

DOCUMENTO  
TECNICO

**Viviana Corich  
Milena Carlot  
Nicola Giusti  
Paola Vagnoli  
Alessio Giacomini**

*Facoltà di Agraria - Università di  
Padova - Sede di Conegliano (TV)*



*Da sinistra:  
M. Carlot,  
A. Giacomini,  
P. Vagnoli,  
V. Corich*

## IMPORTANZA DEL MOMENTO DI INOCULO NELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA DI RABOSO PIAVE

È stato studiato l'effetto di un ceppo selezionato di *Oenococcus oeni* sulla fermentazione malolattica inoculandolo 18 ore dopo l'immissione del lievito oppure al momento in cui nel mosto rimanevano 50 g/hl di zuccheri. L'azione dei batteri sulle caratteristiche del vino viene discussa in rapporto al testimone privo di inoculo batterico.

### Introduzione

L'importanza dei batteri lattici nel settore enologico risiede principalmente nella capacità, che è loro singolare prerogativa, di attuare la fermentazione malolattica (FML), reazione chimica di decarbossilazione che trasforma l'acido L-malico in acido L-lattico (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

La principale conseguenza di tale processo è un cospicuo abbassamento dell'acidità totale (l'acido L-malico

a fine fermentazione è praticamente assente) che si ripercuote nell'innalzamento del pH di 0,3-0,5 unità. In realtà l'effetto finale è ben più complesso di una semplice disacidificazione biologica. La grande importanza della fermentazione malolattica, infatti, risiede proprio nelle nuove caratteristiche e sfumature organolettiche che l'attività batterica impartisce al vino (Liu, 2002; Lonvaud-Funel, 2001). I batteri lattici, infatti, sono in grado di sintetizzare composti e trasfor-

mare molecole preesistenti che hanno un'influenza diretta sulle caratteristiche organolettiche del prodotto. Infine, un altro aspetto positivo associato alla FML, non ultimo per importanza, risiede nell'effetto stabilizzante che tale processo ha sul vino. Infatti, durante lo sviluppo batterico, vengono consumate oltre agli eventuali zuccheri residui, anche fonti energetiche alternative, prima fra tutte l'acido citrico, che potrebbe favorire, in fasi successive (ad esempio, dopo l'im-



**Tab. 1 - Caratteristiche dei ceppi microbici usati per la sperimentazione**

Specie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
Regione di provenienza	La Rioja (Spagna)	-
Utilizzo enologico	inoculo per la fermentazione alcolica	inoculo per la FML
Caratteristiche fermentative	bassa produzione di acidi grassi a catena media, limitate esigenze nutritive, elevata competitività, bassa produzione di composti solforati, fenotipo killer, bassa formazione di schiuma, bassa produzione di acidità volatile, resistenza a basse e alte temperature	buone capacità fermentative a pH bassi (fino a 3,1) a basse temperature (13-15°C), alta resistenza alla SO <sub>2</sub> (fino a 50-60 mg/l di SO <sub>2</sub> totale), elevata tolleranza all'etanolo (fino a 14°)
Effetti sulla composizione del vino	alta produzione di esteri etilici, effetti stabilizzanti sul colore (alta produzione di polisaccaridi)	bassa produzione di acidità volatile, bassissima produzione di ammine biogene, riduce le aldeidi alifatiche responsabili degli odori erbacei
Effetti organolettici	esaltazione degli aromi floreali, riduzione dei toni erbacei	riduzione delle note erbacee e vegetali, esaltazione degli aromi fruttati (ciliegia, frutti di bosco nei vini rossi), degli aromi varietali, aromi di frutta tropicale e quelli di frutta a polpa bianca, mela pera (vini bianchi), aumento della rotondità, complessità e persistenza del vino
Campi di applicazione	fermentazioni primarie per la produzione di vini bianchi e rossi giovani	vini difficili (basso pH e alta gradazione), fermentazione di vini bianchi e rossi per l'esaltazione del carattere fruttato e/o eliminare il gusto erbaceo, fermentazioni a basse temperature
Preparazione tecnologica	lievito secco attivo (LSA)	la coltura è preparata mediante processo brevettato con pre-acclimatazione durante la fase di produzione di biomassa
Metodo di impiego	inoculo diretto nel mosto.	inoculo diretto nel vino

bottigliamento) lo sviluppo di nuove e deleterie flore microbiche in grado di danneggiare il prodotto in modo talvolta irreparabile (Fugelsang e Zoecklein, 1993).

La FML nei vini può avvenire spontaneamente, di solito dopo la fermentazione alcolica, ed è caratterizzata generalmente da un decorso lento che può protrarsi anche per parecchi mesi. Le condizioni necessarie per l'instaurarsi di questo processo sono legate alle esigenze di crescita dei batteri lattici ed in particolare: temperature comprese tra i 18 e i 25°C, grado alcolico non molto elevato, basso contenuto di anidride solforosa e pH superiore a 3,2. Anche una macerazione prolungata e

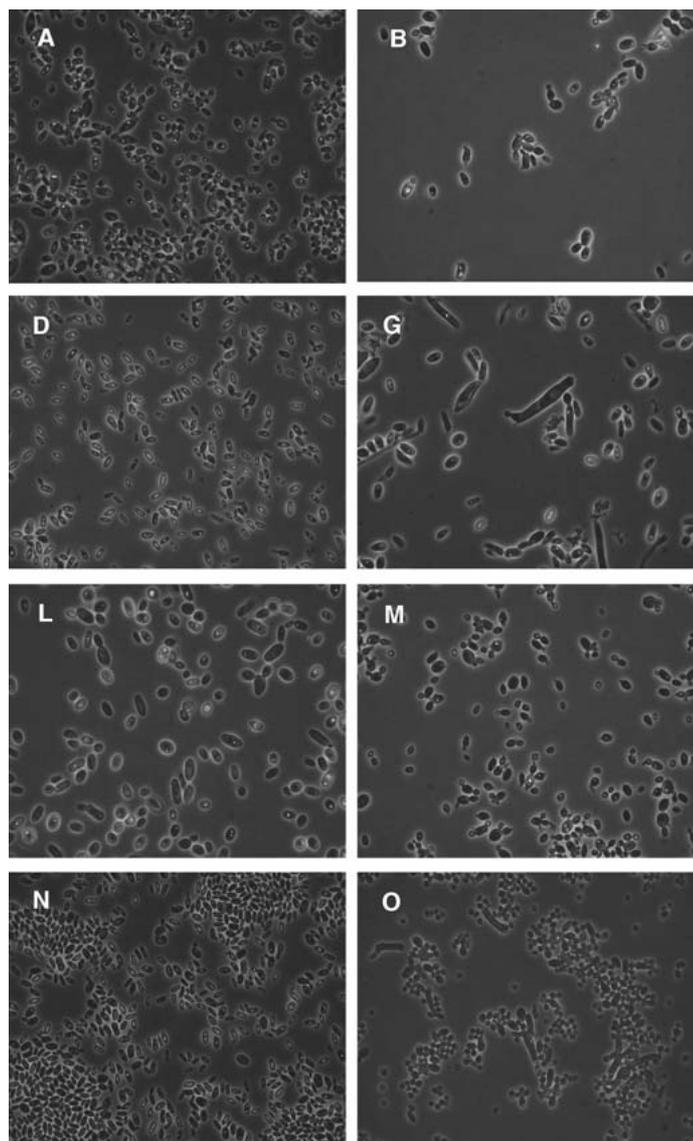
la permanenza sulle fecce ricche di sostanze nutritive risultano utili allo sviluppo batterico e quindi benefiche per l'avvio della FML.

Va però considerato che la microflora batterica naturalmente presente nei vini, costituita prevalentemente da specie appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus*, durante lo svolgimento della FML, produce composti secondari tecnologicamente indesiderati, quali acido acetico, acido succinico, diacetile, amine biogene che, se presenti in concentrazioni elevate, determinano un peggioramento qualitativo, organoletticamente rilevante, del vino (Zambonelli, 2003). E' importante, quindi, che questo

processo venga controllato mediante una gestione accurata dei parametri ambientali che regolano lo sviluppo microbico, in modo da sfruttare al massimo gli effetti positivi e limitare le conseguenze negative. Per questi motivi il mercato propone da tempo l'utilizzo di ceppi batterici selezionati da impiegare come inoculanti nel vino alla fine della fermentazione alcolica.

La specie oggetto della maggior parte dei progetti di selezione di batteri per la FML è *Oenococcus oeni*. I microrganismi appartenenti a questa specie sono in grado di sopportare elevate concentrazioni alcoliche e crescono a condizioni di pH anche lievemente inferiori a 3, fattori che



**Fig. 1** Morfologia cellulare dei principali gruppi di lieviti individuati nel pigiato

normalmente inibiscono lo sviluppo della maggioranza degli altri batteri lattici. Inoltre, molti dei ceppi di *O. oeni* producono basse quantità di acidità volatile e sono in grado di dominare, quando le condizioni si fanno più selettive, sul resto della popolazione batterica (Zambonelli, 2003). Inoltre, di recente, è stato introdotto un ulteriore carattere ai fini della selezione di batteri per la fermentazione malolattica, con lo scopo di rendere più sicuro dal punto di vista sanitario il prodotto. I ceppi selezionati devono produrre bassissime quantità di amine biogene, potenzialmente tossiche per l'uomo, che, nei soggetti sensibili, se presenti ad elevate

concentrazioni, possono produrre veri e propri fenomeni di intossicazione (Lonvaud-Funel, 1999).

Tradizionalmente i protocolli per l'uso dei batteri selezionati in cantina prevedono una fase di adattamento all'alcol mediante passaggi successivi in miscele di acqua zuccherata e vino a concentrazione alcolica crescente che rende piuttosto complesso il loro utilizzo. Per facilitarne l'uso in cantina, è stata recentemente introdotta la modalità dell'inoculo diretto, che prevede l'aggiunta della sospensione batterica ottenuta idratando il formulato commerciale in acqua, ad una concentrazione di circa  $10^6$  cellule/ml, ed aggiungendolo direttamente nel vino. Le nuove tecniche di produzione prevedono, infatti, una fase di adattamento al grado alcolico durante la preparazione del prodotto commerciale, che rende il microrganismo pronto all'uso. Tuttavia possono verificarsi delle condizioni particolarmente ostili allo sviluppo anche di batteri selezionati inoculati a fine fermentazione: pH molto bassi (attorno a 3), temperature inferiori ai  $15^{\circ}\text{C}$ , presenza di  $\text{SO}_2$  e gradazione alcolica elevata (superiore a 11 gradi) agiscono sinergicamente ostacolando anche i ceppi batterici più adattati.

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di mettere a punto un protocollo per la gestione della FML in condizioni particolarmente difficili. Il vino scelto per la sperimentazione è stato il Raboso Piave DOC, prodotto dall'azienda agricola Cecchetto (Tezze di Vazzola - Treviso). Questa tipologia di prodotto, per le caratteristiche di acidità totale (circa 14 g/l di acido tartarico equivalente), pH (attorno a 3), concentrazione di acido malico ( $>7$  g/l) e gradazione alcolica ( $>11,5^{\circ}$ ), è un candidato ideale per l'utilizzo della FLM come metodo di miglioramento della qualità, ma, contemporaneamente, rappresenta l'insieme delle condizioni più sfavorevoli per il suo ottenimento.

In particolare sono stati

sperimentati due momenti di inoculo: (a) l'introduzione dei batteri selezionati è stata contemporanea ai lieviti, prima dell'inizio della fermentazione alcolica e (b) l'aggiunta dei batteri è avvenuta successivamente, verso la fine della fermentazione alcolica e, precisamente, quando gli zuccheri residui erano pari a 50 g/l. Le due diverse tempistiche di inoculo sono state scelte allo scopo di verificare il comportamento dei batteri selezionati introdotti anche in una fase della vinificazione in cui non fossero ancora presenti tutte le situazioni ostili sopra citate, ed in particolare l'elevato grado alcolico e le basse temperature che caratterizzano la situazione di fine fermentazione alcolica. In questo modo è possibile ottenere un adattamento dei batteri direttamente nell'ambiente mosto-vino favorevole al loro sviluppo.

In ciascuna prova sperimentale il mosto è stato inoculato con lo stesso ceppo di lievito selezionato e, dove richiesto, è stato aggiunto il medesimo batterio lattico, forniti entrambi dalla medesima ditta. Per valutare la procedura migliore di inoculo sono stati analizzati parametri microbiologici, quali le cinetiche di crescita microbica e parametri chimici come le variazioni di pH, acido malico, acido lattico e acido acetico durante le fasi della vinificazione.

## Materiali e metodi

**Microrganismi.** I preparati commerciali utilizzati come inoculanti contenevano: uno ceppo di lievito selezionato per la fermentazione alcolica; l'altro un ceppo batterico selezionato per la fermentazione malolattica. Le caratteristiche dei due preparati sono riportate in Tab. 1.

**Mezzi culturali e condizioni di crescita.** Per la crescita dei microrganismi sono stati utilizzati i seguenti mezzi: YM agar (Oxoid) per la determinazione dei lieviti to-



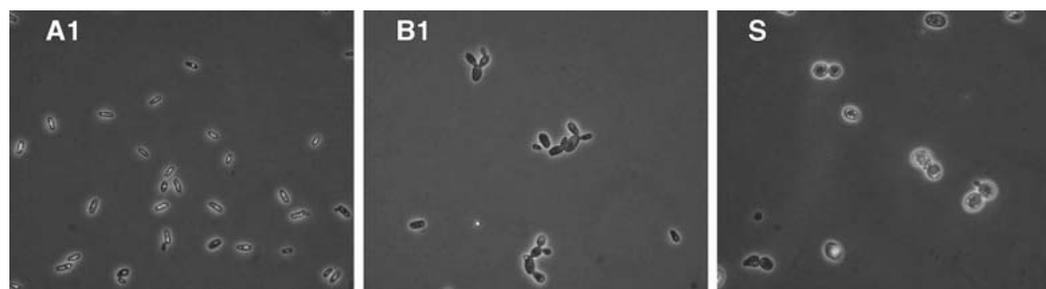
**Tab. 2 - Caratteristiche dei mosti utilizzati nelle tre prove**

	Vinificatore A	Vinificatore B	Vinificatore C
Zuccheri (g%)	18,65	18,82	18,58
SO <sub>2</sub> totale (mg/l)	44,0	28,0	40,0
SO <sub>2</sub> libera (mg/l)	4,0	2,0	4,0
Acidità totale (g/l)	14,10	14,70	12,20
pH	3,01	2,98	2,98
Acido malico (g/l)	7,30	7,95	7,10
APA (mg/l)	217	263	260

**Tab. 3 - Concentrazione di lieviti e batteri selezionati vitali presenti nelle confezioni commerciali e inoculati nelle vasche**

	Lievito	Batterio
Formulato commerciale (CFU/g)	1,04x10 <sup>10</sup> (±3,06x10 <sup>8</sup> )	1,86x10 <sup>11</sup> (±3,27x10 <sup>10</sup> )
Inoculato in vasca (CFU/ml)	3,12x10 <sup>6</sup> (±9,18x10 <sup>4</sup> )	1,86x10 <sup>6</sup> (±3,27x10 <sup>5</sup> )

Tra parentesi è indicata la deviazione standard

**Fig. 2 Morfologia cellulare dei gruppi di lievito presenti nel mosto a 18h dall'inoculo**

tali; WL Nutrient Medium (Oxoid) per l'isolamento e la distinzione morfologica delle colonie dei lieviti; MRS agar (Oxoid) addizionato con l'antifungino cicloesimide ad una concentrazione finale di 20 µg/ml per la determinazione dei batteri lattici totali.

Il mezzo MRS agar è stato incubato a 30°C per 10 giorni all'interno di giare per anaerobiosi (Oxoid) in atmosfera controllata. I mezzi per la crescita dei lieviti sono stati incubati alla temperatura di 25°C per 5 giorni.

## Preparazione dell'inoculo

**Lieviti.** Gli inoculi sono stati preparati singolarmente per ciascuno dei tre vinificatori della capacità di 80 hl.

Una quantità di preparato liofilizzato contenuto in buste di alluminio sottovuoto, necessaria per apportare una concentrazione finale di 30 g/hl è stata risospesa in 30 l di acqua, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. La sospensione è stata quindi trasferita all'interno del vinificatore.

**Batteri.** Gli inoculi sono stati preparati singolarmente per ciascuno dei tre vinificatori. Una quantità di prodotto liofilizzato necessario per ottenere una concentrazione finale di 1 g/hl è stata risospesa in 1,5 l di acqua seguendo le indicazioni della ditta produttrice. La sospensione è stata trasferita nel vinificatore.

**Attivante per la fermentazione malolattica.** Al momento della svinatura è stato aggiunto come attivante per i

batteri malolattici il prodotto noto come "Opti'Malo" nella dose di 20 g/hl nelle vasche in cui erano presenti batteri selezionati.

**Fasi della vinificazione.** L'uva Raboso diraspata e pigiata è stata trasferita in vinificatori della capienza di 80 hl ciascuno. E' stata aggiunta una dose di anidride solforosa in forma liquida pari a 0,04 g/Kg. L'inoculo dei lieviti è stato introdotto sul fondo della vasca all'inizio del trasferimento del pigiato. La vinificazione è stata condotta ad una temperatura di circa 28°C. Dopo 10 giorni dalla pigiatura il vino è stato trasferito in vasche da 50 hl e contemporaneamente è stato aggiunto il preparato "Opti'Malo" nei recipienti che contenevano i batteri selezionati.

Le vasche sono state mantenute ad una temperatura compresa tra i 18 e i 20°C. Sono stati eseguiti 3 travasi in tempi scalari con l'eliminazione di circa il 5% in peso di feccia.

Dopo l'ultimo travaso, a 42 giorni dalla pigiatura, ad ogni vasca è stato aggiunto 1 g/hl di anidride solforosa liquida per bloccare l'attività batterica.

**Prelievo del campione e determinazione della popolazione coltivabile di lieviti e batteri.** Per il monitoraggio dei lieviti introdotti sono stati effettuati 5 campionamenti a circa 2 giorni di distanza l'uno dall'altro. Invece, nel caso dei batteri selezionati, i campionamenti totali sono stati 10. Per ciascuna determinazione, da ogni vasca sono stati prelevati e successivamente analizzati tre campioni. Prima delle operazioni di prelievo, il contenuto dei vinificatori è stato mescolato meccanicamente per circa 10 minuti. I prelievi sono stati effettuati raccogliendo il mosto-vino ad un livello intermedio della vasca. Sui campioni sono state eseguite le opportune diluizioni seriali in acqua peptonata (0,1% Proteose Peptone, Oxoid) prima del trasferimento sui mezzi YM agar, WL e MRS agar per l'isolamento di microrganismi.



**Tab. 4 - Caratteristiche dei principali gruppi di lieviti presenti nel mosto alla pigiatura**

Gruppo morfologico	Caratteristiche della colonia su WL	Aspetto delle cellule	Frequenza del gruppo sul totale (%)
A	piatta, verde intenso, bordo regolare	allungato, apiculato	9,9
B	piatta, bianca, opaca, bordi irregolari	allungato-ellittico, gemmazione multipolare	15,2
D	piatta, presenza di anelli concentrici, verde chiaro	allungato	52
G	bianca, spessa, presenza di pieghe e grinzosità	allungato con cellule di grandi dimensioni, presenza di pseudoife	1,2
L	molto piatta, bianca, liscia	sferico-allungato con cellule di grandi dimensioni	2,1
M	bianca, cremosa, rialzata, bordo regolare	sferico-allungato gemmazione multipolare	1,2
N	bianca, molto grande, con bordo notevolmente frastagliato	allungato	1,2
O	piatta, bianca, sottile, con rare increspature sulla superficie	sferico di piccole dimensioni con presenza di cellule allungata modificate	1,2
Altro	varie	vario	16

Dopo l'incubazione, è stata effettuata la conta delle colonie presenti nelle piastre.

**Determinazione della morfologia cellulare.** La morfologia cellulare è stata determinata tramite microscopia a contrasto di fase (Olympus, modello BX60).

**Determinazione del pH.** Il pH è stato determinato con pHmetro direttamente sul campione prelevato, dopo breve agitazione del contenuto.

**Determinazione della concentrazione degli acidi L-malico, L-lattico.** La concentrazione di questi acidi organici è stata determinata per via spettrofotometrica con appositi kit commerciali.

## Risultati e discussione

**Piano sperimentale.** La sperimentazione è stata condotta presso l'azienda agricola Cecchetto a Tezze di Vazzola (TV). Sono state utilizzate uve di Raboso Piave provenienti dalla zona D.O.C. Sono stati predisposti tre vinificatori ciascuno della capacità di 80 hl, in ciascuno dei quali è stato introdotto l'inoculo dei lieviti selezionati. Per quanto riguarda i batteri, invece, si è proceduto nel modo seguente :

- vinificatore A: controllo, non inoculato con batteri selezionati;

- vinificatore B: inoculo diretto di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato;

- vinificatore C: inoculo diretto di batteri selezionati al raggiungimento di 50g/l di zuccheri residui.

Le caratteristiche dei mosti utilizzati nelle tre prove sono riportati nella Tab. 2.

I valori di acidità totale, pH, acido malico riportati evidenziano le condizioni particolarmente sfavorevoli allo sviluppo.

**Quantificazione delle cellule vitali presenti nelle confezioni di inoculo commerciale.** Per determinare correttamente l'entità dell'inoculo da effettuare è stata precedentemente eseguita, mediante la tecnica della conta su piastra, la determinazione del numero di cellule coltivabili presenti nelle confezioni di liofilizzato da utilizzare nella prova sperimentale. I dati ottenuti sono riportati in Tab. 3.

**Caratteristiche della popolazione indigena di lieviti presenti nel mosto.** Con lo scopo di caratterizzare la popolazione naturale di lieviti presente nel mosto e di verificare la successiva predominanza del lievito selezionato,

il materiale prelevato con i primi due campionamenti alla pigiatura e a 18 h dall'inoculo, è stato opportunamente diluito e piastrato su terreno WL. Questo mezzo di crescita, specifico per i lieviti, permette lo sviluppo delle principali specie enologiche. Le colonie assumono colorazione e/o morfologia caratteristiche che ne rendono agevole il riconoscimento (Cavazza et al., 1992).

Mediante il campionamento dal pigiato, eseguito prima dell'aggiunta dell'anidride solforosa, è stato possibile determinare l'entità della popolazione naturale di lieviti, che si attesta a  $3,1 \times 10^6 \pm 1,85 \times 10^6$  CFU/ml. Questo risultato è in linea con quanto normalmente ritrovato nei mosti (Ribéreau-Gayon et al., 2000). L'esame visivo delle piastre Petri di isolamento ha rivelato la presenza di una microflora molto variabile. Sono state individuate 8 morfologie principali che includono l'84% della popolazione presente sulle piastre di WL. Cellule provenienti da una colonia per ciascuna morfologia è stata osservata al microscopio per la determinazione della morfologia cellulare. Le immagini relative a ciascuno dei gruppi individuati sono riportate in Fig. 1 e le rispet-



**Tab. 5 - Caratteristiche dei principali gruppi di lieviti presenti dopo 18h**

Gruppo morfologico	Caratteristiche della colonia su WL	Aspetto delle cellule	Frequenza del gruppo sul totale (%)
S	color crema, elevatura umbonata, liscia, opaca	ellittico-sferico	38
A1	piatta, verde intenso, bordo regolare	allungato con cellule di piccole dimensioni	52
B1	piatta, bianca, opaca, bordi irregolari	allungato-ellittico, gemmazione multipolare	10

**Tab. 6 - Analisi chimica del vino a fine sperimentazione (dati Enopiave)**

	Controllo	Inoculo a 18 h	Inoculo a 50 g/hl zuccheri residui
Titolo alcolimetrico eff. (%vol)	12,37	13,29	12,65
Acidità volatile (g/l)	0,20	0,27	0,28
Acidità totale (g/l)	9,8	7,7	7,3
Acidità fissa (g/l)	9,56	7,41	7,02
SO <sub>2</sub> totale (mg/l)	87	64	72
Estratto secco totale (g/l)	33,71	32,57	30,90
Estratto secco netto (g/l)	30,91	29,34	28,00
pH	3,43	3,55	3,57
Acido tartarico	3,07	3,10	3,09
Acido L-malico	4,5	0,1	0,1
Acido L-lattico	0,20	3,55	3,66
Rame	0,10	0,40	0,65
Polifenoli totali	3410	3470	3270

tive caratteristiche sono riassunte in Tab. 4. I risultati ottenuti indicano la presenza di lieviti apiculati, confermando quanto riportato in letteratura (Zambonelli, 2003). La morfologia di colonia del gruppo A, è probabilmente riconducibile alla specie *Kloeckera apiculata* (*Hanseniasspora uvarum*), mentre nessuna delle morfologie osservate è attribuibile alla specie *Saccharomyces cerevisiae*.

I risultati relativi al secondo campionamento, eseguito a circa 18 h di distanza dal primo, hanno evidenziato un sostanziale cambiamento nella popolazione di lieviti. In sole 18 h si è verificata una notevole riduzione nel numero di morfologie diverse presenti sulle piastre. Questo risultato è attribuibile (a) all'aggiunta di anidride solforosa, che ha determinato la selezione degli individui più resistenti e (b) all'aggiunta del lievito selezionato.

Su mezzo WL sono state osservate solo 3 tipologie di microrganismi, le cui morfologie cellulari sono riportate in Fig. 2 e le caratteristiche descritte in Tab. 5.

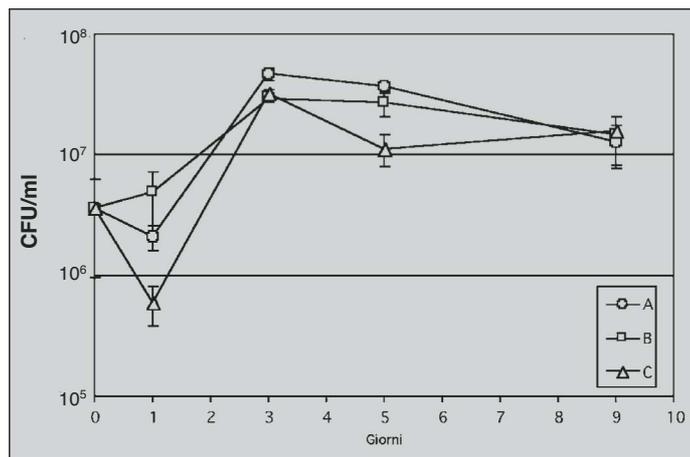
Il gruppo "S" possiede tutte le caratteristiche tipiche della specie *Saccharomyces cerevisiae* ed è pertanto verosimilmente costituito dalle cellule di lievito inoculate. A 18 ore dalla pigiatura, perciò, la popolazione di lievito selezionato costituisce il 38% del totale, indicando che, in questa fase, la dominanza dell'inoculo non è ancora completa.

Per quanto riguarda gli altri due gruppi identificati, A1 è dotato di caratteristiche non osservate nel precedente campionamento; al contrario, B1 ha caratteristiche sovrapponibili a quelle riscontrate nel gruppo B, indicando questo come l'unico gruppo in grado di mantenersi a livelli elevati tra quelli osservati al momento della pigiatura.

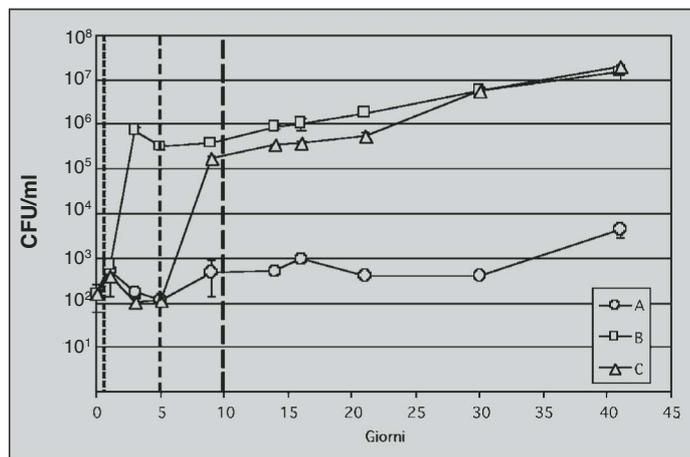
## Inoculo dei lieviti

**Andamento della popolazione di lieviti durante la fermentazione alcolica.** Come si osserva dalla Fig. 3 il lievito inoculato si comporta in modo simile nelle tre tesi a confronto. L'andamento è caratterizzato da una breve fase di latenza della durata di circa 24 ore, dovuta all'adattamento dei microrganismi al mosto e alla presenza di SO<sub>2</sub>, in cui si verifica una lieve flessione nella vitalità cellulare. Il lievito selezionato raggiunge la concentrazione massima ( $3.4 \times 10^7$  CFU/ml) dopo 3 giorni dall'inoculo. Successivamente il numero di cellule vitali di lievito inizia gradatamente a diminuire fino al termine della fermentazione alcolica, avvenuta il decimo giorno, quando si è effettuata la svinatura. L'inoculo dei batteri nella vasca B è avvenuto 18 ore dopo l'introduzione dei lieviti, mentre in C i batteri selezionati sono stati aggiunti dopo 5 giorni dalla pigiatura, quando il mosto aveva raggiunto i 50 g/l di zuccheri residui. Vari lavori scientifici hanno riportato che il coinoculo lieviti-batteri nel mosto conduce a fermentazioni alcoliche stentate fino a veri e propri arresti di fermentazione (King e Beelman, 1986; Huang et al., 1996). Parallelamente altri autori affermano che l'inoculo di batteri poco prima della fine della fermentazione alcolica non incide sullo svolgimento di quest'ultima (Semon et al., 2001). Nella presente sperimentazione, nelle vasche con inoculo batterico non si sono verificati fenomeni di inibizione dei



**Fig. 3 - Andamento delle popolazioni di lievito selezionato**

A: controllo; B: inoculo di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato; C: inoculo di batteri selezionati a 50g/l di zuccheri residui.

**Fig. 4 - Andamento della popolazione batterica durante vinificazione**

A: controllo; B: inoculo di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato; C: inoculo di batteri selezionati a 50 g/l di zuccheri residui. La linea punteggiata indica il momento di inoculo nella vasca B (18 ore dalla pigiatura); la linea tratteggiata stretta indica il momento di inoculo nella vasca C (50 g/l di zuccheri residui); la linea tratteggiata larga indica il momento della svinatura.

lieviti; la fermentazione alcolica si è svolta in modo regolare, senza mostrare differenze rispetto alla vasca non inoculata. Questo risultato sottolinea l'importanza delle interazioni tra lieviti e batteri nel mosto e quindi, pone l'accento sull'importanza della scelta della coppia da utilizzare.

## Inoculo dei batteri

**Andamento della popolazione batterica durante la vinificazione.** I dati relativi

all'evoluzione della popolazione batterica totale sono riportati in Fig. 4. Nei grafici successivi sono evidenziati l'andamento del pH (Fig. 5), le variazioni di acido malico (Fig. 6) e dell'acido lattico (Fig. 7). Il primo campionamento è avvenuto subito dopo la pigiatura. Nonostante la popolazione naturale di lieviti fosse elevata (circa  $4 \times 10^6$  CFU/ml) è stato possibile determinare l'entità della popolazione dei batteri lattici che si attesta a  $1,6 \times 10^2$  CFU/ml, un valore circa 5000 volte inferiore, risultato in linea con quanto si ritrova normalmente nei mosti (Zambonelli, 2003).

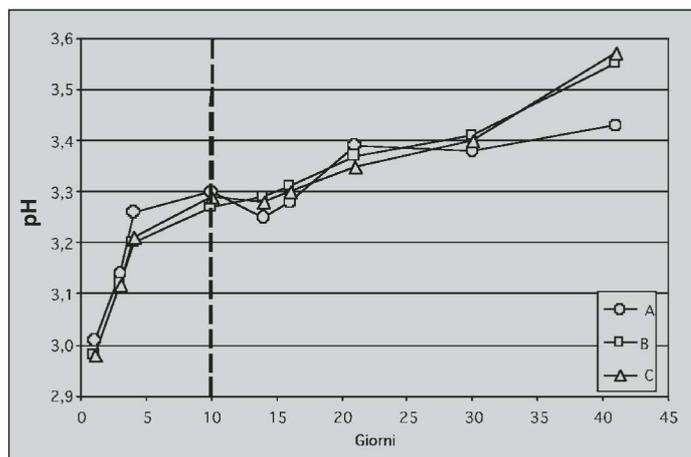
**A) Evoluzione della popolazione di batteri lattici in assenza dell'inoculo selezionato.** Nella tesi di controllo (Fig. 4), la popolazione batterica si mantiene a concentrazioni molto basse, sempre inferiori a  $10^3$  CFU/ml, anche dopo la svinatura, quando si è conclusa l'attività fermentativa dei lieviti. Solo dopo 30 giorni si assiste ad un lento e contenuto incremento che tuttavia non riesce a portare la popolazione naturale ai livelli richiesti (circa  $10^6$  CFU/ml) per un corretto decorso della fermentazione malolattica. Si osserva, infatti, un effetto non marcato sul pH, che in una prima fase aumenta per poi rimanere pressoché costante; contemporaneamente il decremento dell'acido malico è molto modesto e la produzione di acido lattico è scarsissima. In questo caso, la degradazione dell'acido malico (Fig. 6), abbattuto del 30-40% in tutte le tesi durante la fermentazione alcolica, è probabilmente operata unicamente dai lieviti.

**B) Evoluzione della popolazione di batteri lattici in presenza di inoculo batterico aggiunto dopo 18h.** In questo caso l'inoculo di cellule batteriche ( $1,86 \times 10^6$  CFU/ml) è stato effettuato poco tempo dopo l'aggiunta dei lieviti selezionati. Il primo monitoraggio dopo l'introduzione dei batteri è avvenuto al terzo giorno dall'inizio della fermentazione alcolica (Fig. 4). Confrontando il

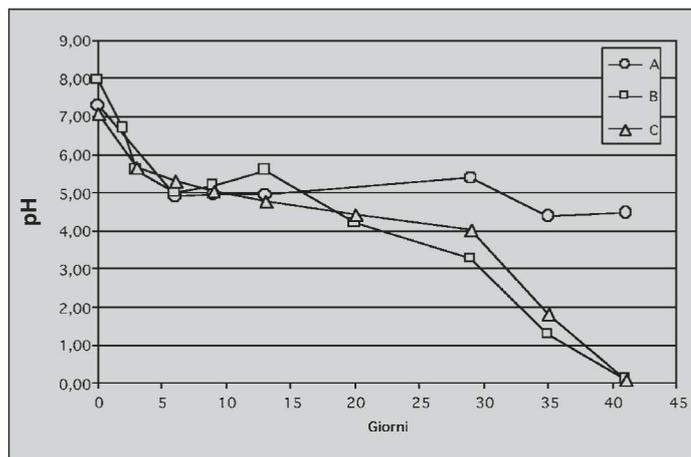
valore dell'inoculo teorico (Tab. 3) e quello determinato nel vinificatore due giorni dopo l'inoculo (Fig. 4) si osserva un leggero calo di cellule vitali (si sono ridotte di circa la metà) ed un ulteriore decremento si riscontra anche il giorno successivo. Il valore rimane stabile poi fino alla svinatura, avvenuta al nono giorno. Nel periodo successivo si verifica un leggero, ma costante, incremento di cellule che porta la popolazione batterica a valori superiori a  $10^7$  CFU/ml. L'attività di degradazione batterica dell'acido malico (Fig. 6) risulta evidente dopo la svinatura. In particolare, come confermato dalla produzione di acido lattico (Fig. 7), la popolazione batterica inocolata dopo 18 ore, inizia la fermentazione malolattica leggermente in anticipo rispetto a quanto succede nella tesi C in cui l'inoculo batterico è avvenuto in tempi successivi. Questo risultato potrebbe essere attribuito al diverso numero di cellule vitali presenti nelle due vasche.

**C) Evoluzione della popolazione di batteri lattici in presenza di inoculo batterico aggiunto a 50 g/l di zuccheri residui.** La popolazione batterica in questa sperimentazione ha mantenuto un comportamento analogo a quello del controllo fino al momento dell'inoculo che è avvenuto il quinto giorno dall'inizio della vinificazione, perciò verso la metà della fermentazione alcolica. Il primo monitoraggio dopo l'introduzione dei batteri è stato condotto 4 giorni dopo, poche ore prima della svinatura. Confrontando il valore dell'inoculo teorico (Tab. 3) e quello determinato (Fig. 4) si osserva un marcato calo di cellule vitali (pari a circa 10 volte), molto più alto rispetto alla tesi B. Dopo la svinatura, nei successivi 11 giorni si verifica un leggero e costante incremento di cellule. In questo periodo la popolazione batterica inocolata mantiene concentrazioni sempre inferiori rispetto a quelle ottenute nella medesima fase dalla tesi B (inoculo a 18 ore). Con



**Fig. 5 - Andamento del pH durante la vinificazione**

A: controllo; B: inoculo di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato; C: inoculo di batteri selezionati a 50 g/l di zuccheri residui. La linea tratteggiata larga indica il momento della svinatura.

**Fig. 6 - Andamento della degradazione dell'acido L-malico**

A: controllo; B: inoculo di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato; C: inoculo di batteri selezionati a 50g/l di zuccheri residui.

questa tipologia di inoculo la popolazione batterica introdotta, nonostante subisca un minor effetto di competizione dovuto alla presenza di lieviti meno attivi in quanto già entrati in fase stazionaria e di declino, viene influenzata da altri fattori in grado ridurre la vitalità batterica, quali l'elevato grado alcolico, la minore disponibilità di nutrienti e il sequestro di frazioni di inoculo batterico determinato dal processo di svinatura. Dal ventesimo al trentesimo giorno dall'inizio del processo, si osserva un incremento della velocità di crescita superiore a quella riscontrata nella tesi B, durante la medesima fase.

Questa situazione, nella fase conclusiva del processo, permette alla popolazione batterica di raggiungere concentrazioni molto simili a quelle ottenute nella prova B. Questi risultati trovano conferma nell'andamento di degradazione dell'acido malico (Fig. 6) e di sintesi di acido lattico (Fig. 7).

## Produzione di acidità volatile

L'acido acetico, che costituisce la quasi totalità dell'acidità volatile, viene prodotto sia dai lieviti che dai batteri lattici. Se la fermentazione alcolica viene gestita in modo corretto e utilizzando lieviti selezionati, la quantità di acido acetico prodotta dai lieviti è molto ridotta e si mantiene intorno a 0,1-0,3 g/l (Ribéreau-Gayon et al., 2000). I batteri lattici, al contrario, producono acido acetico principalmente dalla degradazione degli zuccheri (esosi e pentosi) e dell'acido citrico, attività che fanno parte del metabolismo cellulare per la produzione di energia (Delfini, 1995; Asmundson et al., 1990). La quantità di acidità volatile presente, determinata principalmente dall'acido acetico prodotto, perciò è indicativa sia dell'andamento della fermentazione alcolica da parte dei lieviti che dello sviluppo e dell'attività metabolica batterica. In Fig. 8 sono riportati i valori di acidità volatile, espressa in grammi di acido acetico per litro, registrati nelle tre tesi sperimentali alla svinatura ed al termine della sperimentazione. Quest'ultimo valore è presente anche in Tab. 6, dove sono riportate le caratteristiche chimiche dei vini ottenuti. In relazione all'acidità volatile, entrambe le determinazioni indicano una quantità estremamente contenuta anche a fine sperimentazione dopo che l'attività batterica ne ha inevitabilmente elevato il livello. In particolare, i risultati relativi alla svinatura evidenziano una quantità di acidità volatile limitata in tutte le prove.

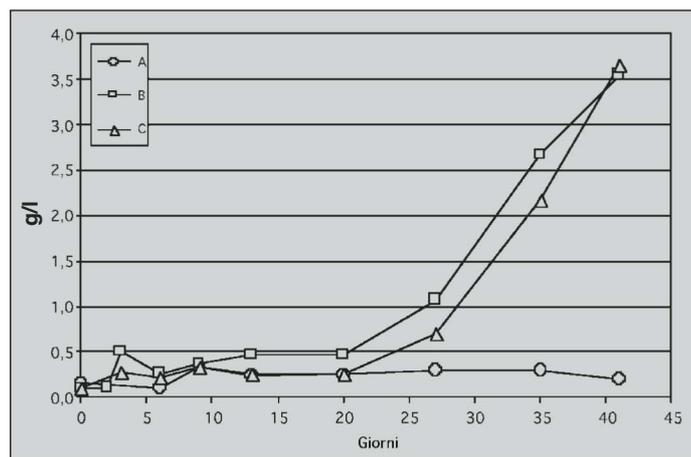
Questo fenomeno è indice di una corretta gestione della fermentazione alcolica. Inoltre, considerando le tesi inoculate, i batteri selezionati durante questa fase sono rimasti inattivi non degradando non solo acido malico, ma neppure gli zuccheri. In particolare, considerando la vasca inoculata a 18 ore, questo risultato differisce da quanto riportato in altri lavori dove sono stati segnalati casi di co-inoculi lieviti-batteri che hanno indotto un aumento di acidità volatile unitamente alla comparsa di difetti olfattivi (Henick-Kling e Park, 1994). Questi dati contrastanti, mettono nuovamente in luce l'importanza delle complesse interazioni che si instaurano tra lieviti e batteri nel mosto e che sono legate ai diversi ceppi utilizzati. Confrontando i dati ottenuti alla svinatura con quelli a fine fermentazione malolattica non si segnalano variazioni di rilievo nel contenuto di acidità volatile. Questo risultato è determinato dal corretto comportamento del batterio inoculato, che ha utilizzato per la produzione di energia prevalentemente la fermentazione malolattica, rispetto ad altri processi fermentativi a carico di zuccheri e altri acidi organici.

## Considerazioni conclusive

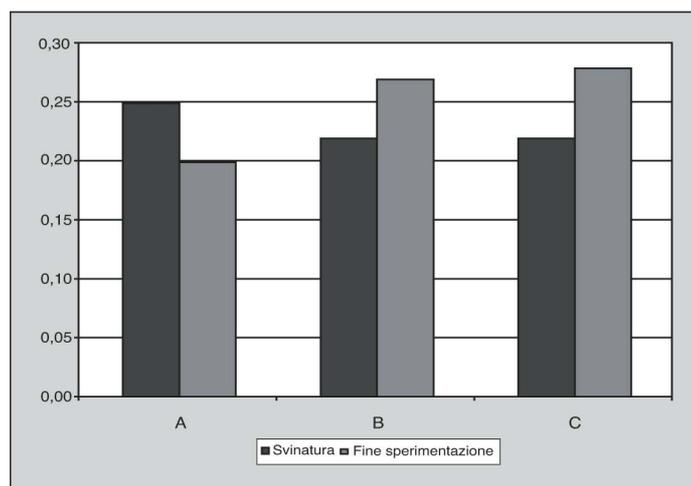
Il lievito selezionato utilizzato come inoculante si è dimostrato, in questo contesto, una scelta corretta, in quanto è riuscito a colonizzare il mosto rivelandosi il ceppo dominante sulla popolazione naturale fin dalle prime fasi della fermentazione alcolica; inoltre, è riuscito a ridurre in modo considerevole la concentrazione dell'acido malico.

Indipendentemente dal momento dell'inoculo, in entrambi i casi, i batteri selezionati hanno mantenuto livelli di vitalità elevati durante tutte le fasi di vinificazione. Al contrario, nella vasca di controllo, in cui non è stato aggiunto inoculo, la popolazione naturale è rimasta a basse



**Fig. 7 - Andamento della produzione di acido L-lattico**

A: controllo; B: inoculo di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato; C: inoculo di batteri selezionati a 50g/l di zuccheri residui.

**Fig. 8 - Produzione di acidità volatile (g/l di acido acetico) alla svinatura e al momento della stabilizzazione con SO<sub>2</sub>**

A: controllo; B: inoculo di batteri selezionati dopo 18h dall'introduzione del lievito selezionato; C: inoculo di batteri selezionati a 50g/l di zuccheri residui.

concentrazioni anche nelle fasi successive alla fermentazione alcolica. La quantità modesta di cellule batteriche presenti nella vasca non è riuscita ad innescare in modo appropriato la fermentazione malolattica.

Nonostante la presenza a concentrazioni elevate della frazione batterica inoculata, fin dalle prime fasi del processo, non si è rilevata alcuna interferenza tra le popolazioni di lieviti e batteri lattici introdotte che potesse influenzare l'andamento sia della fermentazione alcolica che di quella malolattica e quindi la

qualità del vino. In questa sperimentazione, infatti, il ceppo di lievito si è dimostrato in grado di competere con il ceppo batterico che è rimasto silente anche se a concentrazioni relativamente elevate per tutto lo svolgimento della fermentazione alcolica.

E' possibile dedurre, quindi, che per ottenere l'innescio della fermentazione malolattica anche in situazioni difficili non è importante solo la scelta del batterio selezionato più adatto al particolare processo di vinificazione, ma soprattutto deve essere preso in considerazione il grado di compatibilità esistente nella coppia lievito-batterio.

Considerando le prove effettuate, sebbene le cinetiche di degradazione dell'acido L-malico e di produzione di acido L-lattico siano analoghe, nella prova in cui i batteri sono stati aggiunti 18 h dopo l'aggiunta dei lieviti, la fermentazione malolattica si è innescata prima, concludendo con lieve anticipo la degradazione dell'acido L-malico.

#### Ringraziamenti

Si ringraziano Giorgio Cecchetto titolare dell'Azienda omonima per la disponibilità e l'azienda Eno-piave, sede Tezze di Piave (TV) per le analisi chimiche. Il presente lavoro è stato finanziato in parte dalla Provincia di Treviso.

## Bibliografia

Asmundson R.V., Kelly W.J. (1990) The effect of temperature and ethanol concentration on the growth of *Leuconostoc oenos*. In: Proceedings of the Seventh Australian Wine Industry Technical Conference (Adelaide, Australia, 19-17 August 89), ed. Williams P.J., Davidson DM. and Lee T.H., Adelaide: The Australian Wine Research Institute pp: 251-252.

Cavazza A., Grando M.S., Zini C. (1992) Rivelazione della flora microbica di mosti e vini. *Vignevini* 9 (Dossier Biotecnologie).

Delfini C. (1995). *Scienza*

e tecnica della microbiologia enologica, ed. Il Lievito, Asti (Italia).

Fugelsang K.C, Zoecklein B.W. (1993) Malolactic fermentation survey. *Practical Winery* 9: 12-18.

King S.W., Beelman R.B. (1986) Metabolic interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 53-60.

Henick-Kling T., Park Y.H. (1994) Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO<sub>2</sub> and timing of inoculation. *American Journal of Enology and Viticulture* 45: 464-469.

Huang Y.C., Edwards C.G., Peterson J.C., Haag K.M. (1996) Relationship between sluggish fermentation and the antagonisms of yeast and lactic bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 1-10.

Liu S.Q. (2002) Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology* 92: 589-601.

Lonvaud-Funel, A. (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 76: 317-331.

Lonvaud-Funel, A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199: 9-13.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2000) *Hanbook of Enology -Volume 1. The Microbiology of Wine and vinifications*, ed. Wiley, Chichester, Regno Unito.

Semon M.J., Edwards C.G., Forsyte D., Dinn C. (2001) Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7: 52-59.

Zambonelli C. (2003). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*, ed. Edagricole, Bologna (Italia).

