

Coinoculi per una malolattica controllata

Paola Vagnoli

Lallemand Italia

Il coinoculo, cioè la pratica di aggiunta dei batteri lattici 24-48 ore dopo l'inoculo dei lieviti, è una delle principali innovazioni del mondo enologico degli ultimi venti anni. I vantaggi tecnici ed economici sono molteplici, dallo svolgimento rapido e sicuro della fermentazione, al contenimento di microrganismi contaminanti. Per intervenire con efficacia, sono stati sviluppati specifici protocolli e apposite colture starter.

La fermentazione malolattica

La fermentazione malolattica (FML) è il risultato dell'attività metabolica dei batteri lattici che compiono una decarbossilazione enzimatica dell'acido L-malico in acido L-lattico e anidride carbonica.

I batteri lattici coinvolti nella FML del vino appartengono a 4 generi: *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* [7]. Il pH del vino ed il contenuto di SO₂ sono fattori fortemente selettivi per i microrganismi e generalmente sono i ceppi della specie *Oenococcus oeni* che predominano e conducono la malolattica in condizioni difficili; quando i pH sono più elevati alcune specie dei generi *Lactobacillus* e *Pediococcus* possono condurre la FML.

La tendenza degli ultimi anni a diminuire il contenuto di SO₂ e l'aumento del pH dei mosti incrementano considerevolmente il rischio di contaminazione da parte della microflora spontanea; i batteri lattici indigeni, a differenza di quelli selezionati, possono determinare deviazioni sensoriali con un effetto negativo sulla qualità del vino.

Fermentazioni malolattiche spontanee possono portare alla produzione di ammine biogene come istamina, cadaverina e putrescina che hanno un impatto negativo sul quadro sensoriale del vino. Inoltre è importante ricordare che alcuni ceppi di *O. oeni* e *L. plantarum* convertono gli esteri tartarici degli acidi idrossicinnamici in acidi idrossicinnamici liberi che, in presenza di *Brettanomyces*

possono dare origine ai fenoli volatili [8].

Per questo, lo studio dell'attività cinnamil-esterasica è uno dei criteri di selezione e di screening applicato da Lallemand sui batteri della propria gamma, che sono tutti cinnamil-esterasi negativi.

L'impatto sensoriale dei batteri

L'influenza della fermentazione malolattica (FML) sulle proprietà sensoriali del vino è un argomento che negli ultimi anni è stato particolarmente approfondito dalla comunità scientifica [5]; recenti studi hanno portato a una migliore comprensione delle specifiche modifiche legate alla crescita e all'attività metabolica dei

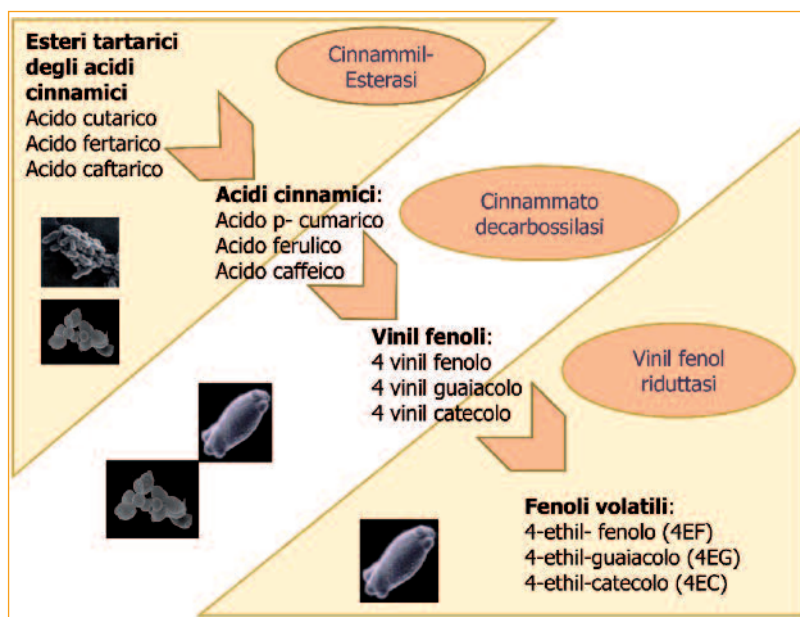


Figura 1 - Via di degradazione degli acidi idrossicinnamici da parte di alcuni ceppi di *Oenococcus oeni* e impatto nella produzione di fenoli volatili in presenza di *Brettanomyces* [8].

batteri malolattici nel vino.

In particolare è stato dimostrato come i batteri influenzano la componente aromatica e gustativa dei vini attraverso diversi meccanismi: (1) la rimozione di composti aromatici esistenti, attraverso il metabolismo e l'adsorbimento sulla parete cellulare;

(2) la produzione di nuovi composti aromatici derivati dal metabolismo degli zuccheri, degli aminoacidi e/o di altri substrati;

(3) il metabolismo e la trasformazione di metaboliti secondari derivati dall'uva - e dal lievito - in prodotti finali di maggiore o minore impatto organolettico [3].

È importante notare che l'impatto netto della FML sulle proprietà organolettiche del vino dipende da più fattori, fra cui le caratteristiche del ceppo batterico, l'intensità aromatica varietale del vino, le tecniche di vinificazione impiegate ed il momento di inoculo; si approfondirà quest'ultimo aspetto nel proseguo dell'articolo.

I batteri selezionati Lallemand sono stati caratterizzati anche in base al loro impatto sensoriale: i diversi ceppi, oltre a contribuire a una importante pulizia aromatica fruttata, presentano peculiari caratteristiche individuali: VP41 conferisce morbidezza e complessità, O-mega apporta freschezza nei vini da uve surmature, Silka diminuisce le sensazioni di astringenza ed amaro, PN4 esalta le note aromatiche speziate e la struttura ed Alpha dà rotondità e riduce il carattere erbaceo.

Sulla base di queste considerazioni, il batterio non deve essere più ritenuto uno strumento per la sola degradazione dell'acido malico ma, al pari del lievito, un importante strumento che può aiutare l'enologo a definire uno specifico stile.

Il momento di inoculo

Nelle prime esperienze di utilizzo dei batteri malolattici l'inoculo veniva eseguito dopo la conclusione della fermentazione alcolica soprattutto per limitare la produ-

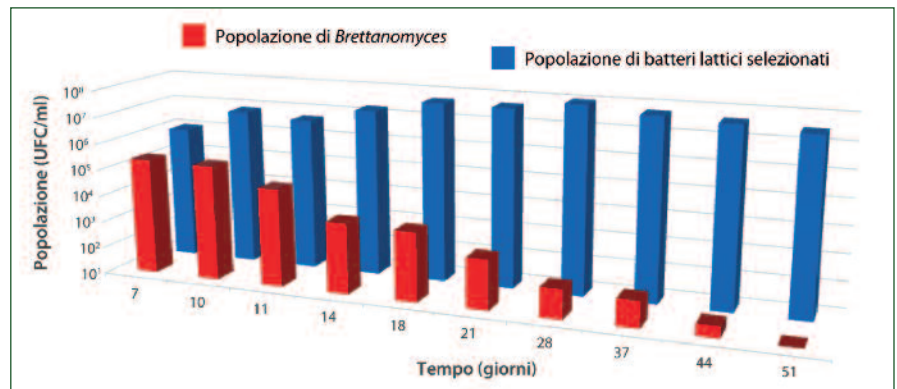


Figura 2 - Sviluppo di Brettanomyces su Pinot nero coinoccolato con batteri lattici selezionati (Borgogna, Francia).

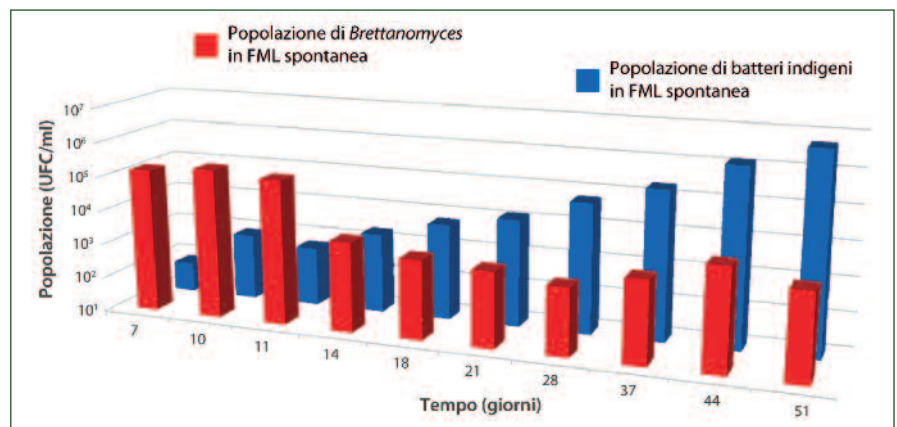


Figura 3 - Sviluppo di Brettanomyces durante una fermentazione malolattica spontanea su Pinot nero (Borgogna, Francia).

zione di acido acetico e acido D-lattico, composti derivanti dal metabolismo eterofermentante dei carboidrati (zuccheri) da parte dei batteri malolattici.

In realtà *O. oeni* a pH inferiori a 3,5 dimostra pochissimo interesse per gli zuccheri e li consuma solo dopo la completa degradazione degli acidi organici: l'acido L-malico è consumato per primo, seguito dall'acido citrico, fumarico e dagli altri acidi. Per questo, e per gli innumerevoli vantaggi tecnici ed economici, a partire dalla fine degli anni '80 il mondo accademico [4] e Lallemand hanno iniziato a suggerire l'inoculo dei batteri direttamente nel mosto in quanto, oltre a non presentare problemi di acidità volatile, sono stati esclusi fenomeni di antagonismo tra lieviti e batteri dimostrando che il decorso della fermentazione alcolica non è influenzato dalla loro presenza [2].

A pH maggiori di 3,5 *O. oeni* può degradare più facilmente zuccheri ed acido citrico, il che può condurre rapidamente a un tenore elevato di acidità volatile. In queste condizioni ci sono interessanti opportunità che vengono da *Lactobacillus plantarum* che, con il suo metabolismo eterofermentante facoltativo, non presenta problemi di acidità volatile nemmeno a pH elevati [7].

Nella pratica di cantina, l'enologo può scegliere per

l'utilizzo dei batteri quattro diversi momenti di inoculo:

- **Co-inoculo dei batteri selezionati con i lieviti:** i batteri vengono aggiunti da 24 a 48 ore dopo l'inoculo del lievito.

- **Inoculo in fermentazione alcolica:** I batteri sono aggiunti dopo i 2/3 della FA quando approssimativamente la densità è minore di 1030 (10 ° Brix).

- **Post fermentazione alcolica:** i batteri sono aggiunti al termine della FA.

- **Inoculo tardivo:** i batteri sono aggiunti dopo la fine della FA, anche alcuni mesi dopo.

La pratica del co-inoculo, per i suoi innumerevoli lati positivi, si sta diffondendo sempre più. Di seguito vengono evidenziati i principali vantaggi di questa pratica.

I benefici del co-inoculo con batteri selezionati

Ambiente favorevole ai batteri

Il mosto, oltre a non esporre i batteri all'effetto tossico dell'alcol, contiene tutti i nutrienti di cui i batteri necessitano. Queste migliori condizioni ambientali, rispetto all'inoculo nel vino, assicurano un più elevato tasso di vitalità ed una migliore colonizzazione dei batteri selezionati oltre a una non-competizione con la flora batterica indigena, il che significa che il ceppo inoculato sarà quello dominante nella FML.

I batteri inoculati nel mosto hanno quindi la possibilità di adattarsi gradualmente, durante la fermentazione alcolica, alle condizioni di alcol elevato.

Durata e risparmio economico

La riduzione delle tempistiche e l'affidabilità del completamento della FML sono importanti vantaggi in termini di risparmio economico.

Con il co-inoculo, la fermentazione malolattica termina poco dopo la fermentazione alcolica consentendo di stabilizzare i vini in maniera precoce ed eventualmente di immetterli in commercio in tempi più rapidi [1].

Inoltre vi è un consistente risparmio energetico in quanto non è necessario riscaldare le vasche o l'ambiente di cantina come nel caso di FML spontanee a fine FA o inoculi di batteri selezionati in post FA.

Strumento di bio-controllo nei confronti di *Brettanomyces*

L'impatto positivo dell'inoculo dei batteri lattici selezionati sulla riduzione del livello di fenoli volatili in vino è già stato dimostrato da diversi studi; nel 2014, l'OIV ha riconosciuto l'utilizzo dei batteri selezionati in co-inoculo come buona

pratica per limitare la crescita di *Brettanomyces*, grazie alla riduzione della finestra temporale tra fine fermentazione alcolica ed inizio malolattica.

Recenti studi condotti da Lallemand in collaborazione con l'IFV (*Institut Francais de la Vigne et du Vin* - Francia) hanno mostrato che alcuni batteri lattici selezionati possono avere un'inibizione diretta sulla crescita di Brett: sono state monitorate le popolazioni di batteri lattici e di *Brettanomyces* in un vino contaminato durante una FML con inoculo di batteri selezionati (Figura 2) e in una FML spontanea (Figura 3).

La Figura 2 mostra l'assenza di crescita di *Brettanomyces* (anche in presenza di alte contaminazioni) ed evidenza come all'aumentare della popolazione di batteri lattici, quella di *Brettanomyces* diminuisca.

Nel caso della fermentazione malolattica spontanea (Figura 3), invece, *Brettanomyces* è presente in quantità elevate fino al giorno del travaso (giorno 11) per poi riprendere il sopravvento grazie alla difficoltà di crescita dei batteri indigeni nel mezzo: il livello finale di Brett nel vino in cui è stata condotta la FML spontanea è risultato essere oltre 10 volte superiore rispetto al vino co-inoculato. Questi risultati confermano come i batteri selezionati Lallemand, grazie alla loro immediata capacità di dominanza ed all'elevato tasso di sopravvivenza, siano in grado di limitare lo sviluppo di *Brettanomyces*.

Profilo sensoriale fresco e bassa produzione di diacetile

I vini ottenuti con la FML in co-inoculo hanno un differente profilo sensoriale e in generale si presentano fruttati ed equilibrati. Il momento d'inoculo, il ceppo batterico utilizzato, la presenza di determinati precursori aromatici, il pH, la temperatura, sono tutti fattori che

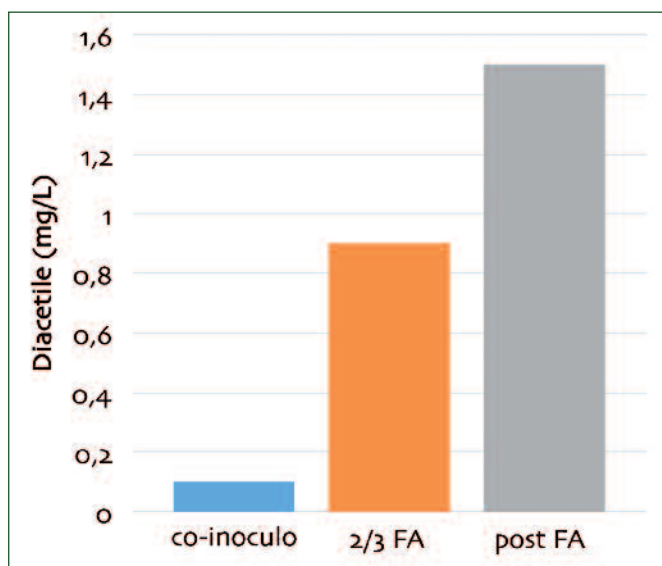


Figura 4 - Produzione di diacetile in vino Chardonnay in funzione del momento di inoculo con lo stesso ceppo batterico.

possono influenzare l'espressione finale dei vini e che devono essere presi in considerazione per modulare l'impatto sulla componente organolettica.

Il coinoculo ha un'importante implicazione stilistica in termini di produzione di diacetile. Studi condotti da Lallemand mettono in luce come con questa tecnica vi sia una notevole riduzione della produzione di diacetile, rafforzando di conseguenza il carattere fruttato fresco dei vini e determinando una diminuzione delle note burrate, lattiche o di nocciola (Figura 4).

Bassa produzione di acidità volatile

Nonostante il metabolismo eterofermentante di *Oenococcus oeni*, diversi esperimenti ed innumerevoli esperienze di cantina hanno dimostrato che la produzione di acidità volatile in coinoculo è molto contenuta.

In uno studio effettuato da Zapparoli et al. (2009) [9] in vini a elevate gradazione alcoliche ottenuti da uve passite, Corvina e Rondinella per la produzione di Amarone, si è dimostrato come i livelli di acido acetico siano simili ed in molti casi addirittura inferiori nelle malolattiche in coinoculo rispetto a quelle in sequenziale.

In generale, buone condizioni di vinificazione, come gestione delle temperature in fermentazione alcolica e nutrizione dei lieviti, sono necessarie per assicurare una produzione limitata di acidità volatile.

Lactobacillus plantarum, lo strumento ideale per il co-inoculo in rossi con elevato pH

Recentemente Lallemand ha messo a disposizione degli enologi di tutto il mondo un *Lactobacillus plantarum*,

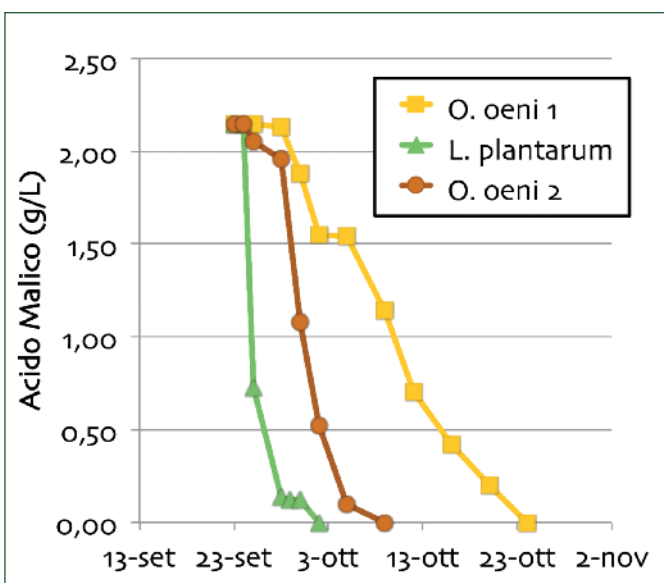


Figura 5 – Cinetica di consumo di acido malico in vino Sangiovese coinoculato con diversi batteri lattici. *Lactobacillus plantarum* ha una cinetica di consumo molto rapida rispetto ai due ceppi di *Oenococcus oeni*.

ML Prime™, che consente di sfruttare i vantaggi del coinoculo e completare una FML veloce durante la fermentazione alcolica senza alcun rischio di deviazioni sensoriali anche su vini con pH elevati, zuccheri residui o in vinificazioni a rischio di arresti fermentativi.

Questo *L. plantarum* ha caratteristiche uniche che si adattano perfettamente all'utilizzo in coinoculo in vini dal pH elevato, infatti grazie al suo metabolismo eterofermentante facoltativo non produce acido acetico dal metabolismo di glucosio e fruttosio.

Le specificità metaboliche di questo batterio sono state abbinate a un nuovo processo produttivo che, ottimizzando la biomassa dei batteri, consente di ottenere un prodotto liofilizzato idoneo all'inoculo diretto, assicurando un livello di attività malolattica senza precedenti. Questa caratteristica consente di ridurre drasticamente la fase di latenza ed i tempi di degradazione dell'acido malico: in alcuni casi l'avvio della fermentazione malolattica può essere rilevato già dopo 24 ore dall'inoculo dei batteri. La durata della fermentazione malolattica è generalmente compresa tra 2 e 10 giorni (Figura 5).

Bibliografia

- [1] Abrahamse C., Bartowsky E. (2012) "Inoculation for MLF reduces overall vinification time." Aust. N.Z. Grapegrower Winemaker. 578, pagg. 41-46.
- [2] Azzolini M., Tosi E., Vagnoli P., Krieger S., Zapparoli G. (2010) "Evaluation of technological effects of yeast-bacterial coinoculation in red table wine production." Ital. J. Food Sci. 3 (22), pagg. 257-263.
- [3] Bartowsky E. J., Henschke P. A. (1995) "Malolactic fermentation and wine flavour." Aust. Grapegrower & Winemaker. 378a, pagg. 83-94.
- [4] Beelman R. B., Kunkee R. E. (1985) "Inducing co-inoculation malolactic-alcoholic fermentation in red table wines." Proceedings: Aust. Soc. Vitic. Oenol. Sem. on Malolactic Fermentation. 97-112.
- [5] Costello P. J., Siebert T. E., Solomon M. R., Bartowsky E. J. (2012) "Synthesis of fruity ethyl esters by acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase and reverse esterase activities in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*." Journal of Applied Microbiology. 114, pagg. 797-806.
- [6] Couto J. A., Campos F. M., Figueiredo A. R., Hogg T. A. (2006) "Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols." Am. J. Enol. Vitic. 57 pagg. 166-171.
- [7] du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S. (2011) "Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – an Overview." Food Bioprocess Technology. 4, pagg. 876-906.
- [8] Osborne J. P., Chescheir S., Philbin D. (2013) "Impact of *Oenococcus oeni* on Wine Hydroxycinnamic Acid Content and Production of Volatile Phenols by *Brettanomyces*." 64th ASEV conference.
- [9] Tosi E., Azzolini M., Guzzo F., Zapparoli G. (2009) "Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine." Journal of Applied Microbiology 107, pagg. 210-218.