

## FERMENTAZIONE MALOLATTICA – UNO STRUMENTO PER RIDURRE L'ACIDITA' E MIGLIORARE L'AROMA NEI CLIMI FRESCI

Maret DU TOIT<sup>1\*</sup>, Lynn ENGELBRECHT<sup>1</sup>, Eida LERM<sup>2</sup>, Doris RAUHUT<sup>3</sup>, Caroline KNOLL<sup>3</sup> and Sibylle KRIEGER-WEBER<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute for Wine Biotechnology & Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland South Africa; <sup>2</sup>Anchor Wine Yeast, PO Box 14, 7475 Epping Industria, South Africa; <sup>3</sup>Department of Microbiology and Biochemistry, Geisenheim University, Von-Lade-Str.1, 65366 Geisenheim, Germany; <sup>4</sup>Lallemand, In den Seiten 53, 70825 Korntal-Münchingen, Germany

\*Corresponding author: M. du Toit, Telephone +27 21 808 3772, Fax +27 21 808 3771, Email: mdt@sun.ac.za

### Introduzione

La fermentazione, sia quella alcolica che quella malolattica, deve essere gestita subordinatamente alle diverse condizioni climatiche in quanto i parametri principali dei mosti che influiscono sui lieviti hanno enormi variazioni in dipendenza del clima. La fermentazione malolattica (MLF) che svolge un importante ruolo nelle fermentazioni dei vini è utilizzata per motivi diversi a seconda delle condizioni climatiche. Nelle regioni fresche l'impatto più rilevante della malolattica consiste nel ridurre l'acidità per migliorare il palato del vino. L'acidità totale nelle regioni fresche può raggiungere i 12 g/L con concentrazioni di acido malico che possono raggiungere i 6-8 g/L mentre nelle regioni più calde l'acido malico può essere intorno ai 2-3 g/L. L'acidità totale elevata si traduce in un pH basso compreso tra 2.9 e 3.3 che influirà sul tipo di batteri lattici (LAB) che sopravvivono in tali condizioni (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011). La rimozione dell'acido malico quale fonte di carbonio preferita alle condizioni di vinificazione rende il vino microbiologicamente stabile nei confronti della crescita di altri batteri lattici e ciò è determinante nei climi caldi dove il pH è superiore a 3.6 e consente la crescita di *Lactobacillus* e *Pediococcus*, batteri tipici di alterazione nel vino. La terza ragione a favore della malolattica è il miglioramento dell'aroma, sapore e delle sensazioni in bocca del vino (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011; Knoll et al., 2011, 2012). I vini che hanno svolto la malolattica sono percepiti più complessi, meglio strutturati con un palato più pieno. In generale, i vini possono essere sia più fruttati che più cremosi/burrosi. L'impatto sull'aroma dipende dal tipo di batteri utilizzati così come dal tipo di coltura starter per l'avvio della fermentazione alcolica.

I batteri lattici più comunemente associati alla vinificazione appartengono ai generi *Oenococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Le specie appartenenti a questi generi degradano l'acido malico attraverso diversi meccanismi ma le due specie che sono utilizzate commercialmente per indurre la MLF sono *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus plantarum*. *Oenococcus oeni* è la specie più studiata e più adatta alle condizioni enologiche e *L. plantarum* è sempre più apprezzato come co-inoculo nei casi di pH elevati. I ceppi di *Oenococcus oeni* si adattano a condizioni più sfavorevoli quali bassi pH (2.9-4.0), concentrazioni di etanolo fino al 16% e anidride solforosa totale (SO<sub>2</sub>) fino a 50 mg/L e sopravvivono a basse temperature. Comunque, *O. oeni* andrà a aumentare lievemente l'acidità volatile essendo eterofermentante obbligato. Al contrario, *L. plantarum* preferisce pH superiori a 3.4; come conseguenza nelle regioni fresche si troverà in condizioni difficili e anche la tolleranza all'etanolo, alla SO<sub>2</sub> e alla temperatura è minore. *O. oeni* nelle condizioni di vinificazione non produce acido acetico e quindi non avrà un impatto negativo sull'acidità volatile. Le due specie hanno diversi

genomi che traducono in diversi profili enzimatici che avranno un impatto diverso sul profilo aromatico del vino determinando diversi stili (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011).

Il momento dell'inoculo può essere utilizzato sia per superare condizioni difficili per la MLF sia per cambiare il tipo di stile di vino. Attualmente le pratiche più comunemente utilizzate sono l'inoculo sequenziale e il co-inoculo (Azzolini et al. 2010; Lerm et al. 2010). L'inoculo sequenziale ha il vantaggio che la MLF può essere controllata in modo che tutte le condizioni possano essere quelle ottimali per il ceppo di coltura starter. Le maggiori criticità sul successo della MLF sequenziale sono i tenori alcolici elevati e i nutrienti esauriti. Il co-inoculo evita i rischi associati all'inoculo sequenziale in quanto l'etanolo è ancora assente o è presente a basse concentrazioni e i nutrienti sono sufficienti sia per i lieviti che per i batteri. Un altro vantaggio del co-inoculo è che il vino può essere stabilizzato prima con l'aggiunta di SO<sub>2</sub>. Il rischio del co-inoculo è che se la fermentazione alcolica rallenta o si ferma, gli starter della MLF, in particolare *O. oeni*, metabolizzano gli zuccheri in condizioni di pH elevati producendo elevate quantità di acido acetico che inibisce la fermentazione alcolica.

### Fattori che influiscono sulla fermentazione malolattica

I fattori che influiscono sulla crescita dei LAB e/o sulla MLF son il pH, l'etanolo, la temperatura, la concentrazione di acido malico, il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzato per la fermentazione alcolica, i nutrienti del mosto, i residui di fungicidi, le proprietà delle cultivar in relazione agli acidi fenolici e l'utilizzo del lisozima (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011). I fattori più importanti nelle regioni con clima fresco sono il pH, l'etanolo, il ceppo di lievito e la concentrazione di acido malico.

#### *pH e etanolo*

Il pH è cruciale per la crescita e la cinetica della MLF nel vino. Il pH di 3.5 è critico per il tipo di LAB che sarà presente e per la pulizia della MLF. Un pH inferiore a 3.5 favorirà la sopravvivenza di *O. oeni* in quanto tale specie si adatta meglio a pH bassi e la dominanza di questa specie assicura una MLF pulita in quanto la competizione con gli altri LAB è limitata. Mentre pH superiori a 3.5 sono favorevoli a tutti i LAB utilizzati in vinificazione e anche la flora naturale è presente con un maggior numero di cellule rendendo possibile la competizione naturale. Come già detto in precedenza, *L. plantarum* è consigliato come coltura starter con pH superiori a 3.4 in quanto il numero di cellule diminuisce rapidamente se inoculato a pH inferiori a 3.4 causando un arresto o una MLF incompleta. I pH bassi sono una realtà che occorre ben considerare e gestire nei casi di viti cresciute nei climi freschi e ciò richiede un'attenta selezione dei ceppi che siano in grado di resistere a condizioni difficili. Inoltre, i pH bassi intensificano l'impatto della SO<sub>2</sub> e dell'etanolo, come esposto più avanti.

E' riportato in letteratura che l'etanolo e il pH agiscono sinergicamente e che pH bassi e concentrazioni elevate di etanolo rappresentano le condizioni più inibenti per la MLF. Lo studio di Knoll et al. (2011) mostra che il pH di 3.2 e l'etanolo del 15% sono condizioni proibitive che consentono solo una parziale MLF e ciò era correlato alla diminuzione del numero di cellule. Un pH di 3.6 associato a un elevato tenore di etanolo aveva ancora un'influenza negativa sullo svolgimento della MLF ma un pH di 3.8 non creava problemi anche con un tenore alcolico del 15%. Al contrario, con concentrazioni di etanolo pari a 12.5% tipiche delle regioni fresche, il pH non rappresentava comunque un problema per lo svolgimento della MLF (Fig. 1). Quindi, nelle regioni climatiche fresche

la gestione della vendemmia nel giusto momento di maturazione delle uve è determinante per assicurare che il pH e la concentrazione di etanolo siano in linea per garantire il successo della MLF.

I risultati ottenuti dallo studio di Knoll et al. (2011) mostravano che questi fattori influivano sul profilo aromatico del vino. Condizioni di bassi pH erano caratterizzate da esteri etilici mentre pH elevati da esteri acetati. La gestione di questi fattori e la scelta del ceppo sono strumenti nelle mani dell'enologo per scegliere un determinato stile di vino e profilo aromatico.

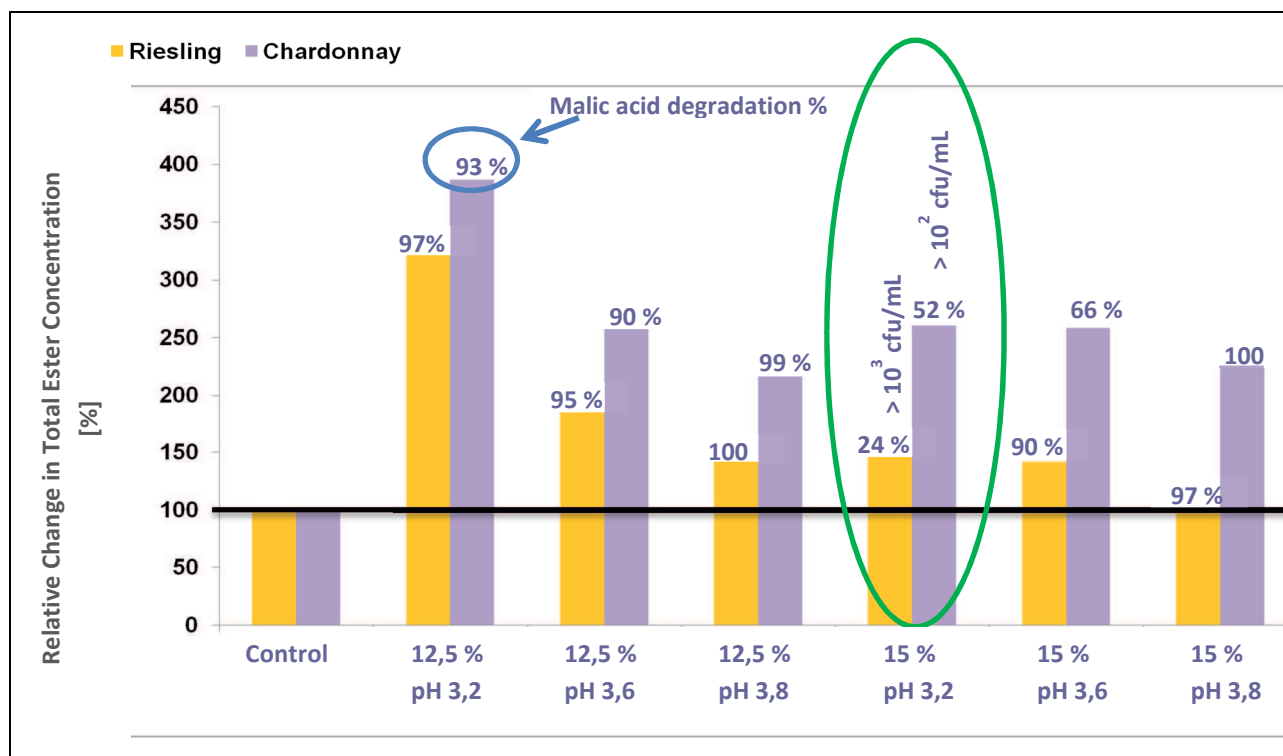


Figura 1: Sinergia del pH e dell'etanolo sulla fermentazione sequenziale in vini Riesling e Chardonnay inoculati con il ceppo di *O. oeni* R1105 (Knoll et al., 2011)

### Concentrazione di acido malico

I livelli di acido malico sono uno dei fattori meno considerati per la gestione della MLF e spesso è un parametro che non viene valutato. La concentrazione di acido malico è fondamentale innanzitutto per la regolazione del gene malolattico e secondariamente la quantità di acido lattico prodotto diventa tossico per la cellula oltre certi livelli causando una diminuzione del numero delle cellule a livelli per cui la quantità di enzima disponibile non è sufficiente per convertire l'acido malico. Questi aspetti dipendono dal ceppo; la selezione del giusto ceppo in relazione alla concentrazione di acido malico è importante per assicurare il successo della MLF. Ciò è importante nelle regioni con climi freschi dove i livelli di acido malico sono più elevati e la MLF deve essere gestita con attenzione anche in relazione agli altri parametri quali il pH, l'etanolo, la  $SO_2$  e i nutrienti. Più la concentrazione di acido malico è elevata più i tempi per completare la MLF si allungheranno anche di tre o quattro volte in molti casi. La Tabella 1 mostra i livelli di acido malico e l'impatto relativo sul successo della MLF.

Tabella 1. L'impatto delle concentrazioni di acido malico sulla MLF

	Easy	Moderate	Difficult	Extreme
Initial level of malic acid (g/L)	2 - 4	4 - 5 or 1 - 2	5 - 7 or 0.5 - 1	>7 or <0.5

Una concentrazione di acido lattico di 1.5 g/L è tollerata dalla maggioranza dei ceppi di MLF ma vi sono alcuni ceppi che già ne risentono. La maggior parte dei ceppi sono sensibili già a 3 g/L ed è l'eccezione che può funzionare e parzialmente degradare i livelli di acido malico. E' stato dimostrato da Lallemant insieme a IFV (Fig. 2) che l'impatto è correlato con la diminuzione del numero di cellule. Si può vedere nella figura il comportamento di un ceppo sensibile a 1.5 g/L: inizialmente vi è una riduzione della vitalità delle cellule seguita da una ripresa della popolazione che consente alla MLF di non bloccarsi. Comunque a 3 g/L la popolazione continua a diminuire senza possibilità di riprendersi con un inevitabile arresto della MLF. Quindi qualora il mosto sia caratterizzato da elevate concentrazioni di acido malico, occorre selezionare un ceppo più resistente alla quantità prevista di acido lattico.

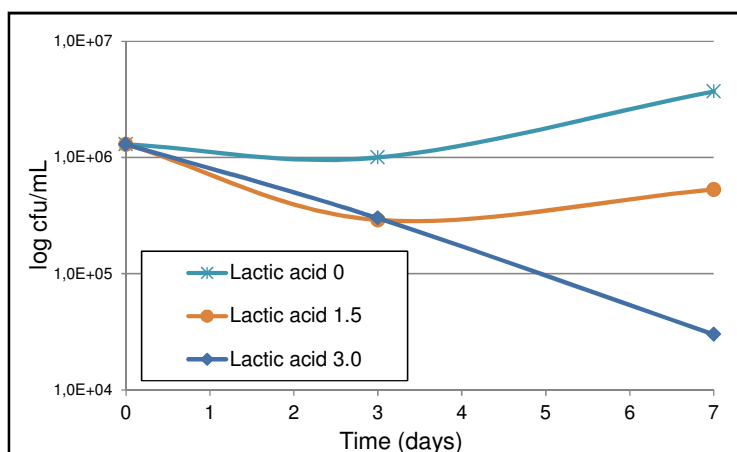


Figura 2: Impatto dell'acido lattico sulla vitalità di un ceppo commerciale di batteri lattici (Vincent Gerbaux International ML School Lallemant 2015).

### Impatto del ceppo di lievito

Il ceppo di *S. cerevisiae* selezionato per la fermentazione alcolica può avere un rilevante impatto sul successo della MLF e deve quindi essere scelto con attenzione, soprattutto in condizioni di clima fresco dove la MLF nella maggior parte dei casi deve avvenire in un contesto difficile se non estremo. I lieviti enologici sono suddivisi in tre categorie, ovvero stimolanti, neutri e inibenti. Il lievito ha la capacità di inibire i LAB producendo composti come l'etanolo, la SO<sub>2</sub>, acidi grassi a media catena e proteine antibatteriche o esaurendo i nutrienti richiesti dai LAB (Alexandre et al., 2004). Alcuni ceppi enologici di lieviti possono svolgere un ruolo positivo nella stimolazione della MLF detossificando il substrato di fermentazione o rilasciando nutrienti per mezzo dell'autolisi. Quindi è fondamentale riuscire a scegliere il giusto abbinamento tra lieviti e ceppi LAB per il successo della MLF. Per

esempio, uno Chardonnay con una concentrazione di acido malico di 4 g/L riusciva a portare a termine la MLF solo con uno dei quattro abbinamenti lieviti/batteri (Fig. 3).

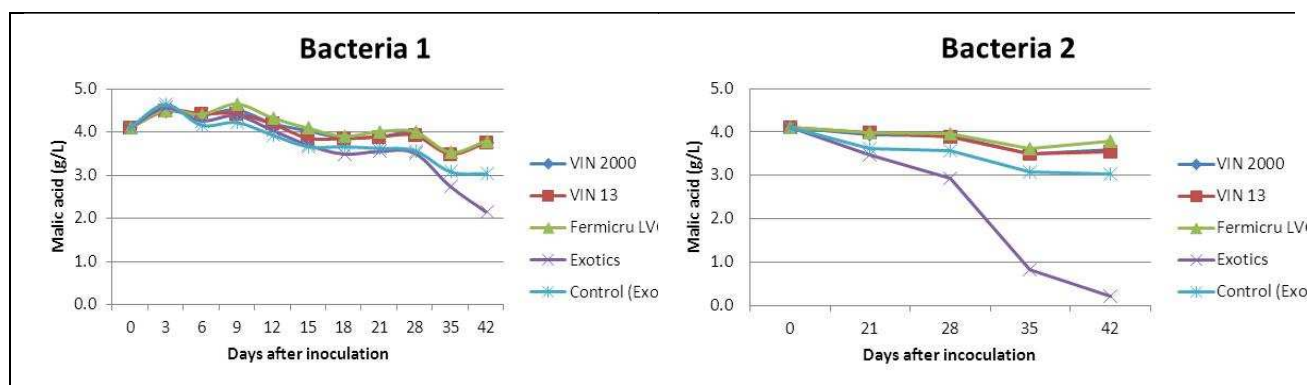


Figura 3: Due diversi batteri abbinati a quattro diversi lieviti in un co-inoculo di Chardonnay con un pH di 3.3 e un'acidità totale di 9.3 g/L (Scholtz, 2013).

### Tempistica per l'inoculo della MLF

Attualmente, tre sono le possibilità per indurre la MLF, ovvero:

- co-inoculo dove lieviti e batteri sono aggiunti insieme nel corso delle prime 48 ore di fermentazione;
- durante la fermentazione alcolica ma prima degli ultimi 50 g/L di zuccheri residui
- inoculo sequenziale dopo la fine della fermentazione alcolica.

Le tre possibilità elencate hanno i loro vantaggi ma anche dei rischi potenziali e quindi in base alle condizioni del vino, il ceppo di lievito utilizzato determinerà la scelta del momento dell'inoculo. Il co-inoculo ha preso piede nell'ultimo decennio in quanto è stato visto che può rappresentare una soluzione a una MLF difficoltosa poiché molti dei composti dei lieviti che rendono la matrice inadatta alla MLF vengono prodotti verso la fine della fermentazione alcolica. Il co-inoculo comporta anche diversi stili di vino in quanto i precursori e le attività enzimatiche di un mosto o di un vino sono differenti. Il co-inoculo consente anche di stabilizzare il vino più velocemente riducendo il rischio di alterazione microbica. E' stato mostrato da Knoll et al. (2012) che il co-inoculo era più veloce rispetto all'inoculo sequenziale e ciò dimostrava che si può trovare il corretto abbinamento lievito/batteri nei vini prodotti nelle regioni fresche. Non c'era alcun impatto sulla fermentazione alcolica se gestita e controllata nel modo ottimale. Si è anche notato che non c'erano differenze nelle quantità di acido acetico rispetto al controllo utilizzando *O. oeni*; non bisogna temere quindi il co-inoculo. Il co-inoculo influiva sui composti volatili aromatici in modo diverso rispetto all'inoculo sequenziale, con livelli più elevati sia degli etil sia degli esteri acetati. L'altra scoperta importante era che le differenze tra i ceppi erano molto più evidenti nel co-inoculo a causa della disponibilità dei substrati e dei precursori, rispetto all'inoculo sequenziale nel quale il profilo aromatico dei diversi ceppi era molto più simile (Fig. 4).

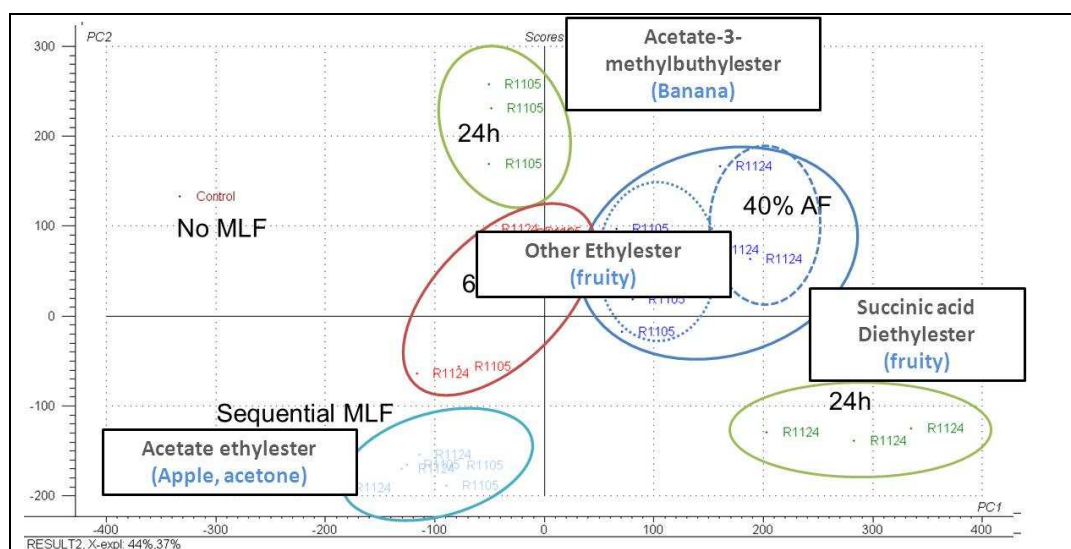


Figura 4: Score plot della PCA dei composti aromatici in vini Riesling con basso pH gestiti con quattro diversi tipi di inoculo e due diversi ceppi (Knoll et al., 2012).

## Conclusioni

In conclusione, il successo della MLF nelle regioni con clima fresco dipende da alcuni fattori cruciali che devono essere presi in considerazione quando si decide il tipo di ceppo per l'inoculo della MLF. I due fattori nei climi freschi che hanno l'impatto più rilevante sulla crescita dei ceppi selezionati sono il pH basso e alti livelli di etanolo. Occorre quindi scegliere il ceppo che si adatta meglio a queste condizioni. Numerosi studi mostrano l'importanza della combinazione lieviti/batteri per la riuscita della MLF in climi freschi; occorre quindi scegliere più attentamente il tipo di lievito per assicurare la migliore compatibilità tra lieviti e batteri. La tempistica dell'inoculo della MLF può essere di aiuto per contenere la durata della MLF in quanto in molti casi con pH bassi, temperature basse e elevati livelli di etanolo la MLF può impiegare mesi nell'arrivare a termine quando si ricorre all'inoculo sequenziale, mentre il co-inoculo può dimezzare i tempi riducendo i rischi di alterazione del vino. Per diversificare lo stile del vino e il profilo aromatico gli enologi possono utilizzare il momento dell'inoculo o diversi ceppi o anche specie, *O. oeni* o *L. plantarum*, o anche un insieme dei due.

## Bibliografia

- Alexandre H., Costello P.J., Remize F., Guzzo J., Guilloux-Benatier M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 93, 141-154.
- Azzolini, M., Tosi E., Vagnoli P., Krieger S., Zapparoli G. (2010). Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science* 3, 257-263.
- Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S. (2011). *Lactobacillus*: The Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – An Overview. *Food Bioprocess Technology* 4, 876-906.
- Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Rauhut D., du Toit M. (2011). Influence of simulated stress on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2077-2086.

Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Krieger-Weber S., du Toit M., Rauhut D. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1143-1153.

Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M. (2010). Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31, 186-212.

Scholtz, M. (2013). Assessing the compatibility of mixed MLF starter cultures with different wine yeasts. Master thesis, Stellenbosch University.

## **ABSTRACT**

*I vini con elevate acidità molto spesso presentano difficoltà nello svolgimento della fermentazione malolattica (MLF). Risulta quindi importante sviluppare strategie per favorire la deacidificazione biologica e il miglioramento dell'aroma nei vini con bassi pH. E' evidente dal nostro screening dei ceppi adatti a pH bassi che il successo della MLF sia dipendente dal ceppo e che è correlato con il numero di cellule. I risultati di uno studio su Chardonnay con un pH di 3.2 e una concentrazione di acido malico pari a 4.3 hanno indicato che la combinazione corretta dei lieviti e i batteri è essenziale per assicurare il successo della MLF e secondariamente essa influisce sul potenziale aromatico dei ceppi di MLF, in particolare degli esteri anche in caso di MLF parziale. I risultati ottenuti mostrano che *Oenococcus oeni* era migliore di *Lactobacillus plantarum* in quanto il numero di cellule nel corso della fermentazione era più elevato. E' stato studiato l'impatto di diverse strategie di inoculo per la MLF con due diversi ceppi di *O. oeni* in vini Riesling provenienti da zone con clima fresco (pH 2.9-3.1) valutando anche il profilo degli aromi volatili del vino. Il tempo della fermentazione nel caso dei trattamenti di co-inoculo erano minori rispetto all'inoculo sequenziale. I risultati mostrano che i vini con il co-inoculo tendevano ad avere concentrazioni più elevate di etil esteri e esteri acetati, quali il fenil etil estere dell'acido acetico, il 3-metilbutilestere dell'acido acetico, l'etil estere dell'acido butirrico, l'etil estere dell'acido lattico e il dietil estere dell'acido succinico. In un altro studio simulando condizioni di climi caldi e freschi con Riesling e Chardonnay, è stato mostrato che pH bassi (3.2) e concentrazioni elevate di alcol (15% v/v) rappresentavano condizioni particolarmente difficili per la MLF ma che persino una MLF parziale aveva un impatto sul profilo aromatico del vino finale, in particolare sugli esteri. I risultati hanno evidenziato anche che alcuni terpeni erano prodotti in maggior misura ad un pH di 3.2 piuttosto che a un pH di 3.8.*

**Parole chiave:** Fermentazione malolattica, Clima fresco, Aroma del vino