

GESTIONE DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA MEDIANTE COINOCULO LIEVITI/BATTERI

di M. Tristezza¹, L. di Feo²,
M. Tufariello³, F. Grieco⁴,
G. Bleve¹, P. Alifano⁵,
F. Grieco¹,*

Microvinificazioni in laboratorio seguite da due vinificazioni industriali dimostrano un'influenza positiva non solo sulle tempistiche di lavoro, ma anche sul quadro aromatico

La fermentazione malolattica (FML) è la conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico e CO₂ attuata da parte dei batteri malolattici (BML) a seguito della loro crescita nel vino. Questo processo fermentativo provoca la disacidificazione del vino, in quanto un acido di-carbossilico, l'acido malico, viene trasformato in un acido mono-carbossilico quale l'acido lattico. Associate a questo processo avvengono altre trasformazioni importanti dal punto di vista organolettico quali modificazioni del colore, rivelazione di aromi e modificazioni dell'impatto gustativo [1]. Essa può avvenire spontaneamente ad opera della flora indigena o mediante l'utilizzo di colture starter selezionate, solitamente appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*. I

vantaggi dell'induzione della FML con l'inoculo di BML selezionati sono un maggiore controllo sull'avvio e sul completamento della degradazione dell'acido malico ed un effetto positivo sull'aroma e sul gusto del vino. Il momento dell'inoculo batterico gioca un ruolo importante nella definizione del profilo sensoriale del vino [2]. Generalmente si raccomanda l'inoculo dei batteri nel vino dopo la fermentazione alcolica (FA), quando la concentrazione di zuccheri è bassa. Infatti, una possibile conseguenza indesiderata del metabolismo eterofermentativo dei BML è lo *spunto lattico* ovvero la degradazione degli zuccheri con conseguente produzione di acido acetico e di acido D-lattico [3].

In vini che al termine delle FA presentano particolari condizioni chimico-fisiche come elevato livello di etanolo, carenze nutrizionali, pH basso, elevati tenori di SO₂ molecolare, rendono difficile lo sviluppo dei BML si consiglia il coinoculo (inoculo simultaneo di lieviti e batteri).

Una conseguenza importante della tecnica del coinoculo è la notevole riduzione dei tempi di fermentazione, che risulta vantaggiosa sia dal punto di vista

economico sia dal punto di vista tecnico-pratico di gestione della cantina [5] e riduce inoltre il rischio di alterazioni microbiologiche dei vini prodotti [4].

Va comunque detto che la pratica della coinoculazione è un'operazione molto delicata, da gestire con cura ed estrema attenzione [6] e sulla quale poche informazioni sono disponibili in letteratura.

Scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di studiare gli effetti a livello fisiologico e chimico dell'inoculo simultaneo in mosto d'uva del lievito *Saccharomyces cerevisiae* e del batterio *O. oeni*, per lo svolgimento in contemporanea delle fermentazioni alcolica e malolattica per una sua applicazione in condizioni difficili di vinificazione, ovvero, ovvero alto tenore alcolico e elevata acidità, tipiche dell'enologia Meridionale.

Risultati

Microvinificazioni Sviluppo delle popolazioni microbiche durante la fermentazione alcolica

La presenza del batterio sin dalle prime fasi della FA non disturba o inibisce la dinamica fermentativa del lievito (Figura 2). Infatti, nel mosto coinocula-

1 CNR – Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), U.O. S - Lecce;

2 Enocentro Distribuzione s.r.l., Lecce;

3 CNR - Istituto per la Microelettronica e Microsistemi, U.O.S Lecce;

4 CNR-ISPA, U.O. Bari;

5 Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento, Lecce

*Corresponding author:

Dr. Francesco Grieco
CNR.-ISPA., via Prov. Lecce-Monteroni, 73100 Lecce, Italia;
Tel: 0832/422612; Fax:
0832/422620; Email: francesco.grieco@ispa.cnr.it

Fig. 2 / Andamento della FA nelle microfermentazioni inoculate rispettivamente con il solo lievito e con il coinoculo lievito/batterio.

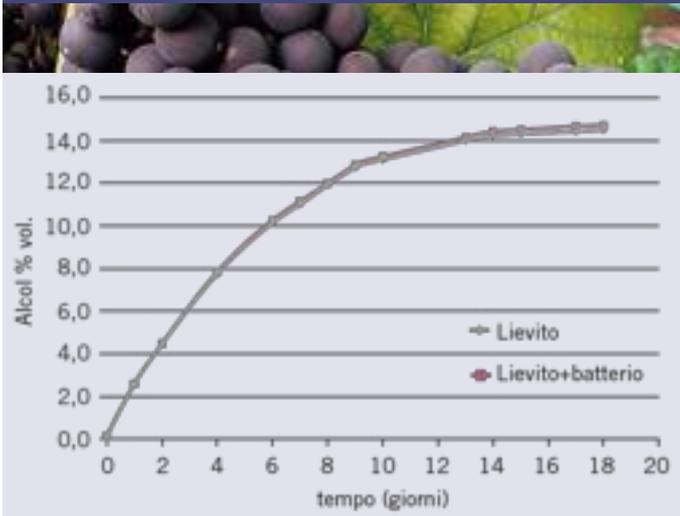
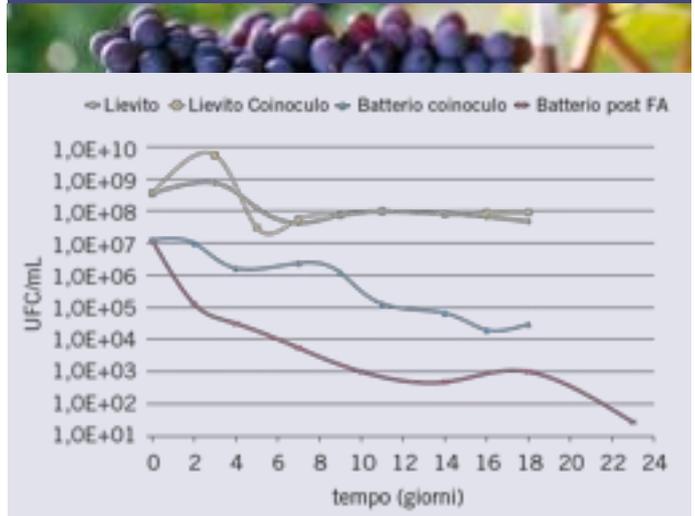


Fig. 3 / Sviluppo delle popolazioni dei lieviti e dei batteri nella microfermentazioni in coinoculo e con l'inoculo batterico effettuato al termine della fermentazione alcolica.



to si osserva come la presenza del batterio non contrasti lo sviluppo della popolazione dei lieviti durante la fermentazione, evidenziando la capacità del lievito di convivere insieme al batterio e la capacità di quest'ultimo di adattarsi meglio all'ambiente fermentativo in coinoculo piuttosto che in forma di inoculo post FA (Figura 3). Nel caso del coinoculo il profilo di sviluppo della popolazione

batterica mostra il suo graduale acclimatemento nel mosto durante l'aumento della concentrazione dell'alcol ad opera dei lieviti. Nel caso dell'inoculo batterico post FA, si osserva un drastico e continuo calo nel numero dei batteri durante tutto il periodo del loro rilevamento. L'alcol in questo caso si dimostra tossico per il batterio decretando la continua e progressiva morte cellulare.

Fermentazione malolattica

La FML innestata mediante coinoculo è durata circa 17 giorni. (Figura 4). La concentrazione di acido malico di partenza (3,04 g/L) è rimasta invariata per i primi due giorni, mentre ha subito una diminuzione di circa il 20% (2,4 g/L) durante le 48 ore successive. Nei giorni dal 4° al 6° il consumo di acido malico ha subito un rallentamento con una

variazione della concentrazione da 2,40 g/L a 2,27 g/L. Dal 6° allo 8° giorno il processo di degradazione dell'acido organico ha accelerato con conseguente riduzione della concentrazione dello stesso a 1,02 g/L. L'inoculo tradizionale, post FA, è stato effettuato alla fine della FA. Il grafico (Figura 4) mostra come il batterio abbia cominciato subito a degradare l'acido malico, infatti, nei primi 4 giorni la con-

Fig. 4 / Consumo di acido malico nelle microfermentazioni effettuate sia mediante coinoculo e tramite inoculo del batterio al termine della FA.

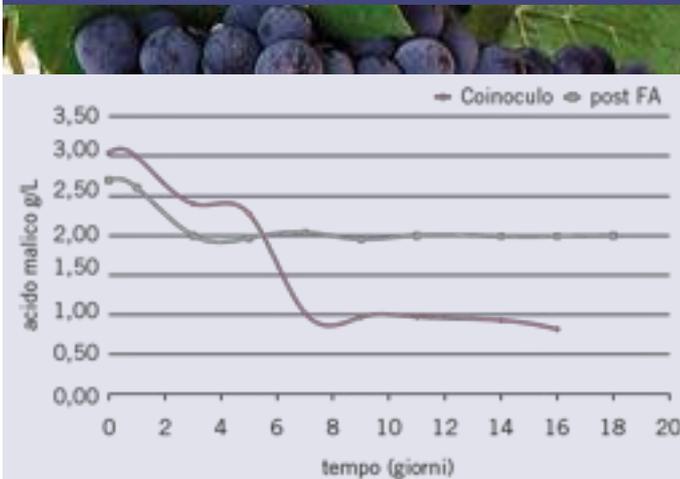
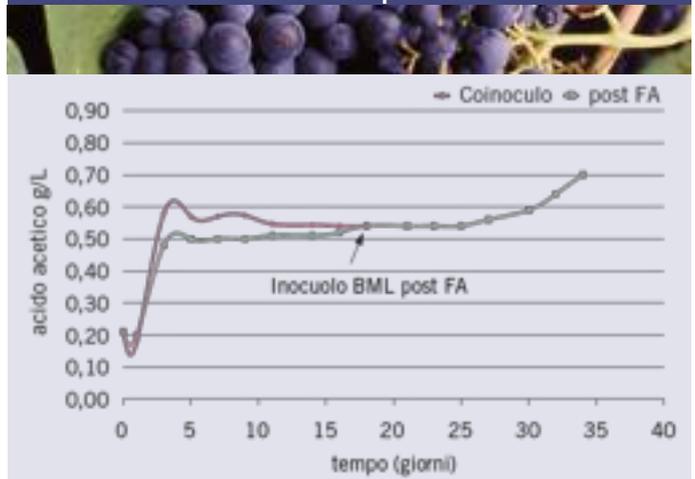


Fig. 5 / Produzione di acido acetico nelle microfermentazioni effettuate mediante tecnica del coinoculo e inoculo del batterio post FA.



Tab. 1 / Composizione chimico-fisica dei vini ottenuti mediante microfermentazione.

Parametri		LIEVITO		COINOCULO		INOCULO POST FA	
Alcol	%	13,81	± 0,09	13,91	± 0,13	14,11	± 0,13
Zuccheri residui	g/L	3,28	± 0,24	3,06	± 0,27	2,28	± 0,13
Acidità totale	g/L	7,45	± 0,09	6,65	± 0,15	7,22	± 0,02
Acidità volatile	g/L	0,54	± 0	0,54	± 0,01	0,7	± 0,01
pH	-	3,35	± 0,01	3,4	± 0,01	3,36	± 0,01
Acido malico	g/L	2,69	± 0,03	0,82	± 0,07	2	± 0,03
Acido lattico	g/L	0,08	± 0,01	1,38	± 0,02	0,43	± 0,02
Acido tartarico	g/L	3,74	± 0,07	3,52	± 0,15	3,74	± 0,07
Acido citrico	g/L	0,4	± 0,06	0,39	± 0,07	0,35	± 0,09
Densità	g/L	0,99	± 0	0,99	± 0	0,99	± 0
Estratto secco	g/L	28,9	± 0,1	29,16	± 0,2	27,86	± 0,22
Glicerolo	g/L	11,2	± 0,09	11,17	± 0,09	11,54	± 0,08
Metanolo	g/L	0	± 0	0	± 0	0	± 0

centrazione dell'acido malico si abbassa dal suo valore iniziale 2,69 g/L a 2,00 g/L. Dal 4° giorno in poi si osserva il blocco della FML in quanto il valore della concentrazione dell'acido malico rimane invariato nel tempo per i successivi 13 giorni.

Parametri enologici

L'uso combinato del lievito e del batterio ha avuto un effetto positivo sulla acidità volatile (AV), risultando al termine della fermentazione condotta mediante coinoculo la concentrazione di acido acetico (0,54 g/L) inferiore del 24% rispetto a quella di rilevata nel vino prodotto mediante tecnica di inoculo tradizionale (0,70 g/L) (Figura 5). I valori di acido citrico, densità, estratto secco, glicerolo e metanolo sono statisticamente invariati nelle tre fermentazioni, indicando che

la tecnica del coinoculo non influenza negativamente la chimica del vino rispetto alla tecnica classica di innesto della FML (Tabella 1).

Analisi dei composti volatili

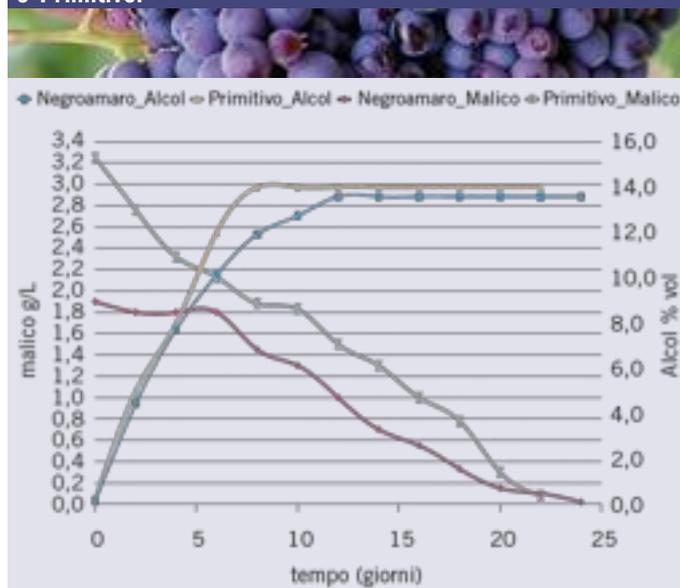
I vini che hanno subito il processo di FML mediante coinoculo presentano una composizione

aromatica più complessa rispetto all'equivalente vino che ha subito l'inoculo dei batteri al termine della FA (Tabella 2). In particolare, il tenore di dietilmalato (aroma oleoso indesiderato) indica che la prova con inoculo post FA ha effettuato solo una parziale malolattica. Nella prova di coinoculo non è stata rilevata la presenza dell'acido 2-metilpropanoico (aroma agrodolce di formaggio), presente nel vino soggetto a FML con inoculo post FA. La componente aromatica del vino prodotto con il coinoculo è stata arricchita dal 2-metossi-4-vinilfenolo (aroma di legno) e dal siringolo (aroma di pepe nero). Nel caso del coinoculo è stata inoltre determinata la presenza di 2,3-butandiolo.

Vinificazione in cantina

La vinificazione di mosto d'uve Negroamaro, ha visto una dura-

Fig. 6 / Produzione di etanolo e consumo di acido malico durante le due vinificazioni industriali di mosti Negroamaro e Primitivo.



Tab. 2 / Principali composti volatili presenti nei vini ottenuti mediante microfermentazione.

COMPOSTI (mg/L)	LIEVITO		COINOCULO		INOCULO POST FA	
ESTERI						
butanoic acid ethyl ester	0,1	± 0,03	0,11	± 0,01	0,07	± 0,04
isoamyl acetate	0,31	± 0,01	0,33	± 0,02	0,2	± 0,06
hexanoic acid ethyl ester	0,1	± 0,02	0,09	± 0,02	0,08	± 0,05
ethyl lactate	0,05	± 0	0,07	± 0,01	0,08	± 0,01
ethyl octanoate					0,07	± 0,01
3-hydroxy-ethylbutanoate	0,04	± 0	0,02	± 0,01	0,04	± 0,02
ethyl decanoate	0,07	± 0,02	0,06	± 0,02	0,06	± 0,02
diethyl succinate	0,06	± 0,01	0,27	± 0,01	0,23	± 0,04
2-phenylethylacetate	0,12	± 0,04	0,12	± 0,02	0,12	± 0,07
mono ethyl succinate	0,76	± 0,07	2,61	± 0,09	1,68	± 0,05
diethyl malate		-		-	0,51	± 0,07
ACIDS						
2-methylpropanoic acid	0,12	± 0,01			0,11	± 0,02
butanoic acid	0,07	± 0	0,07	± 0	0,06	± 0,03
3-methyl butanoic acid	0,54	± 0,02	0,56	± 0	0,66	± 0,09
hexanoic acid	0,44	± 0,05	0,47	± 0,04	0,37	± 0,08
octanoic acid	0,52	± 0,08	0,57	± 0,05	0,4	± 0,09
decanoic acid	0,2	± 0,08	0,16	± 0,04	0,09	± 0,08
benzoic acid	0,15	± 0,02	0,17	± 0	0,13	± 0
benzeneacetic acid		-	0,21	± 0,04	0,1	± 0,04
OTHERS						
butyrolactone	0,07	± 0	0,07	± 0	0,08	± 0,01
methionol	0,21	± 0,02	0,21	± 0,01	0,22	± 0,06
2-methoxy-4-vinylphenol	0,09	± 0,02	0,09	± 0,02		-
siringol	0,02	± 0,02	0,04	± 0,01		-
acetovanillon	0,06	± 0,01	0,05	± 0,02	0,05	± 0,02
ALCOHOLS						
1-propanol	0,06	± 0,02	0,07	± 0,01		
2-methyl-1-propanol	0,56	± 0,07	0,64	± 0,06	0,57	± 0,04
1-butanol	0,05	± 0,02	0,07	± 0,01	0,03	± 0
isoamyl alcohols	8,27	± 0,09	8,52	± 0,06	12,51	± 0,08
3-methyl-1-pentanol	0,03	± 0,03	0,08	± 0,01	0,08	± 0,02
hexanol	0,19	± 0,02	0,2	± 0,01	0,22	± 0,03
3-hexen-ol (Z)	0,04	± 0,01	0,05	± 0,01	0,04	± 0,01
2,3-butan-diol (R,R)	0,26	± 0,14	0,43	± 0,05		-
2,3-butan-diol (S,S)	0,07	± 0,03	0,11	± 0,01		-
2-phenylethanol	7,75	± 0,09	8,26	± 0,05	10,49	± 0,1

te della FA di 10 giorni ad una temperatura di 22 °C, mentre la FML è terminata dopo ulteriori 12 giorni (valore finale di AV = 0,46 g/L). La vinificazione di mosto di uve di Primitivo è stata caratterizzata da una FA della durata di 8 giorni a temperatura di 24 °C con la FML terminata nei successivi 12 giorni (valore finale di AV = 0,49 g/L) (Figura 6).

Discussione

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'uso del coinoculo per la gestione della fermentazione malolattica ha avuto un'influenza positiva sul profilo chimico ed aromatico dei vini prodotti sperimentalmente in laboratorio e in cantina su scala industriale.

Questo studio ha inoltre confermato come la FML possa svolgersi in presenza di zuccheri fermentescibili senza un aumento significativo degli acidi acetico e D-lattico. Nelle prove sperimentali effettuate, il consumo dell'acido malico è avvenuto durante la FA, quando la popolazione dei batteri non era in fase di crescita. Ad ulteriore supporto dell'efficacia del coinoculo lieviti-batteri, è stato osservato un tenore di acidità volatile inferiore del 23% rispetto a quello rilevato nel vino prodotto mediante inoculo tradizionale, con un effetto migliorativo sulle caratteristiche organolettiche del vino [9].

I risultati mostrano che l'utilizzo del coinoculo per la gestione della FML ha avuto un'influenza positiva non solo per quanto riguarda le tempistiche ridotte, ma anche per la

Materiali e metodi

Microrganismi

In questo studio sono stati utilizzati due starter commerciali di *Saccharomyces cerevisiae* (Esseco, Enartis Ferm Red Fruit) e *Oenococcus oeni* (Esseco, ML ONE).

Microfermentazioni

Il mosto di uve Negroamaro (18,2° Babo; 7,2 g/L AT; 3,04 g/L malico; 60 mg/L SO₂ tot; pH 3,34; APA 143,5 mg/L) è stato chiarificato mediante centrifugazione. Le colture starter sono state preparate ed inoculate nei mosti secondo le indicazioni fornite dal produttore. L'inoculo dei BML è stato fatto 24 ore dopo l'inoculo dei lieviti, nel caso delle prove di coinoculo, e a fine FA, nel caso di inoculo tradizionale. Le prove sono state condotte in triplicato, a temperatura ambiente (Figura 1).

Vinificazione in cantina

Due vinificazioni sono state effettuate presso due Aziende Vinicole della Provincia di Lecce, rispettivamente da uve Negroamaro (400 q; 21,5° Babo; 1,9 g/L malico; pH 3,44) e Primitivo (300 q; 22,5° Babo; 3,2 g/L malico; pH 3,52). Il mosto è stato solfitato (10 g/hL MBSK), portato a temperatura controllata e quindi inoculato con il ceppo di lievito *S. cerevisiae*. Trascorse 24 ore è stato inoculato il BML. È stata applicata la tecnica del *délestage*, con due rimontaggi giornalieri.

Determinazione della popolazione microbica

La conta vitale di lieviti e batteri è stata effettuata piastrando i



>> Fig. 1 / Prove di microfermentazione.

campioni di mosto rispettivamente sui terreni WL agar e MRS con cicloheximide 0,5%.

Determinazione degli acidi malico e acetico

Il contenuto di acido malico e acido acetico è stato determinato mediante metodo enzimatico utilizzando un kit commerciale (Biogamma, Italia).

Analisi chimico-fisiche

I parametri chimici di interesse enologico sono stati valutati in mosto ed in vino, mediante l'utilizzo dell'analisi all'Infrarosso con trasformata di Fourier (FTIR) [7]. L'analisi gascromatografica dei composti organici volatili è stata effettuata come precedentemente descritto [8]. ●

positiva influenza sul quadro aromatico.

Infatti la componente aromatica dei vini ottenuti mediante coinoculo è stata arricchita da composti a valenza organolettica positiva (aroma di legno e di pepe nero) e privata di composti con influenza organolettica negativa (aroma di formaggio), in confronto a quelli ottenuti mediante tecnica tradizionale. La presenza del 2,3-butandiolo indica che nel caso del coinoculo i batteri sono stati in grado di effettuare la degradazione del diacetile, il composto derivato dalla FML con maggiore impatto organolettico sul vino [11]. Tale com-

posto se presente nel vino ad alte concentrazioni è in grado di influire negativamente sul bouquet del vino conferendo note aromatiche burrate che interferiscono con gli aromi fruttati dei vini [12]. Di conseguenza, applicando la tecnica del coinoculo sarà possibile produrre vini con minori sentori burrati e lattici ma con profili sensoriali dominati dalle note organolettiche tipiche del vitigno. L'applicazione di questo metodo innovativo, grazie ad un regolare decorso fermentativo e alla possibilità di travasare e solfitare il vino in breve tempo, potrà efficacemente ostacolare lo sviluppo di mi-

croorganismi contaminanti ed i rischi collegati alla produzione di amine biogene [13]. La sperimentazione condotta su scala industriale in due Aziende Vinicole per la produzione di vino da uve Negroamaro e Primitivo ha indicato che il protocollo sperimentale di coinoculo ha contemporaneamente condotto con successo i processi di FA e FML. Questo studio fornisce, quindi, i primi dati sull'applicazione del metodo del coinoculo nelle condizioni di vinificazione tipiche dell'industria vinicola pugliese e rappresenta il primo passo per lo sviluppo di un protocollo operativo atto all'utilizzo indu-

striale di uno starter fermentativo misto lievito/batterio, passibile di un suo futuro trasferimento alla pratica industriale, per il miglioramento della qualità delle produzioni enologiche tipiche. ●

Bibliografia disponibile a richiesta

Ringraziamenti

Si ringrazia il P.A. Giovanni Collella per il valente supporto tecnico. La Dr.ssa Tristezza è beneficiaria di una borsa di studio "Ritorno al Futuro – Borse di Ricerca" P.O. Puglia Fse 2007/2013. Asse IV "Capitale Umano"