatico e una maggiore conservazione delle note varietali del vino.

e dunque possano diventare una interessante soluzione applicativa una volta risolti i problemi logistici che ancora ne limitano la diffusione (tabella 2).

UN MICRORGANISMO, DIFFERENTI APPLICAZIONI

Accanto allo sviluppo di nuove soluzioni tecnologiche la ricerca sui batteri lattici ha portato alla messa a punto di differenti protocolli di impiego dei batteri lattici, offrendo soluzioni che non mirassero solamente a garantire

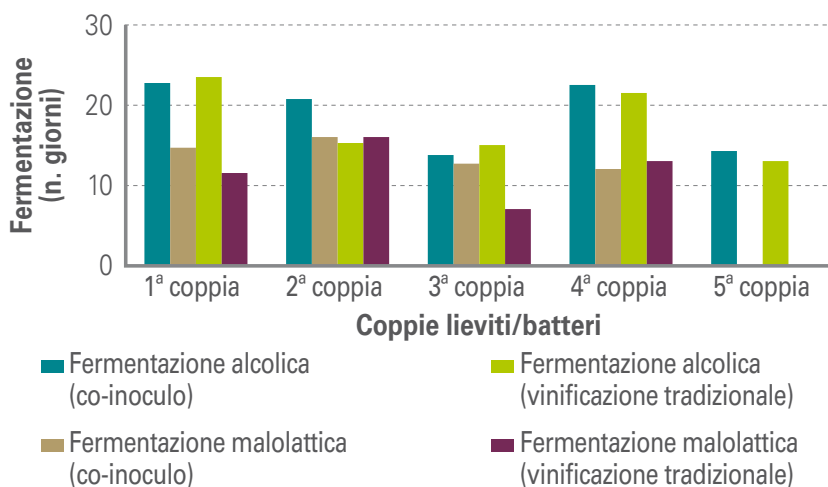
il consumo dell'acido malico, ma permettessero di ottenere vini con profili sensoriali ben differenti, sfruttando i caratteri fisiologici dei batteri. L'esempio più interessante in questo senso è la fermentazione simultanea di lieviti e batteri inoculando questi ultimi in mosto, 24 ore dopo i lieviti (punto 3 del riquadro in questa pagina). Questo approccio alla fermentazione malolattica si basa ormai su 20 anni di studi condotti in differenti distretti enologici; inizialmente adottato

T.2 CONFRONTO DELL'ATTIVITÀ DI LIEVITI E BATTERI LIBERI E IMMOBILIZZATI IN MICROSFERE DI SILICE-ALGINATO (1)

Tipologia di microrganismi	Stato	Processo biologico	Velocità massima di fermentazione (m/s x g di cellule)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Libero	Fermentazione alcolica	4,8 ± 0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Immobilitizzato	Fermentazione alcolica	3,3 ± 0,8
<i>Oenococcus oeni</i>	Libero	Fermentazione malolattica	4,2 ± 0,4
<i>Oenococcus oeni</i>	Immobilitizzato	Fermentazione malolattica	4,0 ± 0,2

(1) L'attività microbica è espressa in termini di velocità massima di fermentazione (Vmax).

G.1 DURATA DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA CONDOTTA CON DIFFERENTI COPPIE LIEVITO/BATTERI SIA IN MODALITÀ TRADIZIONALE SIA IN CO-INOCULO



DATI MEDI DI 5 PROVE SVOLTE SU DIFFERENTI VINI ROSSI AD ALTO pH E TENORE ALCOLICO. LA FERMENTAZIONE SIMULTANEA MEDIANTE CO-INOCULO HA GARANTITO MIGLIORI PERFORMANCE FERMENTATIVE E UN RIDOTTO AUMENTO DELL'ACIDITÀ VOLATILE

per permettere una rapida degradazione dell'acido malico anche in vini difficili. L'idea è semplice: il mosto, povero in etanolo e ricco in nutrienti, è un ambiente più adatto allo sviluppo microbico, non solo per i lieviti ma anche per i batteri. Dunque se i batteri sono inoculati nel mosto è possibile che questi subiscano una minore pressione ambientale e riescano a degradare l'acido malico

rapidamente, anche in presenza di fattori limitanti. I risultati sono dimostrati promettenti, già con le prime prove pubblicate nel 2013 dove l'inoculo simultaneo tra lieviti e batteri è stato testato in mosti da uve rosse con un elevato potenziale alcolico, basso tenore di azoto prontamente assimilabile e alto pH. In queste condizioni, teoricamente inadatte al co-inoculo, i batteri si sono

rivelati capaci di portare a termine la fermentazione malolattica, senza alterare i vini, dato che l'aumento di acidità volatile si è mantenuto nello stesso intervallo delle prove svolte con il tradizionale inoculo batterico in vino (grafico 1).

Esperienze successive, condotte su mosti da uve bianche, incrocio Manzoni e Chardonnay per base spumante, hanno confermato questi risultati, dando indicazioni anche sugli effetti organolettici della fermentazione simultanea.

I vini ottenuti da questo approccio alla gestione delle fermentazioni enologiche sono tipicamente caratterizzati da aromi varietali, percepiti come più freschi alla degustazione, sebbene stabili dal punto di vista microbiologico per il completo consumo dell'acido malico.

La ragione dell'originale profilo organolettico dei vini ottenuti dalla fermentazione simultanea di lieviti e batteri, che si adatta particolarmente a vini di pronta beva, è da ricercarsi nella differente cinetica del consumo dell'acido malico e dell'acido citrico, da cui derivano gli aromi caratteristici della fermentazione malolattica, da parte dei batteri. (punto 4 del riquadro Approfondimenti).

I FUTURI AMBITI DI RICERCA

La ricerca nell'ambito dell'applicazione dei batteri lattici in enologia non è conclusa. Proprio in queste settimane sta prendendo il via un dottorato di ricerca, in collaborazione tra Lallemand, Fondazione Mach e Università di Palermo, riguardante le attività non-starter dei batteri lattici. In altre parole il focus non sarà rivolto alla capacità di degradare l'acido malico: coinvolti



nella ricerca sono microrganismi già nelle collezioni Lallemand dalle provate prestazioni enologiche, quanto i metabolismi secondari, in grado di dare al vino note organolettiche del tutto peculiari. L'approccio a questa ricerca è completamente differente dai precedenti, si partirà con il sequenziamento del genoma batterico per comprenderne le potenzialità e saggiarne poi l'espressione in test di laboratorio e vinificazioni sperimentali, presso le cantine sperimentali siciliane dell'Università di Palermo. Si punta così a sfruttare al meglio le potenzialità di questi microrganismi che si stanno rivelando determinanti almeno quanto i lieviti nel garantire la stabilità e il profilo sensoriale dei vini, offrendo nuovi strumenti di lavoro agli enologi per meglio valorizzare il potenziale di ogni uva.

Raffaele Guzzon

Fondazione Edmund Mach
San Michele All'Adige (Trento)

Tutte le attività illustrate sono state svolte con il supporto economico di Lallemand inc. Si ringraziano in particolare Paola Vagnoli e Sibylle Krieger per il costante confronto scientifico e il sostegno in tutti questi anni.

Questo articolo è corredato di bibliografia/contenuti extra. Gli abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su: www.informatoreagrario.it/bdo

Lo stato dell'arte sulla fermentazione malolattica

BIBLIOGRAFIA

Guzzon et al. (2009) - Selection of a new highly resistant strain for malolactic fermentation under difficult conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*.

Guzzon et al. (2013) - Simultaneous yeast-bacteria inoculum. A feasible solution for the management of oenological fermentation in red must with low nitrogen content. *Annals of Microbiology*.

Guzzon et al. (2015) - Together is better. Experience of simultaneous fermentation of yeast and bacteria as

a possible strategy to prevent stuck fermentation in difficult wines. *Wine Studies*.

Guzzon et al. (2016) - Exploitation of simultaneous alcoholic and malolactic fermentation of incrocio Manzoni, a traditional Italian white wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*.

Callone et al. (2007) - Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *Journal of Materials Chemistry*.



www.viteevino.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.