



# LAFFORT

*l'œnologie par nature*



## INFO

Estratto dai lavori di  
Vincent RENOUF

NUMERO 74 - Settembre - Ottobre 2010

### A proposito di FML: spunti, idee, considerazioni.

Nonostante la sua importanza nell'elaborazione del vino, la **Fermentazione MaloLattica** è ancora troppo spesso una tappa aleatoria della vinificazione. Per razionalizzare il processo, l'impiego preventivo di un inoculo batterico è l'unico strumento applicabile.

Grazie all'inoculo è possibile:

- controllare meglio i processi fermentativi;
- risparmiare (l'inoculo costa meno del riscaldamento della cantina volto a favorire l'avvio della FML spontanea);
- rispettare l'ambiente (il bilancio del carbonio è nettamente a favore dell'inoculo rispetto al riscaldamento di una vasca in cantina);
- guadagnare tempo (con l'inoculo si evitano lunghi periodi di latenza);
- ottenere vini più salubri e puliti (nessuna produzione di ammine biogene o di metaboliti devianti).

#### Gestione dell'inoculo

Classicamente l'inoculo batterico viene fatto dopo la svinatura, è cioè di tipo sequenziale; oggi si tende sempre più frequentemente ad introdurre l'inoculo più precocemente, già durante la fermentazione alcolica, si parla in questo caso di co-inoculo. Si distingue il co-inoculo precoce nel quale i batteri sono introdotti nel vino 24h dopo l'avvio della fermentazione alcolica, in questo caso la FML parte prima che la FA sia terminata, ed il co-inoculo tardivo che consiste nell'aggiungere i batteri durante la FA verso densità 1010, in questo caso la FML parte quando la FA è terminata. Quest'ultima forma di co-inoculo è ritenuta più sicura in quanto i batteri sono aggiunti in un substrato meno ricco in zuccheri con minor rischio di deviazioni.

L'obiettivo primario del co-inoculo precoce è di guadagnare tempo, la FML termina qualche giorno dopo la FA. Va bene quindi in modo particolare per i vini novelli e per i vini a rotazione veloce.

L'obiettivo primario del co-inoculo tardivo è il controllo microbiologico volto alla prevenzione delle alterazioni. I batteri selezionati monopolizzano l'ecosistema a scapito della flora d'alterazione, "chiudono le porte" ai *Brettanomyces* ed ai batteri lattici produttori di ammine biogene.

Con l'inoculo di tipo precoce, si ottimizza l'efficacia dei batteri.

I batteri possono essere utilizzati più tardi-

vamente, in situazioni di soccorso, dopo aver atteso invano l'avvio spontaneo. Questi sono i casi peggiori, perché alle condizioni già difficili (alcol, pH, SO<sub>2</sub>,...) che hanno impedito l'avvio spontaneo della FML si somma inevitabilmente lo sviluppo di popolazioni di microrganismi concorrenti con sottrazione di sostanze nutritive ed accumulo di composti tossici. In questi casi si dovrà ricorrere ad uno specifico protocollo che preveda l'impiego di un ceppo robusto, la detossificazione del substrato con scorze, l'apporto di nutrienti.

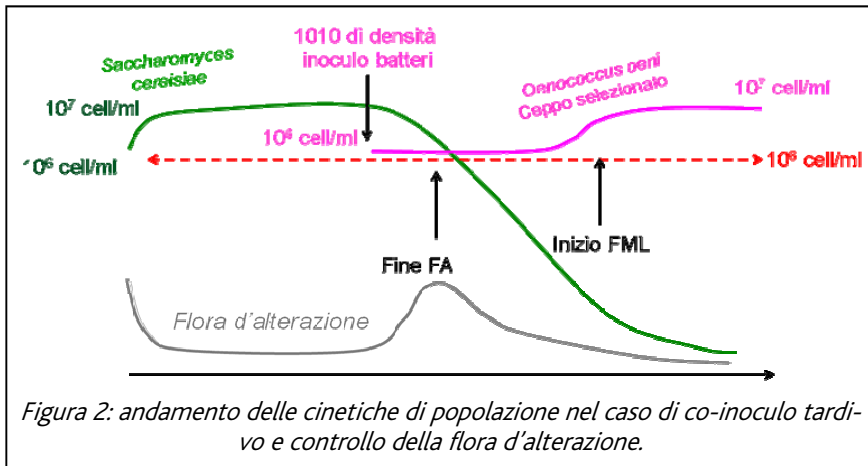
Per migliorare la riuscita dell'operazione di inoculo è possibile realizzare un "pied de cuve". Ossia la dose di batteri necessaria per l'intero volume di una vasca è aggiunta ad un volume di vino pari al 2 - 5% della massa. In questo volume le condizioni ambientali sono rese ottimali per lo sviluppo dei batteri (nutrizione, regolazione temperatura 22° - 25°C, correzione pH, ecc). I batteri presenti ad un'alta concentrazione in condizioni favorevoli si svilupperanno più facilmente e rapidamente iniziando a consumare malico. Una volta che la concentrazione del malico nel "pied de cuve" è ridotta del 75%, i batteri sono al massimo dell'attività e possono essere trasferiti in vasca, dove i batteri attivi avranno minor difficoltà ad impiantarsi nonostante le difficili condizioni del vino.

In queste situazioni il ceppo più idoneo della gamma Laffort è il Lactoenos B16. Non dobbiamo dimenticare però che la preparazione dei "pied de cuve" richiedono sempre cura e tempo.

La quantità di acido L-malico degradato è direttamente proporzionale al numero di cellule di *Oenococcus oeni* attive. In un certo lasso di tempo, una cellula degrada un

Figura 1: diverse strategie di inoculo.





certo numero di molecole di acido L-malico, dunque 100 cellule degradano 100 volte detta quantità. Perché la degradazione sia percettibile a livello analitico occorre una popolazione minima di  $10^6$  cellule di *Oenococcus oeni* in piena attività per mL di vino.

I batteri malo lattici ad inoculo diretto (Lactoenos SB3) o a pre-acclimatazione (Lactoenos 350 PreAc o L. 450 PreAc) sono preparati in modo che inoculando 1g/hL assicurino subito una popolazione di  $10^6$  cellule/mL vino. Dopo una fase di adattamento al vino di 3 – 6 giorni, la FML ha inizio. La velocità di degradazione dell'acido malico è generalmente superiore nei ceppi selezionato che negli indigeni.

Può accadere che nel vino siano presenti cellule di batteri lattici in quantità elevata senza che si abbia avvio della degradazione del malico. In questi casi non è ragionevole procedere con un inoculo, che darebbe origine a fenomeni di competizione tra popolazioni, con ulteriore ritardo dell'avvio, ma è meglio cercare di individuare le cause dell'inattività per poi rimuoverle. Se si sospetta la presenza di composti in grado di inibire l'attività batterica, quali gli acidi grassi a media catena (ac. ottanoico e ac. decanoico), un trattamento con scorze di lievito può essere sufficiente.

Nel caso di carenze nutrizionali si deve ricorrere ad un attivatore di FML, come il Malostart®. Esso apporta vitamine, aminoacidi (esclusi quelli implicati nella produzione di ammine biogene) e cofattori indispensabili al complesso enzimatico responsabile della FML,

quali ioni  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ . Se il fattore limitante è il freddo si dovrà portare la temperatura del vino intorno ai  $20^{\circ}C$ .

Tuttavia l'utilizzo di Malostart e l'aumento della temperatura hanno senso solamente se le seguenti condizioni sono rispettate:

- popolazione di *Oenococcus oeni* >  $10^5$  cellule/mL
  - rapporto 1/1000 tra popolazione di *Brett* e di *Oenococcus*;
- infatti temperature clementi ed apporto di nutrienti sono fattori che favoriscono indistintamente tutti i microrganismi.

È importante non confondere gli attivatori di FML con i preparatori per batteri da usare in fase di reidratazione. I preparatori forniscono, durante la fase di acclimatazione, gli elementi utili alla sopravvivenza dei batteri nei vini, mentre gli attivatori forniscono i composti necessari alla loro attività negli stessi.

Numerosi lavori hanno dimostrato l'azione protettiva di alcuni specifici acidi grassi e degli steroli nel consolidamento della struttura della membrana delle cellule batteriche riducendo l'effetto negativo dell'etanolo.

Gli aminoacidi sono necessari ai batteri lattici per la sintesi delle loro proteine. Alcuni aminoacidi sono detti "essenziali" dato che *O. oeni* non è in grado di sintetizzarli (ac. glutammico, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, serina, arginina, tirosina e triptofano). Generalmente a fine FA il tenore di questi aminoacidi nel vino è sufficiente dato che i lieviti, dopo averli utilizzati, li liberano nel corso della autolisi.

Soprattutto nel caso di FML tardive, primaverili, invece, le carenze sono frequenti e può essere necessario completare la dotazione del substrato con attivatori specifici come Malostart. L'aggiunta si fa alla dose di 20-40 g/hL con un rimontaggio al chiuso senza aereazione.

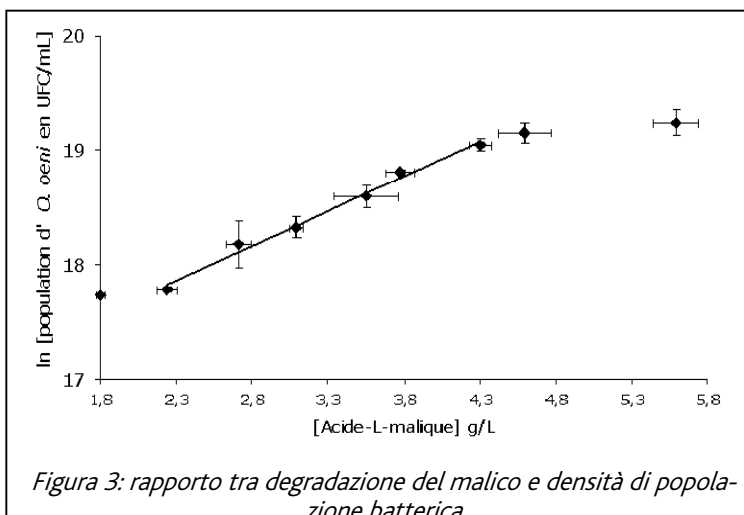
L'utilizzo di fecce di un lotto di vino che ha fatto la FML per inoculare uno che non l'ha fatta a prima vista può sembrare una tecnica ragionevole, in realtà ha le sue controindicazioni:

- i batteri a fine FML tendono a perdere attività sono dunque meno efficaci;

- ogni partita di vino presenta caratteristiche peculiari (alcool, pH,  $SO_2$ , ...) per cui i batteri si devono comunque adattare alle nuove condizioni. Questo adattamento sarà tanto più delicato quanto più i batteri presenti nelle fecce sono a fine carriera e il nuovo ambiente differente;

- le fecce sono un substrato idoneo anche a favorire i microrganismi contaminanti, ad es. *Brettanomyces*, che qui sedimentano e ritrovano le condizioni ideali per il loro sviluppo. Prima di utilizzare le fecce è dunque indispensabile controllare l'assenza di *Brettanomyces*.

In caso di co-inoculo, il ceppo batterico deve essere incorporato sotto il cappello ma non è necessario operare un rimontaggio di omogeneizzazione, i movimenti indotti dall'attività fermentativa



sono sufficienti per permettere la diffusione dei batteri nell'intera massa del vino. Il fenomeno è differente nel caso di inoculo tardivo dopo svinatura. L'omogeneizzazione con un rimontaggio al riparo dall'aria, o un "batonnage" sono metodi idonei a favorire l'adattamento e la dispersione dei batteri nel vino.

### Parametri che influiscono sullo sviluppo batterico

La gestione della FML è sempre più difficile e talvolta maggiormente aleatoria rispetto a quella della FA.

I batteri giungono in un substrato più ostile rispetto al mosto iniziale ove i lieviti trovano condizioni ideali (zuccheri, nutrienti, temperatura, ossigeno, ...) al loro sviluppo. I batteri malo lattici prima di attivarsi devono dunque adattarsi al substrato.

Per questo bisogna porre grande attenzione, al momento dell'inoculo dei batteri, alle condizioni ambientali che si hanno nel substrato.

Per iniziare l'acqua utilizzata per la reidratazione dei preparati batterici deve essere priva di cloro ed alla temperatura di 20 – 25 °C.

Sui vini devono essere presi in considerazione diversi parametri.

La presenza a fine FA di una popolazione microbica contaminante, quale il *Brettanomyces*, > 10<sup>3</sup> cell/ml può rivelarsi negativa all'avvio della FML.

Per quanto riguarda il grado alcolico ed il pH è importante sottolineare che la scelta di un ceppo malo lattico adatto permette di risolvere alcuni casi problematici. Per esempio il ceppo Lactoenos 450 PreAc risulta attivo fino a 16% vol di alcool, ed il ceppo Lactoenos 350 PreAc risulta essere efficace nei vini molto acidi, fino a pH 2,9.

Anche il tenore di acido-L-malico entra in gioco.

Si considera che con meno di 1 g/L di acido-L-malico è difficile far partire la FML, la quantità non è sufficiente affinché i batteri lo scelgano come fonte di carbonio. Quando però il tenore è maggiore a 5 g/L la FML è complicata perché lo stesso ac. malico tende a comportarsi da inibitore. Tra 1 e 5 g/L di acido-L-malico la fermentescibilità malolattica è ottimale.

Etanolo, pH, acidi grassi e temperatura agiscono sulla membrana fosfolipidica dei batteri, elemento chiave sia della sopravvivenza cellulare (capacità a persistere nel vino) che della vitalità (capacità a restare attive nel vino). L'etanolo gli acidi grassi e temperatura agiscono sulla fluidità della membrana, una temperatura troppo elevata rende la membrana troppo fluida, una temperatura troppo bassa la irrigidisce oltremodo. Gli acidi ottanoico e decanoico si inseriscono tra i fosfolipidi perturbando la coesione e la fluidità della membrana. L'etanolo ha un meccanismo simile. Il pH controlla l'attività degli enzimi della membrana e dei trasportatori. Agendo tutti sulla funzionalità della membrana hanno un effetto additivo.

Ecco perché in caso di co-inoculo precoce, quando l'alcool è ancora basso saranno tollerate temperature più alte (28-30 °C) mentre con inoculo sequenziale e

Condizioni di difficile avvio della FML	
Popolazione microrg. indigeni a fine della FA	<10 <sup>3</sup> UFC/mL
Grado alcolico % vol.	>13
pH	<3,2
SO <sub>2</sub> totale	>40 mg/L
Acido-L-malico	<1 g/L e >5g/L
Acidi grassi a media catena : acido ottanoico e acido decanoico	Ac. ottanoico > 20 mg/L Ac. decanoico > 5 mg/L

*Tabella 1: condizioni nelle quali l'avvio della FML può essere difficile.*

grado alcolico elevato (>14%vol), sarà prudente non superare i 24°C.

Alcuni ceppi di batteri selezionati sono capaci di degradare l'acetaldeide e l'acido piruvico che sono due composti che si combinano fortemente alla SO<sub>2</sub> riducendone l'attività stabilizzante. Una FML gestita con un ceppo di questo tipo può permettere di diminuire le dosi di SO<sub>2</sub> necessarie. Inoltre l'aldeide acetica, che è prodotta dai lieviti durante la fermentazione alcolica, con il co-inoculo può essere consumata immediatamente.

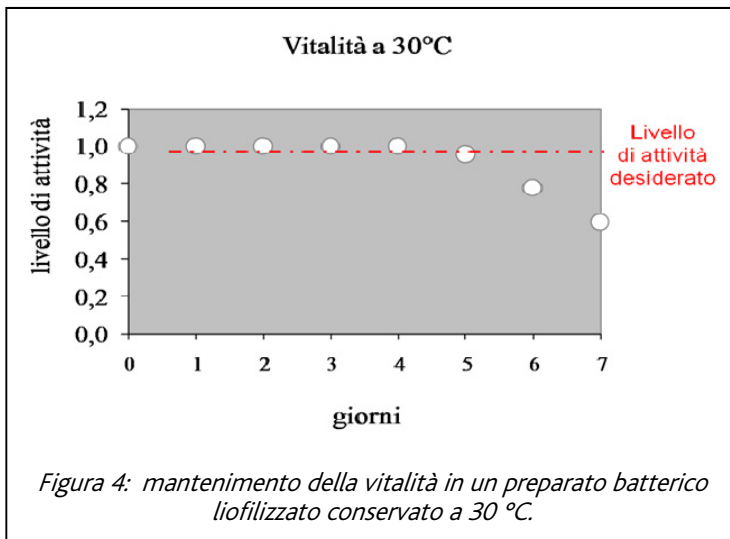
E' stato messo in evidenza come tra un vino lavorato con batteri capaci di degradare l'aldeide acetica e l'acido piruvico ed in più scarsi produttori di diacetile (come ad esempio il 350 PreAc) ed un vino con FML spontanea, il potere combinante nei confronti della SO<sub>2</sub> può essere ridotto addirittura del 50%.

I batteri selezionati, una volta aggiunti al vino, normalmente avviano rapidamente la FML, non hanno pertanto il tempo di adattarsi alle condizioni del vino. A fine FML, quando il vino viene solfitato, non sono adattati allo stress indotto dalla SO<sub>2</sub> e vengono facilmente eliminati. Nel caso di FML indigena i batteri responsabili, derivando dall'uva, subiscono e superano tutte le variazioni ambientali che si susseguono dalla vendemmia in avanti (solfitazione, fermentazione alcolica, ...), sono adattati a queste variazioni e quindi resistono di più all'aggiunta di SO<sub>2</sub> di fine vinificazione, rivelandosi spesso di difficile eliminazione al termine della FML.

### Conservazione dei batteri

La liofilizzazione consiste nel portare i batteri -80°C e poi nell'indurre la sublimazione dell'acqua libera sotto vuoto. Lo scopo della liofilizzazione è quello di eliminare l'acqua dal prodotto conservandone sia il volume che l'aspetto e le proprietà. Alla fine si ottiene un prodotto completamente disidratato che può così essere conservato.

Per i batteri congelati il trattamento si ferma alla prima tappa, ossia l'acqua libera è resa non disponibile dal congelamento, ma non è stata eliminata. Il prodotto deve essere conservato in congelatore perché se acqua libera torna in forma liquida si possono avviare immediatamente reazioni biochimiche che ne alterano l'integrità. L'acqua esiste però nel mondo biologico in due forme ben distinte: acqua legata, incorporata alle strutture molecolari all'interno stesso delle cellule; acqua libera, in circolo all'esterno delle strutture per apportare gli elementi nutritivi necessari al loro funziona-



mento ed assicurare l'eliminazione dei metaboliti.

La liofilizzazione dei batteri elimina l'acqua libera lasciando l'acqua legata.

Per assicurarne una conservazione ottimale devono essere mantenuti a bassa temperatura.

Tuttavia a differenza dei batteri congelati possono trascorrere brevi periodi a temperatura ambiente senza problemi. Prove e controlli hanno dimostrato che i batteri liofilizzati mantenuti a 30 °C per 5 giorni e poi rimessi al freddo non perdono vitalità. Le condizioni di conservazione dei batteri liofilizzati sono dunque molto meno restrittive che le condizioni di conservazione dei batteri congelati.

#### Batteri lattici ed impatto generale sui vini

I batteri lattici della FML sono capaci di metabolizzare gli amminoacidi solforati: metionina e cisteina. E' oggi noto che il 3-metil-sulfanil-propionico, composto derivante da questo metabolismo, contribuisce favorevolmente all'aroma del vino con note di frutti rossi. Allo stato attuale delle conoscenze è il solo prodotto chiaramente identificato con un ruolo sull'impatto aromatico dei batteri malolattici.

Per contro è riconosciuto che una FML stentata, che induce un ritardo nella stabilizzazione del vino è potenzialmente sfavorevole al mantenimento degli aromi fruttati. In caso di FML spontanea si deve anche considerare che alcuni prodotti del metabolismo dei batteri indigeni, quali le ammine biogene, possono avere un ruolo di copertura sugli aromi dei vini. Diversi lavori di ricerca sono attualmente in corso sul binomio FML/aromi.

Eliminare completamente l'acido-L-malico del vino con la FML è impossibile. Quando la concentrazione diventa molto bassa, l'attività malo lattica dei batteri cala, e possono essere attaccati altri substrati, quali ad es. l'acido citrico. Questo porta alla produzione di diacetile ed al tipico "odore burroso" di fine FML. Se si solfitano i vini quando si raggiunge la soglia di 0,3 – 0,4 g/L di ac. malico, l'attività enzimatica residua permette di consumarne ancora qualche molecola e si raggiunge la

quota 0,2 g/L, risultato auspicabile. Ed in questo modo si evita la comparsa di note burrose.

Alcuni operatori sostengono che una FML ritardata favorisce la stabilizzazione del colore dei vini rossi. Questa teoria è fortemente sostenuta in Borgogna nella vinificazione dei Pinot neri.

L'eventuale effetto sul colore non dipende da un'attività diretta dei batteri ma è piuttosto la conseguenza del ritardo della solfitazione che lascia più tempo alle reazioni di stabilizzazione. Però una FML lenta che ritarda la solfitazione è una strategia microbiologica poco prudente.

Sui vitigni bordolesi, prove di co-inoculo precoce con solfitazione a fine fermentazione, non hanno messo in evidenza nessuna differenza sul colore dei vini.

E' stato invece notato che il colore è tanto più stabile quanto più la temperatura della FML è bassa. Nella scala di temperature alle quali si possono sviluppare i batteri (18-25°C) è dunque preferibile porsi verso il limite più basso. La diminuzione della dose finale di SO<sub>2</sub> consentita dall'inoculo batterico è un fatto positivo per le reazioni di stabilizzazione del colore che risultano appunto favorite da solfitazione di fine FML a basse dosi.

#### Malolattica in vasca o in barrique

Ognuno di questi contenitori presenta vantaggi ed inconvenienti che vanno attentamente ponderati.

L'interazione dei batteri lattici con il legno rappresenta da sempre un'argomentazione a favore dell'impiego delle barrique. Alla domanda se i risultati positivi sono dovuti unicamente al contatto prolungato del vino con il legno o all'attività dei batteri lattici hanno risposto studi recenti che dimostrano come i batteri lattici del vino, grazie alle loro attività glicosidiche, favoriscono la liberazione di composti aromatici del legno di rovere, quale ad esempio la vanillina. Sono state descritte cinque attività ( $\beta$ -glucosidasi,  $\alpha$ -glucosidasi,  $\beta$ -xilosidasi,  $\alpha$ -ramnosidasi e  $\alpha$ -arabinosidasi) che probabilmente giocano un ruolo nella nutrizione dei batteri in un ambiente povero quale il vino affinato in barrique.

Oggi lo sviluppo di altre forme di "legno enologico" (trucioli, doghe, ...) permette poi, ove possibile, di conciliare i vantaggi della gestione di una FML in vasca e le interazioni batteri/legno.

Tabella 2: vantaggi e svantaggi dei diversi contenitori.

	Vantaggi	Inconvenienti
Vasca	Temp. più facilmente controllabili Migliori condizioni igieniche Perdita di vino contenuta Mano d'opera limitata Lavoro più omogeneo	Eliminazione della CO <sub>2</sub> lenta Neutralità aromatica
Barrique	Interazione dei batteri lattici con i composti del legno. Batonnage delle fecce per incoraggiare l'avvio della FML Eliminazione progressiva della CO <sub>2</sub>	Difficoltà tra una barrique e l'altra Temperatura difficile da controllare Perdite di vino Forte richiesta di mano d'opera