



Fermentazione malolattica: studio sui batteri lattici autoctoni per valorizzare i vini piemontesi

Ricerca Finanziata dalla Regione Piemonte

■ Maria Carla Cravero, Antonella Costantini, Federica Bonello, Francesca Doria, Enrico Vaudano, Andriana Asproudi, Luca Chiusano, Emilia Garcia-Moruno - CRA-ENO Centro di Ricerca per l'Enologia, Asti
■ Daniele Dellavalle - Vignaioli Piemontesi

La fermentazione malolattica (FML) è una disacidificazione condotta dai batteri lattici che ha luogo nel vino generalmente alla fine della fermentazione alcolica (FA); la reazione principale è la decarbossilazione dell'acido L-malico ad acido L-lattico ed anidride carbonica. Essa non solo stabilizza il vino a livello biologico e ne diminuisce l'acidità, ma determina modificazioni del colore e dell'aroma, dell'astringenza e della struttura, con effetti positivi o negativi a seconda della loro intensità e combinazione. Tali variazioni dipendono strettamente dalle proprietà ceppo-specifiche di *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente associata a tale processo, il cui metabolismo porta alla formazione di una serie di composti secondari, che nel loro insieme contribuiscono in maniera decisiva alle caratteristiche dei vini.

In condizioni normali, la FML avviene dopo la FA, ma, a volte, può ritardare o non avere luogo a causa della temperatura non adeguata, del pH, del contenuto di SO₂ e dell'alcol, della presenza di batteriofagi o per cause ancora non note. Inoltre, quando la FML è spontanea, non si può avere la certezza che

i ceppi coinvolti saranno gli stessi nelle successive annate ed è stato osservato che i ceppi di *O. oeni* cambiano nel corso della FML (González-Arenzana et al., 2012).

Per tutti questi motivi è dagli anni 1980 che sono in commercio preparati liofilizzati di batteri lattici selezionati per la FML, che presentano una serie di vantaggi: un miglior controllo del momento d'inizio, del decorso della fermentazione e del genere che porta a termine il processo. Infatti, l'inoculo con batteri selezionati di *O. oeni* impedisce lo sviluppo di batteri contaminanti appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus*; questi batteri possono produrre elevate concentrazioni di acido acetico, che altera le qualità organolettiche dei vini, e sostanze indesiderabili dal punto di vista della salute, come le ammine biogene. Tuttavia, la vitalità di questi starters può diminuire in seguito all'inoculo nel vino e non ci sono garanzie che sia il ceppo inoculato a dominare e a realizzare la FML e neppure che le caratteristiche sensoriali dei vini non siano alterate.

Lo scopo del progetto era disporre di alcuni ceppi malolattici au-

toctoni, in grado di portare a termine la FML senza produzione di composti indesiderati ed in grado di valorizzare le particolarità organolettiche dei diversi vini del Piemonte. Il progetto è stato articolato nelle seguenti fasi:

- isolamento e caratterizzazione di batteri malolattici autoctoni in cantine del Piemonte;
- selezione dei ceppi migliori da utilizzare come starters in funzione del tipo di vino, in maniera da esaltare l'originalità dei diversi prodotti ed il legame con il territorio;
- ottimizzazione delle condizioni di crescita e sviluppo dei batteri al fine di ottenere un'adatta biomassa all'inoculo in vino;
- preparazione e conservazione dei ceppi selezionati, che arricchiranno la collezione di lieviti e batteri presente presso il CRA-ENO.

Materiali e metodi

Nel corso della vendemmia 2008 sono stati presi in esame 10 campioni di vino in FML, nei quali ovviamente non era stato fatto uso di colture starter, vinificati in 6 cantine del Piemonte (Tab 1):

Tab. 1 Elenco dei vini e delle aziende oggetto di studio.

Azienda	Località	Vino
A	Barbaresco	Nebbiolo Barbera
B	Treiso	Nebbiolo Barbera
C	Montà	Nebbiolo Arneis Chardonnay
D	Costigliole	Barbera
E	Barbaresco	Grignolino
F	Barbaresco	Dolcetto

Sui campioni di vino è stata monitorata la FML mediante analisi HPLC degli acidi fissi.

Sono stati realizzati controlli chimico-fisici e sensoriali sui vini alla fine della FA e alla fine della FML: analisi chimico-fisiche (alcol, estratto secco, acidità totale e volatile, pH, SO₂ libera e totale ed alcoli superiori) con i metodi ufficiali CE (G.U. C.E. n. 2723/10/1990), composti polifenolici, parametri CIE e CIELAB, intensità colorante, tonalità colorante e studio del colore al pH vino (dAL, dAT, dTAT) con i metodi di Di Stefano et al., (1989), estrazione dei composti di fermentazione secondo il metodo Gianotti e Di Stefano (1991) e successiva determinazione per GC-MS.

Dai campioni di tutti i vini sono stati realizzati isolamenti dei batteri lattici. Le colture ottenute sono state caratterizzate a livello di specie mediante PCR *Oenococcus*-specifico (Zapparoli et al., 1998); successivamente le colonie di *O. oeni* isolate sono state

biotipizzate a livello di ceppo per valutare la variabilità intraspecifica (Reguant et al., 2003). Sono stati condotti saggi per la valutazione delle caratteristiche tecnologiche dei ceppi in studio, alcoltolleranza e acido tolleranza, capacità fermentativa.

Sono stati selezionati i 6 ceppi migliori e si sono ricercate le condizioni ottimali per ottenere un'elevata biomassa di *O. oeni* adattati per l'inoculo in cantina.

Inizialmente sono state condotte fermentazioni in 5 litri di tutti i vini in studio; a fine FML tali vini sono stati sottoposti ad analisi chimico-fisiche e sensoriali per confrontarli con i vini in cui la FML si era realizzata in maniera spontanea.

Durante la vendemmia 2010 si sono scelti 7 vini – 1 Arneis, 3 Nebbiolo, 2 Barbera, 1 Dolcetto – ognuno è stato diviso in due tesi, rappresentate da due vasche di uguali dimensioni: T (testimone) in cui la FML era spontanea, l'altra (IN) era inocolata con la mix di ceppi selezionati.

La valutazione sensoriale dei vini è stata realizzata sempre in doppio con il panel (10-14 assaggiatori) del CRA-ENO. In tutte le sessioni di assaggio, i vini sono stati presentati identificati con un codice a 3 cifre, con bicchieri ISO. La descrizione dei profili sensoriali è stata realizzata con una procedura derivata dalle norme UNI-ISO, ampiamente sperimentata (Cravero et al., 2008), che prevede la raccolta dei descrittori utilizzando una lista di descrittori visivi, olfattivi e gustativi; la scelta dei descrittori sulla base delle frequenze di individuazione e la misura dell'intensità dei descrittori, individuati su schede a ruota a scale astrutturate (con valore massimo 80 mm). Sulle prove di cantina del terzo anno si sono eseguiti i duo-trio test per evidenziare eventuali differenze tra T ed IN ed i test di preferenza solo nel caso i campioni fossero stati discriminati tra loro.

Risultati

Nei vini 2008 si sono isolate 162 colonie batteriche. Dalle PCR specie-specifiche, si è osservato che la specie predominante (97%) è *Oenococcus oeni*; in fig. 1 è mostrato un gel ottenuto con questo tipo di tecnica.

Le colonie sono state sottoposte a diversi saggi sia tecnologici che biomolecolari; sulla base dei risultati ottenuti da queste prove sono stati selezionati i sei ceppi migliori (1, 2, 3, 4, 5, 6). In fig. 2 è mostrata una foto di un *O. oeni*.

Dopo aver appurato che la mix di ceppi era in grado di portare a termine la FML in tutte le tipologie di vino in esame, sono state preparate biomasse per inoculare delle vasche su scala di cantina.

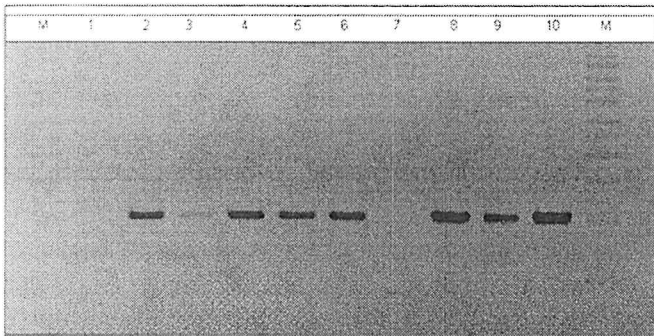


Figura 1. Immagine di un gel elettroforetico relativo all'appartenenza e non, di alcuni campioni di isolati batterici, alla specie *O. oeni*. M = marker di riferimento; 1-10 = campioni di batteri testati



Figura 2. Osservazione di *O. oeni* al microscopio ottico

Nei vini inoculati in cantina (3° anno), al termine della FML sono stati effettuati nuovi isolamenti e nuove biotipizzazioni, dalla comparazione dei fingerprint ottenuti è risultato quanto segue: Nebbiolo Cantina A: predominano oltre al ceppo 3, isolato in questa cantina nella vendemmia 2008, i ceppi 1 e 5.

Nebbiolo Cantina B: predominano oltre ai ceppi 1 e 5, isolati in questa cantina nella vendemmia 2008, anche il ceppo 3.

I ceppi 1, 3 e 5 erano stati isolati soltanto in Nebbiolo. Questo risultato suggerisce come questi ceppi si siano adattati particolarmente bene alla crescita in questo tipo di vino, indipendentemente dalle condizioni di cantina.

Barbera Cantina A: predominano i ceppi 4 (isolato in vino Barbera) e 5, ma nessuno di questi era stato isolato in questa cantina nella vendemmia 2008.

Barbera Cantina B: predominano i ceppi 3 e 6, che non erano stati isolati in questa cantina nella vendemmia 2008. In questo caso i ceppi di *O. oeni* sembrano adattarsi alle condizioni del vino, dell'annata e della cantina.

Dolcetto Cantina E: anche se la FML è stata portata a termine, nessuno dei ceppi inoculati ha predominato. Soltanto il ceppo 2 tra quelli selezionati era presente nel Dolcetto nella vendemmia 2008. Era stato trovato anche in Nebbiolo e Barbera, ma dai risultati già riportati abbiamo visto che questo ceppo non ha predominato in nessuno dei vini testati. Sembra un ceppo caratteristico degli stadi intermedi della FML.

Arneis Cantina C: predomina il ceppo 3, che era stato isolato in

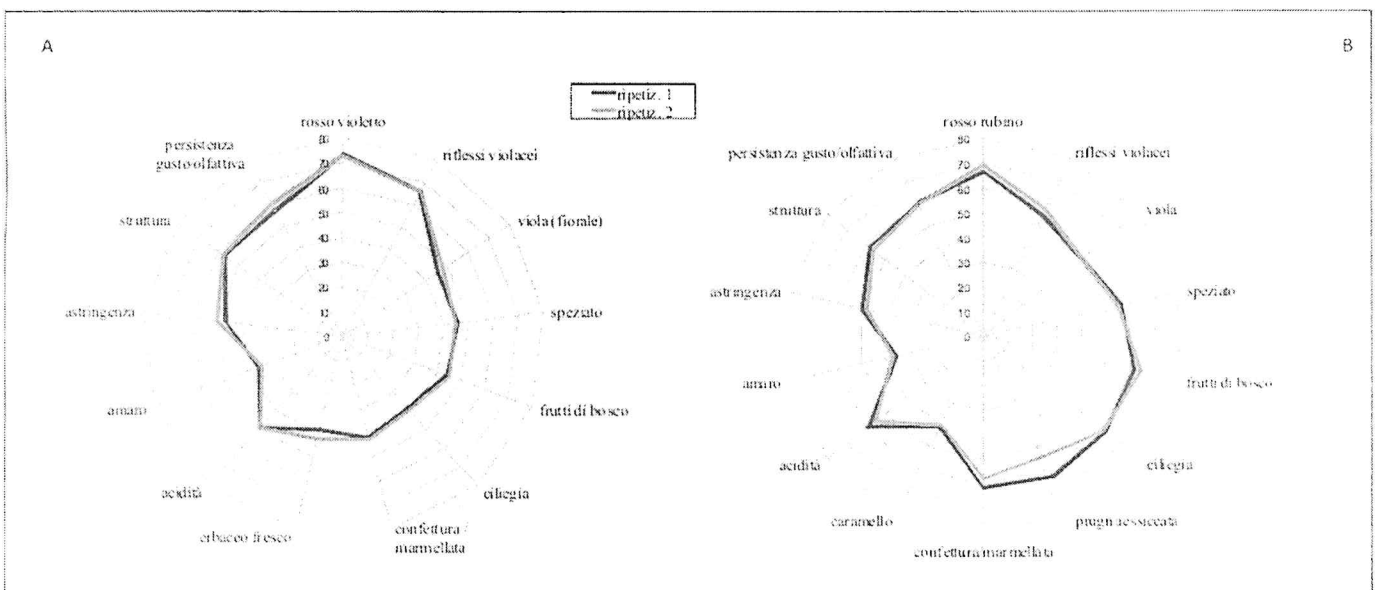


Figura 3. Profili sensoriali ottenuti da vino Barbera: A) FML spontanea; B) FML condotta dai ceppi selezionati in questo studio.

vino Nebbiolo in questa cantina ed anche nella cantina A nella vendemmia 2008. Da sottolineare che nel caso di questo vino non è partita la fermentazione spontanea nella vasca T, mentre ha avuto luogo nella vasca inoculata con i ceppi selezionati in questo lavoro (IN).

Il ceppo 3 sembra particolarmente interessante in quanto è riuscito a predominare in vino Nebbiolo, Barbera ed Arneis.

I profili sensoriali dei vini dopo FML hanno subito notevoli modificazioni del colore, dell'odore e del gusto. In genere, dopo FML si è verificata una diminuzione dei profumi floreali ed un aumento degli odori di marmellata e prugna essiccata. A livello sensoriale prove in piccola scala hanno evidenziato, per alcuni campioni, differenze notevoli tra la FML spontanea e con batteri selezionati. La fig. 3 mostra una comparazione in vino Barbera tra i profili sensoriali ottenuti da FML spontanea e da FML svolta dai batteri selezionati; si evidenzia come i batteri selezionati apportino una maggiore intensità delle note fruttate e speziate al vino.

I vini inoculati con i ceppi selezionati nel complesso sono stati preferiti o considerati non diversi dalla tesi T.

Conclusioni

In questo lavoro, confermando i risultati ottenuti da altri autori, è stata osservata la grande variabilità genetica che si riscontra in *O. oeni*, ma si è anche evidenziata una predominanza di alcuni genotipi in campioni provenienti da diverse cantine. Esiste, quindi, una distribuzione geografica dei ceppi di *O. oeni* che crescono spontaneamente nel vino.

I risultati dell'analisi sensoriale dimostrano che l'inoculo con i ceppi selezionati mantiene inalterata la tipicità dei vini.

In questo studio si conferma che l'inoculo di una mix di ceppi è una garanzia di successo per la FML, in quanto dà la possibilità che almeno un ceppo si adatti a variazioni del vino in diverse annate.

Sviluppi futuri potrebbero riguardare la selezione di ceppi specifici per vino Dolcetto e per i vini bianchi e l'approfondimento delle cause della mancata o difficile realizzazione della FML in alcuni casi non spiegabile con le attuali conoscenze.

Si può concludere che i batteri autoctoni selezionati possono essere, quindi, una valida alternativa agli starter commerciali nell'induzione della FML, non andando a stravolgere le caratteristiche tipiche del vino e della zona di appartenenza, ma nel contempo assicurando la presenza esclusiva di batteri positivi, che non apportino eventuali difetti al vino e rafforzino il legame con il territorio.

