



LAFFORT

l'œnologie par nature



INFO

NUMERO 66 - Maggio - Giugno 2009

Strategie alternative di inoculo della fermentazione malolattica

Allo scopo di avere il controllo della FML, l'impiego di ceppi di *O. oeni* selezionati è sicuramente la via più efficace. Essi danno le maggiori garanzie sulla buona riuscita del processo.

La selezione di ceppi di batteri malolattici efficienti è dunque divenuta una delle principali sfide della ricerca applicata in enologia, ciò ha fatto crescere l'offerta di nuovi ceppi.

Oltre alla selezione, numerosi lavori comprendono la messa a punto di protocolli e tempistiche di inoculo.

Così accanto ai procedimenti di inoculo diretto sono stati sviluppati metodi di inoculo che prevedono una tappa di acclimatazione durante la quale i batteri si arricchiscono di fattori di sopravvivenza che ne favoriscono l'impiantazione nel vino e sono stati sviluppati protocolli di inoculo in diverse fasi della vinificazione.

Come ottimizzare l'impiego dei batteri malolattici.

Per riprodurre la sequenza naturale dello sviluppo dei microrganismi nei vini rossi, le colture di batteri malolattici tradizionalmente sono aggiunte in vasca dopo svinatura. E' chiaro però che più si procede nella vinificazione, più l'ambiente diventa loro ostile. Per le cellule batteriche è più facile adattarsi ad un aumento progressivo del tenore in alcool, che trovarsi improvvisamente in un substrato con un tenore in etanolo elevato.

Nel caso della vinificazione in rosso intervengono anche altri fattori, come l'accumulo di composti fenolici dell'uva, noti per essere inibitori dei batteri. Ben evidentemente non si può pensare di favorire la FML rendendo minimo il tenore in composti fenolici, composti essenziali dei vini rossi.

Per far fronte a questi problemi possono essere suggeriti inoculi di batteri precoci. Aggiungendo i batteri selezionati prima che la fermentazione alcolica (FA) sia completata si attenua l'effetto alcool, mentre inoculando prima del termine della macerazione si attenua la pressione dei composti fenolici.

Si delineano pertanto più possibilità in termini di tempistica di inoculo che riassumiamo brevemente nello schema di figura 1

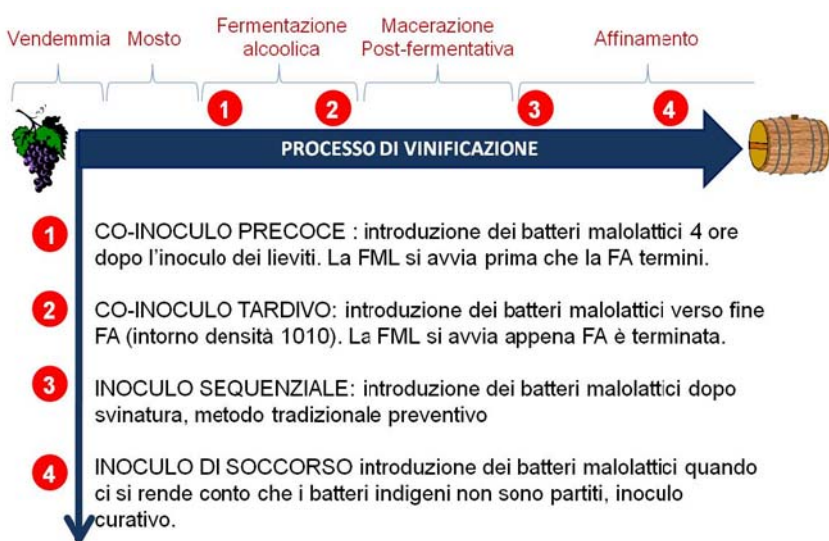
Opportunità in termini di attività fermentativa e di occupazione della nicchia ecologica in funzione della modalità di inoculo.

Cinetica di fermentazione

Inoculando i batteri malolattici a monte del processo fermentativo, visto che lo stress ambientale a cui sono sottoposti è limitato, se ne favorisce l'impiantazione. Un livello di popolazione batterica soddisfacente si traduce in una FML più rapida. La figura 2 mette a confronto un inoculo di batteri malolattici dopo svinatura con un "co-inoculo precoce" (esempio 1) e con un "co-inoculo tardivo" (esempio 2). In entrambi le prove le due versioni di co-inoculo hanno indotto malolattiche nette e rapide. Nella modalità co-inoculo precoce il ceppo impiegato (*Lactobacillus* SB3) è stato aggiunto al quinto giorno di macerazione, 2 giorni dopo l'inoculo dei lieviti. In questo caso la concentrazione in alcool molto bassa, la concentrazione di polifenoli limitata ed il substrato abbastanza ricco di elementi nutritivi, hanno permesso un buon sviluppo della popolazione batterica.

Nel secondo esempio l'inoculo con *Lactobacillus* 450 PreAc fatto in fase finale di FA, ha posto i batteri in un substrato un po' più difficile che nel caso precedente, ma in un ambiente non del tutto ostile, questo ha comunque favorito lo sviluppo della flora batterica, accelerato l'avvio e la conclusione della FML.

Figura 1 : Diverse tempistiche di inoculo della FML



Parametri da controllare per una buona riuscita della FML in co-inoculo.

Il controllo della fermentazione alcolica è il primo parametro di successo di un co-inoculo, se l'attività dei lieviti rallenta prima del completo esaurimento degli zuccheri, i batteri già presenti potrebbero divenire causa di alterazioni del vino. Il co-inoculo implica dunque un'irreprensibile attività dei lieviti. In primo luogo il co-inoculo è possibile solo in presenza di lieviti selezionati ed è assolutamente sconsigliato in caso di fermentazione da parte di lieviti indigeni.

Secondo aspetto, la scelta del ceppo di lievito deve essere maturata oltre che in funzione della materia prima da vinificare e del prodotto obiettivo che si vuole ottenere, anche e soprattutto in base alla compatibilità con il ceppo batterico che si intende co-inoculare. La coppia lieviti/batteri implica differenti tipi di interazioni: positive, neutre o di inibizione. A seconda del ceppo di lievito l'avvio della FML potrà essere favorito oppure rallentato o inibito.

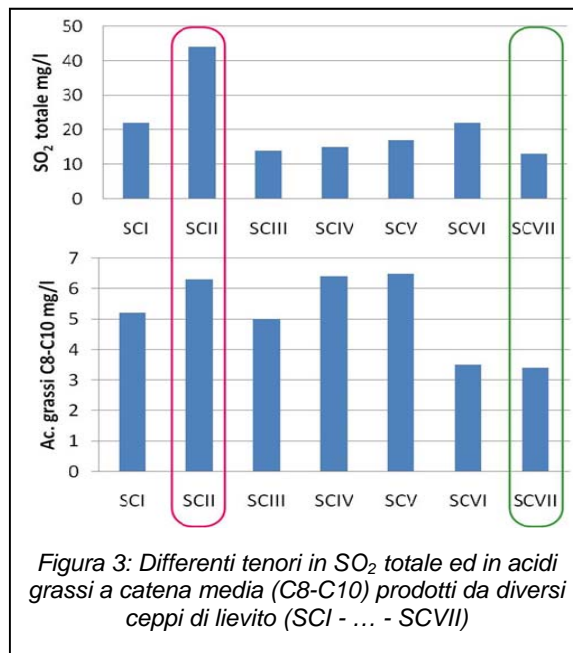
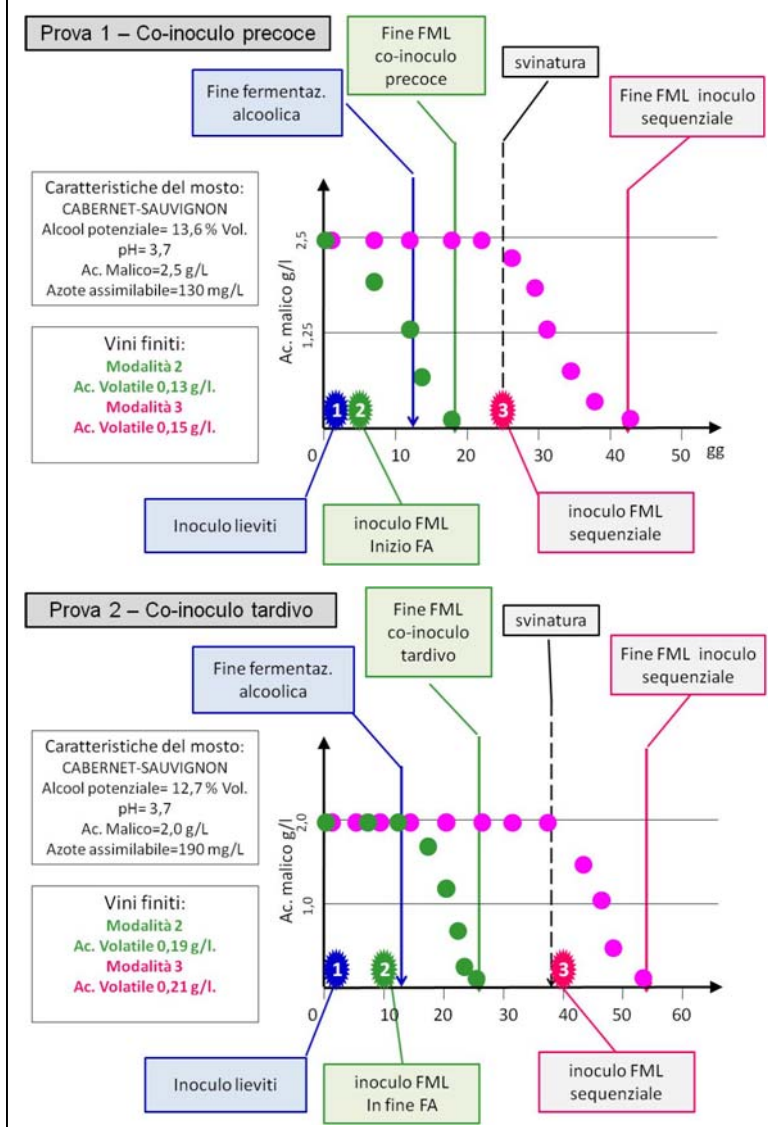


Figura 3: Differenti tenori in SO₂ totale ed in acidi grassi a catena media (C8-C10) prodotti da diversi ceppi di lievito (SCI - ... - SCVII)

Figura 2 : Due esempi di prove di inoculo di batteri malo lattici - prova 1: co-inoculo precoce/inoculo sequenziale; - prova 2: co-inoculo tardivo/inoculo sequenziale



Questo ci porta ad introdurre il concetto di ceppi di lieviti e di batteri "C.I.C." cioè di ceppi "Co Inoculo Compatibili". A titolo di esempio, il grafico della figura 3, mette in evidenza il tenore di SO₂ totale e di acidi grassi a media catena (riconosciuti essere inibitori dei batteri) raggiunti nei vini dopo fermentazione alcolica condotta da diversi ceppi di lievito. A seconda del livello raggiunto, questi fattori influenzano lo sviluppo dei batteri. Nella fattispecie il ceppo di lievito SCII, che produce forti quantità di SO₂ ed acidi grassi a catena media, è da evitare in co-inoculo, al contrario il ceppo SCVII.

Il concetto C.I.C. si applica altrettanto bene ai ceppi di batteri. Un ceppo di *Oenococcus oeni* che tollera bene la forte pressione osmotica del mosto e le temperature relativamente alte della fermentazione alcolica risulta avvantaggiato se impiegato in co-inoculo. I ceppi Lactoenos 450 PreAc e Lactoenos SB3 precedentemente citati sono ritenuti C.I.C. Infine si dovranno rispettare scrupolosamente le elementari regole igieniche in modo da evitare forti inquinamenti da parte di altri microrganismi, ragionare il solfitaggio dell'uva, controllare le temperature ed apportare tutti gli elementi nutritivi necessari ad assicurare una vitalità ottimale del lievito fino al termine della fermentazione alcolica.

Tra le due opzioni di co-inoculo, per motivi di sicurezza, noi consigliamo il "co-inoculo tardivo", esso conduce a risultati confrontabili a quelli del co-inoculo precoce in termini di tempistica e di controllo della microflora del vino, senza il rischio di fare convivere completamente le due popolazioni microbiche ed esporre il substrato zuccherino alla presenza dei batteri. Questo ha importanza soprattutto in vini che sempre più vanno nella direzione

di pH alti e gradi alcolici potenziali elevati.

Dal punto di vista pratico nel co-inoculo tardivo si devono prendere in conto i seguenti accorgimenti. L'inoculo batterico deve essere fatto quando la densità del vino è intorno a 1010 che potrebbe corrispondere a circa 30 g/l di zuccheri e solo se la fermentazione non da e non ha dato segni di rallentamento. Nelle prime 12 ore dopo l'inoculo non si deve fare nessun apporto di ossigeno alla massa, quindi evitare rimontaggi, ossigenazioni o svinatura, in modo da spingere i batteri verso il metabolismo anaerobico di consumo del malico e non stimolare la respirazione degli zuccheri. Trascorso questo lasso di tempo riprendere tranquillamente con il programma dei rimontaggi e se necessario, o quando necessario, procedere alla svinatura. Dal momento dell'inoculo in poi evitare che le temperature aumentino al di sopra dei 28°C.

Occupazione della nicchia ecologica

Nel caso del co-inoculo, sia precoce che tardivo, la FML si avvia non appena l'attività dei lieviti accenna a rallentare e la popolazione batterica raggiunge la consistenza numerica sufficiente. Il periodo di latenza tra fine FA ed inizio FML risulta eliminato

Questo periodo di latenza in natura è un periodo di vuoto microbiologico, sinonimo di instabilità: la popolazione di lieviti è in declino, quella dei batteri è ancora scarsa, ed il vino non è protetto da un adeguato solfitaggio. I *Brettanomyces* sono in grado di approfittare della situazione colonizzando prontamente l'ambiente. Non dimentichiamo che i *Brettanomyces* sono molto resistenti all'alcol ed hanno scarse esigenze nutrizionali. Originari dell'acino d'uva, durante le fermentazioni sono contenuti dalla pressione selettiva esercitata dapprima da *S. cerevisiae* e poi da *O. oeni*. Nel caso di latenza molto lunga tra le due fermentazioni possono svilupparsi, produrre fenoli volatili ed impoverire il substrato ritardando ulteriormente l'avvio della FML.

Qualunque sia il metodo di inoculo, l'impiego di colture di batteri selezionati è positivo, in quanto riduce il periodo di vuoto micro-

Figura 4 : Effetto delle differenti alternative d'impiego degli inoculi sulla carica microbiologica del vino.

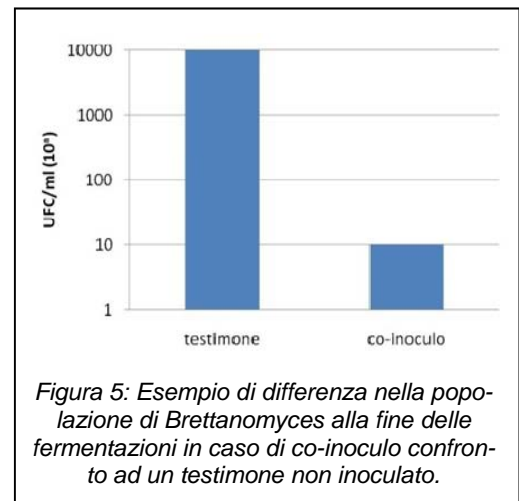
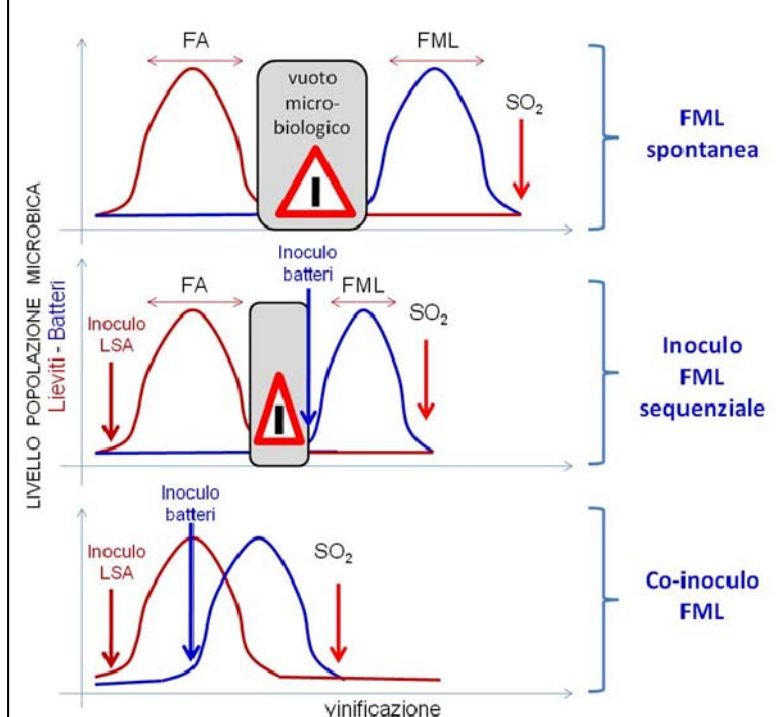


Figura 5: Esempio di differenza nella popolazione di *Brettanomyces* alla fine delle fermentazioni in caso di co-inoculo confronto ad un testimone non inoculato.

biologico. Solo a fermentazioni completate si può intervenire con l'apporto oculato di solforosa. Il corretto ed ininterrotto susseguirsi delle fermentazioni (alcolica e malo lattica) permette dunque di non lasciare mai il campo libero al *Brettanomyces*. Inoltre, operando in questo modo, i vini che dopo aggiunta di solforosa sono avviati all'affinamento, risultano molto meno ricchi di microrganismi inquinanti.

Altri benefici legati al controllo della microflora indigena.

Controllo dell'acidità volatile

L'acidità volatile è legata un po' a tutti i microrganismi del vino. Il suo tenore finale è il frutto delle diverse popolazioni microbiche che si sviluppano durante il processo di vinificazione. Il co-inoculo, che prevede l'aggiunta del ceppo batterico in presenza di zuccheri potrebbe in teoria essere propizio ad un aumento dell'acidità volatile. La corretta conduzione della FA, garantendo una buona attività dei lieviti, esclude il problema. I lieviti, meglio dotati dei batteri per degradare gli zuccheri, durante la FA li consumano in maniera preferenziale, impedendo l'accesso a questo substrato ai batteri, che sono così orientati ad attaccare l'acido-L-malico.

In condizioni di co-inoculo ben condotto, la minor presenza di microrganismi inquinanti, porta dunque ad un abbassamento del livello di acidità volatile.

Flora batterica più facile da stabilizzare.

La tolleranza dei batteri lattici nei confronti della SO₂ è stata l'oggetto di numerosi lavori. E' stato visto che alcune specie indigene, soprattutto di pediococchi, ed alcuni ceppi indigeni di *O. oeni* sono particolarmente resistenti alla SO₂. Per contro, controlli di popolazione eseguiti tre settimane dopo il solfitaggio post-fermentativo, hanno

Tabella 1: Effetto del co-inoculo, precoce o tardivo sulla combinazione della SO₂.

	Prova 1 Co-inoculo precoce		Prova 2 Co-inoculo tardivo	
	Testimone (11 gg da solfitaggio di fine FML)	Co-inoculo (24 gg da solfitaggio di fine FML)	Testimone (13 gg da solfitaggio di fine FML)	Co-inoculo (27 gg da solfitaggio di fine FML)
SO ₂ libera (mg/l)	14	37	11	28
SO ₂ totale (mg/l)	83	81	65	65

mostrato che la popolazione residua di batteri lattici è significativamente più bassa nei vini co-inoculati. Sia in co-inoculo precoce che tardivo, dopo solfitaggio, si hanno vini con livelli di popolazione microbica più bassa rispetto agli stessi vini non inoculati. Questo si traduce in un minore accumulo in questi vini di metaboliti indesiderati, quali amine biogene.

Limitata combinazione di SO₂.

Quando si aggiunge SO₂ nei vini allo scopo di contenere lo sviluppo microbico, la dose deve essere ragionata anche in funzione del potere di combinazione del vino. I composti carbonilici del vino interagiscono con la SO₂ limitandone la disponibilità. Il potere combinante di un vino dipende dalla sua composizione naturale, ma anche dai metaboliti prodotti dai microrganismi. I lieviti ed i batteri producono composti carbonilici, tra i quali l'aldeide acetica è uno dei più importanti.

L'aldeide acetica è principalmente prodotta dai lieviti durante la fermentazione alcolica. I batteri lattici in seguito, durante la FML, degradano una parte di aldeide acetica. Nel caso di co-inoculo il suo tenore è limitato in virtù del fatto che quanto viene prodotto dai lieviti è immediatamente consumato dai batteri. Inoltre la riduzione o eliminazione della fase di latenza riduce la possibilità che composti carbonilici siano prodotti da altri microrganismi. L'insieme degli effetti fa sì che i prodotti carbonilici siano notevolmente ridotti, dunque anche la dose di SO₂ può essere diminuita pur mantenendo invariata la sua efficacia (Tabella 1).

Conclusione

Per favorire il buon svolgimento della FML, l'utilizzo di colture selezionate di batteri è la miglior soluzione oggi proponibile e si può procedere con tempistiche assai diverse, tra cui noi riteniamo interessante il co-inoculo tardivo.

Gli obiettivi sono di favorire l'impiantazione del ceppo e di mantenere

l'ecosistema microbiologico attivo e sotto controllo per tutta la durata della vinificazione. Qualunque sia il protocollo scelto per l'inoculo del ceppo batterico il suo successo è strettamente legato al controllo della fermentazione alcolica ed al rispetto scrupoloso di tutte le norme e raccomandazioni tecnologiche. In co-inoculo, dato che i due microrganismi devono coabitare, anche la loro reciproca compatibilità deve essere presa in considerazione.

L'effetto della totale o parziale copresenza di lieviti e batteri selezionati, che permette la stretta successione dei processi fermentativi, consente di avere il massimo controllo sulle specie indigene. I batteri ed i lieviti selezionati dominano le popolazioni microbiche indigene limitando la capacità di queste ultime di colonizzare l'ambiente. Le popolazioni residue ad inizio affinamento sono dunque limitate, così come i rischi ad esse associati.

Questi vantaggi microbiologici si riversano sugli aspetti qualitativi, quali il minor accumulo nei vini di prodotti secondari e metaboliti indesiderati.

Infine parlando di co-inoculo, sia chiaro come con la sua declinazione da noi definita «co-inoculo tardivo», è possibile unire i benefici del co-inoculo con la sicurezza dell'inoculo sequenziale. Si riducono infatti enormemente i rischi e le difficoltà della coabitazione integrale, ma se ne colgono i molti benefici, in primis quello ecologico, di gestire, controllare e limitare lo sviluppo e l'attività dei microrganismi indigeni, tra cui figurano quelli a noi dannosi.

La corretta gestione e successione di inoculi di microrganismi selezionati diventa dunque una sorta di lotta biologica ai microrganismi indesiderati che ci permette di limitare l'aggiunta di solforosa e di evitare o comunque contenere la comparsa di metaboliti negativi.

Figura 4: Rappresentazione grafica delle interazioni lieviti batteri

