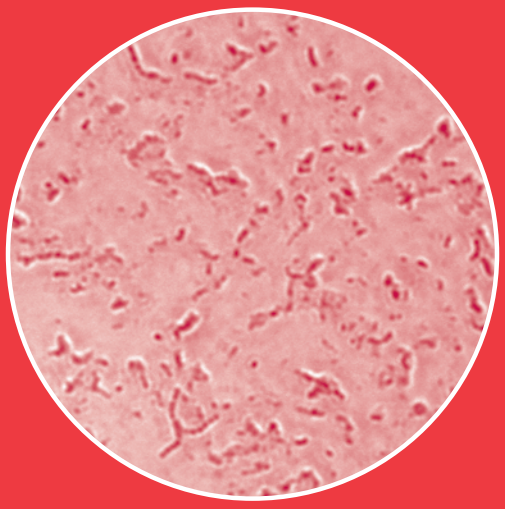


MALOLACTIC FERMENTATION IN WINE
LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DU VIN
LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA DEL VINO
LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA DEL VINO
BIOLOGISCHER SÄUREABBAU IN WEIN
APPEL-MELKSUURGISTING IN WYN
A FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA DO VINHO
葡萄酒苹果酸乳酸发酵
MALOLAKTIČNA FERMENTACIJA VINA

Selezionati dalla natura

LALLEMAND

FERMENTAZIONE MALOLATTICA DEL VINO

COMPRENDERE LA SCIENZA E LA PRATICA

Magali Bou (Francia)

Dr. Neil Brown (U.S.A.)

Dr. Peter Costello (Australia)

Dr. Richard Degré (Canada)

Wilfried Dieterich (Germania)

Sigrid Gertsen-Briand (Canada)

Samantha Kollar (U.S.A.)

Dr. Sibylle Krieger (Germania)

Annamarie Kyne (U.S.A.)

Piet Loubser (Sud Africa)

Dr. Rich Morenzoni (U.S.A.)

Dr. Antonio Palacios (Spagna)

Dr. Chris Powell (Gran Bretagna)

Katie Scully Specht (U.S.A.)

Gordon Specht (U.S.A.)

Didier Theodore (Francia)

Dr. Sylvie Van Zandycke (Belgio)

Responsabile scientifico: Dr. Rich Morenzoni
Responsabile editoriale: Katie Scully Specht e Ann Dumont

Edito da

selezionati dalla natura
LALLEMAND

AGOSTO 2006

Coordinamento di produzione: Claude Racine

Redazione: Judith Brown

Grafica: François Messier

Stampato da Les Impressions Au Point

Alcune ricerche pubblicate o citate in questo libro sono state finanziate totalmente o parzialmente da Lallemand Inc.

AVVERTENZA

Lallemand ha raccolto le informazioni contenute in questo libro e, per quanto le sia dato conoscere, esse sono veritiere e precise. Lallemand offre questa pubblicazione agli enologi professionisti di tutto il mondo come un compendio delle conoscenze attualmente esistenti, di carattere sia scientifico sia aneddotico, riguardo ai batteri lattici del vino, ed alla fermentazione malolattica in condizioni enologiche. È esclusiva responsabilità del lettore decidere se le informazioni qui contenute siano utili o meno. Le informazioni, le tecniche e le procedure presentate in questa pubblicazione non possono essere considerate in nessun modo come una garanzia espressa o implicita di funzionamento, sia essa riferita ad una parte del processo di vinificazione o ad un paese produttore di vino.

Lallemand Inc. Montréal, Canada. H1W 2N8

© 2006 Lallemand Inc. Tutti i diritti riservati. È vietata la riproduzione elettronica, meccanica, per fotocopia o registrazione, o attraverso qualsiasi altro mezzo, di tutta o di parte della pubblicazione, senza preventiva autorizzazione scritta di Lallemand Inc.

Stampato in Canada

AGOSTO 2006

INDICE

Chi è Lallemand iv

Sezione

Gli autori 1

Introduzione 2

Parte prima
Comprendere la scienza della fermentazione malolattica nel vino

La storia dei batteri malolattici del vino 3

Il biochimismo della fermentazione malolattica 4

La microbiologia della fermentazione malolattica 5

Tecniche di selezione dei ceppi 6

Difetti organolettici derivanti dalla fermentazione malolattica incontrollata 7

Le esigenze nutrizionali dei batteri malolattici 8

Fattori ambientali che influiscono sulla fermentazione malolattica 9

Parte seconda
Gestione ragionata della fermentazione malolattica nel vino

Aspetti generali – Gestione ragionata della fermentazione malolattica nel vino 10

Guida all'uso dei ceppi commerciali 11

Scegliere quando inoculare i batteri malolattici 12

Guida alla soluzione dei problemi – Applicazione pratica 13

Il controllo della fermentazione malolattica 14

Uno sguardo al futuro 15

Parte terza
Strumenti per il controllo della fermentazione malolattica

Contatti 16

Batteri malolattici Lallemand, nutrienti per batteri malolattici e lisozima 17

Fermentazione malolattica: tecniche di vinificazione e stile del vino 18

Riavvio delle fermentazioni malolattiche arrestate 19

Calcoli e conversioni 20

AGOSTO 2006

LA SOCIETÀ LALLEMAND

Lallemand – una società per azioni privata canadese fondata alla fine del XIX secolo con filiali operative in diversi paesi del mondo – è attiva nel campo dei lieviti, dei batteri, degli enzimi e dei derivati di lievito per le industrie delle bevande, della panificazione, della nutrizione umana ed animale, e della produzione di alcool industriale. A partire dagli anni '70, Lallemand ha concentrato le sue conoscenze sulla fermentazione nello sviluppo di ceppi di lievito vinario, sotto forma secca attiva di alta qualità, ceppi di batteri e coadiuvanti di fermentazione per il settore enologico.

La gamma di prodotti enologici Lallemand è largamente conosciuta sotto i marchi

LALVIN®, UVAFERM® e ENOFERM®. Tra i principali fornitori di lieviti, batteri e derivati di lievito per l'enologia, Lallemand è l'unico che possiede impianti di produzione propri. La Società deve il suo successo alla costante tendenza all'eccellenza ed ai continui investimenti in ricerca e sviluppo. Per offrire ai suoi clienti i migliori prodotti possibili, Lallemand dà particolare importanza alla ricerca. Un gruppo basato a Toulouse (Francia) collabora con gli istituti di ricerca enologica del mondo intero e conduce ricerche su tutti gli aspetti delle fermentazioni. I ricercatori nella sua sede centrale e all'Institut de Recherche en Biotechnologies (IRB), ambedue a Montréal (Canada), svolgono ricerca fondamentale e sviluppano nuovi ceppi biologici o tecniche di produzione. Sono inoltre numerosi i programmi di ricerca, le pubblicazioni scientifiche ed i continui contatti che legano Lallemand ai laboratori di microbiologia in Europa, Australia, Nord America, Sud America e Sud Africa. Attraverso i suoi incontri tecnici annuali, speciali manifestazioni e pubblicazioni, Lallemand cerca di divulgare la conoscenza e la consapevolezza sulla moderna enologia, a beneficio degli enologi professionisti e dei consumatori finali.

La divisione Lallemand Fermented Beverages ha uffici regionali in Australia, Europa dell'Est, Francia, Germania, Italia, Nord America, Gran Bretagna, Sud Africa, Sud America, Cina e Spagna. Le persone che compongono la rete Lallemand sono giornalmente in contatto con i ricercatori e con gli utilizzatori finali dei loro prodotti. I gruppi Lallemand regionali provvedono alle esigenze dei loro clienti ed offrono aggiornamento tecnico e consulenza enologica. Il loro lavoro è svolto in collaborazione con una rete di distributori e specialisti riconosciuti, che operano nel cuore di ogni regione vitivinicola.

AGOSTO 2006

GLI AUTORI



MAGALI BOU

Alla fine dei suoi studi, nel 1999, presso l'Institut National des Science Appliqués (INSA – l'istituto nazionale di scienze applicate francese), con una specializzazione in Microbiologia e Industria degli Alimenti, Magali Bou è entrata del Dipartimento Ricerca e Sviluppo di Lallemand a Toulouse (F) ed ha partecipato al programma di ricerca europeo FAIR-CT98-9640, finalizzato alla selezione di nuovi interessanti ceppi di batteri malolattici. Attualmente riveste il ruolo di leader di progetto nell'ottimizzazione dei processi di produzione industriale dei batteri starter, e dirige gli studi di fattibilità per i nuovi prodotti MBR®.



NEIL BROWN

Dr. Neil Brown ha ottenuto il suo Ph.D. in Biologia Cellulare e Molecolare nel 1994 presso l'Università del Texas ad Austin ed è stato co-autore del manuale di laboratorio di questa Università "Introductory Cellular and Molecular Biology". Dal 1988 ha lavorato per Vinquiry in Sonoma County, dove gestisce il laboratorio di microbiologia. È autore del Vinquiry Microbiology Photo CD, una raccolta di fotografie di microrganismi del vino e della morfologia delle loro colonie. Dr. Brown dà seminari di microbiologia del vino e tecniche di osservazione microscopica, ed è coinvolto nel programma di formazione offerto da Vinquiry. È membro professionale dell' American Society of Enology and Viticulture (ASEV) e del California Enological Research Association (CERA).



PETER COSTELLO

Dr. Peter Costello è entrato in Lallemand Australia nel 2003 con il ruolo di Responsabile Tecnico Nazionale, dopo 20 anni di esperienza nell'industria vinicola australiana alle dipendenze dell'Australian Wine Research Institute e di tre diversi produttori. La sua specializzazione riguarda la ricerca microbiologica applicata, la fermentazione malolattica e le applicazioni industriali dei batteri lattici e dei lieviti per la produzione di vino. Dr. Costello ha un B.Sc. ed un M.Sc. degrees in Food Technology dall'Università del Nuovo Galles del Sud, ed ha ottenuto il suo Ph.D. in Microbiologia del Vino presso l'Università di Adelaide nel 1999, con una ricerca sul tema "Formazione di odori di topo nel vino a causa di batteri lattici".



RICHARD DEGRÉ

Dr. Richard Degré ha un B.Sc. dalla Université de Sherbrooke ed un M.Sc. dalla Université de Montréal. Dopo aver ottenuto il suo Ph.D. in Microbiologia nel 1983 alla McGill University, in congiunzione con l'Institut Armand-Frappier, Dr. Degré è entrato in Lallemand come vice-direttore del dipartimento di ricerca e sviluppo, e successivamente è stato promosso alla posizione di Direttore della divisione Ricerca, Sviluppo e Controllo Qualità. Nel 1993 è assunto al sua attuale posizione di Vice-Presidente, Ricerca, Sviluppo e Controllo Qualità. Dr. Degré è autore di numerosi articoli di microbiologia applicata.



WILFRIED DIETERICH

Wilfried Dieterich è entrato in Lallemand nel Marzo 2004. Dopo aver fatto pratica in numerose cantine ed istituti, ha studiato enologia e viticoltura con il Prof. Manfred Grossmann dell'Istituto di Geisenheim. Il suo lavoro di tesi è stato realizzato in collaborazione con Lallemand, ed ha riguardato la produzione di lieviti secchi attivi. Mr. Dieterich è in constante contatto con produttori di vino di ogni dimensione e con entità commerciali specializzati.



SIGRID GERTSEN-BRIAND

Sigrid Gertsen-Briand si è laureata alla McGill University in Microbiologia. Dal 1995 lavora nell'industria enologica occupandosi anche della vinificazione amatoriale. Dopo avere avuto esperienze professionali di vendemmia in Australia ed in Francia, è entrata nel gruppo Lallemand come responsabile tecnico per gli USA del Nord-Est. Attualmente opera nel nord della California.



SAMANTHA KOLLAR

Samantha Kollar lavora dal 1998 per Vinquiry, il noto laboratorio di consulenze californiano. Formata su numerosi aspetti del processo di produzione e del management, è attualmente Product Specialist, fornisce supporto tecnico e dà numerose presentazioni sui prodotti e sui servizi offerti da Vinquiry. Fa parte dell' American Society for Enology and Viticulture (ASEV), e del California Enological Research Association (CERA). Ha ottenuto il suo diploma B.A. in Biologia alla Sonoma State University nel 1997.



SIBYLLE KRIEGER

Dr. Sibylle Krieger ha studiato Scienze degli Alimenti alla Universität Hohenheim, Germania, ricevendo il suo M.Sc. da LVAOW Weinsberg nel1984 per il suo lavoro sulla fermentazione malolattica nel vino, ed il suo Ph.D. nel 1989 da Universität Hohenheim/Cornell University per le sue ricerche sul tema "Preparazioni starter di batteri malolattici per l'induzione della fermentazione malolattica nel vino". Nel 1990 ha completato gli studi post-dottorali presso la New York State Agricultural Experiment Station/Cornell University, ed ha lavorato per Gewürzmüller GmbH Stuttgart fino al 1998, dove si è occupata della ricerca, dello sviluppo e della commercializzazione delle colture malolattiche Bitec, inizialmente come responsabile di laboratorio, quindi come assistente alla direzione R&S, poi come assistente alla direzione del controllo qualità dell'azienda ed infine come responsabile della produzione delle colture starter malolattiche Bitec. Nel 1999, Dr. Krieger è entrata in Lallemand, con il ruolo di responsabile della ricerca sulle colture starter malolattiche e di supporto tecnico.



ANNAMARIE KYNE

Annamarie Kyne fa parte del gruppo fermentazione di Scott Laboratories in California, dal 2004 ed attualmente si occupa del marketing e della commercializzazione dei prodotti per la fermentazione, oltre che del coordinamento della pubblicazione tecnico-commerciale annualmente edita da Scott Laboratories. Dopo essersi laureata alla University of California, Davis, nel 1986 con un B.Sc. in Fermentation Science e specializzazione in Enologia, ha lavorato per Chr Hansen, Inc. dove è stata responsabile del lancio di Viniflora® oenos – una coltura di batteri malolattici ad inoculo diretto – nel Nord America.



PIET LOUBSER

Piet Loubser si è laureato in Microbiologia alla Universiteit Stellenbosch in Sud Africa, prima di entrare nella sezione Microbiologia del Nietvoorbij Research Institute di Stellenbosch. Studente lavoratore, ha ottenuto il suo M.Sc. in Microbiologia nel 1993 ed un titolo MBA dalla Graduate School of Business (Universiteit Stellenbosch) nel 1997. Si è unito a Lallemand nell'ottobre 1999 come responsabile per il Sud Africa. Si occupa dello sviluppo e della crescita del mercato sudafricano, e svolge funzioni di supporto tecnico per gli enologi locali e di punto di collegamento tra distributori, università e colleghi.



RICH MORENZONI

B.Sc. in Food Science and Technology all' University of California, Davis, nel 1968, Dr. Rich Morenzoni ha ottenuto il Ph.D. in Microbiologia alla stessa università nel 1973, ed ha quindi lavorato per E&J Gallo Winery in Modesto, California, per quasi 30 anni. Al pensionamento, ha fondato la società di consulenza Art of Winemaking, LLC. Sempre attivo nell'industria vinicola, è stato presidente dell'American Society for Enology and Viticulture, ha fatto parte per anni del suo consiglio direttivo, ed è stato Assistant Editor della rivista scientifica American Journal of Enology and Viticulture. Le sue competenze riguardano lieviti e batteri e le loro relazioni con la produzione e la qualità del vino, la risoluzione di problemi biologici nel vino, le fermentazioni alcoliche e malolattiche, e lo sviluppo di metaboliti indesiderati nel vino.



ANTONIO PALACIOS

Dr. Antonio Palacios è entrato in Lallemand nel 1995 e aiuta instancabilmente i suoi clienti e distributori in Spagna. Ha ottenuto il B.Sc. in Biologia all'Università di Salamanca, il M.Sc. in Viticoltura ed Enologia ed il Ph.D. in Scienze Biologiche alla scuola di agronomia della Universidad Politécnica de Madrid. Dr. Palacios lavora nella selezione di lieviti in La Mancha e Madrid ed insegna enologia all'Università della Rioja, Spagna.



CHRIS POWELL

Dr. Chris Powell ha iniziato a collaborare con Lallemand dal 2004, come consulente nel Laboratorio di Identificazione Genetica, in particolare sviluppando ed implementando un metodo discriminante per l'identificazione dei ceppi di *Oenococcus oeni.* Attualmente è impegnato in progetti di sviluppo di tecniche di biologia molecolare per la caratterizzazione di numerosi microrganismi utilizzati nell'industria alimentare e delle bevande. Dopo aver ricevuto il suo B.Sc. in Biologia e Biologia Ambientale nel 1996, ha iniziato il Ph.D. alla Oxford Brookes University, studiando l'impatto dell'invecchiamento cellulare del lievito sulle sue capacità fermentative nella produzione di birra. Terminato il dottorato nel 2001, Dr. Powell ha partecipato ad un progetto finanziato dalla Commissione Europea, esplorando i meccanismi per una rapida identificazione di un'ampia gamma di microrganismi nelle birrerie, ed ha supervisionato progetti su ceppi di lievito selvaggio ed aggregazione cellulare nei lieviti da birra. È Chairman del sub-comitato ASBC per la Determinazione della vitalità del lievito con epifluorescenza, ed è regolare reviewer di diverse riviste scientifiche.



KATIE SCULLY SPECHT

Dopo la laurea del 1992 alla University of California, Davis, con un B.Sc. in Food Science and Technology, ed una breve esperienza di controllo qualità in un'unità di produzione di succhi di frutta, Katie Scully Specht ha lavorato per Scott Laboratories come specialista degli enzimi per l'industria del vino e dei succhi di frutta, oltre che della stabilizzazione microbiologica. Tra i suoi compiti rientravano anche l'installazione e la manutenzione delle unità di sterilizzazione in USA e Mexico, ed è stata esperta all'OIV della stabilizzazione microbiologica del vino. Nel 2001, Katie è entrata nel gruppo Lallemand come specialista della comunicazione tecnica. È membro del California Enological Research Association (CERA) e del Board of Directors del Sonoma County Wine Technical Group.



GORDON SPECHT

Gordon Specht ha iniziato a lavorare per Lallemand nel 1995 come Responsabile Supporto Tecnico per il Nord America nella divisione Bevande Alcoliche, dopo aver lavorato nell'industria enologica per 11 anni a Scott Laboratories, dove si è occupato di analisi di laboratorio, controllo qualità, produzione di tappi in sughero e responsabile tecnico di prodotto. Gordon ha ottenuto il B.Sc. in Food Science alla Pennsylvania State University, con uno studio indipendente sui batteri malolattici sotto la supervisione del Prof. Robert Beelman.



DIDIER THEODORE

Didier Theodore ha studiato Microbiologia alla Université de Toulouse (F), e si è laureato in Microbiologia Industriale nel 1995. Durante gli studi, ha collaborato con Lallemand nell'ottimizzazione delle procedure di produzione dei batteri malolattici. Nel 1996, Didier è stato assunto da Lallemand per continuare il suo lavoro di messa a punto del processo industriale di ottenimento di colture starter adattate, ed è stato Project Manager nella selezione di nuovi ceppi di batteri. Dopo aver lasciato per poco tempo la società, è tornato a lavorare per Lallemand nel 2002 come Product Manager per i Batteri Malolattici. Basato a Toulouse, è coinvolto nello sviluppo di prodotti, nel supporto tecnico e marketing per l'intera gamma di prodotti per la fermentazione malolattica.



SYLVIE VAN ZANDYCKE

Dopo gli studi in ingegneria biochimica e fermentazione all'Institut Meurice di Brussels, Belgio, Dr. Sylvie Van Zandycke ha ottenuto il Ph.D. nel 2000 alla Oxford Brookes University, ed è stata titolare di una borsa di studio Erasmus di sei mesi che le ha permesso di completare il proprio lavoro sull'invecchiamento delle cellule nella produzione della birra. Come dipendente della SMART Brewing Services, ha condotto ricerche per conto di numerosi clienti, sviluppando metodiche analitiche e kit per l'industria della birra. È stata inoltre molto attiva nell'organizzazione di corsi di formazione, simposi e congressi per l'industria della birra. Dal 2004 Dr. Van Zandycke lavora per Lallemand in Canada come Project Manager nel Laboratorio di Identificazione Genetica. Attualmente è coinvolta nell'Assicurazione Qualità e nella R&S su lieviti e batteri. La sua specializzazione è lo sviluppo di nuovi metodi per l'identificazione e la caratterizzazione di microrganismi.

INTRODUZIONE

DR. RICH MORENZONI

Il vino è un mezzo molto complesso costituito da una miriade di composti che possono essere positivi o negativi per lo sviluppo dei microrganismi. Il ruolo di questi ultimi nel vino non si limita alla conversione del mosto in vino, ma comprende anche l'azione dei batteri lattici nella conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico, denominata fermentazione malolattica (FML). Nel passato, la FML era descritta come un fenomeno delicato e non completamente noto, ma di grande importanza per le caratteristiche finali del prodotto. Le recenti ricerche sulla FML hanno fornito maggiori elementi di comprensione del comportamento dei batteri, ma rimane il fatto che la fermentazione malolattica è un fenomeno biologico e, in quanto tale, soggetto alle influenze ambientali, fisiche e chimiche che la natura ha correlato alla crescita dei batteri.

Non molti anni fa, gli enologi erano soddisfatti di lasciare la natura seguire il suo corso, semplicemente aspettando che la FML si svolgesse spontaneamente. Questa pratica era alla base dei tipici commenti sulla malolattica: "non avviene mai quando lo voglio", oppure "non mi piace quello che fa al vino".

Ora che comprendiamo meglio il fenomeno, è facile capire come mai questi commenti fossero così diffusi. Il vino, per sua natura, non si presta ad una crescita facile e rigogliosa dei microrganismi: esso ha acidità ed alcool relativamente elevati, basso pH, e spesso una certa quantità di solforosa. Proprio per queste ragioni, Louis Pasteur, riconoscendo che il vino era un mezzo ostico per i microrganismi, lo dichiarò esente da microrganismi che possano essere dannosi alla salute dell'uomo e lo definì "la più salutare ed igienica delle bevande".

Quando in un vino si svolge spontaneamente la fermentazione malolattica, significa che I batteri lattici sono riusciti a superare queste difficoltà ed a stabilirsi nel vino. Tuttavia, ciò non significa che questi batteri ci daranno la FML che ci si aspettava, e neppure i caratteri organolettici positivi che ci si attendeva: significa solamente che ci sono batteri lattici che si sviluppano nel vino e che essi, e non l'enologo, hanno il controllo finale sulla qualità del prodotto finale. Per rendere il quadro ancora più fosco, ne consegue che se un ceppo spontaneo di batteri con caratteristiche negative per il vino si impianta nella cantina, tutti

selezionati dalla natura
LALLEMAND

i vini che vi si produrranno successivamente potranno potenzialmente mostrare le caratteristiche negative associate a quel particolare ceppo di batteri.

La più avanzata conoscenza della FML ha dato all'industria enologica uno strumento potente per capire, controllare ed addirittura predire gli effetti ultimi di una fermentazione malolattica. La parola chiave è "fermentazioni malolattiche inoculate". Diventa imperativo aggiungere ceppi di batteri dal comportamento noto e prevedibile, e non affidarsi ai microrganismi che si sono casualmente stabiliti nell'impianto di produzione. I batteri attualmente sul mercato sono stati selezionati in natura, non solamente per la loro capacità di crescita e sviluppo nel vino, ma anche per gli attributi positivi che sanno apportare all'aroma ed al gusto del vino, oltre che per la mancata produzione di metaboliti secondari indesiderati. Inoltre, i batteri isolati sono stati selezionati in base alla loro tolleranza ai composti del vino che possono inibire o prevenire la loro crescita. Sono state studiate anche le esigenze nutrizionali dei batteri, così come la loro compatibilità con i ceppi di lievito utilizzati nella produzione del vino.

Oggi sono disponibili anche informazioni sulla nutrizione dei batteri, che permettono di assicurare la ripetitività e la completezza dell'azione batterica. Si conoscono i contributi al profilo finale del vino dati da certi ceppi di batteri, in modo da potere utilizzare starter specifici per l'ottenimento di uno stile desiderato di vino. In breve, l'ampiezza della nostra conoscenza sulla FML è incrementata in modo esponenziale in un periodo relativamente breve. Lallemand ha raccolto insieme le informazioni pratiche e scientifiche esistenti e le linee guida attualmente disponibili che possono essere di immenso valore per la gestione pratica della FML. Le sue attività di ricerca in laboratorio hanno giocato un ruolo importante nella comprensione degli aspetti scientifici della FML, ed il suo personale ha condotto in tutto il mondo sperimentazioni in cantina per verificare le nuove acquisizioni scientifiche.

I commenti del tipo "non si avvia quando lo voglio" e "non mi piace cosa fa al mio vino" non sono più accettabili. La fermentazione malolattica è stata addomesticata dalla conoscenza scientifica abbinata all'esperienza pratica. Le informazioni e le raccomandazioni contenute in questa pubblicazione dovrebbero essere utilizzate per aumentare il talento e la dedizione degli enologi professionisti in tutto il mondo. Come sempre, l'obiettivo finale è quello di produrre una qualità distintiva e senza compromessi.

LA STORIA DEI BATTERI MALOLATTICI NEL VINO

DR. SIBYLLE KRIEGER

Nel 1837, Freiherr von Babo descriveva nel suo libro "Breve manuale sui buoni trattamenti ai mosti vinificati"[1] il fenomeno di una "seconda" fermentazione nei vini giovani, che si avvia con l'innalzamento primaverile delle temperature (generalmente quando nei vini si sviluppa la fioretta). Questa "seconda" fermentazione liberava CO_2 ed era responsabile di una nuova torbidità nei vini giovani.

Von Babo mise in relazione il fenomeno con la "fusione del grasso" della fermentazione alcolica, e raccomandava un travaso immediato in nuove botti con SO_2, chiarifica e riduzione della temperature, seguiti da un secondo travaso e dalla stabilizzazione con ulteriore aggiunta di SO_2.

Durante i suoi studi sui contaminanti dei vini nel 1866, Louis Paster isolò il primo batterio dal vino ed iniziò il suo "Études sur le vin"[2]. Egli si rese responsabile dell'opinione diffusa secondo la quale tutti i batteri del vino erano da considerarsi negativi. La riduzione d'acidità osservata nei vini fu ancora attribuita alla precipitazione dell'acido tartarico, sebbene nel 1891 Hermann Müller-Thurgau[3] avesse già messo in relazione la riduzione acidica con l'attività batterica. La sua teoria fu confermata da Koch[4] e Seiffert[5] rispettivamente nel 1898 e 1901. Nel 1913, Müller-Thurgau e Osterwalder, con la loro ricerca epocale sui batteri lattici del vino[6], spiegarono la degradazione batterica dell'acido malico in acido lattico e CO_2 secondo la formula:

$$\mathbf{C_4H_6O_5 \rightarrow C_3H_6O_3 + CO_2}$$

Essi chiamarono questo fenomeno "disacidificazione biologica" o "fermentazione malolattica", e *Bacterium gracile* fu identificato come l'agente responsabile. Negli anni '50, l'applicazione di nuovi metodi enzimatici premise di chiarire le reazioni enzimatiche alla base del fenomeno di degradazione dell'acido malico[7]. Più tardi, grazie all'uso di migliori sistemi analitici, Radler[8], Peynaud[9], Beelman[10] e Kunkee[11] portarono ad una migliore comprensione delle complesse esigenze nutrizionali dei batteri lattici, dal momento che la sola degradazione dell'acido malico dà solo un minimo apporto energetico al metabolismo della cellula batterica[12].

selezionati dalla natura
LALLEMAND

TASSONOMIA DEI BATTERI LATTICI DEL VINO

Da queste prime scoperte ad oggi, le ricerche sui batteri lattici hanno fatto grandi progressi. Il nome *Bacterium gracile*, frequentemente utilizzato nel passato per dare un nome ai microrganismi che causavano la fermentazione malolattica, è stato modificato. Gli studi di Vaughn[13] e Radler[8] mostrarono che i batteri lattici del mosto e del vino appartengono ai generi *Lactobacillus, Leuconostoc*, *Pediococcus* e, più recentemente, *Oenococcus*[14]. Molti diversi batteri lattici entrano a contatto con il vino provenendo dalla superficie delle bucce, dai graspi, dal terreno e dalle attrezzature di cantina. Tuttavia, a causa della forte selettività dei mosti e dei vini, solamente alcuni tipi di batteri sono in grado di svilupparsi nel vino[15, 16, 17]. La seguente descrizione generale è valida per tutti i batteri lattici del vino:

- Gram-positivi;
- non mobili e non sporigeni;
- anaerobi facoltativi;
- metabolismo chemorganotrofico – necessitano di un terreno ricco e di zuccheri fermentescibili;
- temperatura ottimale di crescita tra 20° e 30°C.

Oltre alla loro forma (coccica – rotonda - o a bastoncelli), il metabolismo omofermentativo o eterofermentativo è il criterio decisivo per la loro classificazione. I batteri omofermentativi producono acido lattico da glucosio e/o fruttosio. I batteri eterofermentativi producono oltre all'acido lattico anche anidride carbonica, etanolo ed acido acetico, a partire dai carboidrati. I lattobacilli possono possedere ambedue i tipi di metabolismo, e vengono suddivisi in tre gruppi:

Gruppo 1: omofermentativi obbligati – questo gruppo non è mai stato ritrovato nel vino

Gruppo 2: eterofermentativi facoltativi – Una molecola di glucosio viene convertita in due molecole di acido lattico. I pentosi sono fermentati in acido lattico ed acido acetico.

Gruppo 3: eterofermentativi obbligati – Essi fermentano il glucosio in acido lattico, acido acetico, etanolo e CO_2. I pentosi sono trasformati in acido acetico e acido lattico.

Il metabolismo dei carboidrati dei batteri lattici normalmente ritrovati nel vino è riassunto nella tabella seguente.

Tabella 1. Metabolismo dei carboidrati nei batteri lattici

Gruppo	Fermentazione del glucosio	Specie
Lactobacilli (cellule a bastoncello)	eterofermentativi facoltativi Gruppo 2	*Lactobacillus casei*
		Lactobacillus plantarum
	Eterofermentativi obbligati Gruppo 3	*Lactobacillus brevis*
		Lactobacillus hilgardii
Cocci (cellule rotonde)	omofermentativi	*Pediococcus damnosus*
		Pediococcus pentosaceus
	eterofermentativi	*Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni)*

Questa classificazione sarà probabilmente modificata con il progredire dell'identificazione di nuovi isolati batterici nel vino, e con il miglioramento delle tecniche di biologia molecolare utilizzate per identificare gli isolati. Per esempio, nel 1995 Dicks et al.[14] hanno mostrato che *Leuconostoc oenos* era diverso da altre specie di *Leuconostoc* non solo a causa del suo comportamento di crescita in mezzi acidi, delle sue esigenze in TJGF (tomato juice growth factor) e delle sue reazioni fermentative sui carboidrati, ma anche attraverso ibridazione DNA-DNA ed analisi numerica dei profili delle proteine cellulari solubili. Gli studi filogenetici, in particolare quelli riguardanti le sequenze 16S e 23S rRNA, hanno evidenziato chiaramente un gruppo di *Leuconostoc oenos* che risulta separato e diverso dalle altre specie di *Leuconostoc* così come dagli altri batteri lattici in generale. Questo sottogruppo è genotipicamente omogeneo e forma un raggruppamento distinto da *Leuconostoc oenos*, ragione per cui gli è stato assegnato un nuovo genere denominato *Oenococcus oeni*.

ECOLOGIA E CRESCITA DEI BATTERI LATTICI

Come accennato prima, i batteri lattici si possono trovare sulle uve a basse popolazioni (meno di 100 cellule/g)[18], mentre batteri acetici e lieviti sono presenti in maggiori quantità. I batteri lattici si ritrovano sulle foglie e sui graspi, ed anche sul materiale di cantina. Gli studi svolti in diversi paesi indicano che *Oenococcus oeni* è la specie dominante nello svolgimento della fermentazione malolattica nel vino, anche se nella popolazione di batteri lattici nel mosto d'uva ed all'inizio della fermentazione alcolica sono prevalenti i ceppi di *Lactobacillus*. La presenza di *Pediococcus* è normalmente rilevata dopo la fermentazione malolattica, e nei vini con i pH più elevati. I vini con pH inferiore a 3.5 ospitano generalmente solo Oenococcus oeni, mentre in quelli con pH maggiore di 3.5 si possono ritrovare diverse specie dei *Pediococcus* così come alcuni ceppi eterofermentativi di *Lactobacillus*. La rassegna di Wibowo et al.[17] identifica diverse fasi della vinificazione (Fig. 1), nelle quali possono essere presenti e svilupparsi differenti specie di batteri lattici. Per dare un'idea delle quantità "i mosti, subito dopo la pigiatura, contengono generalmente popolazioni di batteri lattici di 10^3 - 10^4 UFC/ml; le specie maggiormente presenti in questa fase sono *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*, ed in misura minore *Leuconostoc oenos* [*Oenococcus oeni*] e *Pediococcus cerevisiae*. Queste specie normalmente non si moltiplicano e muoiono durante la fermentazione alcolica, sebbene in alcuni casi (pH elevati) si possa verificare una leggera proliferazione delle specie più negative. La sensibilità all'etanolo può spiegare questo declino della vitalità cellulare. Dopo una lag-fase, la cui durata dipende fortemente dalle caratteristiche del vino, le cellule sopravvissute iniziano a moltiplicarsi e dopo che esse hanno raggiunto la massa critica, si assiste all'inizio della degradazione dell'acido malico. La sopravvivenza dei batteri malolattici dopo il completamento della FML dipende fortemente dalle condizioni del vino e da come il vino viene trattato. L'aggiunta di anidride solforosa porta alla progressiva perdita di vitalità di questi batteri, ma anche il pH gioca un ruolo importante. A bassi pH, i batteri lattici del vino muoiono progressivamente, mentre a pH maggiori di 3,5 la popolazione batterica può continuare a crescere. Non solo *Oenococcus oeni*, ma anche batteri contaminanti come *Pediococcus* e *Lactobacillus* possono raggiungere livelli di 10^6 - 10^8 UFC/ml e conseguentemente provocare danni al vino. Per questo, in condizioni di pH elevato, si raccomanda una precoce stabilizzazione del vino.

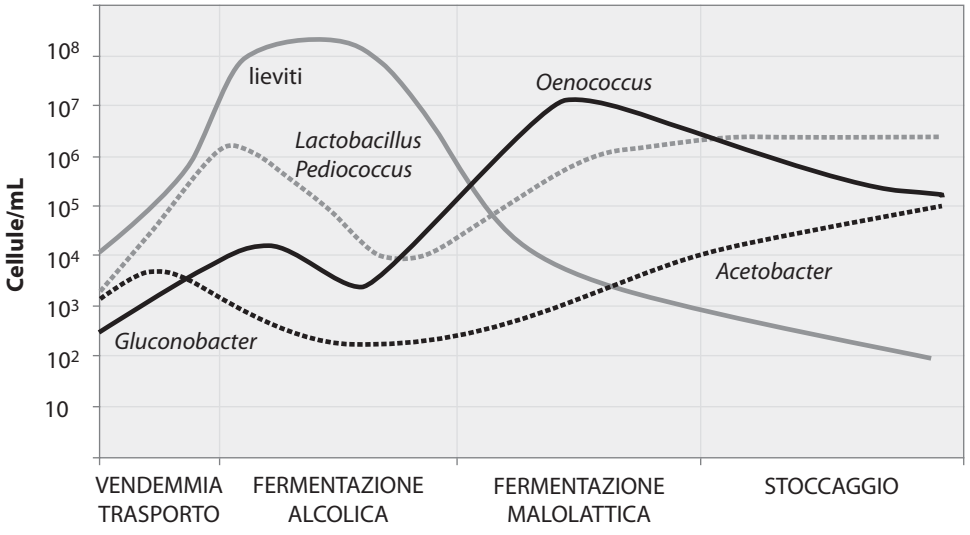


Figura 1. Ciclo di crescita dei batteri lattici nel vino durante la vinificazione e lo stoccaggio

I FATTORI CHE INFLUENZANO LA SOPRAVVIVENZA E LA CRESCITA DEI BATTERI LATTICI NEL VINO

I fattori che influenzano la sopravvivenza e la crescita dei batteri lattici nel vino possono essere suddivisi in tre categorie:

- la composizione chimico-fisica del vino;
- i fattori associati alla vinificazione;
- le interazioni tra i batteri lattici e gli altri microrganismi.

Ogni specifico fattore sarà discusso nel dettaglio, ma riguardo alla composizione del vino, il pH è certamente il parametro più importante nel determinare il comportamento dei batteri lattici nel vino, ed inoltre esercita un'azione selettiva sui ceppi di batteri lattici presenti. Il pH del vino determina quali specie batteriche si svilupperanno, la vitalità e la velocità della loro crescita, la rapidità della degradazione dell'acido malico ed il comportamento metabolico dei batteri stessi. Il pH critico nel vino è 3,5, perché al di sotto di questo valore la microbiologia del vino è facile da tenere sotto controllo. Sebbene a pH inferiori sia più difficile indurre la FML, in queste condizioni poche specie batteriche sono capaci di crescere e metabolizzare. La solforosa (SO_2) ha un forte potere inibente sulla crescita dei batteri lattici, ma la sensibilità alla solforosa da parte dei diversi batteri lattici è variabile. La solforosa è maggiormente inibente a pH bassi. La crescita ed il metabolismo dei batteri lattici sono proporzionalmente inibite dall'alcool a concentrazioni maggiori di 6% (v/v). Per la maggior parte dei batteri lattici il limite massimo di alcool tollerabile è 14%.

I batteri lattici del vino sono mesofili, con una temperatura di crescita ottimale compresa tra 15 e 30°C. La velocità della crescita batterica e dello svolgimento della FML sono fortemente rallentate a basse temperature.

Riguardo alle pratiche enologiche, la chiarifica del mosto e del vino può rimuovere una larga porzione dei batteri presenti, e riduce inoltre l'incidenza della crescita batterica ed il suo impatto sulla qualità del vino[19]. Durante la chiarifica vengono eliminati alcuni nutrienti e particelle sospese che stimolano la crescita dei batteri. I vini prodotti per termovinificazione sono notoriamente meno facili per la FML.

Anche il momento d'inoculo dei batteri malolattici ha un effetto sulla cinetica della FML. Rispetto alle interazioni con altri microrganismi, le colture miste di microrganismi introducono la possibilità di relazioni antagoniste e sinergiche ma, in alcuni casi, non originano nessun fenomeno. Nella vinificazione i batteri possono interagire con lieviti, muffe, batteri acetici e batteriofagi, ma anche con altre specie batteriche e con diversi ceppi della stessa specie[20]. I fenomeni d'antagonismo con i lieviti sono stati spiegati attraverso la competizione per i nutrienti e la produzione di sostanze inibenti per i batteri, come la solforosa e gli acidi grassi a media catena.

D'altro lato, i lieviti possono aiutare la crescita dei batteri nel vino e stimolare la FML. Durante una lunga stasi sulle fecce, l'autolisi di queste ultime rilascia nel vino vitamine ed amminoacidi, portando ad un suo arricchimento in nutrienti e alla conseguente stimolazione della fermentazione malolattica.

Costello[21] ha dimostrato che la crescita di *Pediococcus* spp è aiutata dalla rapida morte delle cellule di *Oenococcus oeni,* e in condizioni di pH elevato, la crescita precoce *Lactobacillus brevis* provoca la completa inibizione dello sviluppo di *Oenococcus oeni*. Recentemente, Gerbaux[31] ha mostrato che le condizioni nel vino che stimolano la FML possono essere in grado di inibire lo sviluppo del lievito contaminante *Brettanomyces*.

L'INFLUENZA DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA SULLA COMPOSIZIONE DEL VINO

La FML non è semplicemente la decarbossilazione dell'acido malico in acido lattico e CO_2. Usando il vino come substrato per la crescita, i batteri malolattici rimuovono alcuni costituenti del vino e ne producono altri, come risultato del loro metabolismo.

L'attività metabolica dei batteri lattici non solo modifica i composti dell'aroma primario e secondario[22], ma conferisce al prodotto finale una certa stabilità biologica.

La crescita dei batteri malolattici è generalmente voluta ed indotta quando la FML è necessaria per ridurre l'acidità del vino, fenomeno positivo per la qualità dei vini prodotti nelle regioni vitivinicole a clima freddo, dove le uve contengono naturalmente alti livelli di acidi organici.

In tutto il mondo i consumatori desiderano attualmente vini dominati dal fruttato con acidità moderata, e questo significa che la riduzione dell'acidità è diventata un'operazione molto importante nel processo produttivo dei vini da regioni fredde. Questa tendenza, unita alla positiva variazione del profilo organolettico del vino associata con la crescita del batteri malolattici nel vino, ha reso la FML un processo desiderabile e voluto per quasi tutti i vini rossi e per certi stili di vini bianchi. Lo sviluppo di batteri lattici nel vino deve essere tenuta strettamente sotto controllo, per assicurare che solo le specie batteriche desiderate possano crescere, evitando i rischi di produzione di difetti sensoriali oppure di composti pericolosi per la salute umana. In molti casi, è importante che la FML si completi rapidamente per abbreviare il ciclo di produzione e per raggiungere velocemente la stabilità del vino. In nessun caso ci si può affidare ai ceppi indigeni di batteri malolattici per la conduzione della FML.

Oltre a produrre acido lattico come maggiore sottoprodotto del catabolismo degli zuccheri[23], è noto che i batteri lattici producono altri composti sensorialmente rilevanti tra cui acetaldeide, acido acetico, diacetile, acetoino e 2,3-butandiolo. Questi ultimi tre composti hanno origine dal consumo dell'acido citrico ed assumono un ruolo importante per il profilo sensoriale del vino. A concentrazioni maggiori di 5 mg/l, il diacetile può essere eccessivo, dando al vino note evidenti di burrato e frutta secca. In base al pH ed al potenziale ossido-riduttivo del vino, l'acido acetico può rappresentare un altro metabolita derivato dalla degradazione dell'acido citrico da parte dei batteri malolattici. In vini che hanno subito la FML, sono stati anche rivelati maggiori tenori in esteri volatili, etil-lattato ed alcoli superiori[24]. Henick-Kling[25] ha caratterizzato il contributo sensoriale di diversi ceppi di batteri malolattici.

LA CONTAMINAZIONE BATTERICA DEL VINO

La FML non è sempre positiva è può essere responsabile di modifiche indesiderate delle caratteristiche sensoriali del vino. Come si è accennato in precedenza, numerose specie di batteri lattici possono condurre la fermentazione malolattica. Quando la FML avviene a pH inferiori a 3,5, è generalmente dominata da *Oenococcus oeni* ed è meno probabile che si originino caratteri negativi, anche se alcuni ceppi indigeni possono avere la capacità di farlo. Le note indesiderate di burro, formaggio, latte, metallico e terroso, così come eccessivi contenuti in acido acetico, sono normalmente associati a fermentazioni malolattiche che avvengono a pH sopra 3,5, e che sono state svolte da pediococchi o lattobacilli. I batteri lattici producono ammine biogene attraverso la decarbossilazione degli amminoacidi.

L'istamina, prodotta dalla decarbossilazione dell'istidina, è ritenuta essere causa di reazioni allergiche in individui sensibili, quando il vino contiene più di 0,1 mg/L. Tra i batteri lattici, *Pediococcus* sp. e *Lactobacillus brevis* sono considerati i più importanti produttori d'istamina[26]. Questi due generi sono normalmente presenti in vini con pH maggiore di 3,5 e, di conseguenza, la sintesi di amine biogene sembra essere significativa solo in vini poco acidi. Se è presente nel vino un batterio in grado di produrre amine biogene, l'enologo dovrà inoculare con una coltura malolattica starter capace di scalzare il batterio indigeno.

I batteri producono istamina solamente durante la fase di crescita attiva. Tuttavia, è stato osservato[26] che anche una popolazione batterica non proliferante può arrivare a produrre quantità significative d'istamina. Di conseguenza, la popolazione batterica del vino deve essere eliminata con pulizia e solfitazione non appena è stata completata la FML, specialmente nei vini a pH elevato.

Il metabolismo dei batteri indigeni può anche essere all'origine della comparsa di deviazioni organolettiche come l'odore di topo, variazioni del colore e malattia del filante.

IL CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

La prevenzione della FML

Se non si desidera la FML, la crescita dei batteri lattici nel mosto e/o nel vino deve essere evitata, rimuovendo o inattivando i batteri presenti. Anche se in certi casi la FML è difficile da indurre, impedire lo sviluppo dei batteri lattici presenta alcune difficoltà. L'aggiunta di 50-100 mg/L di solforosa al mosto, in base al pH, uccide più del 90% dei batteri viventi. L'effetto della SO_2 dipende dal pH del vino ed aumenta al diminuire dello stesso: in certi vini, quindi, è bene considerare la possibilità d'uso del lisozima, in combinazione o no alla solforosa. L'inibizione della FML deve essere impostata favorendo all'opposto tutti i fattori su cui si gioca per la sua induzione. Le regole per inibire la FML sono le seguenti:

- Macerazione minima;
- Basso pH;
- Basse temperature;
- Travasi e chiarifiche precoci.

L'induzione della FML

Le analisi chimiche e sensoriali hanno mostrato che i batteri lattici influenzano la qualità del vino non solo con la FML stessa, ma anche attraverso altre attività metaboliche. Se si desidera la malolattica e la produzione dei composti dell'aroma, l'enologo può incoraggiare la crescita dei batteri lattici mantenendo condizioni favorevoli al loro sviluppo: temperature adeguate, aggiunte minime o nulle di SO_2 e travasi ritardati. Un'altra tecnica è il taglio con altre masse che stanno svolgendo la FML.

Tuttavia, il sistema preferito e di maggior successo è l'inoculo del vino con una coltura di batteri malolattici, preparata in laboratorio oppure di tipo commerciale, o in alternativa il passaggio del vino in un letto di batteri malolattici immobilizzati attivi.

Vengono preferibilmente utilizzati ceppi di *Oenococcus oeni*, dal momento che sono in grado di crescere in vino a basso pH e sanno degradare l'acido malico senza produrre composti sensorialmente o igienicamente negativi. Inoltre, essi non degradano composti del vino importanti per la qualità, ad esempio acido tartarico, etanolo e glicerina[19].

La crescita di *Oenococcus oeni* sarà lenta a valori di pH inferiori a 3,1 e, secondo gli altri fattori di inibizione della crescita e l'iniziale densità di popolazione, l'avvio ed il completamento della FML possono essere notevolmente ritardati. Nelle condizioni più favorevoli di pH elevati e buone condizioni di crescita, *Lactobacillus* e *Pediococcus* possono condurre la FML. È opinione comune[27] che queste specie portano alla produzione di vini meno accettabili rispetto a quelli in cui ha sviluppato *Oenococcus oeni*. In alcuni vini, una FML che non si avvia può essere aiutata inoculando con un vino già in fermentazione. Il principale svantaggio di questa pratica è che bisogna avere a disposizione un vino adatto, e che i batteri che si sono sviluppati nel vino usato per l'inoculo non sempre si adattano a crescere nel vino inoculato. Ancora più importante, le caratteristiche di questi batteri non sono ben note.

La sempre maggiore consapevolezza dell'influenza della FML sulla qualità del vino ha portato gli enologi a cercare un migliore controllo sull'avvio e sullo svolgimento della stessa. L'inoculo con determinate colture starter, selezionate accuratamente dalla natura, riduce il rischio di contaminazione da parte di batteri lattici e/o batteriofagi, assicurando in questo modo un avvio rapido della FML ed una migliore gestione della produzione di composti aromaticamente rilevanti e sul gusto del vino[28].

Sono state messe a punto numerose colture starter di batteri malolattici, la maggior parte delle quali sono liofilizzate o congelate, sebbene restino ancora disponibili sul mercato colture liquide. Questi ceppi sono stati selezionati a partire da fermentazioni malolattiche spontanee, sulla base delle loro buone cinetiche, del loro comportamento in condizioni difficili, e della loro capacità di conferire caratteri organolettici positivi. Essi possono tollerare le condizioni di difficile crescita e sopravvivenza di certi vini e non producono metaboliti pericolosi. Non generano composti che conferiscono al vino note negative, ed al contrario sono

dotati della capacità di apportare caratteri favorevoli.

Nel passato, la maggior parte delle colture starter richiedevano una fase di acclimatazione/riattivazione in condizioni controllate[29]. Comunemente la riattivazione aveniva in mosto d'uva senza solforosa, diluito 1:1 con acqua e/o vino. Il pH del mosto diluito veniva aggiustato a pH 3,6 o superiore, e venivano aggiunti nutrienti a concentrazioni di 0,05% p/v. La riattivazione normalmente richiedeva almeno 24 ore, e per evitare shock termici l'incubazione avveniva ad una temperatura che non differiva più di 10°C da quella del vino a cui la coltura starter era destinata.

Recentemente, sono diventate disponibili colture starter di batteri da inoculare direttamente al vino. Queste colture ad inoculo diretto sono pre-acclimatate durante la loro produzione industriale, in modo da sopravvivere alle ostili condizioni ambientali senza una riduzione drastica del numero di cellule viventi e quindi dell'attività malolattica. Tali preparazioni batteriche possono essere aggiunte direttamente al vino, oppure possono essere preventivamente reidratate in acqua per un breve periodo. La fase di reidratazione permette una distribuzione più uniforme dei batteri aggiunti al vino.

I batteri malolattici possono essere inoculati durante le seguenti fasi della fermentazione alcolica

- Simultaneamente all'inoculo dei lieviti;
- Durante la fermentazione alcolica;
- Verso la fine della fermentazione alcolica;
- Dopo la fermentazione alcolica.

Quale sia il miglior momento per l'inoculo dei batteri lattici è ancora argomento di discussione. Secondo il punto di vista dei francesi di Bordeaux, è raccomandabile inoculare i batteri malolattici solo dopo il completamento della fermentazione alcolica, per evitare il rischio di produzione di acido acetico e di acido D-lattico, fenomeno descritto come "spunto lattico"[30]. La FML che si svolge durante la fermentazione alcolica può occasionalmente portare ad un arresto di fermentazione. Non tutti i ricercatori hanno confermato le preoccupazioni francesi rispetto allo sviluppo di elevate concentrazioni di acido acetico, all'antagonismo con i lieviti o agli arresti di fermentazione che sono stati associati allo sviluppo precoce dei batteri lattici.

L'inoculo simultaneo lieviti-batteri è promosso da coloro che credono che i batteri abbiano migliori opportunità di crescita ed acclimatazione in assenza di alcool.

Per controllare con successo il processo di vinificazione, è importante capire i meccanismi che regolano la crescita ed il metabolismo dei batteri malolattici nel vino. È importante scegliere i ceppi batterici più adatti ed il migliore momento per l'inoculo, in modo da assicurarsi che il giusto ceppo di batteri malolattici domini la FML e che questa si completi entro i termini temporali previsti (Fig. 2)

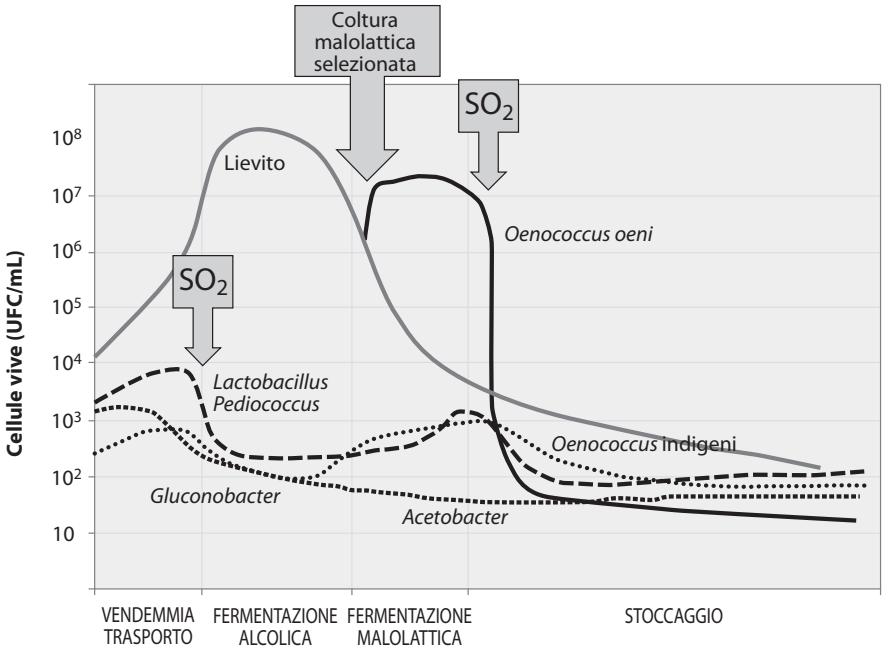


Figura 2. Fermentazione malolattica controllata

BIBLIOGRAFIA

1. von Babo, Freiherr. 1837. Die Mängel und Krankheiten des Weines und deren Verbesserung. In: *Kurze Belehrung über die zweckmäßige Behandlungsart der eingekellerten Weine.* Heidelberg. 59-73.

2. Pasteur, L. 1866. *Études sur le vin*. Paris.

3. Müller-Thurgau, H. 1891. Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem Gebiet der Weinbereitung. *Weinbau und Weinhandel*. 9:421-428.

4. Koch, A. 1898. Über die säureverzehrenden Organismen des Weines. *Weinbau und Weinhandel*. 16:243-245.

5. Seiffert, W. 1901. Über die Säureabnahme im Wein und den stattfindenden Gärprozess. Z. F. Landwirtschaftl. *Versuchswesen Österr*. 4:980-992.

6. Müller-Thurgau, H., and A. Osterwalder. 1913. Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. *Zbl. Bakteriologie II*. 36:129-338.

7. Lüthi, H., and U. Vetsch. 1959. Beiträge zur Kenntnis des biologischen Säuerabbaus in unvergoreenen und vergorenen Obst- und Traubensäften. *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau.* 8:1-8.

8. Radler, F. 1963. Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. *Vitis*. 3:207-236.

9. Peynaud, E., and S. Domercq. 1961. Étude sur les bacteriés lactiques du vin. *Ann. Technol. Agric*. 10:43-60

10. Beelman, R. B., F. J. McArdle, and G. R. Duke. 1980. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML34 and PSU-1 to induce malolactic fermentation in Pennsylvania red table wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 31:269-276.

11. Kunkee, R. E. 1967. Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol*. 9:235-279.

12. Radler, F. 1958. Untersuchung des biologischen Säureabbaus in Wein. III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Microbiol*. 31:224-230.

13. Vaughn, R. H., and A. Techlistcheff. 1957. Studies of the malolactic fermentation of California table wines. I. An introduction to the problem. *Am. J. Enol. Vitic*. 8:74-79.

14. Dicks, L. M. T., F. Dellaglio, and M. D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* gen., comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 45:395-397.

15. Webb, R. B., and J. L. Ingraham. 1960. Induced malolactic fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 11:59-63.

16. Peynaud, E., and S. Domercq. 1959. Possibilité de provoquer la fermentation malolactique à l'aide de bactéries cultivées. *C. R. Acad. Agric. France*. 45:355-358.

17. Wibowo, D., R. Eschenbruch, D. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic*. 36:302-313.

18. Peynaud, E. 1967. Recent studies on the lactic acid bacteria of wine. *2e Symp. Int. Oenol., Bordeaux-Cognac*. 13-17 June 1967, INRA (Ed.) Paris.

19. Henick-Kling, T. 1988. Yeast and bacterial control in winemaking. In: Linskens, H. F. and J. F. Jackson (Eds). *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 6*, Springer Verlag. 296-316.

20. Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, and A. Lonvaud. 2000. *Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. Chapter 6: Lactic acid bacteria development in wine. 161-167.

21. Costello, P. J., G. J. Morrison, T. H. Lee, and G. H. Fleet. 1985. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust*. 35:14-18.

22. Davis, C. R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H. Lee, and G. H. Fleet. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic*. 36:290-301.

23. Henick-Kling, T. 1993. Malolactic fermentation. In: Fleet, G. H. (Ed). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Taylor & Francis Inc, New York. 289-326.

24. Meunier, J. M., and E. W. Bott. 1979. Das Verhalten verschiedener Aromastoffe in Burgunderweinen im Verlauf des biologischen Säureabbaus. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm*. 6:92-95.

25. Henick-Kling, T., T. Acree, B. K. Gavitt, S. A. Krieger, and M. H. Laurent. 1992. Sensory aspects of malolactic fermentation. In: *Proceedings of the Eighth Australian Wine Industry Technical Conference*. 148-152.

26. Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett*. 199:9-13.

27. Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, and P. Sudraud. 1975. *Sciences et Techniques du vin. Traité d'œnologie (Tome 2)*. Dunod, Paris.

28. Bauer, R., and L. M. T. Dicks. 2004. Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 25/2:74-88.

29. Krieger, S. A. 1993. The use of active dry malolactic starter cultures. Proceedings of a seminar of the Australian Society of Viticulture and Oenology, July 1992. *Wine Industry Journal*. February:56-62.

30. Lafon-Lafourcade, S. 1983. Wine and brandy. In: *Biotechnology. Vol. 5*. Rehm, H. J. and G. Reed (Eds). Verlag Chemie, Weinheim. 81-163.

31. Gerbaux, V. Personal communication.

IL BIOCHIMISMO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

DR. PETER COSTELLO

Il termine fermentazione malolattica (FML) descrive la conversione enzimatica dell'acido L–malico in acido L-lattico e CO_2, da parte delle cellule di batteri lattici, a seguito della loro crescita[57]. Questa reazione di disacidificazione biologica è considerata una delle principali capacità metaboliche dei batteri lattici, e la sua gestione è di rilevante importanza nella produzione di vino. Oltre alla reazione di disacidificazione che caratterizza la FML, diventa sempre più evidente che esiste una serie di altre attività metaboliche associate alla crescita ed allo sviluppo dei batteri lattici nel vino, che possono avere un'influenza importante sulla qualità finale dello stesso. In questa sezione, vengono descritte le principali caratteristiche metaboliche dei batteri lattici, con particolare enfasi alla FML, così come le altre reazioni metaboliche che possono avere effetti sulle caratteristiche del vino.

PROPRIETÀ METABOLICHE GENERALI DEI BATTERI LATTICI

I batteri lattici costituiscono un gruppo ubiquitario di batteri che si trova in un'ampia gamma di ambienti, compresi molti alimenti e bevande. Questi batteri sono prima di tutto caratterizzati dalla loro capacità di produrre acido lattico a partire da una fonte di carboidrati fermentescibili. Non avendo citocromi con gruppo eme ed attività catalasi, i batteri lattici ottengono energia dai carboidrati attraverso un metabolismo fermentativo[28].

I batteri lattici possono essere sommariamente classificati in omofermentativi ed eterofermentativi, in base al tipo di sottoprodotti che vengono prodotti dalla fermentazione del glucosio.

I batteri lattici omofermentativi, inclusi i pediococchi ed alcuni dei lattobacilli, utilizzano il percorso glicolitico di Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) per convertire gli zuccheri esosi – glucosio – principalmente in acido lattico. In questa catena metabolica, per ogni mole di glucosio si producono due moli di acido lattico e due di ATP. D'altra parte, i lattobacilli eterofermentativi ed i leuconostoc non possiedono alcuni enzimi chiave della via metabolica EMP e fermentano gli esosi attraverso la fosfochetolasi. In questo percorso, da una mole di glucosio vengono prodotte quantità equimolari di acido lattico, CO_2, ed acido acetico o etanolo, con concomitante guadagno di una mole di ATP. Il potenziale ossido-riduttivo (redox) del sistema modifica il rapporto

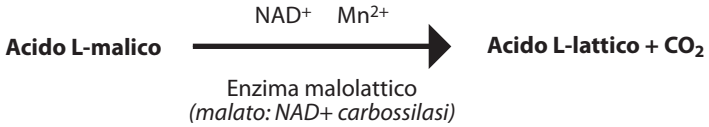
selezionati dalla natura
LALLEMAND

tra le quantità di etanolo ed acetato prodotte: in condizioni aerobiche viene favorita la produzione di acido acetico, in condizioni anaerobiche si produce preferibilmente etanolo[28, 10]. Secondo la specie ed il genere di batteri lattici coinvolti, gli isomeri dell'acido lattico prodotti dalla fermentazione dei carboidrati possono essere L(+), D(-), oppure una combinazione delle due forme[28, 8]. Per esempio i *Leuconostoc*, incluso *Oenococcus oeni*, producono l'isomero D(-) dell'acido lattico dalla fermentazione degli zuccheri esosi, mentre dalla decarbossilazione dell'acido L(-)-malico nella fermentazione malolattica formano solamente l'isomero L(+) dell'acido lattico (Fig. 1). In generale, il gruppo dei batteri lattici può utilizzare una vasta gamma di carboidrati, tra cui gli esosi (glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio), i pentosi, i polioli ed gli oligosaccaridi. Questa loro capacità è dipendente dalla specie e dal ceppo, ed è anche influenzata dal pH del mezzo. Inoltre, dal momento che l'acido malico non può essere utilizzato come unica fonte di carboidrati dai batteri lattici del vino (vedi oltre), la disponibilità e l'utilizzazione dei carboidrati fermentescibili nel vino è essenziale per permettere l'avvio della crescita batterica e lo svolgimento della FML. Studi recenti hanno dimostrato chiaramente che i glicosidi derivati dai composti fenolici hanno un effetto stimolante significativo sulla crescita di *Oenococcus oeni* in un vino sintetico.

CONVERSIONE MALOLATTICA – LA REAZIONE DI DISACIDIFICAZIONE

Globalmente sono stati proposti tre diversi percorsi metabolici per la degradazione dell'acido L-malico in acido L-lattico operata dai batteri lattici durante la FML. La prima coinvolge l'attività di tre enzimi distinti (malato deidrogenasi, ossalacetato decarbossilasi e L-lattato deidrogenasi) e procede attraverso gli acidi intermedi ossalacetico e piruvico. Un secondo meccanismo parte dall'acido piruvico ed utilizza una combinazione di enzima malico e di lattato deidrogenasi. Solamente negli anni '70 sono state completamente chiarite le basi enzimatiche del metabolismo dei batteri lattici del vino, e specificatamente nel ceppo di *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) ML34, da Kunkee e Morenzoni[31, 40] Questo lavoro ha messo in evidenza l'esistenza di un singolo enzima, comunemente noto come "enzima malolattico" che possiede due separate attività enzimatiche che agiscono simultaneamente sull'acido L-malico. L'attività "malolattica" predominante dell'enzima (malato:NAD+ carbossilasi) catalizza la conversione diretta (decarbossilazione) dell'acido dicarbossilico L-malico nel monocarbossilico L-lattico, e richiede NAD e Mn^{+2} come co-fattori:

Figura 1. Fermentazione malolattica



L'enzima malolattico di *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) ha un peso molecolare di 138.000 ed è costituito da due subunità identiche, ognuna con massa molecolare di 65 500[32].

RUOLO ENERGETICO E BIOLOGICO

Negli ultimi decenni sono stati effettuati numerosi studi riguardanti l'apparentemente oscuro beneficio della conversione malolattica per la cellula batterica. Normalmente l'avvio della FML in vino avviene dopo che i batteri lattici si sono moltiplicati fino a superare la popolazione di circa 10^6 UFC/ml. Sebbene si produca una disacidificazione e conseguentemente un aumento del pH di circa 0,2 unità, la conversione malolattica appare di per sé energicamente sfavorevole per i batteri lattici. Essa produce scarse quantità di energia (ΔG = -8,3 kJ/mole), non prevede la formazione di intermedi metabolici e non si produce energia biologicamente disponibile sotto forma di ATP. Inoltre, sebbene il NAD sia un co-fattore essenziale, esso non svolge funzioni di ossidazione/riduzione e non si verifica nessun cambiamento dello stato redox[43, 50, 32, 24, 8]. In termini generali, la FML non è una vera fermentazione. Oltre a produrre quantità infinitesime di energia, non fornisce una fonte di carbonio per le reazioni biosintetiche essenziali per lo sviluppo cellulare. Tuttavia, la presenza e l'utilizzazione dell'acido malico ha un effetto evidente

di stimolazione della crescita iniziale dei batteri malolattici, non completamente spiegato dall'aumento del pH che si produce con l'avanzare della FML.[43, 50, 8]

Sebbene la conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico operata dall'enzima malolattico sia energicamente sfavorevole, è stato dimostrato che la FML genera energia per la cellula sotto forma di ATP. Esso viene prodotto attraverso un meccanismo chemiosmotico che genera un gradiente protonico (Δp) attraverso la membrana cellulare. In questo modello, la FML si svolge in tre fasi. Nella prima, l'entrata dell'acido L-malico nella cellula batterica è facilitata da uno specifico enzima di trasporto. Nel secondo passaggio, l'acido L-malico è decarbossilato nella cellula dall'enzima malolattico producendo acido L-lattico e CO_2 che aumenta il pH intracellulare. Nella fase finale, l'acido L-lattico e la CO_2 sono espulsi dalla cellula: per ogni molecola di acido L-lattico che esce dalla cellula, un protone viene traslocato al suo interno. In questo modo si stabilisce un gradiente protonico tra il mezzo in cui vive la cellula ed il citoplasma cellulare. Tale gradiente, in combinazione con una ATPasi specifica situata nella membrana cellulare, facilita la formazione di energia disponibile per il processo di trasporto, sotto forma di ATP. La sintesi di una molecola di ATP necessita l'entrata di tre protoni attraverso la ATPasi di membrana.[13, 14, 24, 25, 54]

L'acido malico e citrico non rappresentano l'unica fonte di energia per la crescita del batteri lattici [35]. I batteri malolattici hanno bisogno di zuccheri come fonte di carbonio. Tuttavia, in condizioni di scarsità di zuccheri e di basso pH, che inibisce il metabolismo degli zuccheri, l'energia (ATP) generata dalla FML rappresenta un beneficio importante alla crescita cellulare[24]. è stato suggerito che anche un'altra attività dell'enzima malolattico possa contribuire in modo minoritario (<1%) ad aiutare la crescita dei batteri malolattici. Questa reazione secondaria dell'enzima malolattico[40] catalizza la seguente reazione :

Si pensa che le piccole quantità di acido piruvico e $NADH_2$ prodotte da questa attività secondaria possano stimolare gli stadi



iniziali del metabolismo del glucosio e quindi l'avvio della crescita cellulare fornendo accettori di idrogeno[32, 8].

In aggiunta al ruolo dei batteri malolattici nello svolgimento della FML, alcuni lieviti, tra cui *Schizosaccharomyces pombe*, sono in grado di catabolizzare l'acido malico, anche se questo metabolismo non è una vera fermentazione dal momento che l'acido malico viene trasformato in etanolo[39, 7]. Nonostante la sua potenzialità nella disacificazione del vino, sono stati rivelati effetti collaterali dell'uso di lieviti maloalcolici appartenenti alle specie *Schizosaccharomyces* spp. , tra cui la formazione di composti indesiderati come l'idrogeno solforato.[7, 21, 47,52, 16]

EFFETTI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA SULLA COMPOSIZIONE E SULLA QUALITÀ DEL VINO

• Riduzione dell'acidità

Per ogni molecola di acido L-malico trasformato nell'acido più debole L-lattico attraverso la FML, si verifica una perdita stechiometrica di un gruppo carbossilico ed una corrispondente riduzione dell'acidità del vino. L'entità di tale riduzione dipende, oltre che dalla concentrazione iniziale in acido malico, dal potere tampone del vino e dal pH originale8. In generale, il decremento generale dell'acidità del vino che ci si può attendere dalla FML varia dallo 0,1 allo 0,3%, ed il pH può aumentare di 0,1-0,3 unità[16].

I vini prodotti da uve coltivate in aree viticole a clima freddo contengono naturalmente acido malico fino a 8 g/L e la FML è considerata benefica per la conseguente riduzione dell'acidità. D'altra parte, i vini prodotti in regioni calde hanno un'acidità minore (5,0-6,5 g/L), ed un'ulteriore riduzione dell'acidità da parte della FML può risultare negativa per la qualità, portando a vini a gusto piatto e con una eccessiva predisposizione alla contaminazione microbica[48]. Ciò nonostante, la FML può essere desiderata anche in questi vini per conferire maggiore stabilità microbiologica oppure per ottenere una più ampia complessità aromatica, magari acidificando successivamente per raggiungere un livello di acidità e pH accettabili. L'aumento del pH, in seguito alla FML, può anche influire sul colore dei vini.

• Cambiamenti del profilo aromatico

Sebbene ci sia stata discussione sul contributo della FML alle proprietà sensoriale del vino[16], le più recenti ricerche hanno fornito maggiori chiarimenti sui cambiamenti specifici associati alla crescita ed alla attività metabolica dei batteri malolattici nel vino. È chiaro che ceppi diversi di batteri possono aumentare o ridurre l'intensità di certi aromi o gusti del vino, e che tali variazioni sono ceppo-dipendenti[2]. Oltre alla disacidificazione, l'apporto organolettico della FML può essere descritto con note di burrato, lattico, frutta secca, di lievito, di legno, animale e terroso. La FML può anche modificare gli aromi fruttati e vegetali, così come la sensazione gustativa del vino[24, 26, 33]. I meccanismi attraverso i quali i batteri possono influenzare l'aroma del vino comprendono la rimozione degli aromi esistenti tramite metabolizzazione ed assorbimento da parte della parete cellulare, la produzione di nuovi composti da parte dei batteri a partire dal metabolismo degli zuccheri, degli amminoacidi o altri substrati, e le modifiche dei metaboliti secondari dei lieviti che hanno impatto sensoriale più o meno importante[2].

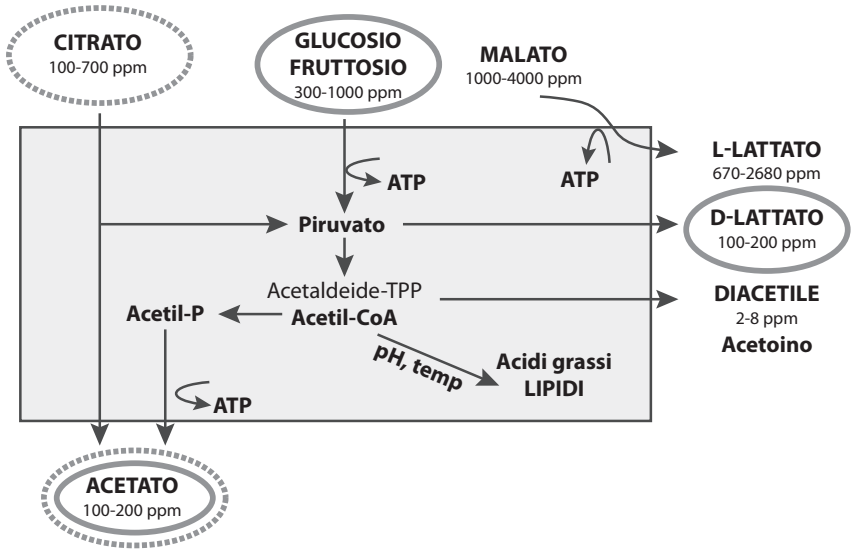
È bene precisare che l'impatto della FML sulle proprietà sensoriali del vino dipende da diversi fattori, come le caratteristiche del ceppo, l'intensità dell'aroma varietale e le tecniche di vinificazione impiegate[25]. Nei paragrafi successivi verranno citate alcune delle sostanze aromaticamente attive associate con il metabolismo dei batteri lattici nel vino.

PRODUZIONE DI DIACETILE – METABOLISMO DELL'ACIDO CITRICO

I batteri lattici sono ben noti per la loro capacità di produrre diacetile (2,3-butendione), un dichetone intensamente aromatico che impartisce note di burrato e frutta secca. Il diacetile può essere prodotto dai lieviti durante la fermentazione alcolica in piccole quantità (0,2-0,3 mg/L), ma il successivo incremento in diacetile del vino è tipicamente associato alla crescita dei batteri lattici della FML[33, 38, 16, 3]. La soglia organolettica del diacetile nel vino è bassa, nell'ordine di 0,2-2,3 mg/L, e dipende dal tipo di vino[38]. La produzione di basse quantità di diacetile, da 1 a 4 mg/L secondo lo stile ed il tipo di vino, contribuisce alla complessità organolettica conferendo note burrate considerate positive; tuttavia, quando la presenza di diacetile supera i 5-7 mg/L, il contributo aromatico può essere eccessivo e considerato una contaminazione[49, 16].

Il diacetile è prodotto da *Oenococcus oeni* come intermedio nel metabolismo dell'acido citrico. In questo percorso metabolico l'acido piruvico è decarbossilato a diacetile in condizioni riduttive. Dal momento che il diacetile è chimicamente instabile, esso può essere ulteriormente ridotto, da cellule attive di *Oenococcus oeni* o dai lieviti, in prodotti finali con minore impatto aromatico, il cheto-alcool acetoino e il diolo 2,3-butanediolo[46, 3,6]. Oltre che all'acido citrico, il metabolismo del diacetile nei batteri lattici è strettamente associato al metabolismo degli zuccheri, come mostrato nella Fig.2.

Figura 2. Metabolismo dei batteri lattici eterofermentativi[29]



I batteri lattici non possono crescere con acido citrico come unica fonte di carbonio[35], ma il co-metabolismo di glucosio ed acido citrico da parte di batteri come *Oenococcus oeni* migliora lo sviluppo cellulare ed è energicamente più favorevole della crescita su solo glucosio[9, 45]. In *Oenococcus oeni*, questo effetto positivo è stato attribuito ad una maggiore sintesi di ATP dovuta alla forza chemiosmotica proton-motrice. Inoltre, il co-metabolismo dell'acido citrico e del glucosio aumenta lo spettro dei prodotti finali del metabolismo, che include la formazione di 2,3-butandiolo ed una maggiore produzione di acido acetico[45]. L'aumento della concentrazione in acido acetico associato al metabolismo dell'acido citrico dipende dalla sua concentrazione iniziale , ma normalmente può essere di 0,1-0,2 g/L. Durante la FML, la massima produzione di diacetile generalmente coincide con la completa degradazione dell'acido L-malico e con il successivo catabolismo del citrato[41, 4, 3].

La produzione di diacetile è influenzata da una vasta gamma di fattori microbiologici, ambientali e tecnologici. In aggiunta al ceppo batterico coinvolto, molti altri fattori legati alla vinificazione possono avere un impatto significativo sul contenuto in diacetile: il tipo di vino, il contatto con le fecce di lievito e di batteri, il tempo necessario a completare la FML, il contatto con l'aria durante la FML, l'aggiunta di solforosa, la concentrazione in acido citrico e in zuccheri fermentescibili, la temperatura ed il pH[38, 3]. Un vino con elevato contenuto in diacetile si ottiene usando un ceppo di batteri con alto potenziale produttivo, riducendo il livello d'inoculo dei batteri, con bassi temperatura e pH, abbreviando il contatto con le fecce di lieviti e di batteri, in condizioni di potenziale redox maggiore, e stabilizzando il vino immediatamente dopo la scomparsa degli acidi malico e citrico. Al contrario, l'uso di un ceppo batterico neutro, elevate popolazioni d'inoculo, basso potenziale redox e contatto prolungato con le fecce, sono tutti fattori che tendono a ridurre il contenuto finale in diacetile nel vino[38, 4, 3].

EFFETTI SULLE SENSAZIONI GUSTATIVE

Esistono molte evidenze sulla capacità della FML di migliorare le sensazioni gustative o il corpo del vino[26, 4]. In aggiunta, in recenti ricerche condotte sugli effetti gustativi della FML in un vino Chardonnay[30], un panel addestrato di assaggiatori ha mostrato che la FML non solo modifica l'acidità percepita e le sensazioni tattili legati all'acidità, compresa l'intensità del "pucker", ma che aumenta anche la percezione di attributi come velluto e riduce quella di saponoso. Da questo stesso studio emerge anche che è possibile ottenere uno specifico "profilo gustativo" impiegando uno specifico ceppo di batteri lattici. Sebbene sia stato osservato che questi effetti gustativi possano essere associati alla biosintesi di polimeri esocellulari come i polisaccaridi, c'è scarsità di risultati scientifici su questa area del metabolismo batterico, in particolare se riferito a *Oenococcus oeni*. Questo metabolismo potrebbe essere legato alla produzione di glucani, come accade in certe specie di *Pediococcus* responsabili del "filante"[36]. È possibile anche che alcuni polisaccaridi del vino siano metabolizzati dalle attività β-glucanasi di *Oenococcus oeni*[23], alterando così le proprietà gustative del vino. Inoltre, la FML può avere un impatto sulle sensazioni di astringenza del vino: essa infatti può aumentare la condensazione di antociani con tannini, processo che porta alla riduzione dell'astringenza e che influisce anche sul colore del vino rosso[56]. Riassumendo, le interazioni metaboliche dei batteri lattici del vino con i composti fenolici ed i polisaccaridi, ed il conseguente impatto sulle sensazioni gustative, sono un fenomeno molto complesso ed altamente dipendente dal ceppo batterico, dalla composizione del vino e dalle condizioni ambientali.

AROMA FRUTTATO E VEGETALE

L'aroma fruttato del vino non viene necessariamente ridotto dalla FML, ed in certi casi è addirittura esaltato. È stato dimostrato che durante la FML i batteri lattici del vino possono produrre alcuni esteri, come l'etil-lattato[19] e l'isoamilacetato[33], ma non è sicuro che questa proprietà possa essere all'origine dell'aumento degli aromi fruttati. D'altra parte, l'attività esterasi dei batteri lattici[17] può potenzialmente alterare il profilo aromatico del vino durante la FML. È interessante notare che l'aumento delle sensazioni di fruttato con la FML è stato associato alla riduzione delle note vegetali[26, 30]. La riduzione di diversi odori vegetali in Chardonnay è stato correlato con la rimozione di odori di urina e aglio cotto legati alla presenza di 1-ottanolo e 1-otten-3-olo[33].

AZIONE GLICOSIDASICA

I precursori glicosidati e non volatili originari dell'uva sono una potenziale fonte di composti che intervengono nel profilo sensoriale del vino. L'idrolisi di questi precursori glucosidi ad opera degli enzimi β-glucosidasici può potenzialmente liberare agliconi volatili, come i norisoprenoidi, i monoterpeni e gli alifatici[5]. Recentemente è stata dimostrata la presenza di attività glicosidica in alcuni ceppi di *Oenococcus oeni*[37, 1, 5, 15], in grado di liberare composti volatili da autentici precursori contenuti in un estratto di glucosidi da Chardonnay durante la FML, come il 3-idrossidamascone, l'alfa-terpineolo, la vanillina, il metil-vanillato, l'acido 4-idrossibenzoico ed il tirosolo, oltre ai terpenoli linaiolo, alfa-terpineolo, neroli e geraniolo da estratti glicosidici di Moscato[58]. Questi risultati suggeriscono che l'attività glicosidasica di *Oenococcus oeni* e la conseguente liberazione di composti dell'aroma possono portare a modifiche delle caratteristiche sensoriali del vino.

ACETALDEIDE ED ALTRI CARBONILI

Prodotto principalmente dal metabolismo dei lieviti, l'acetaldeide è l'aldeide quantitativamente più abbondante nel vino ed ha un ruolo importante nell'invecchiamento, nella stabilità del colore e nelle caratteristiche sensoriali[4, 34]. Le proprietà sensoriali dell'acetaldeide sono normalmente associate alla mela ed allo sherry. Durante la FML la concentrazione di acetaldeide, come quella di altri carbonili, generalmente diminuisce[27, 41]. Alcuni ceppi di *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus* hanno la capacità di metabolizzare acetaldeide libera o legata alla solforosa, trasformandola in acido acetico e etanolo[42]. La diminuzione del contenuto in acetaldeide del vino può avere effetti sul suo colore. Inoltre la degradazione dell'acetaldeide legata alla solforosa può incrementare la presenza di SO_2 libera a livelli sufficienti ad inibire i batteri più sensibili all'antisettico, portando a malolattiche arrestate o rallentate[42, 4].

Ci sono altri composti carbonilici che possono essere potenzialmente metabolizzati dai batteri lattici del vino. Ad esempio, il sistema redox gliossale/glicoladeide sembra poter portare alla riduzione del dicarbonile gliossale da parte di *Oenococcus oeni*, formando glicolaldeide che può indurre l'imbrunimento delle (+)-catechine nei vini bianchi[20].

EFFETTI DELLA FML SUL COLORE DEI VINI ROSSI

È noto che la FML nei vini rossi può ridurre l'intensità del colore, e che sono numerosi i fattori associati a questo fenomeno. Per esempio l'aumento del pH, che è conseguenza della FML, può modificare l'equilibrio pH-dipendente dei pigmenti antocianici, e risultare in una certa perdita di colore rosso[8]. Anche l'attività glicosidasica dei batteri malolattici può giocare un ruolo: gli antociani glicosidati possono essere attaccati dagli enzimi glicosidici (antocianasi) di *Oenococcus oeni* ed il glucosio liberato attraverso questa reazione può fungere da fonte di energia per i batteri stessi, aiutando lo svolgimento della FML. La riduzione del colore nei vini rossi può essere dovuta alla precipitazione delle molecole libere di antociani con polisaccaridi[55, 4]. Lo svolgimento della FML può inoltre provocare un incremento nella condensazioni di antociani e tannini, fenomeno che è stato dimostrato essere legato al colore del vino e alle sensazioni d'astringenza[56]. Infine il metabolismo dei carbonili come l'acetaldeide può avere una certa influenza sull'equilibrio e sulla stabilità del colore rosso dei vini.

FERMENTAZIONE MALOLATTICA E INFLUENZA DEL LEGNO

Oltre ad interagire con i composti derivati dall'uva e dal lievito, i batteri lattici possono svolgere attività metaboliche nei confronti delle componenti del legno. Quando la FML viene condotta in barrique, si assiste a modifiche nella concentrazione di composti specificatamente associati al legno, come un aumento in whisky-lattone e vaniglia e, nel Sauvignon blanc, una riduzione dell'eugenolo[18]. Alla FML in barrique è stata anche associata una riduzione del furfurale[51]. Gli studi francesi hanno mostrato che, rispetto alle FML condotte in recipienti d'acciaio, l'attività batterica in barrique porta a modifiche nel profilo fenolico e nella composizione del colore dei vini rossi. In questo studio è emersa una chiara tendenza a preferire i vini con FML in barrique rispetto a quelli con FML in acciaio dal punto di vista sensoriale, anche quando questi ultimi erano stati affinati in legno dopo la FML. L'attività batterica in barrique porta generalmente a vini più morbidi, ricchi, con maggiore intensità aromatica e meno astringenti; essi normalmente hanno più colore dei corrispettivi vini che hanno avuto la FML in vasca[56].

AMMINOACIDI

Oltre a svolgere un ruolo nutrizionale importante nella crescita dei batteri lattici, gli amminoacidi possono essere metabolizzati in composti che influiscono sulle caratteristiche sensoriali di un vino. Un esempio è il metabolismo di un amminoacido, la metionina, che può essere metabolizzato dai batteri lattici del vino, compreso *Oenococcus oeni*, con la produzione di metantiolo, dimetilsolfuro, 3-(metilsolfanil)propan-1-olo e 3-(metilsolfanil)propionato, tutti composti solforati volatili[44].

Nel Merlot la FML aumenta in modo significativo la concentrazione di 3-(metilsolfanil)propionato, che viene associato ai sentori di cioccolato e tostato, anche se l'aggiunta di questo composto ad un Merlot in quantità superiori alla soglia di percezione provoca l'esaltazione degli aromi di frutta rossa e terroso[44]. D'altro lato, la degradazione di altri amminoacidi da parte dei batteri lattici (in particolare *Lactobacillus* spp), come l'ornitina e la lisina, provoca la formazione dei composti N-eterociclici 2-acetil-1-pirrolina e 2-acetiltetraidropiridina, che sono all'origine del difetto di "odore di topo"[12, 11]. I batteri lattici sono inoltre in grado di produrre amine biogene attraverso la decarbossilazione di specifici amminoacidi. Per un approfondimento di questo aspetto, vedere le sezioni "Storia dei batteri malolattici nel vino" e "Difetti organolettici derivanti da una fermentazione malolattica incontrollata".

ALTRE ATTIVITÀ METABOLICHE DEI BATTERI LATTICI DEL VINO

In aggiunta alle attività metaboliche sopra descritte, i batteri lattici del vino hanno la capacità di metabolizzare una vasta gamma di altri composti che possono avere effetti positivi o negativi sul profilo sensoriale del vino. Tra di essi si annoverano polioli, lipidi, amminoacidi e macromolecole come peptidi e proteine[2, 4, 34]. Sono molte le reazioni associate al metabolismo dei batteri lattici che possono dare origine a difetti come l'incremento di acidità fissa e volatile, la produzione di mannitolo, la sovrapproduzione di diacetile, la formazione di acroleina e la sintesi dell'odore di geranio[53]. La produzione di amine biogene e le altre reazioni che danno origine a difetti sono esaminate in maggiore dettaglio nella sezione "Difetti organolettici derivanti da una fermentazione malolattica incontrollata".

BIBLIOGRAFIA

1. Barbagallo, R., G. Spagna, R. Palmeri, and S. Torriani. 2004. Assessment of β-glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microbial Tech*. 34:292-296.

2. Bartowsky, E. J., and P. A. Henschke. 1995. Malolactic fermentation and wine flavour. *Aust. Grapegrower & Winemaker*. 378a:83-94.

3. Bartowsky, E. J., and P. A. Henschke. 2004. The "buttery" attribute of wine – diacetyl – desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol*. 96:235-252.

4 Bartowsky, E. J., P. Costello, and P. A. Henschke. 2002. Management of the malolactic fermentation – wine flavour manipulation. *Aust. & N.Z. Grapegrower & Winemaker*. 461a:7-8, 10-12.

5. Bartowsky, E. J., P. A. Henschke, P. B. Hoj, and I. S. Pretorius. 2004. Chasing wine aroma – does *Oenococcus oeni* have the potential to release aroma compounds from authentic grape precursors? *Aust. & N.Z. Wine Ind. J*. 19:24-31

6. Bauer, R., and L. M. T. Dicks. 2004. Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 25:74-88.

7. Bidan, P., J. P. Meyer, and A. Schaeffer. 1974. Les *Schizosaccharomyces* en œnologie. *Bull. OIV*. 523:682-706.

8. Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, and R. E. Kunkee. 1998. Malolactic fermentation. In: *Principles and practices of winemaking*. Chapman & Hall, Aspen Publishers, Maryland.

9. Cogan, T. M. 1987. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol*. 63:551-558.

10. Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev*. 46:269-280.

11. Costello, P. J., and P. A. Henschke. 2002. Mousy off-flavour of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Ag. Food Chem*. 50:7079-7087.

12. Costello, P. J., T. H. Lee, and P. A. Henschke. 2001. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. *Aust. J. Grape Wine Res*. 7:160-167.

13. Cox, D. J., and T. Henick-Kling. 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J. Appl. Bacteriol*. 171:5750-5752.

14. Cox, D. J., and T. Henick-Kling. 1990. A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic*. 41:215-218.

15. D'Incecco, N., E. J. Bartowsky, S. Kassara, A. Lante, P. Spettoli, and P. Henschke. 2004. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol*. 21:257-265.

16. Davis, C. R., D. Wibowo, T. H. Eschenbruch, and G. H. Fleet. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic*. 36:290-301.

17. Davis, C. R., D. Wibowo, G.H. Fleet, and T. H. Lee. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic*. 39:137-142.

18. de Revel, G., N. Martin, L. Pripis-Nicolau, A. Lonvaud-Funel, and A. Bertrand. 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem*. 47:4003-4008.

19. Dittrich, H. H. 1987. *Mikrobiologie des Weines. Handbuch der Lebensmitteltechnologie. 2nd edition*. Stuttgart: Ulmer.

20. Flamini, R., and A. D. Vedova. 2003. Glyoxal/Glycoaldehyde: A redox system involved in malolactic fermentation of wine. *J. Agric. Food Chem*. 51:2300-2303.

21. Gallander, J. F. 1977. Deacidification of Eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic*. 18:65-68.

22. Grimaldi, A., H. McLean, and V. Jiranek. 2000. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am J. Enol. Vitic*. 51:362-369.

23. Guilloux-Benatier, M., O. Pageault, A. Man, and M. Feuillat. 2000. Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25:193-197.

24. Henick-Kling, T. 1993. Malolactic fermentation. In: Fleet, G. H. (Ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, 289-326.

25. Henick-Kling, T. 1995. Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. Board, R. G., D. Jones, and B. Jarvis (Eds) *Microbial fermentations: beverages, foods and feeds.* Society for applied bacteriology symposium series No. 24. Blackwell Science. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement* 79:29S-37S.

26. Henick-Kling, T., T. E. Acree, S. A. Krieger, and M. H. Laurent. 1993. Sensory aspects of malolactic fermentation. Stockley, C. S., R. S. Johnston, P. A. Leske, and T. H. Lee (Eds) *Proceedings of the eighth Australian wine industry technical conference; 26-28 October 1992*, Melbourne, Vic, Winetitles, SA. 148-152.

27. Hood, A. 1983. Inhibition of growth of wine lactic-acid bacteria by acetaldehyde-bound sulphur dioxide. *Aust. Grapegrower & Winemaker*. 232:34-43.

28. Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49:209-224.

29. Krieger, S. A. 2005. *Proceedings of the 12th Internationales Symposium fuer Kellerwirtschaft*. Greece, 2005.

30. Krieger, S. A., T. Henick-Kling, U. Fischer, H.-P. Bach, and G. Pickering. 2004. Management of malolactic fermentation in white wine. *Proceedings of the 14th International Symposium for Enology and Viticulture Intervitis/Interfructa.* Stuttgart, Germany, 2004.

31. Kunkee, R. E. 1975. A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malo-lactic bacteria. In: Carr, J. G., C. V. Cutting and G. C. Whiting (Eds) *Lactic acid bacteria in beverages and food*. Academic Press, London. 29-42.

32. Kunkee, R. E. 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in winemaking. *FEMS Microbiol. Rev.* 88:55-72.

33. Laurent, M.-H., T. Henick-Kling, and T. E. Acree. 1994. Changes in the aroma and odour of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Vitic. Enol. Sci.* 49:3-10.

34. Liu, S.-Q. 2002. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 92:589-601.

35. Liu, S.-Q., C. R. Davis, and J. D. Brooks. 1995. Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:166-174.

36. Lonvaud-Funel, A., Y. Guilloux, and A. Joyeux. 1993. Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *J. Appl. Bacteriol.* 74:41-47.

37. Mansfield, A. K., B. W. Zoecklein, and R. S. Whiton. 2002. Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:303-307.

38. Martineau, B., T. Henick-Kling, and T. E. Acree. 1995. Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:385-388.

39. Mayer, K., and A. Temperli. 1963. The metabolism of L–malate and other compounds by *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch. Mikrobiol.* 46:321-328.

40. Morenzoni, R. 1974. The enzymology of malo-lactic fermentation. In: Webb, A. D. (Ed) *Chemistry of winemaking*. Adv. Chem. Ser. American Chemical Society, Washington, DC. 171-183.

41. Nielsen, J. C., and M. Richelieu. 1999. Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. 65:740-745.

42. Osborne, J. P., R. Mira de Orduna, G. J. Pilone, and S.-Q. Liu. 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* 191:51-55.

43. Pilone, G. J., and R. E. Kunkee. 1976. Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:405-408.

44. Pripis-Nicolau, L., G. de Revel, A.,Bertrand, and A. Lonvaud-Funel. 2004. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 96:1176-1184.

45. Ramos, A., and H. Santos. 1996. Citrate and sugar cofermentation in *Leuconostoc oenos*, a 13C nuclear magnetic resonance study. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2577-2585.

46. Ramos, A., J. S. Lolkema, W. N. Konings, and H. Santos. 1995. Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1303-1310.

47. Rankine, B. C. 1966. Decomposition of L-malic acid by wine yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 17:312-316.

48. Rankine, B. C. 1972. Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 23:152-158.

49. Rankine, B. C., J. C. M. Fornachon, and D. A. Bridson. 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis.* 8:129-134.

50. Renault, P., C. Gaillardin, and H. Heslot. 1988. Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:375-379.

51. Sefton, M. A., P. Spillman, K. F. Pocock, I. L. Francis, and P. J. Williams. 1993. The influence of oak origin, seasoning and other industry practices on the sensory characteristics and composition of oak extracts and barrel-aged white wines. *Aust. Grapegrower & Winemaker*. 355:17-25.

52. Snow, P. G., and J. F. Gallander. 1979. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic*. 30:45-48.

53. Sponholz, W. R. 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: Fleet, G. H. (Ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Switzerland: Harwood Academic Publishers. 395-420.

54. Versari, A., G. P. Parpinello, and M. Cattaneo. 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:447-455.

55. Vivas, N. M. Augustin, and A. Lonvaud-Funel. 1997a. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *J. Sci. Food Agric.* 80:1675-1678.

56. Vivas, N., A. Lonvaud-Funel, Y. Glories, and M. Augustin. 1997b. Effect of malolactic fermentation in barrels and tanks on red wine composition and quality. *Practical Winery and Vineyard*. May/June:68-77.

57. Wibowo, D. E, R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(4):302-313.

58. Ugliani, M., A. Genovese, and L. Moio. 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 51:5073-5078.

LA MICROBIOLOGIA DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

DR. CHRIS POWELL, DR. SYLVIE VAN ZANDYCKE E DR. RICHARD DEGRÉ

LA MICROFLORA DEL VINO

I batteri lattici sono normalmente presenti sulle uve, sulle foglie, nel terreno e sulla superficie delle attrezzature; essi possono svilupparsi su diversi substrati, tra cui il mosto d'uva. I batteri lattici più comuni appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*[15, 21]. Questi batteri sono in genere microaerofili, necessitano di carboidrati, e devono trovare disponibilità di amminoacidi e vitamine per potere svilupparsi[43, 75]. Normalmente i batteri lattici si ritrovano nei mosti in popolazioni di circa 10^4 cellule per ml. La maggioranza di essi non tollerano i cambiamenti delle condizioni ambientali associati al processo di vinificazione e scompaiono durante la fermentazione alcolica. Tuttavia, molte specie sono in grado di sopravvivere e tra di esse in particolare

Oenococcus oeni, che può sopportare la fermentazione alcolica[54] ed è spesso presente in vini con pH inferiore a 3,5. I vini con pH superiore a 3,5 possono ospitare una più vasta gamma di specie batteriche, tra cui *Lactobacillus brevis*[73, 20, 60, 13, 70, 17, 26], *Lactobacillus buchneriì*[73, 20, 60, 70], *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*[73], *Lactobacillus fructivorans*[3, 26], *Lactobacillus hilgardii*[73, 20, 17, 26], *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus kunkeei*[25], *Lactobacillus nageliì*[24], *Lactobacillus plantarum*[75, 26, 7], *Lactobacillus sakei*[44], *Lactobacillus desidiosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus* (prima *Pediococcus cerevisiae*), *Pediococcus pentosaceus*[75, 22, 31, 37, 7], *Leuconostoc mesenteroides*[49, 53, 68], *Leuconostoc gracile*[67] e *Oenococcus oeni*[49, 75, 18, 31, 68].

Indipendentemente dalla specie batterica, l'importanza di questi microrganismi nel vino è legata alla loro capacità di condurre la fermentazione malolattica (FML), caratterizzata dalla degradazione dell'acido L-malico in acido L-lattico e CO_2, un processo che riduce l'acidità del vino[15, 52, 66]. La FML non rappresenta tuttavia solamente un processo biologico di disacidificazione: essa esercita anche un impatto importante sulle caratteristiche organolettiche del vino. Questo effetto sensoriale può essere positivo o negativo, secondo la specie e, più precisamente, il ceppo batterico impiegato per condurre la FML. Per informazioni di maggior dettaglio, consultare la rassegna di Liu[52].

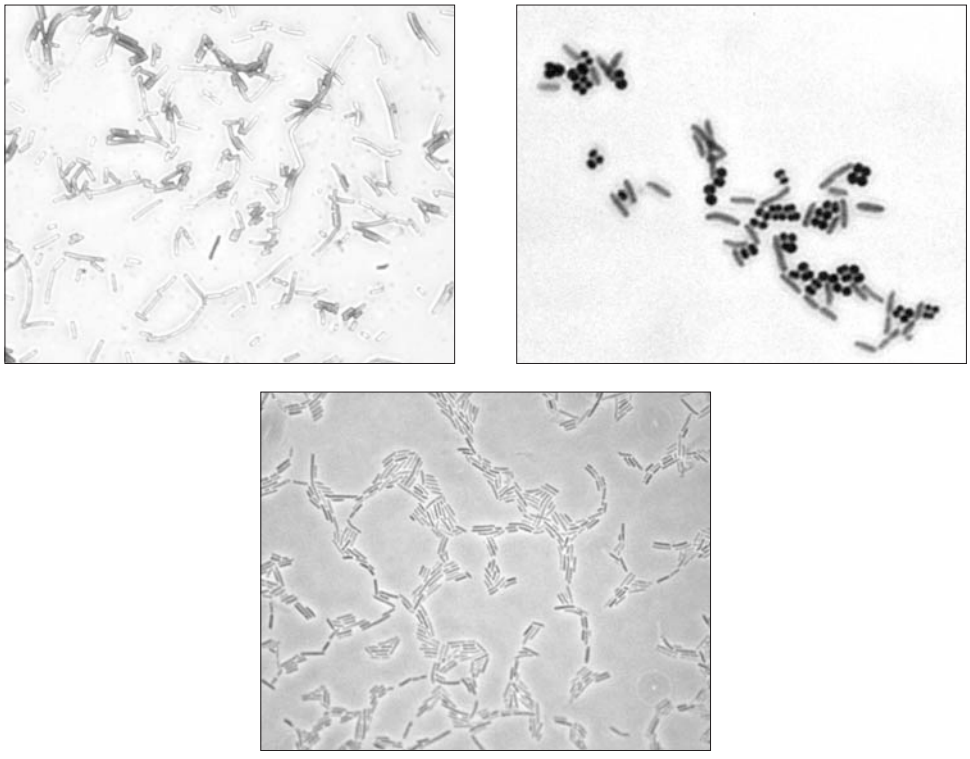
selezionati dalla natura
LALLEMAND

Ai batteri lattici che conferiscono caratteristiche favorevoli al vino e quindi sono preferiti per lo svolgimento della malolattica, ci si riferisce con la definizione di "batteri malolattici". I ceppi di batteri lattici che influenzano negativamente il prodotto finale possono causare modifiche indesiderate alle proprietà sensoriali del vino, alterare il colore del vino ed addirittura portare alla formazione di amine biogene[15].

MICRORGANISMI, FERMENTAZIONE MALOLATTICA E CARATTERISTICHE DEL VINO

In origine alla FML veniva attribuito solamente il ruolo di aumento della stabilità microbiologica del vino e di conversione dell'acido malico in acido lattico. Negli anni si sono accumulate esperienze che danno ai batteri malolattici anche una funzione importante di contributo al gusto ed all'aroma del vino. Data l'importanza dell'organismo che conduce la FML, si è sempre più consolidata la pratica di "seminare", "impiantare" o "inoculare" una fermentazione con un ceppo noto di batteri lattici o con una miscela di più ceppi, piuttosto che dipendere dalla flora naturalmente presente[45]. Il vantaggio dell'inoculo è che l'avvio e la durata della FML possono essere controllati e la qualità del prodotto finale può essere prevista. Come si è detto in precedenza, sono molti i microrganismi in grado di provocare la FML nel vino. Alcune specie di *Lactobacillus* o *Pediococcus* (Fig. 1) possono condurre la FML, specialmente in vini con pH superiore 3,5, ma normalmente danno vini non accettabili. Questi generi sono poco tolleranti ai pH bassi e producono odori sgradevoli oltre ad un eccesso di acidità volatile. Un'eccezione a questa regola è *Lactobacillus plantarum*, che non forma quantità significative di acido acetico ed è stato proposto come agente della FML[58]. Tuttavia, a causa della sua scarsa tolleranza all'etanolo, esso deve essere inoculato nel mosto prima della fermentazione alcolica[61]. Altre specie di *Lactobacillus*, per esempio *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus brevis*, hanno una maggiore resistenza all'alcool ma producono diversi metaboliti in proporzione variabile. Sebbene sia possibile condurre la FML con questi microrganismi, essi possono produrre acido acetico e conseguentemente il loro impiego come starter commerciale è limitato[46].

Figura 1. Colorazione di Gram di *Lactobacillus* (in alto a sinistra), coltura mista di *Pediococcus* (cellule rotonde) e *Lactobacillus* (cellule a bastoncello, in alto a destra), e visione di *Lactobacillus* in contrasto di fase (in basso)



Alcune specie di lievito sono anche in grado di degradare l'acido malico attraverso un processo alternativo. Questi ceppi di *Saccharomyces* possono catabolizzare quantità significative di acido malico in etanolo invece che in acido lattico. Tale conversione è stata denominata fermentazione maloalcolica e potenzialmente permette una maggiore riduzione dell'acidità del vino. La fermentazione maloalcolica è diversa dalla fermentazione malolattica, anche se il risultato finale è simile in termini di degradazione di acido malico. È stata anche attuata una trasformazione genetica di un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* inserendovi i geni malolattici per renderlo in grado di svolgere la fermentazione malolacolica[77, 74]. Sfortunatamente in questo lavoro il ceppo di lievito trasformato ha mostrato una scarsa attività catabolica, e per ottenere una completa degradazione dell'acido malico è stato necessario utilizzare ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* che esprimevano contemporaneamente i geni mles e mae1, codificanti rispettivamente per l'enzima malolattico di *Lactococcus lactis* e la malato permeasi di *Schizosaccharomyces pombe*, due enzimi entrambi sotto il controllo dei promotori del lievito[9]. Al di là del risultato scientifico, l'effetto di questo ceppo sul profilo sensoriale del prodotto finale è anche da chiarire. Inoltre, è difficile che questi ceppi possano essere utilizzati nella produzione commerciale di vino a causa dell'attuale avversione del consumatore rispetto agli organismi geneticamente modificati.

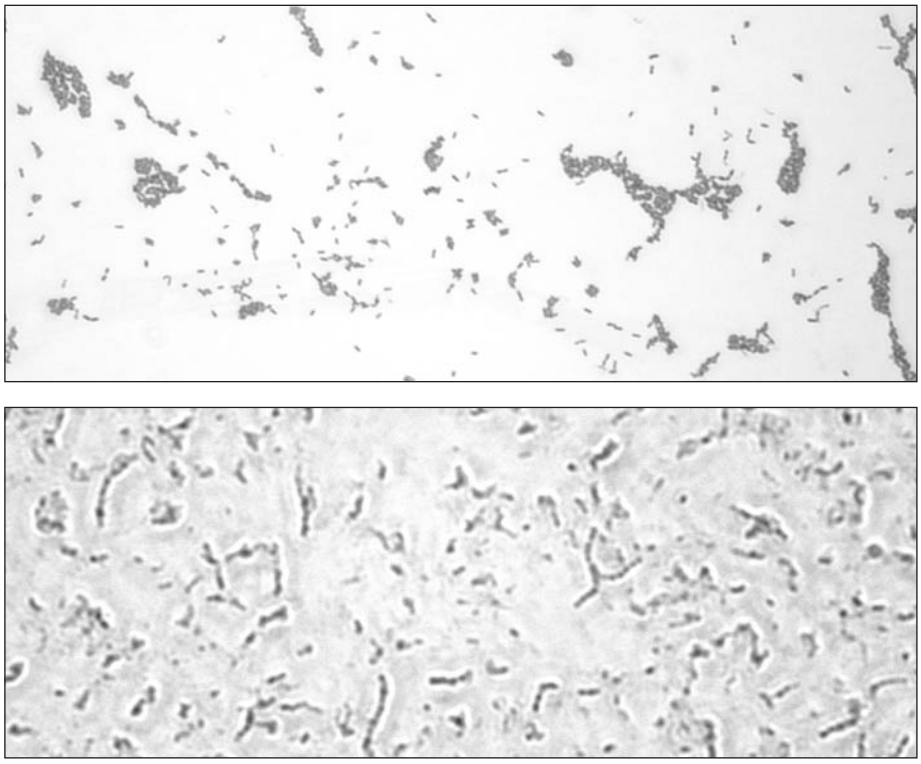
Sono stati anche utilizzati ceppi di *Schizosaccharomyces pombe*[8, 32, 62, 63], che hanno rivelato tuttavia una propensione alla produzione di composti indesiderati nel vino, tra cui l'idrogeno solforato[8, 32, 63]. I ceppi di *Schizosaccharomyces pombe* sono sensibili all'alcool obbligando all' inoculo prima della fermentazione alcolica.

Oenococcus oeni è attualmente la specie batterica preferita a lieviti o altri batteri per la conduzione della FML, e le ragioni di questa preferenza sono descritte nel dettaglio nella sezione che segue. È importante specificare che la riluttanza dei produttori all'impiego di specie batteriche alternative può essere dovuta in parte all'attuale assenza di reali alternative; è probabile che nel futuro possano essere isolati ceppi di *Pediococcus* e *Lactobacillus* adatti a condurre una buona FML. La ragione della preferenza per *Oenococcus oeni* sta nella capacità del microrganismo di sopportare le difficili condizioni ambientali del vino e di convertire velocemente l'acido malico in acido lattico. Anche se omogenea geneticamente, la specie *Oenococcus oeni* mostra un'importante eterogeneità fenotipica tra i diversi ceppi. La conseguenza è che diversi ceppi di *Oenococcus oeni* possono avere effetti significativamente diversi sulle caratteristiche del prodotto finale, ed è stato dimostrato che alcuni ceppi sono più favorevoli di altri alla qualità del vino[28, 49].

OENOCOCCUS OENI

Nonostante molte specie batteriche possano potenzialmente essere utilizzate nella produzione di vino, *Oenococcus oeni* rimane il microrganismo da scegliere per molti produttori di vino. *Oenococcus oeni*, precedentemente denominato *Leuconostoc oenos*[18], è un anaerobio facoltativo e può essere propagato in diversi mezzi a basso pH (pH 4,2-4,8) addizionati di succo di pomodoro o mosto d'uva. Le esigenze nutrizionali sono complesse e sono state descritte nel dettaglio da Henick-Kling[43]. Per una crescita ottimale sono necessarie una fonte di carbonio (derivata da zuccheri), azoto (amminoacidi o peptidi a basso peso molecolare), vitamine (acido nicotinico, tiamina, biotina ed acido pantotenico), ioni minerali (Mn2+, Mg2+, K+ e Na+) e derivati della purina (guanina, adenina, xantina e uracile). Le cellule di *Oenococcus oeni* sono sferiche e si presentano in catenelle quando crescono su un mezzo solido (Fig. 2). La crescita è generalmente lenta e può necessitare di 5-7 giorni per dare origine a colonie visibili, con temperature d'incubazione di 20°-30°C[72].

Figura 2. Colorazione di Gran di *Oenococcus oeni* (sopra) e vetrino di *Oenococcus oeni* (in basso) visti al microscopio in contrasto di fase.



In precedenza incluso nel gruppo dei *Leuconostoc*, *Oenococcus oeni* è stato successivamente separato in conseguenza dell'analisi del DNA, che mostra chiaramente la sua appartenenza ad un gruppo geneticamente diverso da *Leuconostoc*. Il gruppo dei ceppi di *Oenococcus oeni* è geneticamente omogeneo, come dimostrano le analisi delle proteine solubili, l'ibridazione DNA-DNA e l'analisi sequenziale della regione inter genica 16S-23S rDNA[79, 80, 19, 50, 78]. È stato ipotizzato che tale omogeneità derivi da una linea di clonazione e da una relazione specializzata di molti anni con la viticoltura e la produzione di vino[80]. L'omogeneità genetica non si manifesta anche negli effetti di *Oenococcus oeni* sul vino, ed il particolare ceppo utilizzato può produrre effetti differenti sulle caratteristiche finali del prodotto. Gli studi fenotipici su *Oenococcus oeni* hanno mostrato notevoli diversità in termini di lattato deidrogenasi, fermentazione dei carboidrati e acidi grassi cellulari[71, 34, 35]. Guerrini et al.[38] sono riusciti ad evidenziare specificità genotipiche e fenotipiche per diverse aree di produzione vinicola, indicando l'evoluzione naturale dei ceppi da diverse regioni del mondo.

Oenococcus oeni è da tutti considerato il migliore agente per condurre la FML grazie alla sua resistenza a diversi stress ambientali[10], in particolare alle condizioni di elevata acidità e grado alcolico tipici del vino.

L'inoculo del vino con ceppi di *Oenococcus oeni* accuratamente selezionati ha il vantaggio di permettere al produttore un maggiore controllo della FML. Inoltre, l'uso di un ceppo specifico di *Oenococcus oeni* permette all'enologo di garantirsi la comparsa di certe note sensoriali nel prodotto finito, creando in questo modo vini più originali e caratteristici (vedi la sezione sulla selezione).

Generalmente si impiega una coltura con un unico ceppo batterico, ma in alcuni casi si può utilizzare per l'inoculo una miscela di diversi ceppi. Questa pratica può aiutare ad ottenere il profilo di vino desiderato, ma minimizza anche i rischi di mortalità batterica dovuta ad attacchi di batteriofagi[42].

INFLUENZA DEL LIEVITO SULLO SVILUPPO DEI BATTERI LATTICI E SULLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Anche se alcuni ceppi di lievito contribuiscono positivamente alla FML[1], il ruolo dei lieviti è generalmente negativo, dato che la loro principale funzione è di convertire i nutrienti in etanolo. L'effetto inibitorio di alcuni ceppi di lievito sulla FML è stato dimostrato[29, 57, 51, 76, 36] ed è normalmente causato dalla produzione di composti del lievito che possono avere un'influenza negativa sulla crescita e sulla sopravvivenza dei batteri, così come dalla competizione per i nutrienti essenziali o dalla loro completa eliminazione[29, 5, 59, 1]. Alcuni studi sulle dinamiche di crescita di lieviti e batteri in piastra, condotti nei laboratori Lallemand ed altrove[16], hanno indicato che alcuni ceppi di lievito possono inibire attivamente la crescita di *Oenococcus oeni* attraverso la produzione di sostanze "antimicrobiche". Questi dati sostengono la convinzione che la relazione tra lieviti e batteri sia complessa e che la scelta della giusta combinazione di ceppi sia la chiave del successo della FML.

Data l'importanza delle interazioni lievito-batteri nel decidere il successo della fermentazione malolattica, il migliore momento per l'aggiunta degli starter malolattici al vino è stato oggetto di un ampio dibattito. Quelli a favore[5, 4] dell'inoculo al mosto con batteri malolattici, contemporaneamente ai lieviti della fermentazione alcolica, sostengono che i batteri hanno maggiori possibilità di sviluppo poiché hanno accesso ai nutrienti. Essi pensano inoltre che questa pratica permette il completamento della FML prima del termine della fermentazione alcolica. Sebbene siano stati documentati risultati positivi utilizzando questa tecnica, in altri casi è stata osservata una scarsa crescita dei batteri ed una parziale degradazione dell'acido malico[33, 49]. Se la fermentazione alcolica è ritardata, c'è una netta possibilità che i batteri malolattici metabolizzino gli zuccheri del mosto. Questo può portare ad una minore produzione di alcool da parte dei lieviti, ma soprattutto alla produzione di elevati livelli di acido acetico[49] nel prodotto finale.

L'inoculo dei batteri alla fine della fermentazione alcolica crea altri tipi di problemi. Il vino in questa fase è praticamente senza nutrienti e la concentrazione in etanolo è molto elevata. Queste due condizioni possono causare un significativo ritardo nello sviluppo della FML[5, 49] in base alle caratteristiche del ceppo di batteri utilizzato. È da evidenziare che, sebbene l'etanolo generalmente inibisca la crescita dei batteri, la FML può procedere anche quando le cellule non sono in fase attiva di moltiplicazione o quando si riproducono a velocità limitate.

Secondo alcuni, l'inoculo dei batteri malolattici nel vino alla fine della fermentazione alcolica beneficia della presenza delle cellule di lievito morte. Sono numerosi i lavori che dimostrano come la pratica di mantenere il vino sulle fecce di lievito può aiutare la FML, fornendo nutrienti ai batteri attraverso il fenomeno dell'autolisi[5, 29]. L'attività autolitica dei lieviti vinari durante la stasi sulle fecce può modificare in modo importante la concentrazione in composti azotati disponibili per i batteri malolattici, in particolare amminoacidi, peptidi e proteine[14, 55, 56, 2, 30]. Anche altre macromolecole, come i glucani e le mannoproteine, sono rilasciate dall'autolisi del lievito[14, 30] ed è stata osservato un loro effetto stimolante sulla crescita dei batteri[39]. In aggiunta, piccole quantità di CO_2 prodotte dal metabolismo fermentativo del lievito creano un ambiente favorevole alla crescita dei batteri lattici. È stato suggerito che la stasi del vino sulle fecce di lievito, specificatamente per mantenere una maggiore presenza di CO_2, può incoraggiare ulteriormente la FML[33]. Anche se l'attività proteolitica, la produzione di macromolecole, la capacità autolitica e la produzione di CO_2 possono stimolare la crescita dei batteri lattici e la FML, è bene precisare che questo ambiente dinamico è difficile da controllare e che ogni effetto dipende probabilmente dal lievito e dal batterio utilizzati.

Al di là del momento dell'inoculo dei batteri, per molti enologi risulta critica la presenza di SO_2 nel vino, dove essa è soggetta ad un equilibrio dipendente dal pH tra forma combinata, libera e molecolare, e tra ioni solfito e bisolfito. A bassi livelli la solforosa inibisce la crescita dei batteri lattici nel vino, impedendo la FML, ed a tenori più elevati uccide completamente le cellule batteriche[48, 75]. La SO_2 molecolare è la forma più tossica per i batteri e per certi ceppi anche concentrazioni di 0,1-0,15 mg/L possono avere effetto inibitorio. Per assicurarsi che questi livelli non siano raggiunti, la concentrazione in SO_2 totale deve essere inferiore a 50 mg/L o quella libera meno di 10 mg/L[65, 67].

Le concentrazioni di SO_2 nel vino dipendono principalmente dalle pratiche di vinificazione, ed in particolare delle aggiunte di solfiti prima della fermentazione alcolica, ma possono anche essere influenzate dal ceppo di lievito utilizzato per condurre la fermentazione alcolica[64, 27, 69]. Alcuni ceppi di lievito sono in grado di produrre quantità importanti di SO_2 durante al fermentazione alcolica. Se si desidera la FML, è importante usare un ceppo di lievito che produca SO_2 in quantità scarse o nulle. Inoltre, Dick et al.[16] hanno documentato l'esistenza di metaboliti del lievito di natura proteica che possono portare alla morte le cellule batteriche. Infine, gli acidi grassi a media catena derivati dalla degradazione delle membrane cellulari del lievito possono inibire la crescita dei batteri[23], ma anche ridurre la capacità delle cellule batteriche di metabolizzare l'acido malico[49, 11]. Questi effetti dipendono dal tipo e dalla concentrazione degli acidi grassi presenti nel vino[1] e possono essere amplificati dai bassi pH[11].

INIBITORI DELLA CRESCITA DEI BATTERI LATTICI E DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Nella produzione di vino si creano una serie di sistemi fortemente dinamici e le interazioni tra le componenti di questi sistemi può influenzare il successo della fermentazione. La composizione del vino, il metodo di vinificazione e le relazioni tra batteri lattici ed altri microrganismi presenti possono avere effetti sulla sopravvivenza e la crescita del batteri lattici nel vino e quindi sullo svolgimento della FML[15, 67, 75]. Anche condizioni ambientali come il pH, la temperatura, il livello di etanolo, lo stato nutrizionale e l'anidride solforosa (SO_2) possono svolgere un ruolo importante. Un parametro critico per il successo della FML è il pH, ed il suo valore minimo a cui i batteri possono svilupparsi è di circa 2,9-3,0[67]. La crescita batterica è più veloce e la FML si completa più rapidamente quando il pH aumenta sopra 3,0. Sebbene il pH ottimale per l'attività dell'enzima malolattico sia 6,3, la degradazione dell'acido malico da parte di cellule di *Oenococcus oeni* non proliferanti è più rapida a valori di pH inferiori[47] grazie ad un aumento del pH intracellulare[40]. È opinione comune che in termini di avvio e completamente della FML, un pH di circa 3,4 sia il più favorevole.

Come accennato in precedenza, la tolleranza all'alcool è una delle caratteristiche più importanti di molti batteri lattici, e tale resistenza è variabile. Molti ceppi non sono in grado di proliferare in vini con concentrazioni in etanolo maggiore al 15% ma altri sono stati visti crescere in presenza del 20% di etanolo[75].

La temperatura ottimale per la crescita dei batteri lattici è compresa tra 25 e 35°C[6, 43] e la velocità della degradazione dell'acido malico è massima più o meno alle stesse temperature[47]. La velocità di crescita dei batteri malolattici e della FML sono ridotte a basse temperature. Questo può porre problemi, soprattutto nella produzione di vini bianchi, dove si tende a fermentare a temperature più basse.

Anche la presenza di batteriofagi, virus capaci di uccidere i batteri, può inibire la fermentazione malolattica nei vini[12, 15, 41]. Sono stati isolati ceppi di batteriofagi che possono resistere in condizioni avverse[41] ed indurre la lisi cellulare dei batteri malolattici distruggendo le dinamiche di popolazione della FML. Per contrastare l'azione dei batteriofagi, possono essere selezionati ceppi di *Oenococcus* resistenti o, in alternativa, si possono utilizzare come starter miscele di ceppi batterici, per massimizzare la capacità di sopravvivenza di una coltura. Sebbene la presenza di batteriofagi possa porre problemi alla qualità del processo di vinificazione, i virus tendono ad essere inibiti durante la fase di crescita attiva dei batteri malolattici ed il loro effetto potenziale può essere minimizzato assicurando condizioni che favoriscono la crescita dei microrganismi desiderati[43].

BIBLIOGRAFIA

1. Alexandre, H., P. J. Costello, F. Remize, J. Guzzo, and M. Guilloux-Benatier. 2004. *Saccharomyces cerevisiae – Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int. J. Food. Microbiol.* 93:141-154.

2. Alexandre, H., D. Heintz, D. Chassagne, M. Guilloux-Benatier, C. Charpentier, and M. Feuillat. 2001. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in oenological conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotech*. 26:235-240.

3. Amerine, M. A., and R. E. Kunkee. 1968. Microbiology of winemaking. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:323-358.

4. Beelman, R. B., and R. E. Kunkee. 1985. Inducing simultaneous malolactic-alcoholic fermentation in red table wines. In: Lee, T. H. (Ed), *Malolactic Fermentation*. Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia. 97-112.

5. Beelman, R. B., R. M. Keen, M.J. Banner, and S. W. King. 1982. Interactions between wine and malolactic bacteria under wine conditions. *Dev. Ind. Microbiol*. 23:107-121.

6. Benda, I. 1982. Wine and Brandy. In: *Prescott and Dunns Industrial Microbiology (4th ed.)*. Reed, G. (Ed). 293-402. AVI Publishing Co., Westport, CT.

7. Beneduce, L., G. Spano, A. Vernile, D. Tarantino, and S. Massa. 2004. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *J. Basic Microbiol.* 44:10-16.

8. Bidan, P., J. P. Meyer, and A. Schaeffer. 1974. Les *schizosaccharomyces* en œnologie. *Bull. OIV.* 47:682-706.

9. Bony, M., F. Bidart, C. Camarasa, L. Dulau, P. Barre and S. Dequin. 1997. Metabolic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* engineered for malolactic fermentation. *FEBS Letters*. 410:452-456.

10. Bourdineaud, J., B. Nehmé, S. Tesse, and A. Lonvaud-Funel. 2003. The ftsH gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2515-2520.

11. Capucho, I., and M. V. San Romao. 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 42:391-395.

12. Cazelles, O., and F. Gnaegi. 1982. Enquête sur l'importance pratique du problème des bactériophages dans le vin. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 14:267-270.

13. Chalfan, Y., I. Goldberg, and R. I. Mateles. 1977. Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from Israeli red wines. *J. Food. Sci.* 42:939-943.

14. Charpentier, C., and M. Feuillat. 1993. Yeast autolysis. In: Fleet, G. H. (Ed), *Wine Micobiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 225-242.

15. Davis, C. R. D., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H. Lee, and G. H. Fleet. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:290-301.

16. Dick, K. J., P. C. Molan, P. C. and R. Eschenbruch. 1992. The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. *Vitis*. 31:105-116.

17. Dicks, L. M. T., and H. J. J. Van Vuuren. 1988. Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wines. *J. Appl. Bacteriol.* 64:505-513.

18. Dicks, L. M. T., F. Dellaglio, and M. D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. *Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:395-397.

19. Dicks, L. M. T., H. J. J. Van Vuuren, and F. Dellaglio. 1990. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:83-91.

20. Du Plessis, L. D. W., and J. A. Van Zyl. 1963. The microbiology of South African winemaking: Part IV. The taxonomy and the incidence of lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 6:261-273.

21. Du Toit, M., and I. S. Pretorius. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:74-96.

22. Edwards, C. G., and K. A. Jensen. 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington state wines: *Pediococcus* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:233-238.

23. Edwards, C. G., R. B. Beelman, C. E. Bartley, and A. L. McConnell. 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am. J. Enol. Vit.* 41:48-56.

24. Edwards, C. G., M. D. Collins, P. A. Lawson, and A. V. Rodriguez. 2000. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *Inst. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:699-702.

25. Edwards, C. G., K. M. Haag, M. D. Collins, R. A. Hutson, and Y. C. Huang. 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 84:698-702.

26. Edwards, C. G., J. R. Powers, K. A. Jensen, K. M. Weller, and J. C. Peterson. 1993. *Lactobacillus* spp. from Washington State wines: isolation and characterization. *J. Food Sci.* 58:453-458.

27. Eschenbruch, R. 1974. Sulfite and sulfide formation during winemaking – A Review. *Am. J. Enol. Viti.* 25:157-161.

28. Fleet, G. H., and S. Lafon-Lafourcade. 1984. The ecology of yeasts and lactic acid bacteria associated with Bordeaux wines. In: Lee, T. H., and C. S. Somers, (Eds). Advances in viticulture and oenology for economic gain. *Proc. 5th Aust. Wine Ind. Tech. Conf. 29 Nov-1 Dec 1983*. Perth. The Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia.

29. Fornachon, J. C. M. 1968. Influence of different yeasts on growth of lactic acid bacteria in wine. *J. Sci. Food Agric.* 19:374-378.

30. Fornairon-Bonnefond, C., C. Camarasa, M. Moutounet, and J.-M. Salmon. 2001. État des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 35:57-78.

31. Fugelsang, K. C. 1997. *Wine microbiology*. Chapman & Hall, New York.

32. Gallander, J. F. 1977. Deacidification of Eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 28:65-68.

33. Gallander, J. F. 1979. Effect of time of bacterial inoculation on the stimulation of malo-lactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 30:157-159.

34. Garvie, E. I. 1969. Lactic dehydrogenases of strains of the genus *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.* 58:85-94.

35. Garvie, E. I., and J. A. E. Farrow. 1980. The differentiation of *Leuconostoc oenos* from non-acidophilic species of *Leuconostoc*, and the identification of five strains from the American Type Culture Collection. *Am J. Enol. Vitic.* 31:154-157.

36. Gilis, J.-F., M.-L. Delia-Dupuy, and P. Strehaino. 1996. Étude qualitative et quantitative des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Leuconostoc oenos*. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 3:151-157.

37. Gindreau, E., E. Walling, and A. Lonvaud-Funel. 2001. Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *J. Appl. Microbiol.* 90:535-542.

38. Guerrini, S., A. Batianini, G. Blaiotta, L. Granchi, G. Moschetti, S. Coppola, P. Romano, and M. Vincenzini. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food. Microbiol.* 83:1-14.

39. Guilloux-Benatier, M., J. Guerreau, and M. Feuillat. 1995. Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:486-492.

40. Henick-Kling, T. 1986a. Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine. PhD thesis. University of Adelaide, South Australia.

41. Henick-Kling, T. 1986b. Control of malolactic fermentation. *Technical review no 41.* The Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia. 3-6.

42. Henick-Kling, T. 1985. Phage infection of malolactic fermentation. In: Lee, T. H. (Ed) *Malolactic fermentation. Proc. Seminar, 16 August 1984*, Melbourne. The Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia. 128-143.

43. Henick-Kling, T. 1988. Yeast and bacterial control in winemaking. In: Linskens, H. F. and J. F. Jackson (Eds). *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 6.* Springer-Verlag. 276-316.

44. Kandler, O., and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins, Baltimore. 1208-1234.

45. Krieger, S. 1993. The use of active dry malolactic starter cultures. *Proceedings of ASVO seminar, 30 July 1992*, McLaren Vale. 56-62.

46. Krieger, S. A., W. P. Hammes, and T. Henick-Kling. 1990. Management of malolactic fermentation using starter cultures. *Vineyard Winery Manage*. Nov/Dec 45-50.

47. Lafon-Lafourcade, S. 1970. Étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. *Ann. Technol. Agric.* 19:141-154.

48. Lafon-Lafourcade, S. 1975. L'histamine des vins. *Connaiss. Vigne Vin.* 2:103-115.

49. Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribéreau-Gayon. 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:874-880.

50. Le Jeune, C., and A. Lonvaud-Funel. 1997. Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) application to strain differentiation. *Res. Microbiol.* 148:79-86.

51. Lemaresquier, H. 1987. Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 4:91-94.

52. Liu, S.-Q. 2002. Malolactic fermentation in wine – beyond acidification. *J. Appl. Microbiol.* 92:589-601.

53. Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317-333.

54. Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux, and O. Ledoux. 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.* 71:501-508.

55. Martinez-Rodriguez, A. J., A. V. Carrascosa, P. J. Martin-Alvarez, V. Moreno-Arribas, and M. C. Polo. 2002. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 29:314-322.

56. Martinez-Rodriguez, A. J., A. V. Carrascosa, and M. C. Polo. 2001. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microbiol.* 68:155-160.

57. Mayer, K. 1978. Progrès récents dans la connaissance des phénomènes microbiologiques en vinification. *Bull. OIV.* 51:269-280.

58. Murphy, M. G., L. O'Connor, D. Walsh, and S. Condon. 1985. Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Microbiol.* 121:75-79.

59. Nygaard, M., and C. Prahl. 1996. Compatibility between strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* as an important factor for successful malolactic fermentation. *Proceedings of the Fourth Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology 16-20 July, 1996.* Rochester, NY, USA, VI-103-VI-106.

60. Pilone, G. J., R. E. Kunkee, and A. D. Webb. 1966. Chemical characterization of wines fermented with various malo-lactic bacteria. *Appl. Microbiol.* 14:608-615.

61. Prahl, C., A. Lonvaud-Funel, S. Korsgaard, E. Morrison, and A. Joyeux. 1988. Étude d'un nouveau procédé de déclenchement de la fermentation malolactique. *Connaiss. Vigne Vin.* 22:197-207.

62. Radler, F. 1982. The metabolism of organic acids by *Saccharomyces*. *Proc. Univ. Calif., Davis, Grape and Wine Cent. Symp.* 103-108.

63. Rankine, B. C. 1966. Decomposition of L-malic acid by wine yeasts. *J. Sci. Food. Agric.* 17:312-316.

64. Rankine, B. C. 1968. The importance of yeasts in determining the composition and quality of wines. *Vitis*. 7:22-49.

65. Rankine, B. C., and D. A. Bridson. 1971. Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malo-lactic fermentation. *Austral. Wine Brew. Spirit. Rev.* 90:44, 46, 48, 50.

66. Rankine, B. C., J. C. M. Fornachon, D. A. Bridson, and K. M. Cellier. 1970. Malo-lactic fermentation in Australian dry red wines. *J. Sci. Food. Agric.* 21:471-476.

67. Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, and P. Sudraud. 1975. *Sciences et techniques du vin, vol 2.* Dunod, Paris.

68. Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, and A. Lonvaud-Funel. 2000. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley. England.

69. Romano, P., and G. Suzzi. 1993. Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: Fleet, G. H. (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur. Switzerland. 373-393.

70. Sharpe, M. E. 1981. The genus *Lactobacillus*. In: Starr, M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Barlows, and H. G. Schegel (Eds), *The Prokaryotes, vol 2.* Springer-Verlag, Berlin. 1653-1679.

71. Tracey, R. P., and T. J. Britz. 1989. Cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 66:445-456.

72. Van Vuuren, H. J. J., and L. M. T. Dicks. 1991. *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:99-112.

73. Vaughn, R. H. 1955. Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. *Adv. Food. Res.* 6:67-108.

74. Volschenk, H., M. Viljoen-Bloom, R. E. Subden, and H. J. van Vuuren. 2001. Malo-ethanolic fermentation in grape must by recombinant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 18:963-970.

75. Wibowo, D. E., R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet and T. H. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:302-313.

76. Wibowo, D., G. H. Fleet, T. H. Lee, and R. E. Eschenbruch. 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 64:421-428.

77. Williams, S. A., R. A. Hodges, T. L. Strike, R. Snow, and R. E. Kunkee. 1984. Cloning the gene for malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbruckii* in *Escherichia coli* and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:288-293.

78. Zapparoli, G., C. Reguant, A. Bordons, S. Torriani, and F. Dellaglio. 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr. Microbiol.* 40:351-355.

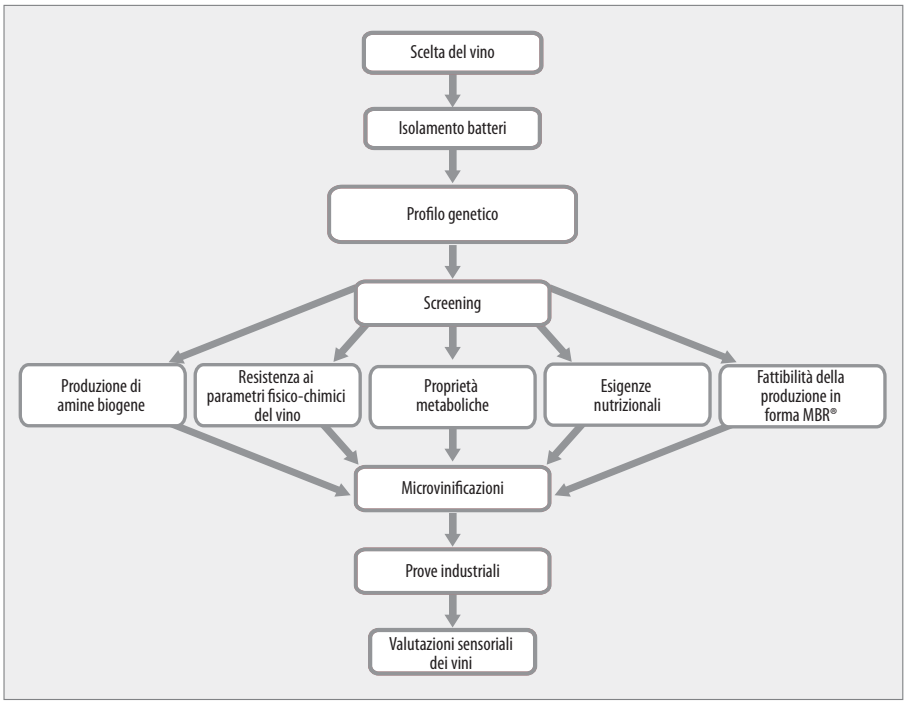
79. Zavaleta, A. I., A. J. Martinez-Murcia, and F. Rodriguez-Valera. 1996. 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiol.* 142:2105-2114.

80. Zavaleta, A. I., A. J. Martinez-Murcia, and F. Rodriguez-Valera. 1997. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1261-1267.

TECNICHE DI SELEZIONE DEI CEPPI

MAGALI BOU E DR. CHRIS POWELL

Come spiegato in precedenza, affidarsi alla microflora batterica indigena per completare tempestivamente una buona fermentazione malolattica può essere rischioso. Quando i batteri malolattici desiderati si stabiliscono in cantina, l'avvio della fermentazione malolattica (FML) può impiegare diversi mesi e può verificarsi in alcune barrique o vasche ma non in altre. Per questa ragione, l'induzione della FML attraverso l'uso di colture starter di batteri selezionati sta diventando velocemente l'opzione preferita. *Oenococcus oeni* è l'agente principale per la FML, ma non tutti i ceppi di questo batterio sono buoni candidati per diventare colture starter.



La selezione dei ceppi di *Oenococcus oeni* con le migliori caratteristiche e che sono i più interessanti dal punto di vista dell'apporto organolettico è un obiettivo ambizioso e complicato da raggiungere. Il protocollo utilizzato da Lallemand a questo scopo si compone di diverse fasi, che sono schematizzate in Fig. 1, e che saranno descritte nel dettaglio in seguito.

Figura 1. Procedura per la selezione di nuovi ceppi di batteri malolattici

selezionati dalla natura
LALLEMAND

IL PROTOCOLLO DI SELEZIONE DEI CEPPI DI BATTERI MALOLATTICI

Fase 1: Scelta dei vini da cui isolare i batteri

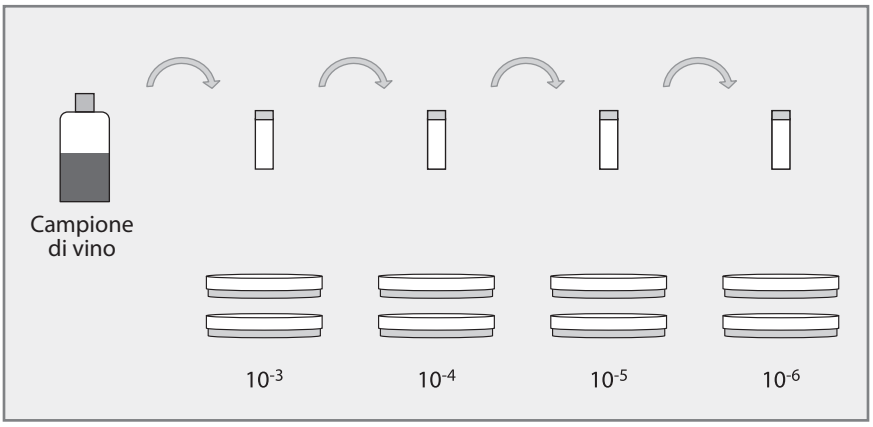
Lallemand ha un'attiva rete di collaborazioni mondiali con istituti di ricerca, università e produttori, che le permette di condurre programmi di selezione di batteri in tutte le regioni del mondo. La regola è di isolare e lavorare solamente su ceppi di batteri presenti in natura. Il protocollo utilizzato per raggiungere lo scopo prevede che i ceppi siano isolati da vini che hanno subito una FML spontanea. Per molte ragioni non tutti i ceppi spontanei di batteri malolattici conferiscono caratteri positivi al vino. Di conseguenza, i batteri su cui lavorare sono isolati da vini che impongono una naturale pressione selettiva, con basso pH, bassa temperatura di cantina, alcool elevato e tenori importanti di SO_2.

Per avere maggiori probabilità di isolare il (i) ceppo (i) dominante i campioni di vino vengono prelevati quando 66%-75% dell'acido L-malico è stato convertito in acido L-lattico. A questo punto della FML, il vino viene messo in contenitori sterili, e partono le procedure di isolamento microbiologico. Se gli isolati trovati nel vino sono in grado di superare i diversi passaggi di selezione, essi possono diventare strumenti utili alla comunità degli enologi per indurre con sicurezza una FML di qualità.

Fase 2: Collezione, isolamento e purificazione dei ceppi

L'isolamento dei ceppi di batteri malolattici inizia con l'impiego delle tecniche microbiologiche classiche di piastramento, per separare i batteri dall'ambiente vino. Al momento dell'isolamento su piastra, il vino contiene da 5×10^5 a 5×10^7 batteri per millilitro. Il terreno di coltura usato per la crescita dei batteri è generalmente molto ricco in alcuni componenti specifici, dal momento che i batteri malolattici non sono in grado di sintetizzare tutti i composti necessari alla loro crescita. In questa fase il vino campionato contiene, oltre ai batteri, anche una popolazione significativa di cellule viventi di lievito: questo impone l'aggiunta al terreno di coltura in piastra di una sostanza inibitrice della crescita ei lieviti. Il vino è diluito da 1.000(10^{-3}) a 1.000.000(10^{-6}) volte prima di essere messo in piastra, in modo da assicurare che gli isolati crescano effettivamente separati sulla piastra d'isolamento. La procedura è schematizzata in Fig. 2.

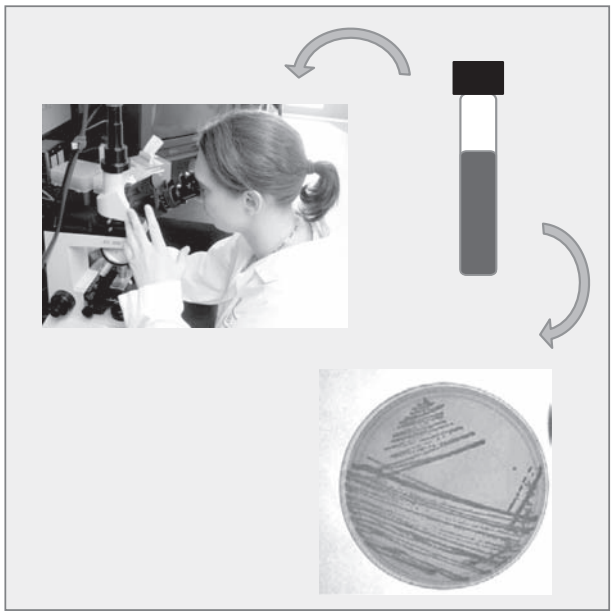
Figura 2. Protocollo d'isolamento dei batteri

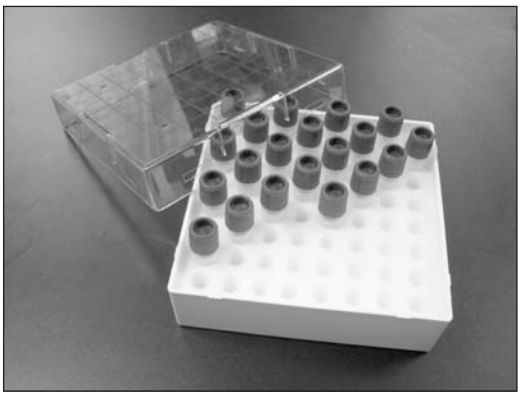


Le piastre d'isolamento sono mantenute a 30°C per 7 giorni in un incubatore per microbiologia. La crescita avviene in atmosfera arricchita in CO_2 perché lo sviluppo e lo stato fisiologico di *Oenococcus oeni* su terreno solido sono migliorati dall'esposizione a questo tipo di ambiente gassoso. Quando le singole colonie, ben isolate, diventano visibili ad occhio nudo, esse vengono separate secondo la loro morfologia, al microscopio, e grazie alla colorazione di Gram. Al microscopio le cellule di *Oenococcus oeni* appaiono rotonde, in coppie o in lunghe catenelle. Si sottopongono poi le cellule alla reazione di Gram, un metodo per

distinguere i batteri in due gruppi sulla base della composizione della loro parete. Le colonie che mostrano una reazione positiva alla colorazione di Gram, assorbendo un colorante specifico, sono conservate per la successiva purificazione. Dopo aver verificato la purezza degli isolati, si passa alla determinazione dei loro profili genetici. Gli isolati sono quindi conservati a -80°C in presenza di glicerina, una procedura che garantisce la stabilità del ceppo durante lo stoccaggio. Il processo è descritto in Fig. 3.

Figura 3. Caratterizzazione e conservazione degli isolati



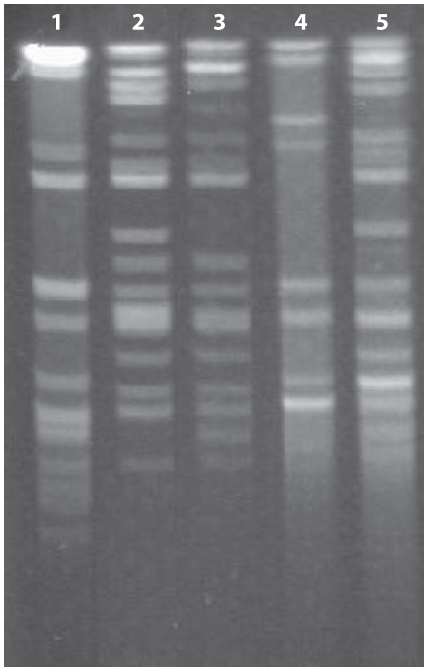


Fase 3: profilazione genetica

Una volta isolato, ogni ceppo è sottoposto ad una rigorosa analisi genetica per assicurarsi che questo nuovo ceppo sia effettivamente diverso dagli altri isolati ed anche dai ceppi già presenti nella collezione Lallemand. L'analisi del genoma serve anche a verificare la stabilità genetica del ceppo nel tempo. Sfortunatamente, a causa dell'omogeneità genetica della specie *Oenococcus oeni*, molte delle comuni tecniche basate sull'analisi del DNA non sono sufficienti a discriminare i ceppi. I metodi del tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), normalmente impiegati per differenziare una vasta gamma di ceppi batterici, non trovano in questo caso applicazione perché la variabilità intra-specifica è molto bassa, in particolare nella regione 16s-23s dell'rDNA. Attualmente, la tecnica più affidabile per la differenziazione dei ceppi e per la verifica della stabilità genetica è il CHEF (Contour-clamped Homogenous Electric Field), un tipo particolare di PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Nel caso dei ceppi di *Oenococcus*, l'intero DNA genomico è tagliato con enzimi di restrizione per produrre frammenti di varia lunghezza. Questi frammenti possono essere separati sulla base della loro dimensione usando l'apparecchiatura CHEF, dando un'impronta digitale del DNA specifico per ogni singolo ceppo.

La Fig. 4 mostra un tipico risultato dell'analisi, dove il DNA è stato tagliato facendo uso di un solo enzima di restrizione. Si può vedere che ogni ceppo dà un profilo tipico ed unico, permettendo così una facile differenziazione basata sulle variazioni del genoma. Il profilo CHEF è particolarmente adatto per la valutazione della stabilità genetica dell'organismo, poiché la traslocazione di un gene è facilmente identificabile. Il CHEF può essere utilizzato anche per differenziare i ceppi e, per aumentare il potere discriminante, si possono impiegare diversi enzimi di restrizione. Sebbene il CHEF sia ritenuto attualmente il miglior metodo disponibile per la differenziazione dei ceppi batterici, il tempo necessario all'analisi (circa 3 giorni) lo rende in alcuni casi inadatto per i controlli di routine nel laboratorio di Controllo Qualità.

Figura 4. Differenziazione di 5 ceppi di *Oenococcus oeni* con gel elettroforesi CHEF



Il RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) è una tecnica basata sulla PCR (Polymerase Chain Reaction) che offre una veloce e sensibile alternativa per la discriminazione dei ceppi. Come nel CHEF, si utilizza l'intero genoma per generare un profilo genetico o "impronta digitale". Tuttavia le similitudini sono limitate a questa.

RAPD-PCR è una tecnica diversa perché si basa sull'amplificazione con PCR di segmenti "casuali" del genoma, che si traduce nella replicazione di frammenti di DNA attraverso la reazione PCR, come mostrato in Fig.5, dove le piccole frecce indicano i siti di inserimento del primer. Se i primer si attaccano a strisce opposte di DNA ed esse sono vicine tra loro, si forma il prodotto della PCR. Generalmente, data la lunghezza del DNA genomico, si formano numerosi prodotti di dimensione variabile, dando luogo ad un profilo genetico. Di conseguenza, la dimensione ed il numero di frammenti amplificati sono dipendenti dalla precisa posizione del sito d'attacco del primer, oltre che dalla lunghezza del DNA intermedio. La Fig. 6 mostra un tipico gel ottenuto utilizzando RAPD-PCR. La linea 1, all'estrema sinistra, è il DNA standard, che serve a caratterizzare gli altri profili (linee 2-6), ciascuno derivante da un ceppo diverso di batteri e facilmente discriminabile dagli altri. Per ottenere una maggiore specificità, si possono usare più tipi di primer, indipendenti tra loro, per creare una serie di profili ceppo-specifici.

Figura 5. Schema della RADP-PCR

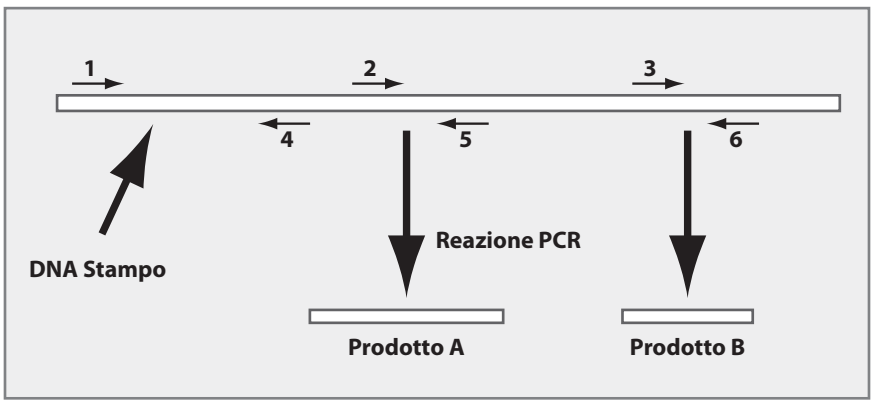
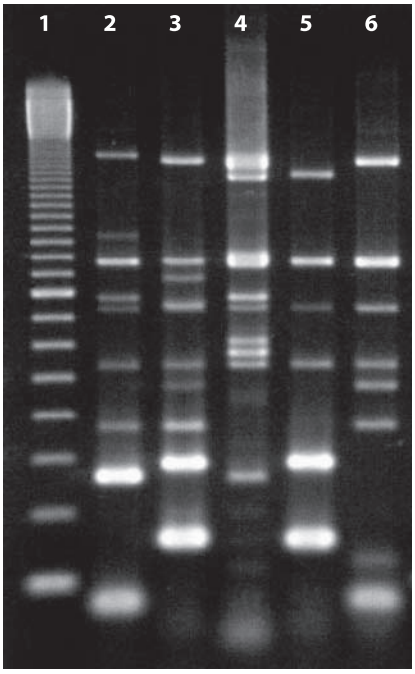


Figura 6. Profilo genetico RAPD di 5 ceppi di *Oenococcus oeni*



In Lallemand, attualmente i nuovi ceppi di *Oenococcus oeni* sono caratterizzati geneticamente facendo uso sia del CHEF che del RAPD, come complemento della nostra conoscenza sulle caratteristiche fenotipiche e fermentative di ogni ceppo. Le analisi genetiche di routine assicurano che ogni ceppo è composto da individui geneticamente identici, in grado di fermentare e comportarsi in modo prevedibile.

Le tecniche RAPD e CHEF sono ritenute essere le metodiche più appropriate per la valutazione dei ceppi di *Oenococcus oeni* in un laboratorio di Controllo Qualità. Tuttavia sono disponibili molte altre tecniche basate sul DNA. Molte di esse non sono ora adatte ad un impiego di routine, ma i continui progressi e miglioramenti, apportati a tecniche come il sequenziamento del DNA, l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), il *ribotyping* e la PCR multipla specie-specifica, possono dare vita a metodi aggiuntivi che potranno essere integrati nelle procedure di Controllo Qualità.

Fase 4: tecniche di screening applicate agli isolati batterici

Dopo aver determinato in laboratorio i profili genetici e le caratteristiche fisiologiche dei ceppi interessanti, questi ultimi devono dimostrarsi in grado di sopportare le condizioni di produzione con il processo MBR®, che predispone i batteri all'inoculo diretto nel vino. Non tutti i ceppi sono in grado di resistere a questa tecnica di produzione. Vengono poi avviate microvinificazioni per determinare la capacità dei ceppi di funzionare nell'ambiente vino, le cinetiche di crescita in vino ed il loro impatto sensoriale sullo stesso. Infine, vengono effettuate microvinificazioni comparative utilizzando come confronto ceppi già esistenti e disponibili in commercio, sia MBR® che convenzionali. Dal momento che i batteri possono essere determinanti per la qualità del prodotto finale, le seguenti considerazioni vengono considerate molto importanti in Lallemand:

- gli isolati devono essere in grado di crescere e proliferare nelle difficili condizioni chimico-fisiche del vino;
- il metabolismo dei ceppi e le loro specifiche esigenze nutritive devono essere sufficientemente chiari;
- i ceppi selezionati devono esercitare un'influenza positiva sul profilo sensoriale del vino.

L'impegno di Lallemand verso la qualità è esemplificato dal coinvolgimento della società nel programma europeo di ricerca FAIR-CT98-9640 dal 1999 al 2001. L'obiettivo di questo programma era di selezionare e sviluppare nuovi ceppi di batteri malo-

lattici, e di caratterizzarli sulla base di criteri enologici. Numerosi istituti di ricerca europei, università e aziende produttrici hanno lavorato con Lallemand su questo progetto, che ha portato ad una collezione di oltre 100 ceppi diversi.

I nuovi isolati batterici sono selezionati sulla base delle seguenti caratteristiche:

• Tolleranza nei confronti dei parametri chimico-fisici del vino

È noto che fattori importanti come pH, alcool, temperatura e SO_2 influenzano la crescita e la sopravvivenza dei batteri lattici[1, 3, 4, 5, 6, 7,14, 15]. I ceppi destinati ad essere commercializzati come colture starter sono selezionati sulla base della loro resistenza a questi fattori. Queste valutazioni sono fatte in laboratorio, utilizzando soluzioni modello definite in modo da mimare le condizioni chimiche e fisiche che il batterio troverà nel vino. In tutti i casi, il comportamento dei nuovi ceppi viene valutato a confronto con un ceppo di riferimento, che è uno starter batterico già in commercio. Se i nuovi ceppi non sono in grado di tollerare le condizioni prima citate, oppure se il tempo necessario al completamento della FML risulta troppo lungo, essi non passano alla fase successiva di selezione. Tutti i dati ottenuti definiscono la capacità dei ceppi di resistere alle condizioni proibitive a cui il batterio sarà esposto una volta immesso nell'ambiente vino.

• Proprietà metaboliche

I principali effetti biochimici della fermentazione malolattica comprendono:

- variazione del pH e dell'acidità dovuta alla decarbossilazione dell'acido malico in acido lattico ad opera dell'enzima malolattico;
- catabolismo dell'acido citrico che porta alla produzione di acido acetico, acido lattico, diacetile ed altri composti C4;
- utilizzazione dello zucchero per la produzione di acido lattico, etanolo ed acido acetico;
- variazione della concentrazione di alcuni composti minori, come gli amminoacidi, altri acidi organici e le vitamine;
- variazione nel contenuto di altri composti importanti per il profilo sensoriale del vino, la maggior parte dei quali non ancora completamente identificati[9, 14]

Le specifiche proprietà metaboliche in base alle quali vengono selezionati i ceppi sono le seguenti:

- Catabolismo dell'acido citrico

  La caratterizzazione del profilo metabolico dell'acido citrico nei ceppi di *Oenococcus* è importante perché l'acido citrico può essere degradato ad acido piruvico, il quale funge da precursore (diretto o indiretto) per molteplici composti, tra cui l'acido lattico, l'acido acetico, l'etanolo, il diacetile ed altri composti C4. Il diacetile (2,3-butandione) è il principali composto dell'aroma prodotto dalla FML, e può impartire una nota di burrato al vino2,12. Ceppi diversi di *Oenococcus oeni*, con diversi profili metabolici rispetto all'acido citrico, daranno quantità variabili di diacetile nel vino. Se la concentrazione di diacetile è eccessiva, possono aumentare anche i livelli di acetoino e 2,3-butandiolo, prodotti della riduzione del diacetile[10].

- Utilizzazione dello zucchero

  Glucosio e fruttosio costituiscono la maggioranza degli zuccheri nel mosto d'uva e nel vino. Oltre a questi due zuccheri, gli unici esosi presenti nel vino sono mannosio e galattosio. Tuttavia, a basse concentrazioni si trovano diversi pentosi, costituenti delle pectine delle piante: arabinosio, xilosio, ribosio, e ramnosio. Sono stati identificati anche i saccaridi maltosio, melibiosio, raffinosio, melezitosio e stachiosio[9]. Il catabolismo di questi zuccheri, sia esosi che pentosi, è molto diverso da ceppo a ceppo. Non solamente essi possono mostrare diverse velocità di sviluppo sullo stesso zucchero, alcuni zuccheri possono essere utilizzati da alcuni ceppi ma non da altri. La capacità del ceppo di degradare diversi carboidrati formando determinati metaboliti finali è importante per la loro sopravvivenza nel vino ed ha un'influenza diretta sulla qualità del vino. Conseguentemente è essenziale arrivare ad una completa conoscenza dell'utilizzazione degli zuccheri e tale fase di caratterizzazione viene condotta in una soluzione modello contenente glucosio e fruttosio in combinazione con diversi pentosi, oltre ad acidi tartarico, malico e citrico in concentrazioni simili a quelle ritrovabili nel vino. Attraverso HPLC si analizza la scomparsa dei composti sopra elencati e la produzione di sottoprodotti come mannitolo, acido acetico, acido lattico, etano-

lo e glicerina. La capacità dei ceppi di degradare i carboidrati con i quali vengono messi in contatti è altrettanto importante della loro tendenza a produrre metaboliti secondari.

• Produzione di amine biogene
Le amine biogene si trovano in diversi alimenti e bevande, come ad esempio pesce, formaggio, salumi secchi, vino, birra ed altri alimenti fermentati, e sono formati dalla decarbossilazione enzimatica di specifici amminoacidi[13]. Dal momento che tali composti sono associati a problemi di igiene e sicurezza alimentare, è molto importante che gli starter commerciali di batteri malolattici non abbiano la capacità di produrne. Lallemand valuta gli isolati sviluppandoli in una soluzione modello contenente vari precursori di amine biogene come istidina, tiroxina, ornitina ed arginina. I batteri vengono fatti sviluppare per 7 giorni a 30°C, dopo di che il surnatante è analizzato per la presenza di amine biogene[11]. In alternativa, sono utilizzate tecniche genetiche per evidenziare l'eventuale presenza dei geni che codificano per gli enzimi istidina carbossilasi o ornitina decarbossilasi, che sono responsabili della formazione delle amine biogene corrispondenti (risultati non pubblicati, Dr. Martin Sievers, Hochschule Wädenswil, Switzerland). Gli isolati che si mostrano in grado di produrre amine biogene sono eliminati dalle fasi successive di selezione.

• Produzione di polisaccaridi
La quantità ed i tipi di polisaccaridi prodotti dai batteri malolattici sono caratterizzati per HPLC.

• Capacità di venire prodotti nella forma MBR® ad inoculo diretto

La forma MBR® di un batterio malolattico disponibile in commercio deriva da una procedura che sottopone le cellule a diversi stress chimici ed ambientali, in modo da renderle capaci di meglio sopportare la difficile fase di inoculo diretto nel vino. Non tutti i ceppi sono in grado di sopportare il processo. Anzi, sono molto pochi gli isolati di batteri lattici che possono essere prodotti con questo protocollo.

I ceppi possono essere eliminati dal programma di selezione anche in ragione della loro lenta crescita, di una scarsa espressione dell'enzima malolattico o della loro incapacità a sopravvivere al processo di produzione. I ceppi che resistono sono robusti, sono in grado di condurre in modo affidabile la FML e sanno produrre vini di elevata qualità.

• Produzione di vino ed aspetti sensoriali

Infine, e molto importante, tutti i ceppi sono valutati per la loro capacità di produrre vini di qualità e finezza esemplari. Per verificare l'efficacia dei nuovi isolati sono condotte prove di vinificazione, che esplorano la sensibilità e l'adattabilità del ceppo ai diversi effetti esercitati dall'annata, dalla regione, dalla varietà di uva e dalle proprietà chimico-fisiche del vino prodotto. Oltre a disacidificare il vino durante la FML, i batteri influiscono sull'aroma e sul gusto finale, modificando gli aromi primari e producendo composti aromaticamente attivi. Sono state descritte anche differenze nel corpo e nella persistenza aromatica in vini prodotti con e senza FML. Inoltre, sono stati caratterizzati gli effetti dei singoli ceppi: alcuni producono burrato intenso, note di lievito e frutta secca, mentre altri ceppi non hanno un impatto significativo[9]. Non tutti i ceppi isolati durante le prime fasi della selezione diventano ceppi commerciali distribuiti sul mercato. Se sono in grado di sopravvivere a tutti gli screening metabolici, fisiologici e genetici, ma non sono in grado di produrre vini con caratteristiche superlative, essi sono eliminati dal programma di selezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Asmundson, R. V., and W. J. Kelly. 1990. *Methods for analysis of musts and wines*. John Wiley & Sons. New York, NY.

2. Bertrand, A., C. Smirou-Bonamour, and A. Lonvaud-Funel. 1984. Aroma compounds in malolactic fermentation. *Proceedings of the Alko Symposium on Flavor Research in Alcoholic Beverages*. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research., Helsinki. 37-49.

3. Britz, T. J., and R. P. Tracey. 1990. The combination effect of pH, SO_2, ethanol, temperature on the growth of *Leuconostoc oenos. Journal of Applied Microbiology*. 68:23-31.

4. Chauvet, J., P. Brechot, C. I. Dubois, P. Dupuy, and J.-L. Dorange. 1982. Stimulation de la croissance dans le vin d'une flore malolactique par les acides malique et citrique. *Sciences des Aliments*. 2:495-504.

5. Costello, P. J., P. R. Monk, and T. H. Lee. 1985. An evaluation of two commercial *Leuconostoc oenos* strains for induction of malolactic fermentation under winery conditions. *Food Technology in Australia.* 37:21-23, 30.

6. Davis, C. R., D. Wibowo, T. H. Lee, and G. H. Fleet. 1986a. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 51:539-545.

7. Fugelsang, K. C. and B. W. Zoeklein. 1993. MLF survey. *Practical Winery and Vineyard*. 9:12-18.

8. Krieger, S. A., W. P. Hammes, and T. Henick-Kling. 1993. How to use malolactic starter cultures in the winery. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*. 8:153-160.

9. Henick-Kling, T. 1993. Malolactic fermentation. In Fleet, G. H. (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Hardwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 289-326, 510.

10. Henick-Kling, T. and B. Martineau. 1994. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *Journal of Applied Bacteriology*. 78:526-536.

11. Moreno-Arribas, M. V., M. C. Polo, F. Jorganes, and R. Munoz. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 84:7-123.

12. Rankine, B. C., J. Fornachon, and D. A. Bridson. 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis*. 8:129-134.

13. Ten Brink, B., C. Damink, H. M. L. J. Joosten, and J. H. J. Huis in't Veld. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 11:73-84.

14. Wibowo, D., R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36:302-313.

15. Wibowo, D., G. H. Fleet, T. H. Lee, and R. E. Eschenbruch. 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology. 64:421-428.*

DIFETTI ORGANOLETTICI DERIVANTI DALLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA INCONTROLLATA

DR. ANTONIO PALACIOS

Contemporaneamente alla riduzione dell'acidità del vino operata dalla FML, la crescita dei batteri lattici porta alla produzione di altri composti derivati dal loro metabolismo. Alcuni di essi, come l'etil-lattato e il diacetile, quando le loro concentrazioni sono appropriate, possono esercitare un ruolo positivo sul vino aggiungendo complessità. In conseguenza della FML, i batteri lattici possono ridurre le note vegetali ed astringenti e l'amaro del vino, contribuendo positivamente alla rotondità e all'espressione positiva dei tannini. Gli effetti dipendono dallo specifico ceppo batterico utilizzato, e questo rafforza il principio dell'impiego di ceppi specifici e noti di batteri malolattici per la conduzione della FML.

I vini che hanno completato con successo la FML sono normalmente caratterizzati dai seguenti descrittori positivi:

- burro
- frutta secca
- lievito
- miele
- vaniglia
- cuoio
- spezie
- terroso e tostato
- maggiore corpo e rotondità
- tannini fini
- maggiore persistenza al gusto.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

Le FML incontrollate, specialmente quelle che avvengono a pH maggiori di 3,5, generano invece spesso i seguenti descrittori negativi:

- intensi aromi lattici
- yogurt rancido
- note di sudore
- acetico
- amaro intenso nel finale
- note animali
- cuoio bagnato
- fiammifero bruciato
- frutta marcia.

Le possibili alterazioni indesiderate che possono avvenire nel vino come risultato di un mancato controllo della FML sono discusse di seguito e riassunte in Fig. 1.

DEGRADAZIONE DELL'ACIDO TARTARICO

Questa situazione si ritrova normalmente in vini con bassa acidità totale ed è l'effetto di una decomposizione totale o parziale dell'acido tartarico ad opera dei batteri lattici, in particolare *Pediococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. Nei vini con pH superiore a 3,5, alcuni batteri lattici possono attaccare l'acido tartarico con la conseguente formazione di acido lattico, acido acetico e CO_2. Su 78 ceppi di batteri lattici esaminati, Radler e Yannissis[1] ne hanno trovati solo 4 appartenenti alla specie *Lactobacillus plantarum* ed 1 ceppo di *Lactobacillus brevis* in possesso della capacità di degradare l'acido tartarico. Quando si verifica il fenomeno, l'acidità totale diminuisce ed aumentano l'acidità volatile e l'acido succinico. Il vino diventa insipido e debole, i pigmenti rossi diventano meno intensi e la tonalità del colore tende al violetto. Inoltre, la crescita microbica causa spesso torbidità al vino. Nelle condizioni estreme, l'aroma diventa sgradevole e può avere toni di acetammide, ricordando l'urina di topo[2]. Quando l'acido succinico supera gli 0,5 g/L, il vino assume un carattere acido e salato. L'acido succinico apporta un forte carattere acido e persiste sul palato, causando un disequilibrio del vino ed un retrogusto non pulito.

DEGRADAZIONE DELLA GLICERINA

La degradazione batterica della glicerina porta alla formazione di acroleina, che causa amaro nel vino. Storicamente l'acroleina è stata ritrovata in vini a basso grado alcolico, soprattutto torchiati e vini mantenuti per lungo tempo a contatto con le fecce. Il primo a menzionare il carattere dell'amaro, associato con la presenza di batteri a bastoncello e con la perdita di glicerina, fu Pasteur[3]. L'acroleina non è amara di per sé, ma reagisce con i gruppi fenolici degli antociani formando composti amari. Secondo Margalith[4], concentrazioni in acroleina inferiori a 10 ppm possono già far emergere il difetto. Un effetto collaterale della degradazione della glicerina è la formazione degli acidi lattico ed acetico, quando è presente glucosio[5]. Gli agenti microbici responsabili del difetto nel vino sono *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus hilgardii*.

FERMENTAZIONE DEGLI ZUCCHERI IN VINI CHE NON HANNO COMPLETATO LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Questa condizione si osserva normalmente in vini dove la fermentazione alcolica ha avuto problemi e si è arrestata, mentre si avviava la fermentazione malolattica. Non essendo stata completata la fermentazione alcolica, questi vini contengono quantità importanti di zuccheri fermentescibili. La maggior parte dei batteri eterofermentativi sono in grado di utilizzare questi zuccheri formando acido lattico ed acido acetico, attraverso il cammino metabolico eterolattico. Quando il fenomeno avviene, si assiste

ad un significativo incremento dell'acidità totale e dell'acidità volatile, con una perdita della complessità e dell'equilibrio del vino. In questi casi si forma acido D-lattico, mentre l'acido L-lattico deriva dalla FML. In aggiunta, dal fruttosio i batteri possono produrre mannitolo, che provoca torbidità e gusto dolciastro[6]. Quando l'acido acetico ed il mannitolo si ritrovano contemporaneamente nel vino, il primo amplifica la sensazione d'amaro, ed il secondo quella del dolce.

FERMENTAZIONE DI ZUCCHERI IN VINI CHE HANNO COMPLETATO AL FERMENTAZIONE ALCOLICA

Si verifica in vini secchi, dove la fermentazione alcolica non ha incontrato problemi e si è sviluppata fino alla fine. Tuttavia, anche i vini definiti "secchi", alla fine della fermentazione alcolica conservano 1,5-2 g/L di zuccheri. Arabinosio e xilosio – pentosi che il lievito non può fermentare – rappresentano circa 1 g/L, ed il resto è costituito da tracce di fruttosio e glucosio. Durante lo stoccaggio, il contenuto in glucosio può inoltre aumentare a causa dell'idrolisi dei glucosidi del vino. Durante la FML; i batteri lattici possono consumare una parte di questi zuccheri, con la formazione di acido acetico. Per esempio, in vini con pH elevato, la degradazione di 1 g/L degli zuccheri da parte dei batteri può portare all'incremento di 0,6 g/L dell'acidità volatile. Per questa ragione è bene stabilizzare il vino immediatamente dopo la fine della FML. Questo si ottiene normalmente con filtrazione, aggiunta di SO_2 o uso dell'enzima lisozima, per arrestare l'attività batterica. Le specie omofermentative di *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. possono produrre acido D-lattico da questi esosi senza la produzione di acido acetico. Tuttavia, queste specie possono fermentare i pentosi residui in acido lattico e acetico.

FILANTE

Il filante è causato alla produzione, a partire dal glucosio, di polisaccaridi esocellulari come glucani e destrani, che provocano un aumento della viscosità del vino. La sintesi di polisaccaridi esocellulari da parte dei batteri lattici è una caratteristica molto diffusa: la produzione di destrani da parte di *Leuconostoc mesenteroides* è l'esempio meglio conosciuto. Van Vurren e Dicks[7] hanno mostrato che alcuni ceppi di *Oenococcus oeni* possiedono una sorta di strato viscoso attorno alla cellula. *Pediococcus damnosus*[8], come altri *Pediococcus* spp., *Streptococcus mucilaginosus* e *Lactobacillus pasteurianus* sono anch'essi stati indicati come microrganismi coinvolti nel difetto. Il filante normalmente si verifica in vini bianchi ed è molto raro nei rossi perché questi microrganismi non riescono a svilupparsi bene in presenza di tannini. Il filante usualmente inizia quando il vino è lasciato sulle fecce di lievito, poiché il lievito autolisandosi rilascia nel mezzo nutrienti che aiutano la crescita batterica, specialmente in vini a pH alti.

PRODUZIONE DI FENOLI VOLATILI

Nei vini rossi i composti 4-vinilfenolo, 4-vinilguaiacolo, 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo sono stati associati alla presenza di odori che ricordano il sudore di cavallo e l'odore di stalla.

I 4-etilfenoli sensorialmente attivi sono stati ritrovati in vini con gusto di topo. La comparsa di questi composti è legata alla crescita di certi ceppi di *Pediococcus* e *Lactobacillus*, sebbene il microrganismo maggiormente responsabile di questi difetti nel vino sia *Brettanomyces / Dekkera*. Chatonnet[9] ha dimostrato che *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* spp., così come alcuni ceppi di *Oenococcus oeni*, sono in grado di degradare l'acido p-cumarico in 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo. La sommatoria di questi composti in soluzione raggiunge una concentrazione tale da influire sul profilo sensoriale del vino. È quindi possibile che le quantità di fenoli volatili prodotte dai batteri possano sommarsi a quelle prodotte da *Brettanomyces*, portando la presenza totale al di sopra della soglia di percezione e dando origine al difetto anche laddove la popolazione di *Brettanomyces* è bassa.

GUSTO DI TOPO

Alcuni ceppi di batteri lattici eterofermentativi possono degradare gli amminoacidi ed alcuni zuccheri, portando alla formazione di odori indesiderati. Il metabolismo dell'ornitina e della lisina è associato alla formazione di N-eterocicli, la 2-acetil-1-pirrolina e la 2-acetil-tetraidropiridina, che sono la causa del difetto del vino denominato gusto di topo. Il fenomeno è causato da ceppi eterofermentativi di *Lactobacillus* spp.[10, 11], alcuni ceppi di *Oenococcus oeni*, e dal lievito *Brettanomyces* / *Dekkera*. I vini con questo difetto hanno caratteri nauseabondi che ricordano l'urina di topo o l'acetammide, particolarmente evidente nel retrogusto del vino.

MASCHERAMENTO DEGLI AROMI VARIETALI

Il mascheramento dell'aroma varietale del vino può essere in parte dovuto alla formazione di etil lattato, etil acetato e diacetile durante la FML. Il tipico aroma di burro della malolattica, l'odore di crauti o di sudore possono modificare negativamente la qualità del vino se non sono in equilibrio con gli altri aromi. La comparsa di diacetile ad opera dei batteri lattici è il maggior contributo degli stessi al profilo aromatico. Secondo Henick-Kling "la produzione di diacetile, 2,3-butandiolo, 2-acetolattato e 2-acetoidrobutirrato non può spiegare la varietà di note aromatiche prodotte con la FML"[12]. Il suo gruppo ha trovato cambiamenti significativi nelle note di vegetale, secondo il ceppo di batteri utilizzato nella FML.

ETIL CARBAMMATO ED AMMINE BIOGENE

La decomposizione dell'arginina da parte del batteri lattici porta alla produzione di citrullina e carbamil-fosfato. Se questi composti reagiscono con l'urea prodotta da certi lieviti durante la fermentazione alcolica, si può formare etil-carbammato. La decarbossilazione di alcuni amminoacidi porta alla formazione di ammine biogene come istidina, putrescina e cadaverina. La putrescina e la cadaverina possono conferire odori di putrefazione ai vini che le contengono.

Figura 1: tabella riassuntiva dei potenziali problemi associati con una FML non controllata

Problema	Condizioni in cui si verifica	Microrganismi coinvolti	Composti modificati	Composti prodotti	Effetto sul vino
Degradazione dell'acido tartarico	Rossi o bianchi con pH>3,5, bassa acidità totale	*Pediococcus, Lactobacillus, Oenococcus*	Acido tartarico	Acido lattico, acido acetico, CO_2	Riduzione acidità, AV, perdita colore, torbidità
				Acetammide (raramente)	Odore di urina di topo (raramente)
Degradazione della glicerina	Rossi o bianchi con basso alcool, alto pH, (soprattutto torchiati e vini invecchiati)	*L. casei, L. fructivorans, L. hilgardii*	Glicerina	Acroleina	Amaro
			Glicerina (in presenza di glucosio)	Acido lattico, acido acetico	AV

Problema	Condizioni in cui si verifica	Microrganismi coinvolti	Composti modificati	Composti prodotti	Effetto sul vino
Arresto della fermentazione alcolica	Rossi o bianchi con zuccheri residui disponibili per i batteri lattici	Molti batteri lattici	Zuccheri fermentescibili	Acido lattico, acido acetico	Aumento acidità totale, AV, perdita di complessità ed equilibrio, torbidità
			Fruttosio	Mannitolo	Gusto amaro - dolciastro
Metabolismo degli zuccheri non fermentescibili in vini "secchi"	'Vini "secchi", specialmente rossi con pH elevato	Molti batteri lattici	Arabinosio, xilosio, glucosio, fruttosio	Acido acetico	AV
Produzione di fenoli volatili	Vini rossi con pH elevato	Alcuni *Pediococcus* e *Lactobacillus* (soprattutto lieviti *Brettanomyces / Dekkera*)	Acido cumarico	4-VP, 4-VG, 4-EP, 4-EG	Note di sudore di cavallo, stalla, cuoio, asfalto, muffa, medicinale, affumicato
Gusto di topo	pH elevato, ossidazione	*Lactobacillus, Oenococcus oeni* (possibile anche *Brettanomyces / Dekkera*)	Amminoacidi (lisina, ornitina), zuccheri	Piridine	Gusto di topo
Mascheramento degli aromi varietali	Vini bianchi e rossi	Alcuni ceppi di batteri malolattici	Acidi organici, zuccheri, amminoacidi	Etil-lattato, etil-acetato	A bassi livelli maschera il fruttato, a livelli elevati note di frutta secca, caramello, lievito, pelliccia bagnata
				Diacetile	
Formazione di etilcarbammato	Alcool elevato, pH alti	Batteri lattici	Arginina in presenza di urea prodotta dai lieviti	Etil carbammato	Problemi di carattere sanitario
Sviluppo di ammine biogene	Vini con pH elevato	Batteri lattici	Alcuni amminoacidi	Istidina	Problemi di carattere sanitario
				Putrescina, cadaverina	Putrefazione, carne, aceto, odori di sporco

RISULTATO PRATICO DELLA FML NON CONTROLLATA

La formazione di ammine biogene in una FML non controllata, così come la produzione di etilcarbammato derivante dall'azione combinata di lieviti e batteri, può causare difetti importanti che il consumatore è in grado di riconoscere, come dimostrato da un lavoro svolto all'Università della Rioja, Spagna. In questo studio, sono stati aggiunti ad un vino i seguenti composti:

- Diacetile (vino bianco, a 0,1 ppm, 5 ppm, 10 ppm; vino rosso a 0,1 ppm, 10 ppm, 30 ppm);
- Ammine biogene volatili (putrescina e cadaverina nel vino rosso a concentrazioni di 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm);
- Etil-fenoli (etilfenolo e etilguaiacolo in vino rosso a concentrazioni di 425 mg/L, 800 mg/L e 1000 mg/L).

Questi vini sono stati degustati da esperti di vino spagnoli, ed i risultati mostrano chiaramente che i composti aggiunti sono facilmente riconoscibili. I giudici individuano con alta frequenza i difetti, descrivendo i difetti con il proprio vocabolario come segue:

- Diacetile: nel vino bianco, il diacetile è stato descritto come burro, formaggio, ma anche associato all'ossidazione, facendo apparire il vino invecchiato. Il diacetile è stato anche identificato nel vino rosso, contribuendo ai caratteri associati al burro ed alla mandorla. La frequenza della percezione aumenta all'aumentare delle quantità di composto aggiunte. La tendenza è maggiore nel vino bianco che nel vino rosso.
- Ammine biogene volatili: gli assaggiatori sono risultati relativamente meno sensibili. L'aumento della concentrazione in putrescina non ha migliorato la capacità d'identificazione del difetto originato dal composto. Tuttavia, la molecola è stata descritta come responsabile dell'odore di frutta marcia, di fermentato, di rancido e sporco. La cadaverina è stata identificata più facilmente alle concentrazioni maggiori, con descrittori tipo carne, aceto e sporco.
- Etil-fenoli: come nel caso del diacetile, la frequenza della percezione di questi composti aumenta con l'aumentare delle concentrazioni del composto aggiunto, più nel vino bianco che nel rosso. L'etilfenolo è stato descritto come cuoio, animale, letame bovino, cavallo ed asfalto. L'etilguaiacolo è stato descritto con fungo, medicinale, affumicato.

Gli stessi vini sono stati fatti assaggiare anche ad un esperto di vino che era a conoscenza della natura delle aggiunte. L'assaggiatore è stato in grado di identificare i difetti a tutte le concentrazioni d'aggiunta, ed i descrittori corrispondevano a quelli espressi precedentemente.

I microrganismi alla base di questi problemi sono principalmente appartenenti alle specie *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., e questo supporta l'importanza di una buona gestione della FML, che può essere raggiunta attraverso una adeguata igiene di cantina e l'impiego di batteri malolattici per l'avvio del processo fermentativo.

LA MASCHERA…

Lallemand ha sviluppato un kit (Figura 1) per aiutare gli enologi a valutare l'impatto organolettico di alcuni composti sul vino. Aggiungendo al vino scelto i composti secondari prodotti dai batteri indesiderati, l'enologo può valutare le conseguenze gustative e olfattive di una specifica alterazione. Il kit è composto di nove fiale, che contengono i composti ai quali sono attribuite le alterazioni organolettiche di fermentazioni malolattiche non controllate. Questi composti includono: putrescina, cadaverina, diacetile, etil-fenolo, etil-guaiacolo, acetaldeide, etil-lattato, 4-idro-piridina ed etossi-diene. La tabella 4 descrive l'impatto organolettico di ognuno di questi composti. Il kit contiene anche una fiala controllo.

Figura 1. Foto delle 10 fiale che contengono i composti causa di difetto nelle FML non controllate

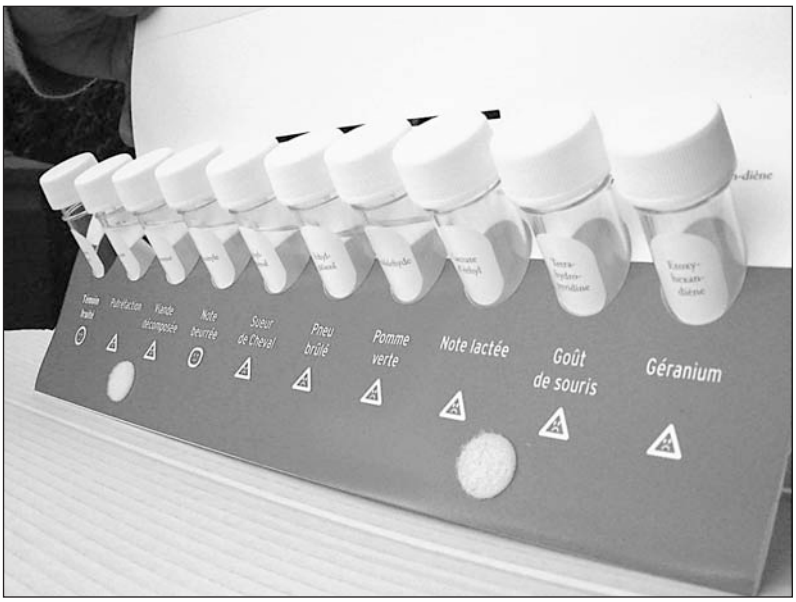


Tabella 2. Lista dei composti e dei loro descrittori

Composto	Descrittore	Concentrazione nel vino testimone	Concentrazione normalmente riscontrata nei vini
Putrescina	Putrefazione	100 mg/L	10 mg/L
Cadaverina	Carne avariata	100 mg/L	5 mg/L
Diacetile	Burro	30 mg/L	7-10 mg/lL
Etil-fenolo	Sudore di cavallo	1 mg/L	0,15 mg/L
Etil-guaiacolo	Gomma bruciata	1 mg/L	0,1 mg/L
Acetaldeide	Mela ammaccata	50 mg/L	40 mg/L
Etil-lattato	Latte	25 mg/L	15 mg/L
4-idro-piridina	Gusto di topo	Non misurabile*	0,05 mg/L
Etossi-diene	Geranio	0,01 mg/L	0**

* I metodi utilizzati per introdurre questo composto al vino non ci permettono di determinare con precisione la concentrazione finale.

** L'etossi-diene si forma dal metabolismo dell'acido sorbico ad opera dei batteri lattici. L'acido sorbico può essere utilizzato nel vino per la sua capacità di inibire la crescita dei lieviti.

Lo scopo di questo kit è di educare gli enologi sui rischi potenziali associati a fermentazioni malolattiche non controllate, dove batteri lattici indesiderati producono i composti sopra descritti. L'impatto sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finito, deve essere valutato con attenzione, poiché il consumatore riesce ad identificare gli aromi difettosi e talvolta a descriverli con precisione. È importante che l'enologo sia consapevole di questo e riesca a prevenire la contaminazione microbiologica controllando il processo. Ciò è possibile con l'applicazione di buone pratiche igieniche in cantina e con l'utilizzo di colture batteriche selezionate per l'induzione della FML.

BIBLIOGRAFIA

1. Radler, F., and C. Yannissis. 1972. Weinsäureabbau bei Milchsäurebakterien. *Arch. Mikrobiol.* 82:219-238.
2. Gössinger, M. 2000. Mäuseln. In: *Weinfehler Erkennen, Vermeiden, Beheben.* Eder R. and J. Glatt (eds). Eugen Ulmer Verlag. 108-109.
3. Pasteur, L. 1873. *Études sur le vin*. Paris.
4. Margalith, P. Z. 1983. *Flavour Microbiology*. Thomas, C. G. (Ed). Illinois. 173-224.
5. Schütz, H., and F. Radler. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propandiol-1,3 by *Lactobacillus buchneri. Systematic and Applied Microbiology*. 203:1-10.
6. Bandion, F., and M. Valenta. 1977. Zum Nachweis des Essigstichs bei Wein und Obstwein in Österreich. *Mitteilungen Klosterneuburg*. 27:18-22.
7. Van Vuuren, H. J., and L. M. Dicks. 1993. *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:223-229.
8. Mayer, K. 1974. Nachteilige Auswirkungen auf die Weinqualität bei ungünstig verlaufendem biologischen Säureabbau. *Obst- u. Weinbau*. 110:385-391.
9. Chatonnet, P., D. Dubourdieu, and J. N. Boidron. 1999. The influence of *Brettanomyces / Dekkera* yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:545-549.
10. Costello, P. J., and P. A. Henschke. 2002. Mousy off-flavour of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Ag. Food Chem.* 50:7079-7087.
11. Costello, P. J., T. H. Lee, and P. A. Henschke. 2001. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7:160-167.
12. Henick-Kling, T., T. Acree, B. K. Gavitt, S. A. Krieger, and M. H. Laurent. 1992. Sensory aspects of malolactic fermentation. *8th Australian Wine Industry Conference 25-29 October 1992*, Melbourne, Australia.

LE ESIGENZE NUTRIZIONALI DEI BATTERI MALOLATTICI

DR. SIBYLLE KRIEGER

Per molto tempo si è creduto che la degradazione dell'acido malico in acido lattico fosse una fonte di energia per la crescita dei batteri malolattici nel vino[1]. Radler[2] per primo confutò questa teoria, provando che in un mezzo sintetico la crescita dei batteri lattici dipende dalla presenza di zuccheri fermentescibili. In generale, i batteri lattici sono noti per essere particolarmente delicati, con esigenze nutrizionali molto complesse. La seguente sezione fornisce una rassegna delle diverse esigenze nutrizionali dei batteri lattici del vino in generale, con particolare attenzione ad *Oenococcus oeni*.

CARBOIDRATI

I batteri lattici trovano nel vino durante la fermentazione malolattica (FML) condizioni di crescita molto difficili. Durante il processo vengono degradati 0,4-0,8 g/L di zucchero, la maggior parte dei quali rappresentati da glucosio e fruttosio che sono la principale fonte di energia per la crescita batterica[3]. Radler[4] ha calcolato che 1 g/L di acido malico viene degradato da circa 0,01 grammi di batteri, e che 0,1 g di glucosio possono fornire abbastanza energia per produrre la biomassa necessaria. Quasi tutti i vini contengono quantità di zuccheri residui sufficienti per sostenere la crescita dei batteri ed assicurare la FML; ma è stato visto che la FML può essere inibita nei vini nei quali la somma delle concentrazioni in glucosio e fruttosio non raggiunge gli 0,2 g/L[5].

Oenococcus oeni è un organismo eterofermentativo e converte il glucosio in acido D-lattico, acido acetico (o etanolo) e CO_2. Quasi tutti i ceppi di batteri malolattici fermentano sia il glucosio sia il fruttosio, ma la maggior parte preferisce il secondo (ceppi fruttosofili). Quando si sviluppano su fruttosio come unica fonte carboniosa, parte dello zucchero viene convertito in mannitolo, che produce una mole aggiuntiva di ATP e minori quantità di acido acetico.

Tuttavia, un eccesso di mannitolo provoca nel vino un difetto, caratterizzato da un incremento nella produzione di acido acetico e la comparsa di un gusto amaro e dolciastro. Questo fenomeno è discusso in maggior dettaglio nella sezione "Difetti organolettici derivanti da una fermentazione malolattica incontrollata".

selezionati dalla natura
LALLEMAND

La maggioranza dei batteri lattici sono in grado di degradare i pentosi – arabinosio e xilosio – durante la fase di crescita[6]. Anche gli oligosaccaridi, i polisaccaridi ed i composti glicosidati possono fungere da substrato per la crescita dei batteri, e Rosi et al.[8] hanno mostrato l'effetto positivo dei polisaccaridi prodotti dal lievito (mannoproteine) sull'avvio e sulla velocità della FML. La maggior parte dei ceppi di batteri malolattici desiderati, *Oenococcus oeni,* sono capaci di produrre β-glicosidasi[7] e possono essere distinti da altri ceppi di batteri dalla loro incapacità a fermentare saccarosio, lattosio e maltosio.

COMPOSTI AZOTATI

I batteri lattici hanno bisogno di un'ampia disponibilità in amminoacidi, purine, pirimidine, vitamine e minerali[9], il che significa che il contenuto azotato del vino sarà significativamente alterato dalla FML[10]. Le esigenze in amminoacidi specifici variano da un ceppo all'altro. *Oenococcus oeni* e *Pediococcus pentosaceus* isolati dal vino possono necessitare fino a 16 diversi amminoacidi[11], ma non possono utilizzare fonti inorganiche di azoto come il fosfato ammonico. *Oenococcus oeni*, come è stato dimostrato da Fourcassie et al.[13], mostra un'esigenza assoluta per gli amminoacidi arginina, acido glutammico, triptofano ed isoleucina, ed altri 6 amminoacidi sono richiesti per la crescita ottimale di questo microrganismo. Lallemand, in collaborazione con il gruppo di Jean Guzzo, ha studiato le esigenze nutrizionali di quattro ceppi commerciali di batteri malolattici ed un ceppo di laboratorio (rapporto interno), ottenendo risultati in accordo a quanto riportato in altre due pubblicazioni scientifiche[12, 13]. In tutti e tre gli studi, 7 amminoacidi su 13 si sono rivelati essenziali per la crescita, con l'acido glutammico necessario a tutti i ceppi, e metionina, serina, fenilalanina e tiroxina essenziali per la maggior parte dei ceppi. Alanina, glicina e prolina esercitano un ruolo minore sulla crescita di *Oenococcus oeni*, mentre valina, isoleucina, istidina ed arginina possono essere definiti essenziali in quanto sono necessari per la maggior parte dei ceppi di *Oenococcus oeni* e sono molto graditi, anche se non indispensabili, per gli altri[14]. Le esigenze quantitative per ogni amminoacido sono state definite: la crescita dei batteri lattici è assicurata da una quantità di amminoacidi equivalente a meno di 2 mgN/L. Durante lo sviluppo dei batteri nel vino, la concentrazione di diversi amminoacidi può ridursi notevolmente, mentre altri possono mostrare un incremento[5]. La disponibilità in amminoacidi non si è mai dimostrata il fattore limitante della crescita[2], considerando che anche peptidi e proteine possono essere utilizzati con fonte di amminoacidi[15]. La crescita batterica è stimolata dalla presenza di composti azotati derivati dal lievito, come i peptidi e le mannoproteine della parete cellulare. Tutti i terreni non sintetici utilizzati per lo sviluppo dei batteri malolattici comprendono estratto di lievito o autolisato di lievito[16]. Per potere utilizzare queste fonti complesse di azoto per la loro crescita, i batteri devono essere capaci di idrolizzarle in sottounità e trasportarle all'interno della cellula. Gli studi di sequenziamento del genoma di *Oenococcus oeni* realizzati dal gruppo di Guzzo e dalla Genome Express Company hanno rivelato la presenza di geni che possono potenzialmente codificare per proteasi e peptidasi, oltre che per trasportatori specifici di peptidi e amminoacidi. Recentemente Remize et al.[17] hanno dimostrato che due diverse fonti di azoto derivate dal lievito hanno un impatto distinto, e dipendente dal ceppo, sulla crescita di *Oenococcus oeni*.

VITAMINE, MINERALI ED ALTRI FATTORI DI CRESCITA

Oltre all'azoto amminico, il batteri lattici devono avere a disposizione purine e pirimidine, oppure loro derivati. Adenina, xantina, guanina ed uracile hanno un effetto stimolatore sulla crescita dei batteri malolattici[4]. Numerose vitamine del gruppo B sono essenziali per la crescita e tutti i ceppi sembrano necessitare di acido folico e acido nicotinico[2]. Le esigenze in biotina, riboflavina, acido pantotenico e piridossina sono dipendenti dal ceppo. Durante la produzione industriale di ceppi commerciali di *Oenococcus oeni*, la resa in biomassa può essere accresciuta attraverso l'aggiunta di 1 mg/L rispettivamente di pantotenato di calcio, tiamina e piridossina[18]. La scoperta della facile contaminazione batterica della sala ketchup ha portato all'uso di succo di pomodoro come nutriente nella formula dei mezzi di crescita dei batteri lattici[19]. Amachi[20] ha descritto il "tomato-juice factor" come un derivato dell'acido pantotenico ed ha dimostrato che esso è in grado di stimolare la crescita di *Leuconostoc oenos* [*Oenococcus oeni*]. Zickler[21] ha messo in evidenza la necessità di potassio, sodio, magnesio e manganese in quantità relativamente elevate, per permettere la crescita di un batterio malolattico noto come *Bacterium gracile*. Il manganese gioca

anche un importante ruolo come co-fattore nella enzimologia della FML condotta dai batteri lattici[2]. Generalmente, tutti questi ioni sono presenti nel vino in concentrazioni sufficienti per la crescita ed il metabolismo del batteri lattici[2].

ACIDI ORGANICI

Sebbene il malico sia l'acido più importante nel metabolismo dei batteri lattici nel vino, anche altri acidi organici sono coinvolti, come discusso di seguito.

• Acido tartarico

Durante la FML si osservano a volte piccoli decrementi nella concentrazione di acido tartarico, dovuti più probabilmente ai cambiamenti nella solubilità dell'acido tartarico che ad una reale degradazione microbica[16]. Solo alcuni ceppi di *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus arabinosus* si sono dimostrati in grado di degradare l'acido tartarico[22], fenomeno sempre associato ad una contaminazione del vino.

• Acido malico

Gli acidi tartarico e malico sono i due principali acidi organici del vino, specialmente in quelli derivanti da climi freddi. L'acido malico è naturalmente presente nella forma L-. L'acido D-malico non è proprio del vino e non può essere metabolizzato dai batteri lattici. Diversi studi hanno mostrato che l'acido L-malico stimola la crescita e la produzione di biomassa in *Oenococcus oeni*[23, 24]. Nella crescita a bassi pH, i batteri malolattici degradano l'acido malico con maggiore velocità, mentre i carboidrati sono metabolizzati più lentamente. Il fenomeno porta ad un aumento globale del pH che, di per sé stesso, permette un incremento dell'utilizzazione dei carboidrati, il che spiega l'osservazione dell'effetto positivo dell'acido malico sulla crescita batterica[25]. Sebbene si pensasse che la conversione dell'acido malico in acido lattico e CO_2 non producesse energia[26], gli studi più recenti hanno dimostrato che cellule integre di *Oenococcus oeni* generano più ATP quando crescono in presenza di acido L-malico[27].

• Acido citrico

L'acido citrico è uno dei macrocomposti del mosto d'uva e vi ci si può ritrovare in concentrazioni variabili da 0,1 a 0,7 g/L. Il metabolismo dell'acido citrico da parte di *Oenococcus oeni* è stato messo in relazione con la sintesi di acido acetico, diacetile ed acetoino[28]. *Oenococcus oeni* non può crescere su acido citrico come unica fonte di carbonio, ma in presenza di una fonte di energia come il glucosio, la velocità di crescita e la produzione di biomassa di *Oenococcus oeni* risultano migliori in presenza di citrato.

Questo fenomeno è in parte dovuto all'aumento nella resa in ATP derivante dalla fosforilazione a livello di substrato durante il co-metabolismo del glucosio e dell'acido citrico[30]. In alcuni vini l'acido citrico è completamente metabolizzato, in altri viene solo parzialmente ridotto. La produzione di diacetile ed acetoino in *Oenococcus oeni* è direttamente correlata alle concentrazioni di acido citrico[31] e la massima presenza di diacetile si verifica dopo la completa degradazione dell'acido malico[32]. Durante la FML, la degradazione dell'acido citrico è ritardata rispetto a quella dell'acido malico.

DIPENDENZA DELLA DISPONIBILITÀ DI NUTRIENTI DALLE PRATICHE ENOLOGICHE

La chiarifica del mosto e del vino non solo rimuove una larga porzione di batteri lattici, ma riduce il tasso di crescita batterica, con conseguenze sulla qualità del vino[19]. Inoltre, la chiarifica rimuove nutrienti e particelle in sospensione che stimolano lo sviluppo dei batteri, avendo così un effetto sulla FML. Per ragioni simili, nei vini ottenuti con termovinificazione la FML si svolge con maggiore difficoltà. Anche la tempistica dell'inoculo di batteri lattici (trattata in una diversa sezione) può influenzare la cinetica della FML. La disponibilità in nutrienti dipende dalle interazioni con altri microrganismi del vino. Comunemente si pensa che colture miste di microrganismi vivano situazioni di antagonismo o sinergia tra popolazioni, ma che in generale esse esercitino un'influenza minima o nulla sulla dinamica di fermentazione. Nelle condizioni enologiche, esiste sempre la

possibilità di interazioni tra batteri lattici, lieviti, funghi, batteri acetici ed anche batteriofagi. Inoltre, possono esistere interazioni tra diverse specie e ceppi di batteri lattici[20]. L'antagonismo tra lieviti e batteri malolattici è stato spiegato con la competizione per i nutrienti e con la produzione di sostanze che possono inibire la crescita batterica, come la SO_2 o gli acidi grassi a media catena. D'altra parte, i lieviti possono aiutare lo sviluppo del batteri lattici nel vino e stimolare la FML. Durante il processo di autolisi del lievito vengono rilasciate nel vino vitamine ed amminoacidi, e per questo la stasi prolungata sulle fecce arricchisce il vino in micronutrienti e favorisce la FML. Costello[21] ha evidenziato che una rapida morte cellulare di *Oenococcus oeni* migliora la crescita di *Pediococcus* spp. In condizioni di alto pH, la crescita precoce di *Lactobacillus brevis* inibisce completamente lo sviluppo di *Oenococcus oeni*. Recentemente Gerbaux (comunicazione personale) ha dimostrato che le condizioni del vino che favoriscono la FML possono svolgere un ruolo inibente sullo sviluppo del lievito contaminante *Brettanomyces*.

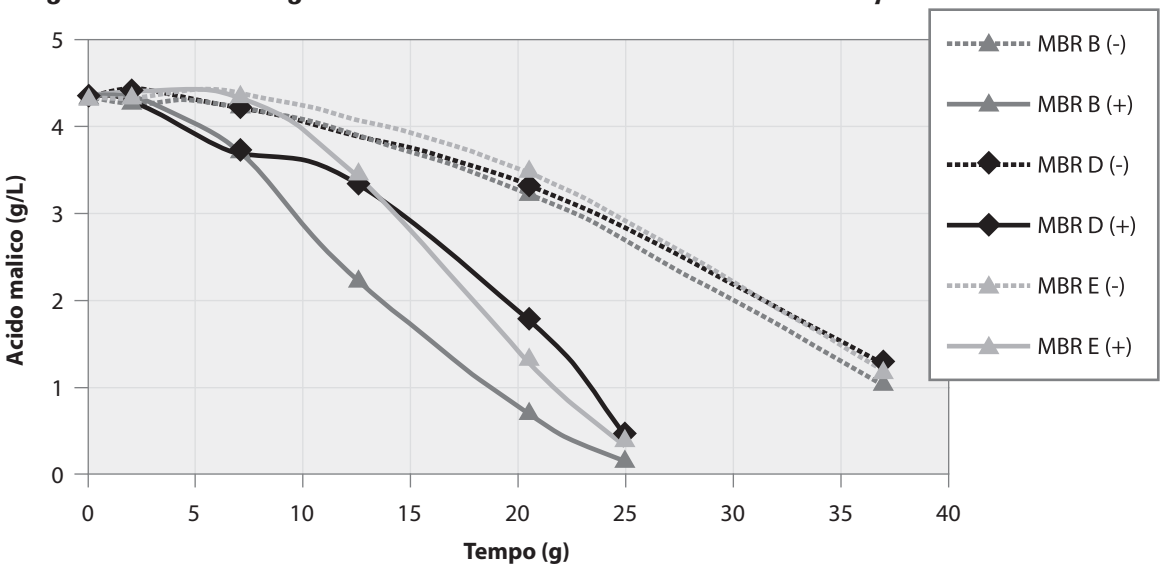
FORMULATI DI NUTRIENTI PER LA MALOLATTICA

Numerose ricerche hanno portato ad una maggiore comprensione delle esigenze nutrizionali delle colture starter di batteri malolattici, delle interazioni dei lieviti con queste colture e dell'effetto delle condizioni ambientali del vino sulla crescita dei batteri e sulla nutrizione dei lieviti durante la fermentazione alcolica. Ad esempio, è noto che se la fermentazione alcolica è condotta da un lievito con elevate esigenze nutrizionali, il mosto viene rapidamente impoverito dai fattori necessari a sostenere la crescita dei batteri lattici. In queste condizioni è necessario aggiungere uno specifico nutriente per batteri[33].

L'aggiunta di nutrienti per batteri è molto importante anche in mosti con bassi livelli naturali di nutrienti, perché alcuni lieviti possono produrre in queste condizioni quantità eccessive di SO_2, che inibisce fortemente i batteri malolattici. È bene ricordare che una corretta nutrizione sia dei lieviti che dei batteri è sempre essenziale.

In condizioni difficili di pH, SO_2, alcool e disponibilità azotata, l'uso di nutrienti aggiunti può permettere ad *Oenococcus oeni* di sopravvivere e moltiplicarsi. Un'attenta preparazione della coltura malolattica starter ed un adeguato uso di preparati nutritivi messi a punto per quelle colture assicura un avvio rapido della FML. La Fig. 1 illustra i risultati ottenuti con l'inoculo di una coltura starter di batteri malolattici in un vino Chardonnay , con o senza aggiunta di nutrienti per batteri. Le cinetiche di degradazione dell'acido malico, per tutte e tre le colture, sono molto più rapide quando si usano nutrienti, mentre senza aggiunta i batteri arrivano a degradare solamente 1 g/L di acido malico.

Figura 1. Cinetica di degradazione dell'acido malico in un vino Chardonnay 2003



Alcool 14,1% v/v, SO_2 totale 14 mg/L, pH 3,38
Inoculo diretto di batteri malolattici con(+) o senza(-) aggiunta di nutrienti per batteri

Si raccomanda quindi un'adeguata aggiunta di nutrienti alle colture starter di batteri malolattici, così come è importante che anche i lieviti fermentino in condizioni nutritive ottimali. La nutrizione dei batteri lattici è diversa da quella dei lieviti e deve essere controllata con cura: nei casi di vini con limiti compositivi, essa può essere cruciale per ottenere successo nella FML. Per dirla con le parole dell'immortale Shakespeare, "Essere, o non essere…"

BIBLIOGRAFIA

1. Kvasnikov, E. I., and G. F. Kondo. 1960. Fermentation by heterofermentative lactic acid bacteria which cause wine spoilage. Cit.: *Chem. Abstr.* 54:14575.

2. Radler, F. 1966. Die mikrobiologischen Grundlagen des Säureabbaus in Wein. Zentralbl. *Bakteriol. Parasiten Abt. II*. 120:237-287.

3. Melamed, N. 1962. Détermination des sucres résiduels du vin, leur relation avec la fermentation malolactique. *Ann. Techn. Agric.* 11:5-11, 107-119.

4. Radler, F. 1958. Untersuchung des Säureabbaus im Wein. III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* 31:224-230.

5. Henick-Kling, T. 1986. Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillius plantarum* in wine. PhD thesis. University of Adelaide, South Australia.

6. Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, and P. Sudraud. 1975. Sciences et Techniques du vin. *Traité d'œnologie (Tome 2)*. Dunod, Paris.

7. Grimaldi, A., H. McLean, and V. Jiranek. 2000. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic*. 51/4:362-369.

8. Rosi, I., A. Gheri, P. Domizio, and G. Fia. 2000. Production de macromolécules pariétales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Revue des Œnologue*s. 94:18-20.

9. Radler, F. 1963. Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau. Übersicht. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. *Vitis*. 3:207-236.

10. Du Plessis, L. De W. 1963. The microbiology of South African winemaking. Part V. Vitamin and amino acid requirements of lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci*. 6:485-494.

11. Weiller, H. G., and F. Radler. 1972. Vitamin- und Aminosäurebedarf von Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. Mitt. *Höheren Bundeslehr- und Versuchsanstalt Wein- und Obstbau Klosterneuburg.* 22:4-18.

12. Garvie, G. I. 1967. *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 48:431-438.

13. Fourcassie, P., E. Makaga-Kabinda, A. Belarbi, and A. Maujean. 1992. Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strain in 18 media deficient in one amino acid. *J. App. Bacteriology* 73:489-496.

14. Remize, F., M. Guilloux-Benatier, A. Gaudin, and Y. Kong. 2005. Étude des besoins et des capacités d'utilisation de l'azote par *Oenococcus oeni* en vinification. Rapport final interne.

15. Feuillat, M., P. Bidan, and Y. Rosier. 1977. Croissance de bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin. *Ann. Technol. Agric*. 26:435-447.

16. Kunkee, R. E. 1967. Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9:235-279.

17. Remize, F., Y. Augagneur, M. Guilloux-Benatier, and J. Guzzo. 2004. Effect of nitrogen limitation and nature of feed upon *Oenococcus oeni* metabolism and extracellular protein production. *J. Appl. Microbiol.* Online publication date: 8 December 2004.

18. Krieger, S. A. 1989. Optimierung des biologischen Säureabbaus in Wein mit Starterkulturen. PhD thesis. University of Hohenheim, Germany.

19. Mickle, F. L. 1924. *Abstr. Bacteriol.* 8:403-404.

20. Amachi, T. 1975. Chemical structure of a growth factor (TJF) and its physical significance for malolactic bacteria. In: Carr J. G., C. V. Cutting, G. C. Whiting (Eds). *Lactic acid bacteria in beverages and food*. Academic Press, London. 103-118.

21. Zickler, F. 1964. Mikrobiologische Untersuchungen des biologischen Säureabbaus in Wein. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II* 117:702-713.

22. Henick-Kling, T. 1988. Yeast and bacterial control in winemaking. In: Linskens, H. F. and J. F. Jackson, (Eds). *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 6*. Springer Verlag. 296-316.

23. Champagne, C. P., N. Gardner, and G. Doyon. 1989. Production of *Leuconostoc oenos* biomass under pH control. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2488-2492.

24. Krieger, S. A., W. P. Hammes, and T. Henick-Kling. 1992. Effect of medium composition on growth rate, growth yield and malolactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZH1-t7-1. *Food Microbiology.* 9:1-11.

25. Miranda, M., A. Ramos, M. Veiga-da-Cunha, M. C. Loureiro-Dias, and H. Santos. 1997. Biochemical basis for glucose-induced inhibition of malolactic fermentation in *Oenococcus oeni*. *J. Bacteriol.* 179:5347-5354.

26. Kandler, O., J. Wintre, and K. O. Stetter. 1973. Zur Frage der Beeinflussung der Glucosevergärung durch L-Malat bei *Leuconostoc mesenteroides*. *Arch. Mikrobiol.* 90:65-75.

27. Cox, D. J., T. Henick-Kling. 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* 171:5750-5752.

28. Shimazu, Y., M. Uehara, and M. Watanbe. 1985. Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem*. 49:2147-2157.

29. Salou, P., P. Loubière, and A. Pareilleux. 1994. Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during co-metabolism of glucose with citrate or fructose. *Appl. Environ. Microbiol*. 60:1459-1466.

30. Ramos, A., and H. Santos. 1996. Citrate and sugar co-fermentation in *Leuconostoc oenos*, a 13C nuclear magnetic resonance study. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2577-2585.

31. Nielsen, J. C., and M. Richelieu. 1999. Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol*. 65:740-745.

32. Pfitzer, B. 1992. Zur Physiologie der Bildung aroma- bzw. geschmacksbeeinflussender Substanzen durch Milchsäurebakterien. Thesis. University of Hohenheim, Germany.

33. Lallemand Winemaking Update Number 2, 2004.

FATTORI AMBIENTALI CHE INFLUISCONO SULLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

PIET LOUBSER

La fermentazione malolattica (FML) è generalmente considerata come la semplice degradazione dell'acido malico nei vini rossi, ed in alcuni vini bianchi, accompagnata dalla formazione di CO_2 ed acido lattico e dalla riduzione dell'acidità totale del vino. In effetti questo è ciò che accade, ma la descrizione di cui sopra è sicuramente semplicistica. La degradazione dell'acido malico in acido lattico impartisce stabilità microbiologica; la formazione di diversi composti ha un impatto organolettico importante. Inoltre, la riduzione dell'acidità ed il corrispondente incremento del pH, contribuiscono a rendere il vino più "morbido", "rotondo", "corposo"[2, 4, 9, 10, 15, 19].

Nel passato la FML era condotta nella maggioranza dei casi da popolazioni indigene di batteri, non sempre con risultati conformi alle aspettative. Negli ultimi anni sono diventate disponibili sul mercato colture commerciali di batteri di grande affidabilità che non solamente offrono maggiore controllo e maggior successo nell'avviare la FML, ma anche apportano un contributo sensoriale al vino. Queste colture commerciali sono selezionate sulla base di criteri molto rigidi e riescono a funzionare anche in condizioni sfavorevoli. Esse hanno un impatto positivo sul profilo organolettico del vino e contribuiscono ad aumentare la complessità e l'equilibrio gustativo[2, 4, 7, 9, 15, 19].

Sono numerosi i fattori che giocano un ruolo nel successo della FML, alcuni ben noti, altri meno conosciuti: essi saranno discussi di seguito nel dettaglio, per meglio comprendere il processo e le possibilità di gestione della FML.

FATTORI BEN CONOSCIUTI CHE INFLUENZANO LA FML

I fattori più noti da cui dipende il successo della malolattica comprendono la SO_2, il pH, l'alcool e la temperatura. Affinché la FML si svolga regolarmente, i valori di questi parametri devono restare all'interno di certi limiti, dove i batteri si sviluppano senza problemi. È importante ricordare che questi fattori agiscono in sinergia tra loro e che, quindi, il loro effetto globale è maggiore della sommatoria degli effetti dovuti ad ogni singolo fattore. Parallelamente esiste anche un effetto di compensazione, per cui un fattore a livelli favorevoli può compensare una situazione critica rispetto ad altri fattori.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

Anche se è difficile assegnare valori esatti ad ogni componente, è essenziale attenersi alle specifiche fornite dai diversi produttori di colture malolattiche.[2, 4, 17, 18] Il rispetto delle regole è forse l'azione più importante per assicurare una FML di successo, ma in certi casi risulta difficile produrre un vino con quadro analitico conforme ai limiti fissati.

I vini rossi prodotti nel Nuovo Mondo che sono raccolti ad avanzata maturità e quindi hanno gradi alcolici elevati sono un tipico esempio. In questi casi è importante usare ceppi di lievito adatti per la fermentazione alcolica ed associarvi un ceppo di batteri adeguato per la FML.

In alcuni casi, anche quando tutti i parametri chimici del vino rientrano nei livelli indicati, la FML può incontrare difficoltà.[13]

Le possibili cause di queste anomalie sono l'oggetto della successiva trattazione.

FATTORI MENO CONOSCIUTI CHE INFLUENZANO LA FML

Sono numerosi i fattori poco conosciuti che possono influenzare lo svolgimento della FML. Il fatto che essi siano meno noti non significa che siano meno importanti.

• Tannini

Studi recenti hanno mostrato che i tannini dell'uva possono avere un'influenza negativa sui batteri malolattici, e di conseguenza sullo svolgimento della FML. Queste ricerche hanno mostrato che i vini da certe varietà di uva rossa, come il Merlot, svolgono la FML con maggiore difficoltà.[12, 18]

Lallemand ha recentemente ottenuto risultati che dimostrano che gli acidi fenolici in un terreno di crescita di laboratorio influenzano la crescita di alcuni ceppi di batteri. L'effetto può essere sia positivo che negativo, secondo la specie batterica, l'acido fenolico specifico e la sua concentrazione. Per esempio, l'acido caffeico a 50 mg/L e 100 mg/L genera un effetto positivo sulla crescita batterica e sulla degradazione dell'acido malico. L'acido ferulico, invece, sembra avere un effetto negativo, ma solo su alcuni ceppi. L'effetto inibente dell'acido p-cumarico è il risultato essere il più evidente, e maggiore all'aumentare della concentrazione. Questi risultati sono in accordo, in linea di principio, con quanto riportato precedentemente da altri autori[9, 10].

In queste circostanze limitanti, è bene considerare l'aggiunta di un nutriente per aiutare la FML.

• Lievito utilizzato nella fermentazione alcolica

È noto da tempo che alcuni lieviti selezionati per la conduzione della fermentazione alcolica interagiscono meglio di altri con i batteri malolattici facilitando la FML. In certe condizioni, alcuni lieviti possono produrre elevate quantità di SO_2, che ha un effetto negativo sulla crescita e sulla vitalità dei batteri malolattici. Alcuni lieviti che hanno esigenze nutrizionali superiori alla media, possono esaurire il mezzo ad un livello tale da non lasciare nutrienti disponibili ai batteri. L'applicazione di un'adeguata strategia nutrizionale per questi lieviti nelle prime fasi della fermentazione alcolica può essere di grande utilità nell'evitare questo problema.[10, 13, 16, 17]

• Deficienze nutrizionali

Per avere una FML di successo, è importante che i batteri abbiamo a disposizione nutrienti in quantità sufficiente. La criticità della nutrizione dei batteri è resa evidente dal seguente esempio:

> un vino da Pinotage, varietà diffusa in Sud Africa, è stato inoculato con una coltura commerciale di batteri malolattici alla fine della fermentazione alcolica; 110 giorni più tardi era stato degradato solo il 40% dell'acido malico originale. Si è proceduto quindi ad un controllo analitico dell'acidità volatile e ad un'analisi microbiologica. L'acidità volatile era ancora bassa, e la popolazione di *Oenococcus oeni* era significativa ed apparentemente in buona salute, a conferma della bontà

dell'inoculo. Sulla base di queste analisi, si è deciso di aggiungere un nutriente specifico. Undici giorni più tardi, la FML era completa.[11, 14]

Il concetto dell'aggiunta di nutrienti non è semplice, ed indissolubilmente legato a buone pratiche igieniche di cantina ed alle modalità di inoculo dei batteri. È importante assicurarsi che la FML sia sempre condotta in buone condizioni igieniche e che la SO_2 presente nel vino sia sufficiente a controllare le popolazioni indigene. È importante anche inoculare il vino con le dosi consigliate di coltura starter, per assicurarsi che sia presente nel vino una popolazione adeguata di "buoni" batteri. L'aggiunta di nutrienti non è mai consigliata quando la FML è condotta da popolazioni batteriche spontanee e sconosciute. Per maggiori dettagli fare riferimento alla sezione "esigenze nutrizionali dei batteri malolattici".

• Compattazione delle fecce

La pressione idrostatica in vasca compatta sul fondo della vasca le fecce che "intrappolano" lieviti, batteri e nutrienti impedendo loro di funzionare in modo corretto.[5] È stato recentemente osservato che la dimensione della vasca è inversamente correlata con la rapidità d'avvio della FML. I problemi causati dalle vasche di grandi dimensioni possono essere risolti attraverso opportuni rimontaggi in corrispondenza dell'inoculo di batteri o nel giorno successivo.[8]

Un raccomandazione di carattere generale è quella di smuovere regolarmente le fecce (almeno settimanalmente) per assicurarsi che batteri e nutrienti restino in sospensione.[8, 14]

• Attività residua da lisozima

Se si è utilizzato lisozima durante la vinificazione, gli eventuali residui possono influire sul tempo necessario all'avvio della FML. È importante attenersi alle istruzioni del fornitore riguardanti i tempi da attendere tra l'uso di lisozima e l'inoculo di batteri malolattici.[10] In molti casi viene consigliato il travaso del vino per eliminare le fecce grossolane.

• Eccessiva presenza di ossigeno

I batteri malolattici sono sensibili ad una eccessiva presenza di ossigeno e conseguentemente è da evitare una loro esposizione al gas dopo il completamento della fermentazione alcolica. Sebbene anche bassi livelli di ossigeno possano avere un effetto negativo, la microssigenazione può aiutare la malolattica grazie all'azione di dolce rimescolamento della massa associata alla risalita delle bolle.[8, 17]

• Residui di fungicidi

Alcuni insetticidi ma soprattutto fungicidi possono influire negativamente sullo svolgimento della fermentazione malolattica. I più pericolosi sono i residui di composti sistemici utilizzati nelle annate umide per controllare la *Botrytis* e di conseguenza in queste annate l'attenzione deve essere maggiore. Chi vinifica deve essere a conoscenza dei trattamenti effettuati sulle uve, che devono rispettare i tempi di carenza prescritti per ogni prodotto antifungino.[2, 3]

• Concentrazione iniziale dell'acido malico

Il livello iniziale di acido malico può variare in base alla varietà di uva ed all'annata: conseguentemente, la durata della FML può essere diversa da un anno all'altro.[13, 14] È molto difficile avviare la FML in vini che contengono meno di 0,8 g/L di acido malico.[8, 10, 13, 14] In questi casi, si raccomanda di utilizzare colture starter con un'elevata attività malato permeasi.

• Acidi grassi

Il successo della FML dipende in grande misura dalla capacità della coltura malolattica di raggiungere e mantenere una elevata vitalità cellulare nel vino. Affinché ciò avvenga, sono necessari nel mezzo sufficienti quantità di acido oleico. Il successo della FML dipende anche dalla capacità del ceppo batterico di assimilare acido oleico dal mezzo. Alcune pratiche enologiche, come la chiarifica dei mosti, possono portare a vini carenti in acido oleico. In questi casi, il successo della FML dipende fortemente dal livello di acido oleico (C18:19) e acido ciclico lattobacillico (C19:C9) presente nel ceppo batterico stesso. Nel caso in cui la FML sia indotta inoculando popolazioni molto alte di batteri, il fenomeno può passare inosservato.[2]

Gli acidi grassi a media catena possono avere un effetto negativo sul corso della FML.

Alexandre et al. (2004) e Edwards et al. (1990) hanno indicato come causa dell'antagonismo tra lieviti e batteri lattici la produzione di alcuni acidi grassi a media catena (da C6 a C12) derivanti dal metabolismo del lievito.[1, 6]

BIBLIOGRAFIA

1. Alexandre, H., P. J. Costello, F. Remize, J. Guzzo, and M. Guilloux-Benatier. 2004. *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: Current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 93:141-154.
2. Bauer, R., and L. M. T. Dicks. 2004. Control of malolactic fermentation in wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol. 25/2:74-88.
3. Bordons, A., M. Carme Masque, and M. Vidal. 1998. Isolation and selection of malolactic bacteria and effect of pesticides. In: *The Management of Malolactic Fermentation and Quality of Wine*, Lallemand Technical Meeting, Verona, Italy, 16-17 April 1998. 51-56.
4. Davis. C., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H. Lee, and G. H. Fleet. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:290 – 301.
5. Delteil, D., 2005. Personal communication. (Mr. Delteil is a consultant to the wine industry.)
6. Edwards, C. G., R. B. Beelman, C. E. Bartey, and A. L. McConnell. 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:48-56.
7. Henick-Kling, T., and T. E. Acree. 1998. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. In: *The Management of Malolactic Fermentation and Quality of Wine*, Lallemand Technical Meeting, Verona, Italy, 16-17 April 1998. 17-22.
8. Krieger, S. 2005. Personal communication. (Dr. Krieger is Head of Research and Development, Lallemand Inc.).
9. Kunkee, R. E. 1967. Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9:235-279.
10. Lallemand Research and Development Reports, 1999-2004.
11. Lallemand Winemaking Update. 2004. *Bacteria Nutrition – The Key to Successful Malolactic Fermentation*. 2:1-2.
12. Lonvaud-Funel, A. 2001. Interactions between lactic acid bacteria of wine and phenolic compounds. In: *Nutritional Aspects II, Synergy between Yeast and Bacteria*, Lallemand Technical Meeting, Perugia, Italy, 27-30 April 2001. 27-32.
13. Loubser, P. A. 2004. Familiarise yourself with Malolactic Fermentation. *Wynboer Technical Yearbook* (a Wineland publication). 2004/5:32-33.

14. Loubser, P. A. Own experimental work, 1993-2004.

15. Rankine, B. 1990. Malolactic fermentation is more complex than it appears. *The Australian Grapegrower and Winemaker*. 14.

16. Rauhut, D. 2001. Influence of the time of inoculation on the malolactic fermentation and the interactions between yeast and bacteria. In: *Nutritional Aspects II, Synergy between Yeast and Bacteria*, Lallemand Technical Meeting, Perugia, Italy, 27-30 April 2001. 39-47.

17. Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Doneche, and A. Lonvaud. 1998. *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley and Sons Ltd.

18. Vivas, N., M. Augustin, and A. Lonvaud-Funel. 2000. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus Oeni* (*Leuconostoc Oenos*, 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1675-1678.

19. Wibowo, D., R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wines. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:302–313.

ASPETTI GENERALI – GESTIONE RAGIONATA DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA NEL VINO

DIDIER THEODORE

La Parte Seconda di "La fermentazione malolattica nel vino" riguarda l'applicazione pratica delle informazioni scientifiche presentate nella Parte Prima.

Oenococcus oeni, come spiegato nella Parte Prima, è il batterio malolattico universalmente riconosciuto come la specie responsabile delle fermentazioni malolattiche del vino che contribuiscono in modo significativo a migliorarne la qualità.

Anche in condizioni ideali, i batteri malolattici hanno esigenze nutrizionali complesse e crescono molto lentamente. Non è sorprendente quindi che condizioni sfavorevoli alla crescita possono rendere in un vino molto difficile l'avvio ed il completamento della FML. Per far partire la FML, è necessario che la popolazione batterica raggiunga o superi le 10^6 UFC/ml, e le condizioni chimico-fisiche del vino possono rendere questo obiettivo difficile da raggiungere.

GESTIONE DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA IN CANTINA

I principali fattori che influenzano la crescita batterica nel vino sono l'alcool, la SO_2, la temperatura ed il pH. I batteri iniziano a mostrare segni d'inibizione da etanolo a circa 10% v/v. La solforosa libera deve essere mantenuta quanto più possibile bassa, per non rendere ancora più critica la crescita e la sopravvivenza dei batteri malolattici. La FML si svolge regolarmente a temperature tra 18 e 20°C, ma la crescita batterica è fortemente ridotta a temperature inferiori. I batteri possono crescere a pH compresi tra 3 e 4, con livelli ottimali vicini a 4. I pH alti rendono più facile lo svolgimento della FML, ma in vini poco acidi è più facile che si sviluppino ceppi di batteri lattici con impatto negativo sulla qualità del vino.

È necessario considerare tutti questi parametri in relazione agli altri, dal momento che la loro influenza non è esercitata individualmente, ma si somma a quella degli altri fattori. Il vino, quindi va considerato come un mezzo non favorevole ad una facile crescita dei microrganismi. Per superare lo stress naturale del mezzo vino, e per assicurare la crescita dei microrganismi ed il completamento della FML, è raccomandato l'impiego di colture starter di batteri. *Oenococcus oeni* è il microrganismo principe,

selezionati dalla natura
LALLEMAND

ed è preferibile aggiungerlo in quantità adeguata, in modo da non costringerlo a crescere e moltiplicarsi nelle condizioni del vino e potere avviare la FML senza attendere lo sviluppo di un numero sufficiente di cellule.

Sul mercato sono disponibili colture di batteri malolattici che possono essere utilizzate per l'inoculo. Queste colture sono disponibili in forma liquida, congelata e liofilizzata. Alcune colture liofilizzate sono state adattate con processo biofisico per potere resistere alle difficili condizioni del vino, in modo da potere essere aggiunte direttamente al vino senza fase di attivazione. Gli altri tipi di preparazioni batteriche richiedono passaggi successivi di acclimatazione e moltiplicazione prima di essere introdotti nel vino, con protocolli che richiedono organizzazione e lavoro supplementare. Quando essi sono eseguiti correttamente, normalmente assicurano una FML completa anche nei vini più difficili, poiché il ceppo selezionato è stato scelto per la sua resistenza a condizioni avverse. Quando si usano colture ad inoculo diretto nel vino, o quelle che prevedono un singolo passaggio di moltiplicazione, l'obiettivo è di inoculare il vino con una popolazione minima di batteri di 10^6 UFC/ml , senza avere quindi necessità di sviluppo batterico per avviare la FML.

La ricerca ha permesso una migliore conoscenza della nutrizione batterica e dell'influenza dell'ambiente vino e della nutrizione del lievito in fermentazione alcolica sullo sviluppo dei batteri lattici. È stato dimostrato che, durante la fermentazione alcolica, i lieviti con elevate esigenze nutrizionali impoveriscono velocemente il mezzo dai fattori di crescita necessari allo sviluppo dei batteri lattici. Questo fenomeno può verificarsi in tutti i mosti d'uva, ma è particolarmente importante con varietà d'uva che hanno naturalmente livelli più bassi in nutrienti. Questa ricerca ha portato a consigliare l'aggiunta di nutrienti per batteri dopo la fermentazione alcolica per aiutare l'avvio ed il completamento della FML. Anche un'adeguata nutrizione del lievito è importante.

TEMPISTICA DELL'INOCULO

È imperativo che il vino sia inoculato con una coltura starter di batteri corrispondente ad una popolazione di 10^6 UFC/ml, per garantire la presenza di un numero di batteri sufficiente a degradare l'acido malico. Quanto la fermentazione alcolica si avvia e si completa regolarmente, la degradazione dell'acido malico da parte del batteri malolattici non è normalmente responsabile di produzioni eccessive di acidità volatile (AV). Quando la volatile aumenta oltre la normalità, la causa è generalmente da ricercare nella crescita di batteri indigeni causata probabilmente dalle scarse condizioni igieniche in condizioni di pH elevato. Questi batteri indigeni si sviluppano utilizzando zuccheri come fonte di energia, e producendo acido acetico.

La ricerca ha dimostrato che, quando si comprendono le interazioni tra i lieviti ed i batteri malolattici, è possibile inoculare con successo lo starter malolattico in diversi momenti durante la fermentazione alcolica. Tuttavia, secondo le pratiche di vinificazione adottate – microssigenazione, termovinificazione o macerazione prolungata – la FML può essere ritardata fino al termine della fermentazione alcolica. In questi casi, giocano un ruolo fondamentale la SO_2, la pulizia del vino ed il regime termico adottati.

Nel caso di vini con pH elevato può essere di beneficio un'aggiunta precoce di lisozima (un enzima che attacca specificatamente i batteri Gram+) e l'inoculo, in un secondo momento, della coltura batterica desiderata. L'introduzione delle colture starter commerciali ha permesso agli enologi di integrare meglio il loro processo di vinificazione con la gestione della FML.

POSSIBILI PROBLEMI

Invece di migliorare il vino, i batteri lattici possono in certi casi portare cambiamenti indesiderati. Quando la FML di svolge naturalmente e senza controllo, ad opera di ceppi indigeni di *Lactobacillus* e *Pediococcus*, il vino può andare incontro a deterioramenti qualitativi. Questi composti non solo mascherano gli aromi primari, ma possono apportare note indesiderate al profilo sensoriale del vino. Ad esempio, l'acidità volatile irrita le mucose nasali e causa un gusto aspro. Il diacetile può apportare aromi di frutta secca o caratteristiche che ricordano il caramello, il lievito o anche la pelliccia animale bagnata.

Gli odori indesiderati derivati dalla crescita di microrganismi contaminanti possono generare caratteristiche simili a yogurt, burro rancido o sudore. Nei vini rossi i fenoli volatili possono produrre odori che ricordano la stalla equina, nei bianchi gli stessi composti possono far insorgere note di antisettico. Questi odori possono essere accompagnati da sensazioni gustative di amaro o di metallico. Inoltre, la crescita incontrollata di microrganismi indesiderati può portare alla formazione di composti secondari come le ammine biogene (istamina, putrescina e cadaverina) e sostanze potenzialmente cancerogene come l'etil-carbammato e l'ocratossina A.

PROCEDURE ANALITICHE

La decarbossilazione dell'acido malico è l'effetto più ovvio della FML, che si traduce in una riduzione dell'acidità totale e nel-l'aumento del pH. Il modo più semplice per monitorare la FML è quello di analizzare chimicamente l'acido malico per seguirne la scomparsa. I due metodi più comuni sono descritti di seguito

• Cromatografia su carta

È una tecnica cromatografica quantitativa utilizzata per seguire visivamente la scomparsa dell'acido malico. Non è precisa, ma è di facile applicazione in cantina.

• Tecniche enzimatiche

Questa tecnica analitica è più complessa e più costosa, ma molto precisa. Essa fa uso dell'analisi chimica per determinare la concentrazione assoluta di ogni acido organico che si desidera quantificare nella matrice vino. Durante la FML, l'acido L-malico è specificatamente convertito in acido L-lattico, e la misura della presenza dell'acido L-lattico può essere utilizzato come indi-catore dell'avvio della FML. In genere, se il livello di acido L-lattico raggiunge 200-300 mg/L, si può pensare con ragionevole certezza che la FML sia iniziata. Normalmente la FML si considera terminata quando la concentrazione in acido malico scende al di sotto di 100-200 mg/L.

• Conteggio microbiologico in piastra

Questa tecnica isola e conteggia il numero di batterli malolattici vitali nel vino. La loro crescita è molto lenta, quindi sono necessari fino a 7 giorni per potere contare il numero di cellule di *Oenococcus oeni*. La crescita dei batteri indesiderati, come *Lactobacillus* e *Pediococcus*, è più rapida, ed il numero di questi microrganismi può essere ottenuto entro 2 giorni.

• Osservazione al microscopio

Questo metodo si basa sull'osservazione diretta del vino attraverso un microscopio di buona qualità. Non è quantitativa, ma quando attuata da un tecnico esperto, permette di ottenere una valutazione veloce della microflora presente nel vino.

GUIDA ALL'USO DEI CEPPI COMMERCIALI

GORDON SPECHT

Con il progredire delle biotecnologie, i produttori di vino acquisiscono una migliore comprensione del processo di vinificazione. Il controllo della fermentazione malolattica (FML), una parte importante del processo di produzione del vino, è stato a lungo ignorato fino a che non sono diventate disponibili le colture commerciali di batteri malolattici. Per varie decadi erano disponibili solo le colture liquide di batteri; all'inizio degli anni '80 sono state sviluppate colture congelate e liofilizzate. Gli anni '90 hanno visto lo sviluppo delle colture batteriche liofilizzate ad inoculo diretto, che hanno virtualmente rivoluzionato il controllo e la pianificazione della FML nel vino.

La maggior parte delle colture starter disponibili traggono vantaggio da uno stoccaggio in condizioni refrigerate nelle loro confezioni originali ed integre, che devono essere aperte solo immediatamente prima dell'uso. Inoltre, i batteri liofilizzati devono evitare il contatto con l'ossigeno, con eccessi d'umidità e con alte temperature che sarebbero negative per la sopravvivenza dei microrganismi. Per ottenere il massimo dei vantaggi dalle colture commerciali di batteri malolattici, è importante seguire accuratamente le raccomandazioni del produttore nel loro uso e stoccaggio.

Tutti i tipi di colture batteriche che richiedono una o più fasi di preparazione dello starter per l'inoculo trarranno vantaggio dalle seguenti considerazioni:

- I contenitori utilizzati per la preparazione dello starter malolattico devono essere puliti e sanitizzati, poiché la maggior parte dei microrganismi presenti in una cantina cresceranno più velocemente di *Oenococcus oeni*, il batterio normalmente utilizzato per le preparazioni commerciali.
- Tutti i ceppi di lievito favorevoli alla FML possono essere aggiunti alla preparazione dello starter. Questo aiuterà i batteri ad adattarsi all'ambiente alcolico ed aiuterà a controllare i microrganismi contaminanti.
- La presenza di lieviti causa la produzione di schiuma. Lasciare uno spazio di testa sufficiente nel contenitore dello starter malolattico per far posto alla schiuma, ed installare sul contenitore una chiusura adatta alle fermentazioni

selezionati dalla natura
LALLEMAND

• Controllare l'avanzamento della coltura malolattica con un microscopio per vedere quanto bene stanno crescendo le cellule. Al microscopio, le cellule in buon stato di salute di *Oenococcus oeni* appaiono come coppie di cellule, o come corte catenelle o anche a cellule singole. Lo starter è pronto quando 50-100% dell'acido L-malico è stato degradato. Fare riferimento alla sezione "Controllare la fermentazione malolattica" per maggiori dettagli.

La tabella 1 sintetizza i parametri applicabili per i diversi tipi di starter malolattici disponibili in commercio. Le informazioni fornite sono a solo scopo illustrativo e sono state ottenute direttamente dalle diverse schede tecniche dei produttori. Per informazioni specifiche, consultare direttamente i rispettivi fornitori.

Tabella 1: proprietà delle colture batteriche in commercio

PROPRIETÀ	TIPO DI COLTURA DI BATTERI MALOLATTICI			
	CONGELATA	**SOSPENSIONE LIQUIDA**	**INOCULO DIRETTO (MBR®)**	**LIOFILIZZATA TRADIZIONALE (STANDARD)**
TEMPERATURA DI CONSERVAZIONE E SCADENZA	Fino a 120 giorni a -26°C o 1 anno a -29°C in un frigorifero non defrost	2 giorni a temperatura ambiente o 2 settimane a 4°C	18 mesi a 4°C o 30 mesi a -18°C	18 mesi a 4°C o 30 mesi a -18°C
CONFEZIONE APERTA	Una volta scongelata, usare immediatamente. Non ricongelare	USO IMMEDIATO	USO IMMEDIATO	USO IMMEDIATO
TEMPO PER LA PREPARAZIONE DELL'INOCULO	48 ore prima dell'inoculo	Espansione in volume 10 volte maggiore in 3-7 giorni	0-15 minuti	3-14 giorni
AGGIUNTA DI NUTRIENTI	30 g di estratto di lievito nel mezzo di attivazione	1 g di estratto di lievito per litro di mezzo di crescita	Nutrienti malolattici specifici consigliati in casi di FML in condizioni difficili	Nutrienti malolattici specifici consigliati in casi di FML in condizioni difficili
DOSI D'IMPIEGO	Rossi: ca. 1 g/hL Bianchi: 3-8,5 g/hL	Inoculo pari al 2-5% del volume oppure, quando di usa vino nella preparazione dello starter, 5-10% del volume	Ca. 1 g/hL	Ca. 1 g/hL

Continúa

	CONGELATA	SOSPENSIONE LIQUIDA	INOCULO DIRETTO (MBR®)	LIOFILIZZATA TRADIZIONALE (STANDARD)
PREPARAZIONE DELL'INOCULO	Scongelare in acqua a temperatura ambiente, non in frigorifero. Miscelare 3 litri di mosto d'uva, 3 litri di acqua e 30 g di estratto di lievito. Aggiustare il pH a 4,0 con carbonato di calcio o altro tampone autorizzato e omogeneizzare bene la massa. Lasciare a 18-24°C per 48 ore prima dell'inoculo.	Usare mosto chiarificato e pulito, senza SO_2. Se possibile, scaldare il mosto a 60°C. Ridurre gli zuccheri a 18°Brix con acqua. Se non è disponibile mosto, sostituirlo con una miscela composta da 50% vino (SO_2 totale bassa e libera < 10 ppm), 25% acqua e 25% succo di mela. Aggiustare il pH a 3,5-3,6 con carbonato di calcio. Se il pH del vino da inoculare è inferiore a 3,2, aggiustare il pH a 3,4. Aggiungere la coltura e mantenere la temperatura a 22-26°C. Seguire la degradazione dell'acido malico: quando è completa usare la miscela al 10% per espandere la coltura o per l'inoculo. Se si è usato vino per la preparazione della coltura starter, espandere la coltura raddoppiando il volume con vino, fino a che la coltura starter non raggiunge il 5-10% della massa finale.	Non necessaria, ma può essere sciolta in acqua pulita e senza cloro per facilitarne la manipolazione.	Reidratare in una miscela di acqua e vino 50:50. Il vino deve essere con pH > 3,3 e SO_2 totale < 30 ppm. Seguire il consumo di acido malico: quando 2/3 sono convertiti in acido lattico, espandere la coltura usando la miscela come inoculo al 5%. Assicurarsi che il pH del vino sia > 3,3 ed alcool < 12,5%. Seguire l'acido malico e, quando è stato consumato per 2/3, utilizzare la coltura come inoculo al 4% del volume.
CONDIZIONI LIMITE DEL VINO	Alcool < 14% pH > 3,2 SO_2 totale > 75 ppm Temperatura > 18°C Evitare i travasi	Nessuna, se acclimatata durante la preparazione	Dipende dal ceppo di Oenococcus oeni, ma in generale: alcool <15% pH > 3,1 SO_2 totale < 60 ppm Temperatura > 12°C	Alcool < 15-16 % pH > 3,1 SO_2 totale < 75 ppm Temperatura > 10°C

SCEGLIERE QUANDO INOCULARE I BATTERI MALOLATTICI

DR. SIBYLLE KRIEGER

La fermentazione malolattica (FML) si svolge nei vini come risultato dell'attività metabolica di certi ceppi adattati di batteri lattici. La riduzione dell'acidità del vino e le modifiche del suo aroma dovute a questa fermentazione secondaria sono normalmente considerati positive per la sua qualità. Il vantaggio procurato dall'induzione della FML con l'inoculo di batteri selezionati è duplice. Primo, si ha un migliore controllo sull'avvio e sulla durata della conversione dell'acido malico e, in secondo luogo, si può indurre un effetto positivo sul profilo organolettico del vino. Gli studi sensoriali hanno dimostrato che i composti prodotti dai batteri lattici provocano cambiamenti riconoscibili nelle caratteristiche organolettiche del vino1. Diversi studi mostrano che diversi ceppi di batteri lattici danno profili aromatici e gustativi diversi ai vini finali[1, 2, 3, 4, 5], ma non è chiara l'influenza del momento di aggiunta dell'inoculo e della popolazione iniziale di batteri.

INOCULO SIMULTANEO DI LIEVITI E BATTERI

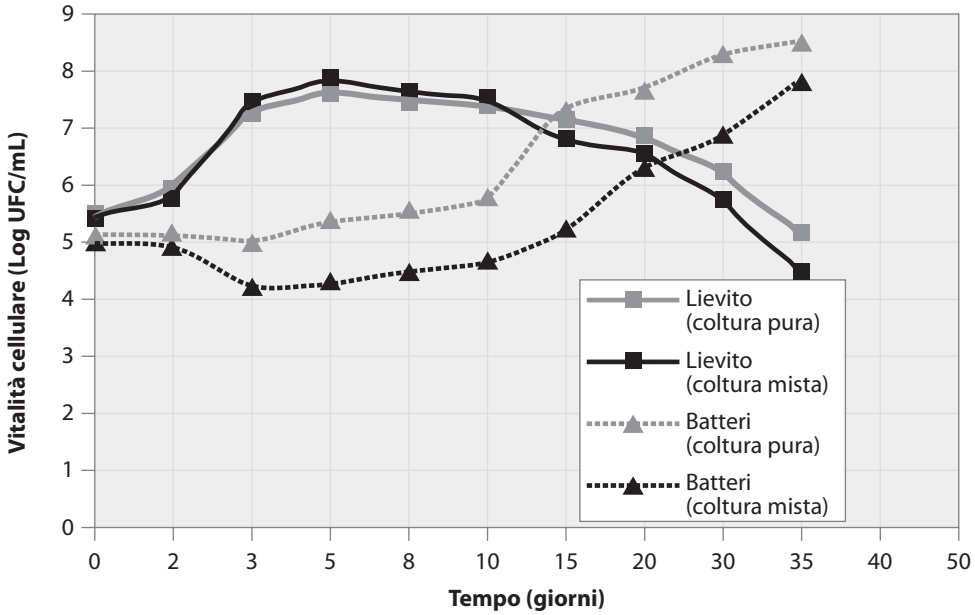
L'opinione generale in Francia è di raccomandare l'inoculo dei batteri malolattici dopo il completamento della fermentazione alcolica, per evitare i rischi di produzione di acido acetico e acido D-lattico, fenomeno normalmente definito "spunto lattico".[6] La FML che avviene durante la fermentazione alcolica può occasionalmente portare ad un arresto della stessa.

Non tutte le ricerche su batteri inoculati precocemente hanno evidenziato gli aumenti di acido acetico, gli antagonismi con il lievito e gli arresti di fermentazione alcolica paventati in Francia. In molti sostengono che l'inoculo dei batteri malolattici contemporaneamente a quello dei lieviti dia maggiori possibilità di crescita ed acclimatazione ai batteri, che non vengono esposti all'effetto tossico dell'etanolo e che trovano piena disponibilità di nutrienti. Beelman e Kunkee[7] hanno dimostrato che una FML in presenza di zuccheri fermentescibili non porta necessariamente alla produzione di quantità in eccesso di acido acetico da parte dei batteri, a patto che la fermentazione dei lieviti si avvii rapidamente e vada al termine[1]. Al contrario, King e Beelman[8] sostengono che la crescita del ceppo di *Oenococcus oeni* PSU-1 durante la fermentazione alcolica in un mosto d'uva sintetico possa essere ritardata dalla produzione di composti tossici del lievito, diversi dall'etanolo e dalla solforosa.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

Quando essi hanno messo a confronto le curve di crescita batterica in coltura pura ed in coltura mista con lieviti, hanno visto che la presenza di un lievito in attiva crescita esercita un effetto antagonistico sullo sviluppo dei batteri (Fig. 1). Gli autori hanno attribuito l'inibizione della crescita batterica alla presenza di metaboliti del lievito e/o alla rimozione da parte dei lieviti di sostanze fondamentali per la nutrizione dei batteri. I dati in Fig. 1 mostrano che il punto di transizione dalla lag-fase a quella di sviluppo esponenziale dei batteri coincide con l'inizio della fase di declino della curva dei lieviti. Questo fenomeno può essere spiegato con un ritorno in soluzione di nutrienti essenziali, come risultato della morte e dell'autolisi dei lieviti. Quando si mettono a confronto le curve di crescita dei lieviti in coltura pura o mista, risulta chiaro che, fino alla fase stazionaria, la presenza di batteri è ininfluente. Tuttavia, si assiste ad un'accelerazione della mortalità delle cellule di lievito nelle colture miste nelle quali si sta verificando una crescita rapida delle popolazioni di batteri.

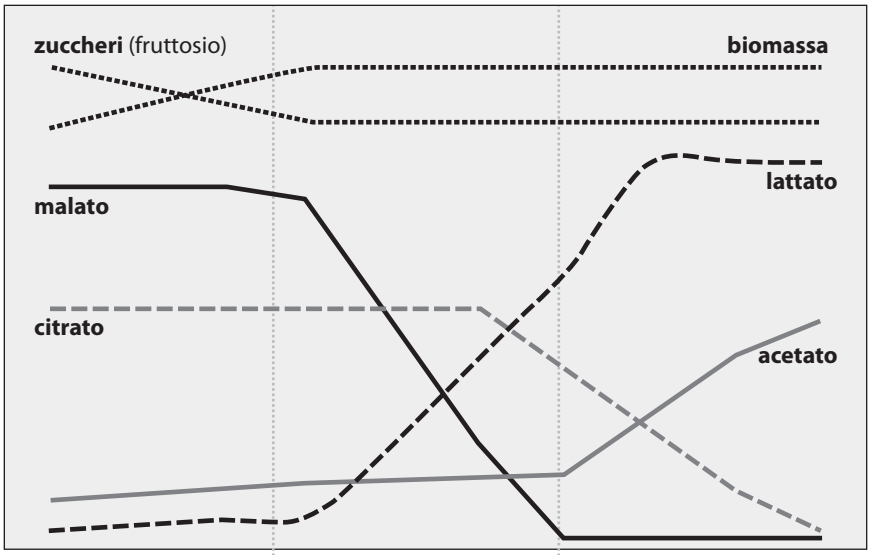
Figura 1. Sviluppo di lieviti e batteri vinari in coltura mista e in purezza



Mosto/vino 20 Brix[8]

Una forte crescita batterica può inibire lo sviluppo dei lieviti e portare di conseguenza alla produzione di quantità eccessive di acidità volatile[9]. Nelle tre fasi schematizzate in Fig. 2, Radler[22] ha quantificato in 0,2-2 g il consumo di zuccheri durante l'intera crescita. Durante lo sviluppo nella Fase di Crescita si producono piccole quantità di acido acetico e acido D-lattico. Quando la popolazione supera i $5x10^6$ UFC/ml (Fase I), inizia la degradazione dell'acido malico che non comporta ulteriore formazione di acido acetico. La Fase II è caratterizzata dalla degradazione dell'acido citrico e degli zuccheri, accompagnata dall'incremento in acido acetico. Tuttavia, i batteri iniziano a consumare zucchero solamente quando sono stati esauriti gli acidi organici: il malico per primo, seguito dal citrico, il fumarico ed altri[10]. La degradazione degli zuccheri – in questa fase - è all'origine di incrementi importanti dell'acidità volatile.

Figura 2. Metabolismo degli zuccheri e degli acidi organici durante la fermentazione malolattica nel vino.



CRESCITA CELLULARE	FASE STAZIONARIA I	FASE STAZIONARIA II
Catabolismo degli zuccheri	No catabolismo zuccheri	No catabolismo zuccheri
No catabolismo malato	**Catabolismo malato**	No catabolismo malato
No catabolismo citrato	No catabolismo citrato	**Catabolismo citrato**
Leggera produzione acetato	No produzione acetato	**Produzione acetato**
Leggera produzione lattato	**Produzione lattato**	No produzione lattato

Gli esperimenti condotti dal gruppo di ricerca Lallemand confermano che l'acido acetico non viene prodotto durante la crescita dei batteri malolattici ed una FML attiva. In queste prove, l'aumento dell'acido acetico è stato rilevato solamente quando oltre metà dell'acido malico era stato degradato ed i batteri iniziavano ad utilizzare l'acido citrico. Le esperienze nelle quali sono stati messi a confronto l'inoculo simultaneo e sequenziale lieviti -batteri hanno mostrato che non esistono differenze significative nel livello finale di acido acetico nel vino, e che invece esiste una correlazione diretta tra degradazione dell'acido citrico ed aumento dell'acido acetico[11]. In base alla disponibilità di ossigeno ed al potenziale ossidoriduttivo del mezzo, l'acido citrico può essere utilizzato come accettore di idrogeno, con formazione di acido acetico, oppure può essere trasformato in diacetile. Anche il passaggio successivo, la degradazione del diacetile a acetoino e 2,3-butandiolo, dipende dall'equilibrio redox del vino. Il diacetile è considerato essere il composto derivato dalla FML con maggiore impatto organolettico sul vino, ed a concentrazioni di 0,2-2 mg/L può conferire al vino un netto aroma di burro. La soglia organolettica per acetoino e 2,3-butandiolo è molto più elevata della concentrazione normalmente riscontrata nel vino. Essi, quindi, non contribuiscono all'aroma del vino. Sono necessari altri studi per definire con precisione gli effetti dell'ossigeno e del potenziale ossido-riduttivo sulle concentrazioni finali di acido acetico e diacetile nel vino. La FML in presenza di fecce dà sempre livelli inferiori di diacetile, perché il potere riduttivo delle cellule vitali di lievito converte il diacetile in composti meno odoranti. Di conseguenza, il coinoculo del vino con lieviti e batteri darà sempre aromi meno burrati e lattici, e quindi profili sensoriali e stili di vino dominati dal fruttato. In uno studio compiuto in collaborazione con Massey University in Nuova Zelanda, Lallemand ha prodotto un vino utilizzando un ceppo di lievito e due ceppi di batteri. Per ogni combinazione lievito/batterio, i batteri malolattici sono stati inoculati sia insieme ai lieviti (FA/FML simultanee), sia al termine della fermentazione alcolica (FA/FML sequenziale). Il vino è stato fatto a partire da uve Chardonnay provenienti da un vigneto di Fernhill nella regione neozelandese di Hawke's Bay. Dopo pressatura, il mosto senza aggiunta di SO_2 è stato sedimentato a 4°C per 24 ore, ed al travaso sono stati aggiunti 30 g/hL di ammonio fosfato. La vinificazione è avvenuta in contenitori da 25 litri, ed il mosto iniziale aveva i seguenti parametri: 20,7° Brix, pH 3,28 e acidità

totale (espressa in tartarico) a 10 g/L. I risultati (Tabella 1) mostrano che nella FA/FML sequenziale la FML è stata sempre più prolungata rispetto alla FA/FML simultanea.

Tabella 1. Fermentazione malolattica e sequenza d'inoculo

	FA/FML simultanee	FA/FML sequenziali
Coltura malolattica A	26 giorni	74 giorni (acido malico residuo)
Coltura malolattica B	19,5 giorni	68 giorni

L'acido malico, che aveva una concentrazione iniziale di 5 g/L, è stato degradato in circa 3 settimane, l'identico tempo necessario per la conversione degli zuccheri in alcool durante la FA/FML simultanea. Quando i batteri malolattici sono stati aggiunti al vino dopo la fermentazione alcolica, la FML è risultata difficile e la sua durata è stata sensibilmente maggiore. L'inoculo sequenziale, utilizzando il ceppo batterico A, è risultato in un arresto della FML, con 100 mg/L di acido malico residuo nel vino (tabella 1).

Durante le prime due settimane dell'esperimento, non sono state notate differenze significative nella degradazione del glucosio e fruttosio tra le due tesi. Tuttavia, 20 giorni dopo il completamento della FA/FML simultanea, glucosio e fruttosio erano presenti solo in tracce nella tesi con coinoculo, mentre la sommatoria dei due zuccheri dava 700 mg/L nell'altra tesi. Dal momento che glucosio e fruttosio fungono da fonte di carbonio ed energia per molti microrganismi, la completa assenza dei due zuccheri significa maggiore stabilità microbica del vino.

La degradazione dell'acido citrico è risultata diversa nelle due tesi. In quella con inoculo simultaneo, l'acido citrico è stato degradato velocemente con produzione di una quantità leggermente superiore di acido acetico. Tuttavia, le differenze nelle concentrazioni finali di acido acetico sono risultate molto piccole e statisticamente non significative (Tabella 2).

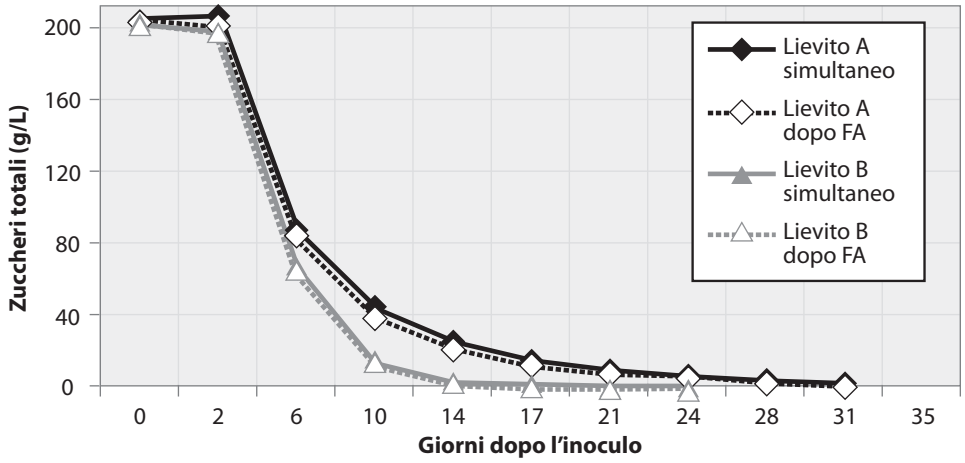
Tabella 2. Produzione di acido acetico (g/L) vs. protocollo di inoculo

	FA/FML simultanee	FA/FML sequenziali
Coltura malolattica A	0,195	0,147
Coltura malolattica B	0,187	0,168

La valutazione sensoriale dei vini prodotti in questa prova ha messo in luce differenze significative tra i due diversi momenti di inoculo e meno rilevanti tra i ceppi batterici utilizzati. I vini prodotti con coinoculo sono risultati più fruttati di quelli con inoculo sequenziale.

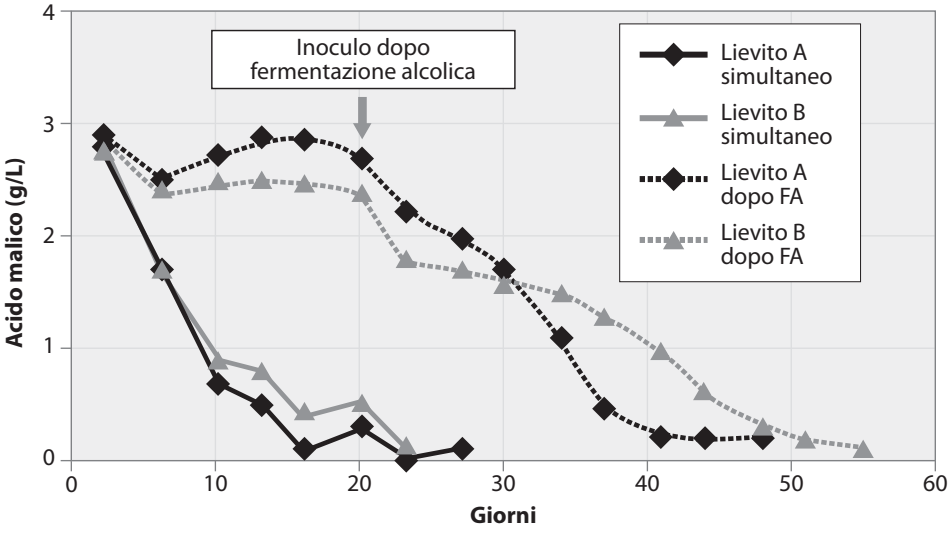
In collaborazione con le stazioni sperimentali di Neustadt e Trier, Lallemand ha studiato l'inoculo simultaneo di lieviti e batteri in un vino Riesling. Il disegno sperimentale fu messo a punto per valutare l'impatto del momento dell'inoculo sull'aroma varietale e sulla produzione di acido acetico. I risultati, rappresentati in Fig. 3, mostrano che la fermentazione simultanea non ha influenza sulla fermentazione dei lieviti, e che non viene formato acido acetico in eccesso.

Figura 3. Fermentazione simultanea di lieviti e batteri a confronto con la fermentazione alcolica in purezza



L'inoculo precoce della coltura starter di batteri malolattici ha dato una FML molto più veloce, e l'acido malico è stato degradato in 23 giorni rispetto agli otre 50 nel caso dell'inoculo dopo fermentazione alcolica (Fig. 4). La tempistica dell'inoculo ha avuto un impatto importante sul profilo sensoriale del vino. Nel caso delle fermentazioni simultanee, il rapido avvio della FML ha consentito un metabolismo dell'acido malico in condizioni riducenti a causa dell'attività dei lieviti. Nella tesi di coinoculo, questo ambiente riducente ha impedito la formazione di aromi lattici e burrati, ed il vino finale aveva aromi tipici delle uve Riesling. I vini inoculati dopo la fermentazione alcolica avevano invece note evidenti di burrato e frutta secca, tipiche della FML, e gli aromi primari del Riesling erano assenti.

Figura 4. Andamento della degradazione dell'acido malico in funzione del momento dell'inoculo



Questi risultati mostrano che l'induzione simultanea di fermentazione alcolica e malolattica porta ad un anticipo nel completamento della FML. I vini prodotti con questa tecnica sono più stabili dal punto di vista microbiologico perché la solforosa può

essere aggiunta prima nel processo di vinificazione e sono assenti glucosio e fruttosio. La tecnica di induzione simultanea di AF e MFL non è raccomandabile in vini con pH maggiore di 3,6.

Recentemente alcuni autori francesi hanno accennato alla possibilità di coinoculo[12] di lieviti e batteri nel mosto d'uva. Nella regione della Champagne è stata proposta una variante della tecnica per acclimatare i batteri malolattici durante la fase iniziale del "pied de cuve". La procedura prevede due passaggi e l'aggiunta di lieviti per evitare la crescita di *Lactobacillus* contaminanti durante l'acclimatazione dei batteri selezionati. Le colture batteriche utilizzate in Champagne non sono acclimatate durante il processo di produzione industriale e quindi non possono essere inoculate direttamente al vino. Durante le due fasi del processo di acclimatazione, il primo passaggio di riattivazione è seguito da una seconda fase di "pied de cuve malo", nel quale i batteri malolattici sono lentamente acclimatati alle difficili condizioni del vino. La procedura "pied de cuve malo" era difficile e richiedeva parecchio tempo, poiché il primo passaggio doveva essere svolto in laboratorio.

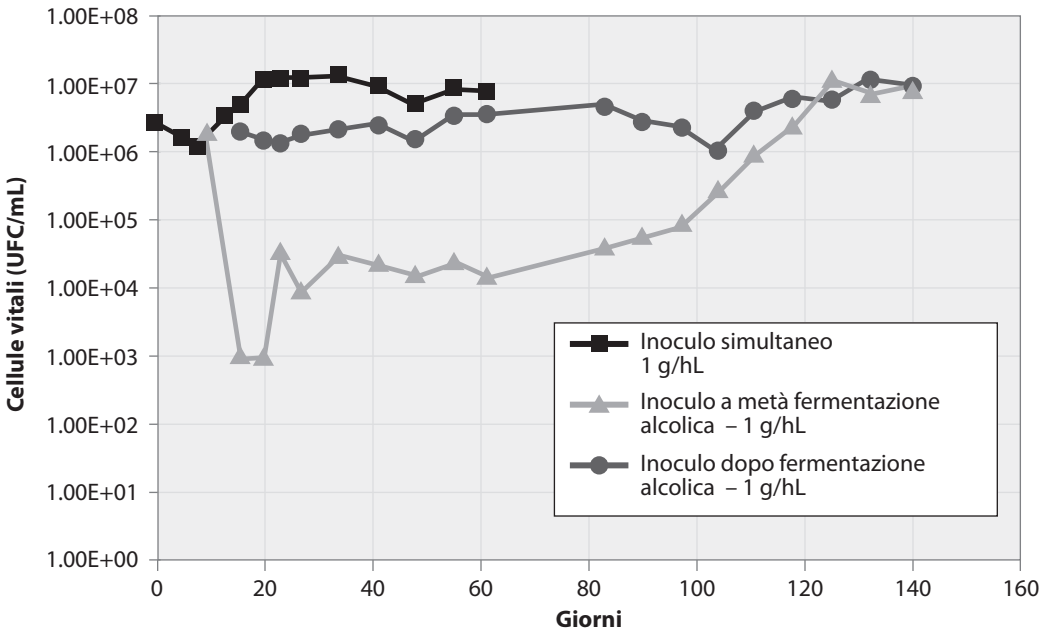
Nel 1993, Michel Valade et al.[13] proposero un protocollo semplificato per la riattivazione dei batteri, facendoli sviluppare in mosto d'uva diluito addizionato di nutrienti per batteri e lieviti secchi attivi, mantenendo il pH tra 3,2 e 3,5, per far adattare i batteri a concentrazioni crescenti di alcool. Questo processo rappresentava un'importante semplificazione del passaggio "pied de cuve malo". Gli autori non riscontrarono eccessive produzioni di acido acetico ed acido lattico ("piqûre lactique"), ma puntualizzarono che questo processo non era comparabile con il coinoculo del vino.

Oggi i ricercatori francesi riconoscono i vantaggi dell'inoculo simultaneo di lieviti e batteri nella produzione di vini "Primeur", destinati al consumo entro due mesi dalla vendemmia. Il processo permette ai batteri malolattici di acquisire tolleranza all'etanolo durante la fermentazione alcolica, quindi alla FML di avviarsi durante l'ultimo terzo della FA[14] e di completarsi velocemente alla fine della stessa. L'impiego di questa pratica facilita la stabilizzazione precoce del vino, ne permette la commercializzazione in data anticipata e minimizza la possibilità di sviluppo di microrganismi contaminanti come i batteri acetici o i lieviti *Brettanomyces*. La pratica, abbinata ad un'adeguata strategia nutrizionale dei lieviti, garantisce fermentazioni alcoliche regolari con buone cinetiche e trae vantaggio dall'impiego di ceppi di lievito che favoriscono la FML. È importante avere un mosto a circa 3,5, perché al di sopra di questo valore gli zuccheri sono degradati più facilmente dai batteri. Tuttavia, è bene ricordare che *Oenococcus oeni* non attacca gli zuccheri fino a che l'acido malico non è completamente assente.

INOCULO DELLE COLTURE SELEZIONATE DI BATTERI MALOLATTICI DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Il vantaggio dell'inoculo dei batteri durante la fermentazione alcolica può essere spiegato dal fatto che, in questa fase, la maggior parte della solforosa è legata ai composti carbonilici prodotti durante la crescita del lievito e che la concentrazione in etanolo non ha ancora raggiunto livelli tossici. Tuttavia, l'antagonismo da parte del lievito attraverso la produzione di acido decanoico può risultare massima proprio in questa fase[15]. Rosi et al.[16] hanno riportato una perdita di vitalità dei batteri quando l'inoculo viene effettuato a metà fermentazione alcolica. Gli autori hanno attribuito questa diminuzione a vari fattori, comprendenti la scarsità in nutrienti, la produzione di alcool e la caduta di pH causata dalla produzione di acidi. Questi risultati indicano che l'inoculo a questo punto della fermentazione alcolica sottopone i batteri ad un antagonismo con i lieviti che potrebbe essere insormontabile. Le ricerche effettuate da Lallemand nei propri laboratori confermano che l'inoculo di batteri effettuato a metà fermentazione alcolica porta sempre ad una significativa mortalità dei batteri (Fig. 5).

Figura 5. Vitalità dei batteri malolattici dopo l'inoculo a diversi stadi della fermentazione alcolica



White Rieslaner 1999, vendemmia tardiva, pH 3,3, Alcool 12,5% (v/v), 13°C

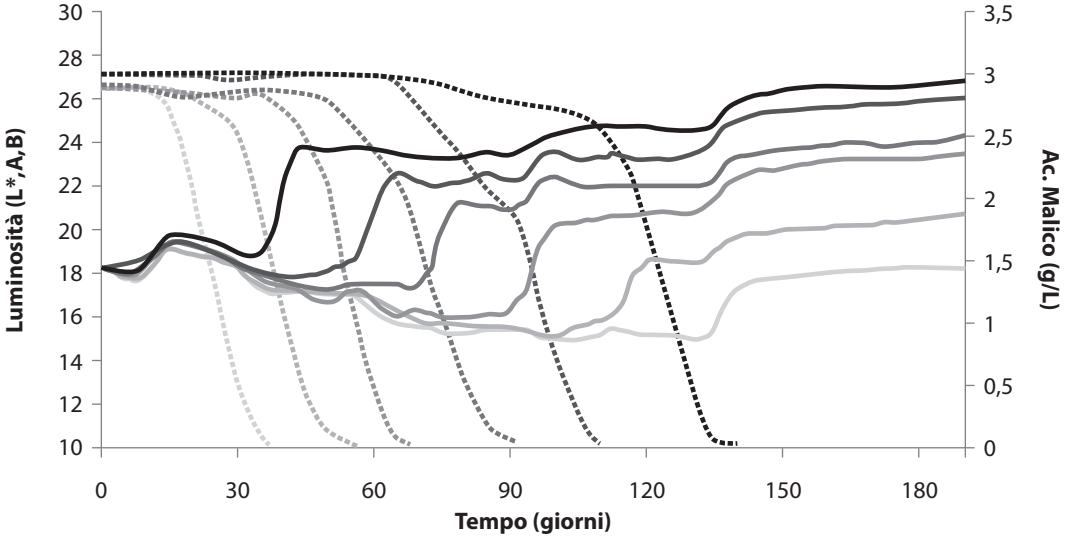
INOCULO DELLE COLTURE SELEZIONATE DI BATTERI MALOLATTICI DOPO LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

L'inoculo alla fine della fermentazione alcolica non origina rischi di degradazione degli zuccheri da parte dei batteri eterofermentativi con conseguente aumento dell'acidità volatile. Questo tipo di inoculo ritardato evita la tossicità degli acidi carbossilici, poiché la loro concentrazione si riduce alla fine della fermentazione alcolica[17]. Un altro vantaggio dell'inoculo a fine fermentazione alcolica è in relazione alla disponibilità di nutrienti, che si liberano nel vino a seguito della morte ed autolisi del lievito[18]. D'altro lato, l'esposizione dei batteri agli alti livelli di etanolo presenti può portare ad un ritardo nell'avvio della FML, specialmente in vini prodotti in climi caldi. Normalmente i batteri aggiunti dopo la fermentazione alcolica riescono a raggiungere popolazioni comparabili con quelle raggiunte nel caso di inoculo nel mosto, se le condizioni non sono limitanti. Nel caso di carenza nutrizionale (vedi "Esigenze nutrizionali dei batteri malolattici") o quando le condizioni del vino sono difficili, l'aggiunta di nutrienti batterici può aiutare la FML. Nei casi in cui l'alcool del vino è maggiore di 15,5% (v/v), la maggior parte delle colture batteriche deve essere acclimatata prima dell'inoculo in vino. Nella sezione "Guida all'uso dei ceppi commerciali" di questo libro sono riportati protocolli specifici.

AVVIO RITARDATO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Negli ultimi 15 anni la qualità delle colture starter di batteri malolattici è stata drasticamente migliorata. Le colture starter ad inoculo diretto ora disponibili sono facili da usare e permettono un migliore controllo della FML. L'impiego di questa nuova generazione di batteri malolattici permette un avvio anticipato della FML ed un suo più rapido completamento. Nella regione della Bourgogne francese, o in altre zone dove si producono soprattutto vini da Pinot nero, il rapido sviluppo della FML è in contrasto con il loro tradizionale sistema di vinificazione, normalmente affidato alle FML spontanee di primavera. La diffusione dell'impiego di batteri malolattici ad inoculo diretto ha portato in generale ad una FML più rapida, ma anche ad una significativa riduzione della pigmentazione. Gerbaux[19] ha studiato l'effetto della velocità della FML sull'intensità del colore e sulla limpidità dei vini Pinot nero (Fig.6).

Figura 6. Influenza della cinetica della fermentazione malolattica sul colore di vini Pinot nero.



Gerbaux, Enoforum Piacenza, 2005

Egli è riuscito ad ottenere una maggiore stabilità del colore applicando le seguenti condizioni:

- aumento del tempo intercorrente tra svinatura o eliminazione delle fecce grossolane e l'avvio della FML;
- riduzione della velocità della FML;
- ritardo dell'aggiunta di SO_2 fino al termine della FML.

In generale, tutte le pratiche enologiche che inibiscono o ritardano la FML (elevati livelli di SO_2, temperature inferiori a 10°C, aggiunta di lisozima in qualche fase del processo) aiutano a stabilizzare la perdita di pigmenti in vini con scarso colore, come Pinot nero o Sangiovese.

I consumatori di vino chiedono in tutto il mondo vini con colore stabile, e questo obiettivo è stato raggiunto applicando la tecnica della microssigenazione, che causa la formazione di piccole quantità di acetaldeide, aumentando la polimerizzazione dei polifenoli e quindi la stabilità del colore. Al termine dell'intervento di microssigenazione, il colore rosso dei vini è stabilizzato e questo minimizza le perdite di colore dovute alla FML. È noto che la microssigenazione ritarda l'avvio della FML, per cui l'inoculo dei batteri sarà fatto solo una volta terminata la microssigenazione. Il batterio *Oenococcus oeni* consuma l'acetaldeide, ed in questo modo verranno eliminati eventuali residui del composto nel vino. Di conseguenza, la FML successiva alla microssigenazione avrà anche il vantaggio di ridurre i livelli di acetaldeide.

Il ritardo nell'induzione della FML è raccomandato nei casi di microssigenazione di vini a pH elevato in regioni calde: in questi casi è consigliabile l'impiego di lisozima[20] , da solo o in combinazione con la SO_2.

In conclusione, non esiste una regola universale per l'induzione della FML nei vini attraverso l'inoculo. Come indicato da Silver e Madej[21], il momento migliore per l'inoculo dipende da numerosi fattori di processo, i più importanti dei quali sono la composizione chimica del vino, il ceppo di lievito utilizzato e le tecniche di vinificazione.

La tabella 3. sintetizza le linee guida per la scelta del momento di inoculo in diverse condizioni enologiche.

Tabella 3. Linee guida per la scelta del momento di inoculo dei batteri malolattici

Condizioni del vino	Stile del vino	Inoculo	Commenti
pH molto basso < 3,1	Vino spumante	Colture standard con pied-de-cuve	La degradazione di ac. malico ridurrà il rischio di FML spontanee durante la rifermentazione. La FML aumenterà la morbidezza e aiuterà la formazione del perlage. La FML è difficile da indurre. In molti casi si renderanno necessarie varie fasi di acclimatazione.
pH basso ≤ 3,4	Bianchi aromatici	Inoculo simultaneo lieviti-batteri	Obiettivo: vini bianchi stile fruttato, rispetto delle caratteristiche varietali, assenza di note burrate o lattiche
pH basso ≤ 3,3	Vini rossi con problemi di stabilità del colore	Ritardare líinoculo di batteri	Travaso e rimozione delle fecce grossolane, FML lenta a basse temperature (15-16°C).
pH compreso fra 3,2-3,5	Vini bianchi e rossi	Inoculo a fine FA	Per assicurare la qualità del vino ed essere sicuri che la FML sia condotta da batteri con caratteristiche note. Scegliere la coltura batterica in relazione allo stile del vino.
Vini ad elevato alcool potenziale	Ogni tipologia	Inoculo durante la FA (a 2/3 o 30 g/L di zuccheri residui)	La gestione della FML è fondamentale (adattamento agli aumenti di tenore alcolico), rischio di una marcata riduzione dell'attività e della vitalità dei batteri. L'uso di nutriente specifico per batteri è caldamente raccomandato
Tenore alcolico compreso fra 12-14% e pH > 3,6	Ogni tipologia	Inoculo anticipato, 12-24 ore dopo il lievito o prima della fine della FA (30 g/L di zuccheri residui).	Utilizzare un lievito con buone caratteristiche fermentative, compatibile con il batterio scelto. Assicurare una buona nutrizione al lievito, seguire la degradazione degli zuccheri e i valori di ac. malico. C'è la possibilità, in caso di arresto della FA, che i batteri degradino gli zuccheri dopo gli acidi organici aumentando il tenore di AV.
In ogni condizione	Ogni tipologia	Inoculo dopo la FA	Assicurarsi che la condizioni del vino non siano limitanti (SO_2, pH, alcool, temperatura). Scegliere la coltura batterica in relazione alle condizioni del vino. Se le condizioni sono limitanti, utilizzare un protocollo di acclimatazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Laurent, M. H., T. Henick-Kling, and T. E. Acree. 1994. Changes in the aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. *Wein-Wissenschaft*. 49:3-10.

2. Henick-Kling, T., T. E. Acree, S. A. Krieger, M. H. Laurent, and W. D. Edinger. 1994. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. *Wine East*. 8-15 .

3. Martineau, B., and T. Henick-Kling. 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. of Appl. Bacteriology*. 78:526-536.

4. Müller Botti, K. 1996. Inducción de fermentación maloláctica en vino Chardonnay con distintas cepas de bacterias lácticas (*Leuconostoc oenos*). Memoria para optar al titulo profesional de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago, Chile.

5. Rosi, I., P. Domizio, S. Ferrari, S. Zini, and S. M. Picchi. 1998. Influenza di diversi starter di batteri malolattici sulla qualità del vino. Proceedings: *The Management of Malolactic Fermentation and Quality of Wine*, organized by Lallemand, Verona, 16-17 April 1998.

6. Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, and P. Sudraud. 1975. Sciences et Techniques du vin. *Traité d'œnologie (Tome 2)*. Dunod, Paris.

7. Beelman, R. B., and R. E. Kunkee. 1985. Inducing simultaneous malolactic-alcoholic fermentation in red table wines. *Proc. Aust. Soc. Vitic. Oenol. Sem. on Malolactic Fermentation*. 97-112.

8. King, S. W., and R. B. Beelman. 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:53-60.

9. Lafon-Lafourcade, S., and P. Ribéreau-Gayon. 1984. Les altérations des vins par les bactéries acétiques et les bactéries lactiques. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 18:67-82.

10. Krieger, S. A. 1989. Optimierung des biologischen Säureabbaus in Wein. PhD thesis, Hohenheim University, Institut Allgemeine Lebensmitteltechnologie.

11. Krieger, S. 2002. Starter cultures for malolactic fermentation – time of inoculation. *Proceedings 13th International Enology Symposium,* 9-12 June 2002. 91.

12. Sieczkowski, N. 2004. Maîtrise et intérêt de la co-inoculation « levures-bactéries ». *Revue Française d'œnologie*. 207:24-28.

13. Laurent, M., and M. Valade. 1993. La réactivation des bactéries lyophilisées sur moût pour l'ensemencement de la fermentation malo-lactique en Champagne. Entretiens scientifiques Lallemand 1 : *Les aspects microbiologiques de la fermentation malo-lactique*. 49-55.

14. Vuchot, C. 2004. La coinoculation préserve les arômes variétaux. *La Vigne.* Juillet/août 2004:40-41.

15. Lafon-Lafourcade, S., C. Geneix, and P. Ribéreau-Gayon. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by the yeast and their elimination from yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol*. 47:1246-1249.

16. Rosi, I., G. Fia, and V. Canuti. 2003. Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni. Austr. J. of Grape and Wine Research*. 9:194-199.

17. Lafon-Lafourcade, S. 1983. Wine and brandy. In: *Biotechnology. Vol. 5.* Rehm, H. J. and G. Reed (Eds). Verlag Chemie, Weinheim. 81-163.

18. Kunkee, R. E. 1967. Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9:235-279.

19. Gerbaux, V., and C. Briffox. 2003. Influence de l'ensemencement en bactéries lactiques sur l'évolution de la couleur des vins de Pinot noir pendant l'élevage. *Revue des Œnologues*. 103:19-23.

20. Sieczkowski, N., and C. Gerland. 2004. La gestion des flores microbiennes: enjeu important pour l'élaboration de vins de qualité. *Revue des Oenologues*. 108:13-16.

21. Silver, J., and R. Madej. 1981. Results of tests of 44.40 malolactic culture at commercial wineries. Technical note, Biologicals (USA) Wine Products, Berkeley, California.

22. Radler, F. 1963. Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau. Übersicht. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. *Vitis*. 3:207-236.

GUIDA ALLA SOLUZIONE DEI PROBLEMI – APPLICAZIONE PRATICA

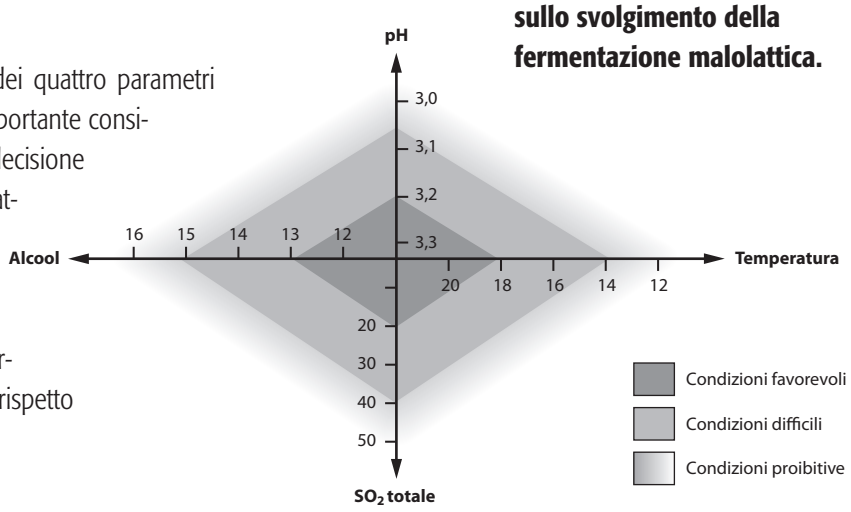
ANNAMARIE KYNE E SIGRID GERTSEN-BRIAND

Quando si sceglie di gestire la FML ci sono numerosi parametri chimico-fisici da considerare. Tra di essi i più importanti sono pH, alcool, temperatura e SO_2. È essenziale tenere presenti questi quattro fattori quando ci si prepara ad inoculare con batteri malolattici, e ricordare che essi sono sinergici. Per esempio, al momento dell'inoculo, se l'alcool è alto ed il pH è basso, l'effetto combinato risulterà in condizioni che possono non essere sufficienti a permettere la crescita e l'attività dei batteri inoculati. In termini generali, la FML si svolgerà abbastanza facilmente in vini che presentano contemporaneamente le seguenti condizioni:

- pH maggiore di 3,2;
- SO_2 libera inferiore a 10 ppm[1];
- Temperatura maggiore di 18°C;
- Alcool inferiore a 13% (v/v).

La Fig. 1 illustrata gli effetti relazionati dei quattro parametri sulla facilità (o difficoltà) della FML. È importante considerare questi fattori quando si prende la decisione sul momento dell'inoculo, sul ceppo di batteri da utilizzare, sul tipo di preparato (da riattivare o ad inoculo diretto). La comprensione degli effetti globali dell'ambiente in cui si trovano i batteri permetterà di assumere decisioni adeguate rispetto a queste variabili.

Figura 1. Fattori che influiscono sullo svolgimento della fermentazione malolattica.



[1] Misurare la SO_2 libera presente ma seguire anche l'SO_2 totale, dal momento che *Oenococcus oeni* è in grado di liberare la solforosa dalla sua forma combinata.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

La guida alla soluzione dei problemi della malolattica aiuta ad individuare le migliori modalità di gestione della FML nei vari scenari di produzione. Essa è strutturata in modo da ordinare le considerazioni necessarie alla buona conduzione della fermentazione malolattica. Essa è anche destinata ad aiutare nella diagnosi delle FML fuori controllo ed a proporre eventuali soluzioni. È stata concepita nel formato ad albero SI/NO. Per esempio, se si desidera la FML, andare ad **A** e proseguire. Se la FML è già avviata, ma sono sorti problemi, iniziare da **B**, e se non si desidera la FML, iniziare da **C**.

GUIDA ALLA SOLUZIONE DI PROBLEMI CON LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

A. Si vuole indurre la fermentazione malolattica

a. FML da indurre tramite inoculo

i. All'inizio della fermentazione alcolica

1. Usare un ceppo di lievito favorevole alla FML.

2. Scegliere un preparato batterico ad inoculo diretto oppure un coltura da acclimatare in base alle condizioni descritte in Fig. Scegliere un preparato batterico ad inoculo diretto oppure un coltura da acclimatare in base alle condizioni descritte in Fig. 1.

3. Considerare l'opportunità di aggiunta di nutrienti complessi per i lieviti per ridurre il rischio di arresto della fermentazione alcolica.

4. N.B. La quantità di SO_2 aggiunta al mosto determina la tempistica dell'aggiunta di uno starter di batteri:

- meno di 50 mg/L – Inoculare i batteri subito dopo l'inoculo dei lieviti
- 50 - 65 mg/L – Attendere 12 ore dall'inoculo de lieviti prima di aggiungere i batteri
- **Maggiore di 65 mg/L – Il co-inoculo lieviti/batteri non è consigliato.**

5. Verificare il pH – pH maggiori di 3,5 facilitano la crescita di microrganismi contaminanti; sotto questi valori di pH, *Oenococcus oeni* è dominante.

6. Controllare la temperatura – 18-22°C è il livello ottimale, evitando grossi sbalzi durante la fermentazione alcolica, perché l'etanolo diventa maggiormente tossico per i batteri con l'aumentare della temperatura. A temperature molto basse si rallentano sia la fermentazione alcolica che la malolattica.

7. Controllare frequentemente gli eventuali cambiamenti nel profilo organolettico del vino durante la FML. Se si lasciano sviluppare batteri o lieviti indesiderati gli aromi possono essere mascherati e possono apparire odori anomali.

8. Monitorare gli zuccheri, l'acido L-malico e l'acidità volatile perché a pH elevati *Oenococcus oeni* può produrre acido acetico dagli zuccheri al termine della degradazione del malico. Il controllo analitico è preferibile al semplice assaggio.

ii. A metà fermentazione alcolica

1. L'aggiunta di batteri malolattici non è consigliata in questa fase della fermentazione. L'attività fermentativa dei lieviti esercita un'eccessiva pressione competitiva sui batteri.

iii. Alla fine della fermentazione alcolica

1. Tener conto dello stile di vino desiderato, che sarà influenzato dalla tempistica della FML:

- Stile fruttato senza note burrate: per ottenerlo preferire un inoculo simultaneo dei batteri con i lieviti, oppure avviare la FML immediatamente alla fine della fermentazione alcolica quando è ancora presente una grande popolazione di lieviti in grado di degradare il diacetile prodotto.
- Note burrate e di diacetile ricercate:
  Stabilizzare il vino tramite filtrazione o aggiunta di solforosa alla fine della FML, appena completata la scomparsa del malico, oppure attendere qualche settimana dopo la fermentazione alcolica affinché il lievito muoia e non riesca più a metabolizzare il diacetile.

2. Scegliere un ceppo batterico tollerante ai livelli di alcool, SO_2 e pH del vino da inoculare.
3. La temperatura ottimale è 18-22°C. In climi freddi, le basse temperature possono inibire la FML.
4. Analizzare la SO_2 alla fine della fermentazione alcolica ed assicurarsi che la libera sia al di sotto di 10 ppm. La SO_2 a fine fermentazione alcolica può essere inaspettatamente alta se è stata condotta da un lievito capace di produrre solforosa.
5. Determinare il contenuto in etanolo del vino. Livelli elevati di alcool possono risultare tossici ai batteri ed obbligare all'impiego di una preparazione da acclimatare piuttosto che all'inoculo diretto.

b. MLF condotta da batteri indigeni – **NON CONSIGLIATA!**
i. Controllare la popolazione batterica almeno una volta alla settimana utilizzando un microscopio o tramite conta su piastra. La prevenzione dello sviluppo di batteri lattici contaminanti è di capitale importanza.
ii. Mantenere la temperatura idealmente a 18-22°C. Questo aumenta le possibilità che la FML sia condotta da batteri indigeni favorevoli.
iii. Aggiustare il pH a meno di 3,5 e mantenerlo su questi livelli. Valori di pH maggiori di questo limite aumentano il rischio di contaminazione batterica.
iv. Misurare zuccheri, acido L-malico e acidità volatile. In condizioni di alto pH, *Oenococcus oeni* può produrre acidità volatile dagli zuccheri. Un controllo analitico è preferibile al semplice assaggio.
v. Assaggiare settimanalmente il vino per accorgersi di cambiamenti nel profilo sensoriale del vino o della comparsa di odori anomali.

B. La fermentazione malolattica è in corso
a. La FML è lenta
i. Verificare che nei trattamenti in vigna non si siano verificate irregolarità, come ad esempio modifiche nel tipo o nella concentrazione degli agrofarmaci utilizzati. I prodotti sistemici applicati alla fine della fase di maturazione hanno una tossicità specifica verso *Oenococcus oeni*.
ii. Ricordare che la varietà d'uva e le tecniche di vinificazione possono influire sulla FML. I vini derivanti da Chardonnay, Merlot e Tannat sono noti per le difficoltà a svolgere la FML, come anche i vini ottenuti da mosti fortemente chiarificati.
iii. Considerare i quattro principali parametri di cui alla Fig.1. Esistono condizioni ed interazioni che rendono il vino un ambiente ostile per i batteri ? In questo caso, scegliere il ceppo batterico più tollerante alle condizioni difficili.
iv. Valutare l'opportunità di un'aggiunta di nutrienti per lieviti, perché l'aspetto nutrizionale può essere critico. Se la FML è iniziata e successivamente ha rallentato o si è fermata, un supplemento di nutrienti può essere risolutivo. Spesso la carenza di uno o più nutrienti specifici può impedire lo sviluppo dei batteri e portare ad una riduzione della vitalità delle cellule presenti.
v. Nel vino possono essere presenti acidi grassi a media catena che hanno un effetto inibente sui batteri inoculati. L'aggiunta di un nutriente complesso può aiutare a ridurre l'effetto tossico di questi composti.

b. È iniziata, ma non si completa
i. Verificare che i parametri critici di vinificazione,come temperatura, acidità volatile e SO_2, non si siano modificati.
ii. Analizzare gli zuccheri residui, l'acidità volatile, i livelli di acido malico e vitalità dei batteri.
iii. Verificare che i batteri siano stati inoculati alle dosi consigliate dal produttore.
iv. Verificare che la preparazione batterica sia stata preparata correttamente.
1. Moltiplicazione cellulare nelle colture standard
- Verificare che l'inoculo sia stato preparato correttamente. Essere obiettivi e vedere se tutti i passaggi sono stati eseguiti con cura.
- Controllare le materie prima usate nella preparazione. Non usare succo d'uva concentrato che può contenere quantità importanti di solforosa con effetto inibente sui batteri.

2. Inoculo diretto

- Verificare che le confezioni di batteri liofilizzati siano stati conservati in buone condizioni ed in accordo con la **Guida all'uso dei ceppi batterici in commercio** di questa pubblicazione. Se i sacchetti sono stati esposti ad alte temperature, i batteri possono essere morti.
- Assicurarsi che le confezioni utilizzate fossero sigillate e siano state aperte immediatamente prima dell'uso.
- Assicurarsi che siano state utilizzate le dosi indicate. Nel caso in cui l'inoculo sia stato scarso, è bene procedere immediatamente ad un'aggiunta.

v. Verificare che la responsabilità dell'arresto di FML non sia attribuibile ad un batteriofago, virus che uccidono i batteri. La piastratura della coltura può aiutare a capire se è avvenuto il fenomeno.

C. La fermentazione malolattica non è desiderata.

i. Mantenere la temperatura a 10°C.

ii. Aggiungere lisozima a 300-500 ppm. Il lisozima è un enzima naturale in grado di uccidere la maggior parte dei batteri lattici, ma alcuni ceppi non sono sensibili.

iii. Aggiungere 30-50 ppm di SO_2. La dose esatta è dipendente dal pH del vino.

iv. Rimuovere i batteri con filtrazione a membrana. L'uso di membrane con porosità di 0,45µ permette di eliminare dal mezzo i batteri.

IL CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

SAMANTHA KOLLAR E DR. NEIL BROWN

La fermentazione malolattica (FML) è un fenomeno biologico influenzato da una miriade di fattori ambientali e fisici. Nel corso del processo di vinificazione è essenziale il controllo dell'andamento della FML rispetto alla sua principale azione chimica, la conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico, oltre che il controllo microbiologico della microflora presente nel vino. Storicamente gli enologi si sono spesso affidati ai proprio sensi (vista, olfatto, gusto, in qualche caso anche udito) per trarre informazioni sull'andamento della FML. È ora riconosciuto che questi parametri, sebbene importanti, non sono sufficienti per definire in modo adeguato l'avanzare della FML. I sensi allenati e sensibili degli enologi esperti saranno sempre lo scheletro di base nella produzione di vino di qualità, ma essi possono essere confortati ed assistiti da analisi di laboratorio.

È noto che i sensi sopra citati possono risultare stanchi e che spesso gli enologi sono costretti a valutare in tempi brevi un vasto numero di campioni. In queste situazioni, le capacità sensoriali dell'enologo possono essere sovraccaricate e non più in grado di riconoscere livelli minimi di certi composti, oppure di percepire leggere variazioni che si stanno verificando nel vino durante il processo.

Un problema emergente può non rendersi evidente se non quando ormai è andato troppo avanti, lasciando l'enologo di fronte a soluzioni poco chiare ed improvvisate. In questo contesto, le scienze della chimica e della microbiologica possono essere di grande aiuto per l'enologo.

CHIMICA

Controllare l'andamento della fermentazione malolattica è uno degli aspetti più critici del controllo qualità di una cantina. Durante la FML sono molti i parametri che si modificano. La produzione di CO_2 , la riduzione dell'acido malico, l'aumento dell'acidità volatile e dell'acido lattico, i cambiamenti del pH e dell'acidità titolabile: sono tutti effetti cumulati che provocano variazioni importanti nelle proprietà sensoriali del vino.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

I due più importanti fenomeni chimici da monitorare durante lo svolgimento della FML sono la scomparsa dell'acido malico e l'aumento in acidità volatile (AV). L'AV è un forte indicatore dell'attività batterica e, quando prodotta in quantità eccessive, è normalmente correlata allo sviluppo di batteri contaminanti. Lo sviluppo dei batteri lattici comporta una piccola e normale produzione di acidità volatile, ma gli incrementi rapidi sono un segnale di allarme di una crescita importante di batteri indesiderati nel vino. In tutti i casi, un controllo frequente ed accurato dei livelli di AV durante la storia del vino è di importanza capitale. L'AV è facilmente misurata in un laboratorio d'analisi comune.

La FML è definita come la conversione di un acido organico, l'acido L-malico, in un altro acido organico, l'L-lattico, accompagnata dalla produzione di anidride carbonica (CO_2). L'avanzare della FML può essere facilmente seguito analizzando i sopra citati acidi organici oppure determinando la quantità di CO_2 liberata.

I metodi classici includono la cromatografia su carta, la cromatografia su strato sottile, l'analisi enzimatica, la riflettanza, l'elettroforesi capillare (CE) e la cromatografia liquida (HPLC). La CO2 può essere determinata sia attraverso la valutazione sensoriale, oppure utilizzando un'analisi spettrofotometrica.

Per la maggior parte delle cantine, i costi d'investimento associati all'uso di HPLC e CE risultano proibitivi, quindi la scelta sarà limitata agli altri metodi. Queste tecniche saranno incluse solo nel riassunto, nel confronto di costi, accuratezza, velocità e livello di capacità tecnica richiesto per effettuare l'analisi. La tabella 1 mostra un confronto tra i metodi su una scala di giudizio relativa, dove 1 è il valore più basso e 4 è attribuito ai casi con valutazione più alta.

Tabella 1. Confronto fra diverse tecniche analitiche degli acidi organici

Metodo	Costo	Precisione	Rapidità	Capacità tecniche
Cromatografia su carta	1	1	1	1
Cromatografia su strato sottile	1	1	3	1
Riflettanza	2	3	4	2
Analisi enzimatiche	3	4	3	3
CE	4	4	3	4
HPLC	4	4	2	4

CROMATOGRAFIA SU CARTA

La cromatografia su carta è una tecnica utilizzata per separare i composti chimici in miscela liquida sfruttando la loro diversa affinità con la fase stazionaria (carta) e con la fase mobile (solvente). La tecnica è utilizzata in enologia principalmente per la separazione di acidi organici come il tartarico, il citrico, il malico, il lattico ed il succinico. La tecnica, descritta di seguito, è abbastanza facile.

- Un piccolo volume di vino è prelevato con un tubo capillare. Il volume contenuto nel tubo deve essere sufficiente a creare una macchia di circa 1 cm di diametro quando il campione viene messo sulla carta da cromatografia.
- Le macchie di campione devono essere posizionate su una linea a circa 2 cm dal bordo inferiore ed almeno 2,5 cm una dall'altra.
- Una volta che le macchie sono completamente secche, il foglio di carta da cromatografia viene arrotolato, il cilindro è fermato con una graffetta o un punto metallico e appoggiato con il lato delle macchie in basso in un vaso da cromatografia chiuso ermeticamente per non fare entrare aria, contenente un solvente composto da butanolo, acido formico, acqua ed un colorante, nel quale il foglio viene immerso per circa 0,5 cm.

- Il solvente migra verso l'alto nella carta da cromatografia per azione capillare, dissolvendo il campione e separando gli acidi man mano che il fronte avanza.
- Dopo 6-8 ore, o prima che il sovente raggiunga la cima del foglio, la carta viene estratta dal vaso, ed appesa ad asciugare in un ambiente secco e ben ventilato per parecchie ore o durante la notte.
- Dopo l'asciugatura, la carta apparirà blu con una serie di macchie gialle disposte in modo verticale. Ad ogni macchia gialla corrisponde un acido organico.

Si raccomanda di aggiungere ad ogni corsa uno standard con acido malico e lattico, che risulta particolarmente utile in fase d'interpretazione dei risultati permettendo una facile localizzazione dei diversi acidi sul foglio di cromatografia. Gli acidi appariranno secondo l'ordine seguente: tartarico (al fondo della carta), citrico, malico, lattico e succinico (in cima al foglio).

La cromatografia su carta è una tecnica semplice, economica e sufficientemente affidabile per seguire lo stato della FML dei vini. Tuttavia, è necessario fare qualche considerazione. La carta deve essere mantenuta perfettamente pulita e asciutta e deve essere maneggiata prendendola solo sui lati. Il solvente descritto è tossico e si degrada col tempo. Può essere conservato per 3-6 mesi, ma nel tempo assorbe l'umidità dell'aria. Quando questo accade, la qualità della cromatografia viene sensibilmente ridotta.

CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

La cromatografia su strato sottile (TLC) è una tecnica analitica chimicamente affine alla cromatografia su carta. Richiede un solvente diverso ed utilizza piastre TLC invece della carta, ma il principio della procedura è esattamente lo stesso. La tecnica permette di ottenere risultati in 1 ora circa, ed è quindi molto più veloce della tecnica su carta.

Nessuna di queste tecniche è specifica per l'acido L-malico, l'isomero dell'acido malico metabolizzato dai batteri lattici durante la FML. I preparati commerciali di acido malico, comunemente utilizzati per aggiustare l'acidità dei vini, sono spesso una miscela delle forme L e D. Se un vino acidificato con acido malico subisce la FML, alla fine del processo sarà ancora visibile una macchia relativa all'acido malico.

Queste tecniche di monitoraggio della FML sono strettamente qualitative, e servono quindi ad osservare l'avanzamento della malolattica ma non verificano il suo completamento. Per ottenere quel tipi d'informazione, è necessario adottare tecniche analitiche quantitative.

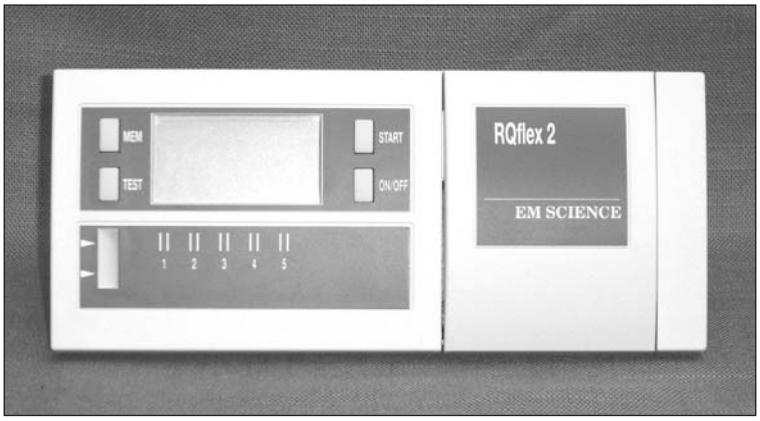
RIFLETTANZA

Una tecnica che si è resa disponibile più recentemente al settore vinicolo è il sistema Reflectoquant®, o RQFlex® (Fig. 1).

Questo strumento si basa sulla riflettanza fotometrica, e fa uso di strisce di reattivo test per analizzare i diversi componenti del vino. Il suo costo è di parecchio inferiore a quello di uno spettrofotometro. Le strisce di reagente utilizzare per l'acido lattico costano la metà circa dei reagenti per l'analisi enzimatica. Lo strumento è in grado di misurare diversi parametri del vino con una precisione del 10% dopo una calibrazione con un metodo chimico di riferimento che, nel caso dell'acido malico, è quello tradizionale di determinazione per via enzimatica e spettrofotometrica.

Il RQFlex® è utile per misurare le concentrazioni degli acidi durante l'avanzamento della FML, ma il livello assoluto di acido malico deve essere confermato con metodi più accurati in momenti critici della FML. Il range operativo dello strumento è tra 1 e 60 mg/L di acido malico, ed alcuni campioni devono essere diluiti e/o decolorati. Questo metodo è attualmente il più veloce a disposizione per testare un singolo campione, dal momento che la lettura del dato è possibile in 5 minuti. Non è possibile analizzare più di un campione, e le strisce con i reagenti hanno una scadenza anche se conservate in luogo refrigerato.

Figura 1. Sistema Reflectoquant®



ANALISI ENZIMATICA

Il metodo di analisi quantitativa più comunemente utilizzato nel controllo della FML è la determinazione enzimatica dell'acido L-malico (Fig. 2). Questo metodo usa un enzima che reagisce specificatamente con l'acido L-malico ed uno spettrofotometro capace di leggere nell'ultravioletto per analizzare il progresso dell'analisi enzimatica. Sono disponibili kit che forniscono tutti i reagenti, gli enzimi e le procedure richieste per la determinazione dell'acido malico. Essi offrono precisione e ripetitività eccellenti, ma sono abbastanza costosi e devono essere utilizzati velocemente una volta aperte le confezioni. La procedura indicata da questi test varia secondo il produttore, ma in ogni caso è necessario l'uso di micropipette di precisione. La tecnica enzimatica è in grado di quantificare l'acido L-malico a livelli molto bassi ed in molti casi non è necessaria la diluizione del campione. Se un campione è eccessivamente torbido, esso deve essere illimpidito per centrifugazione o filtrazione prima di procedere all'analisi. Secondo il numero di campioni da analizzare, i risultati sono normalmente disponibili in 30 minuti. Il calcolo del valore finale è un po' complesso, ma può essere effettuato facilmente una volta impostato un foglio elettronico. I reagenti devono essere conservati in frigorifero e riportati a temperatura ambiente prima dell'uso.

Come accennato in precedenza, per controllare l'avanzamento della FML, oltre alla misura degli acidi organici, si può ricorrere alla determinazione spettrofotometrica della CO_2 prodotta durante il processo. La tabella 2 qui sotto riassume i parametri normalmente utilizzati per seguire la FML e lista le tecniche analitiche necessarie per misurare questi parametri.

Tabella 2. Analisi chimiche per la fermentazione malolattica

	PARAMETRI DELLA FML			
METODO ANALITICO	**AV (acido acetico)**	**Acido malico**	**CO_2**	**Acido lattico**
Valutazione sensoriale	●	●	●	●
Distillazione	●			
Spettrofotometro	●	●	●	●
Riflettanza		●		●
Cromatografia su carta / strato sottile		●		●

Figura 2. Tipica apparecchiatura per l'analisi enzimatica



Il monitoraggio della FML non può fare a meno dell'osservazione dell'aspetto del vino, dalla valutazione dell'odore e del gusto da parte di un enologo esperto. Le sue decisioni devono essere supportate da misure di laboratorio precise ed accurate, effettuate tramite cromatografia su carta, TLC o riflettanza, durante il procedere della FML. Quando questi metodi indicano il completamento della FML, è bene far loro seguire un'analisi di conferma più precisa. Il controllo chimico è importante durante tutte le fasi della vita del vino in cantina, ma nessuna strategia di monitoraggio della FML risulta completa se non comprende una valutazione microbiologica, che sarà l'oggetto della prossima sezione.

MICROBIOLOGIA

Osservazione diretta al microscopio

Il modo più semplice di uso della microbiologia per il controllo della FML è l'osservazione diretta del vino al microscopio.

Date le piccole dimensioni dei batteri del vino ed il loro indice di rifrazione, per differenziarli è necessario utilizzare un microscopio con contrasto di fase o uno a campo chiaro di ottima qualità, in grado di sviluppare immagini a 1000x ingrandimenti (fig. 3). Gli unici altri attrezzi necessari sono vetrini, coprivetrini, olio d'immersione e pipette. Il microscopio è uno strumento molto utile nelle mani dell'enologo, perché con un buon strumento ed un minimo d'esperienza, è possibile individuare istantaneamente le popolazioni batteriche presenti nel vino. Per fortuna sono pochi i batteri che possono vivere nel vino, e tra di loro abbastanza facilmente distinguibili, per cui è relativamente facile identificare al microscopio *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Acetobacter* e stimarne la carica. L'osservazione diretta al microscopio può anche permettere di valutare la salute e l'abbondanza di un inoculo di un ceppo commerciale di *Oenococcus oeni*. In caso di buona salute, il microrganismo forma catenelle evidenti composte di cellule attaccate l'una all'altra e normalmente più lunga è la catena, maggiore è la salute della popolazione. Quando sono visibili solo cellule singole o coppie di cellule di *Oenococcus* in 20 o più campi visivi, la coltura ha probabilmente perso vitalità (un'eccezione è il momento immediatamente successivo all'inoculo di colture prodotte per liofilizzazione, processo che provoca la rottura di tutte le catenelle). Chiaramente, quanto maggiore è la densità cellulare nei singoli campi visivi, tanto più abbondante sarà la popolazione batterica.

Figura 3. Microscopio a contrasto di fase ed attrezzatura necessaria



L'apparecchio fotografico digitale istallato su questo microscopio è un miglioramento aggiuntivo.

Le cellule di *Oenococcus* sono normalmente le più piccole osservate nel vino, con un diametro inferiore a 1 micrometro. Esse possono presentarsi rotonde o allungate, ed alcune volte formano bastoncelli. Sebbene possano variare in lunghezza, le estremità sono sempre arrotondate, e formano catenelle perché si dividono trasversalmente (Fig. 4).

Sebbene ci siano diverse specie di *Pediococcus* e *Lactobacillus* che possono crescere nel vino, l'aspetto al microscopio non aiuta a distinguere tra di esse. Le cellule di *Pediococcus* sono quasi perfettamente rotonde (cocci) e si presentano isolate, a coppie, in tetradi o in piccoli gruppi. Siccome si dividono lungo tutti gli assi, non formano catenelle; queste caratteristiche, unite al fatto che esse appaiono bianche e luminose in contrasto di fase (riflettono la luce in modo diverso), le rendono facilmente distinguibili dalle cellule di *Oenococcus*.

Le cellule di *Lactobacillus* sono a bastoncello: il loro diametro è relativamente costante per tutta la lunghezza, almeno per un dato ceppo. Le cellule di *Lactobacillus* appaiono normalmente isolate o in coppie nel vino, eccetto rari casi dove l'infezione è talmente virulenta che esse si presentano in matasse. Il fatto che appaiano usualmente bianco brillante in contrasto di fase, come le cellule di *Pediococcus*, fa comprendere l'importanza dell'uso di una buona apparecchiatura microscopica (Fig. 5).

Nel vino, quando c'è abbastanza ossigeno presente, possono crescere anche diverse specie dell'organismo aerobico *Acetobacter*. Le sue cellule, come quelle di *Lactobacillus*, sono fatte a bastoncello, di lunghezza variabile, ma il diametro varia sensibilmente lungo la cellula. Le cellule di *Acetobacter* sono tipicamente isolate o in coppie, tendono ad avere estremità più arrotondate o appuntite, e possono essere confuse con grandi cellule di *Oenococcus* più facilmente di quanto lo siano con *Lactobacillus*. Dal momento che nessuno dei batteri del vino possiede flagelli per la propulsione, e sono piccoli e leggeri, le cellule si muovono disordinatamente nell'ambiente acquoso del vetrino ad opera dei moti browniani (movimenti molecolari casuali dipendenti dalla temperatura). Per questa ragione le cellule batteriche sono difficili da fotografare, ma per fortuna l'occhio umano è uno strumento molto migliore dell'apparecchio fotografico, e la vera forma di queste cellule può essere individuata in pochi secondi.

Figura 4. Una densa coltura di *Oenococcus oeni* (sinistra) e colorazione di Gram di *Oenococcus oeni* (destra)

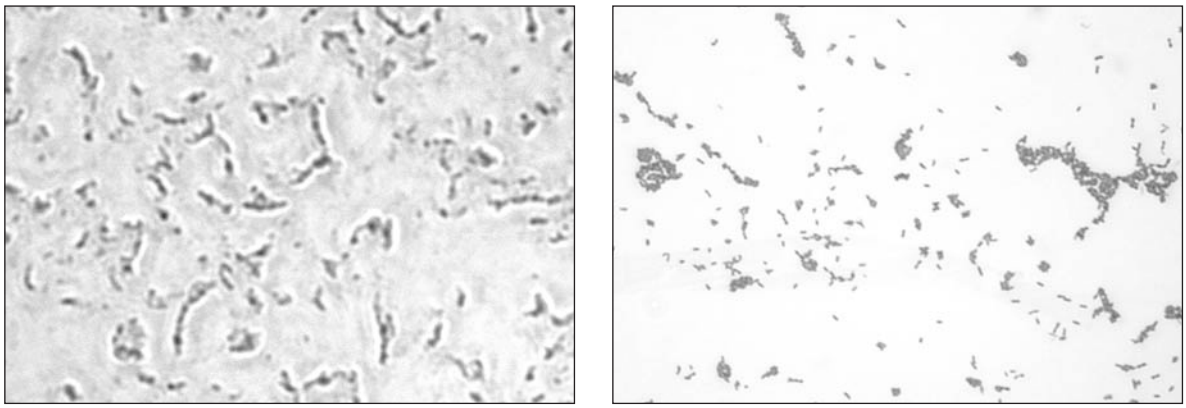
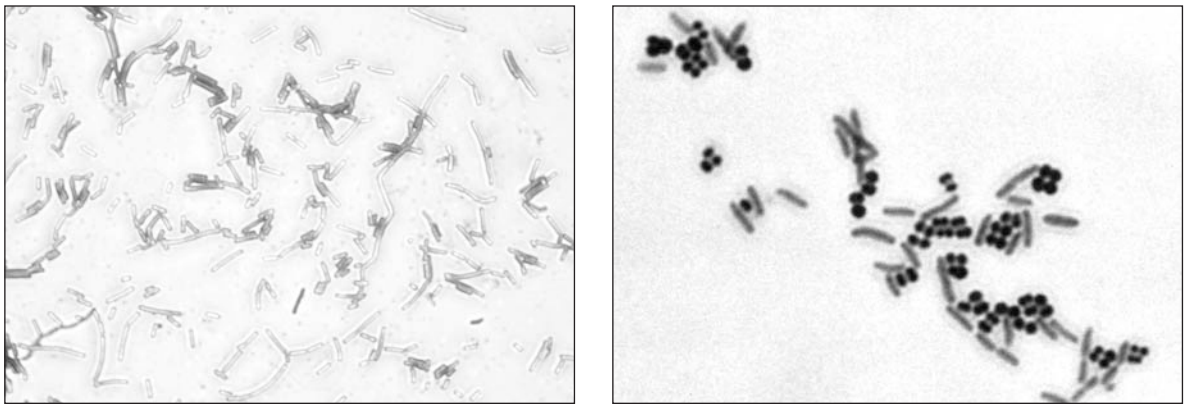


Figura 5. Colorazione di Gram di *Lactobacillus* (sinistra) e colorazione di Gram di *Lactobacillus* e *Pediococcus* (destra)



Il microscopio è un mezzo potente, ma quando si ha a che fare con i batteri il suo impiego è solo qualitativo, dal momento che la vitalità dei batteri non può essere determinata con un normale microscopio e che queste cellule possono restare in sospensione nel vino molto più a lungo di altre particelle. Quando è necessaria un'informazione sulla quantità di batteri vitali presenti, è necessario ricorrere alle tecniche colturali.

TECNICHE DI COLTURA DELLE CELLULE VIVENTI

Contrariamente all'osservazione diretta al microscopio, dove le cellule possono essere realmente osservate, il piastramento delle colture viventi si basa sulla capacità delle cellule di riprodursi in colonie, visibili sulla superficie del mezzo nutritivo dopo qualche giorno. I batteri del vino sono normalmente fatti sviluppare su terreni agarizzati a basso pH, contenenti succo di mela, succo di pomodoro, V8 juice, o altre componenti simili ed in grado di stimolare la crescita dei batteri lattici. La cicloesimide (actidione) può essere aggiunta al terreno per inibire la crescita dei lieviti e rendere più semplice l'individuazione delle colonie batteriche (più piccole). I tempi d'incubazione consigliati sono di solito di 1 settimana a 30°C, perché alcuni batteri lattici formano lentamente colonie visibili.

Il conteggio dei microrganismi nel vino richiede l'impiego di appropriati terreni sterili e la conoscenza delle tecniche asettiche (procedure di laboratorio che assicurano che il tecnico non contamini il terreno con qualcosa di diverso da ciò che è presente nel vino). Il numero di colonie visibili che si formano dà un'indicazione della popolazione di batteri viventi nel campione. Le due tecniche più comuni sono la distribuzione su piastra e la filtrazione a membrana.

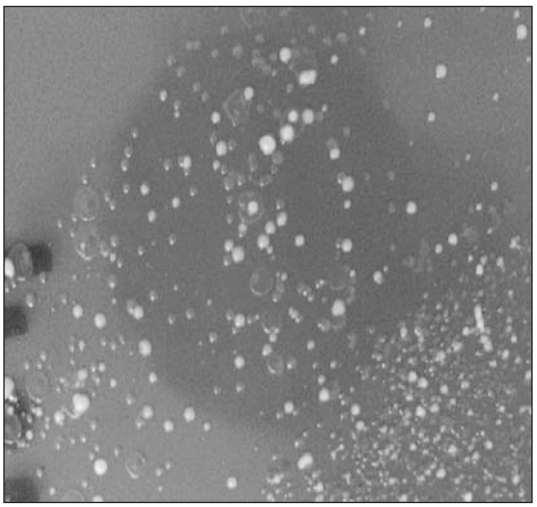
• Tecnica di filtrazione a membrana

Si utilizza quando si ha a che fare con vini che hanno una popolazione batterica vitale molto ridotta. Si filtra sotto vuoto un volume abbastanza grande di vino attraverso un piccolo filtro membrana che trattiene e concentra le cellule. La bottiglia di vino viene agitata più volte per mescolare il contenuto, ed il collo della bottiglia viene immerso in una soluzione al 70% di alcool isopropilico. L'alcool che rimane sul collo della bottiglia viene incendiato per sterilizzarlo. Si toglie quindi il tappo con un cavatappi precedentemente immerso nella stessa soluzione. Il filtro sul quale è passato il vino viene trasferito in modo asettico sulla piastra di terreno agarizzato.

• Tecnica di distribuzione su piastra

È utile quando ci sono popolazioni elevate di batteri. In modo asettico si pipettano 0,2 ml di vino in piastre da 100 mm contenenti i terreni di coltura sopra descritti, e con un'ansa di vetro preventivamente passata alla fiamma si distribuisce uniformemente il campione sulla superficie dell'agar. Dopo 7 giorni di incubazione a 30°C il numero di colonie che si possono contare dalla piastra a 0,2 ml di campione si deve moltiplicare per 5 per avere una stima della popolazione vivente espressa in UCF/mL (unità formanti colonie per millilitro). Nei vini che hanno livelli molto bassi di popolazione si possono anche non avere colonie nella piastra, ma in questo caso si formeranno colonie sul filtro membrana in piastra. Dal momento che le colonie dei batteri lattici sono molto simili, è necessaria l'identificazione al microscopio. Diverse colonie dello stesso tipo vengono campionate con un ago e distribuite su un vetrino con una goccia d'acqua, quindi osservate a 1000x per identificare il microrganismo.

Figura 6. Coltura su piastra di batteri malolattici.



Acetobacter e *Oenococcus* (le piccole colonie bianche) su terreno Apple Rogosa

Le colonie piccole e bianche sono *Oenococcus*, ma possono essere confuse con quelle di *Pediococcus* o *Lactobacillus* dal momento che non sono distinguibili a vista.

Se la carica microbica è molto alta, si può utilizzare la diluizione in serie per enumerare le cellule viventi: diluire 1 mL di coltura batterica in 9 mL di terreno sterile liquido o soluzione salina (diluizione di 10 volte), miscelare e prelevare quindi 1 mL di questa soluzione per aggiungerla ad altri 9 mL di soluzione sterile (ora diluizione di 100 volte), e così via. Se si piastra 0.1 mL di soluzione (in pratica un'altra diluizione di 10 volte, dal momento che il risultato è espresso in UFC/ml) il numero di cellule può essere contato e la popolazione del campione può essere stimata moltiplicando il dato per il fattore di diluizione. In una diluizione seriale, la piastra che contiene da 30 a 300 colonie è considerata la più significativa per il conteggio.

UNO SGUARDO AL FUTURO

DR. SIBYLLE KRIEGER

Il vino è il prodotto di una fermentazione microbica complessa del mosto d'uva, che coinvolge lo sviluppo sequenziale di varie specie di lieviti e batteri lattici. Il compito dell'enologo è quello di assicurare che i lieviti ed i batteri desiderati predominino nel mosto e nel vino e siano agenti del processo. Nelle ultime due decadi, le ricerche sulla fermentazione malolattica hanno fornito una massa di nuove informazioni, portando allo sviluppo di colture starter commerciali e sperimentali per l'inoculo della FML nel vino. Le prime preparazioni commerciali sono disponibili dagli anni '80 e la maggior parte è a base di *Oenococcus oeni*. Sono inoltre state condotte numerose ricerche sui fattori che influiscono sulla FML, grazie alle quali le conoscenze hanno fatto grandi progressi. In alcuni casi poco frequenti, l'avvio della FML può non andare a buon fine a causa delle difficili condizioni che i batteri incontrano nel vino o delle interazioni negative con altri microrganismi.

COMBINAZIONI LIEVITI-BATTERI

In certi casi l'insuccesso di una coltura malolattica può essere dovuto alle interazioni d'antagonismo tra lieviti e batteri[1]. King and Beelman[2] hanno ipotizzato che la crescita di *Oenococcus oeni* durante la fermentazione alcolica può essere ritardata dalla produzione da parte del lievito di composti tossici diversi dall'etanolo e dalla solforosa.

Inoltre, vini derivanti dallo stesso mosto possono mostrare diversa facilità di avvio della FML, un fenomeno che è stato messo in relazione con il ceppo di lievito utilizzato nella fermentazione alcolica. Questa inibizione è correlata con la capacità del ceppo di lievito di produrre elevate quantità di solforosa nelle prime fasi della fermentazione oppure d'impoverire il mezzo in micronutrienti. Le ricerche più recenti cercano di capire meglio queste interazioni, di quantificare le esigenze nutritive dei lieviti vinari e dei batteri lattici, e di identificare l'esistenza di altri fenomeni d'interazione tra *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni* nell'ambiente vino. Una migliore comprensione di questi aspetti della fisiologia dei microrganismi del vino ci consentirà di offrire le migliori combinazioni di colture starter di lieviti e batteri, e di mettere a punto colture specifiche per varietà d'uva.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

UN TEST PER DETERMINARE LA CAPACITÀ DI UN VINO DI SUBIRE LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Come accennato in precedenza, in un numero limitato di casi l'induzione della malolattica può non avere successo. In questi casi, anche se si utilizzano colture selezionate di batteri, le difficili condizioni del vino (carenze nutritive) o sostanze inibitrici presenti nel vino (pesticidi, acidi grassi a media catena, residui di lisozima ecc.) possono far sorgere problemi. Basandosi sulle conoscenze dei diversi ceppi batterici rispetto alla loro tolleranza alle condizioni del vino, alle specifiche esigenze nutrizionali e alle loro resistenza a fattori inibenti, è possibile arrivare a mettere a punto un test per determinare l'attitudine di un vino ad essere oggetto della FML. Il test è attualmente in fase di sviluppo presso i laboratori Lallemand e, una volta perfezionato, permetterà di identificare il miglior ceppo da utilizzare in un certo vino. In alternativa, esso potrà indicare se il vino in questione contiene composti inibenti e si rende necessario un trattamento prima dell'inoculo delle colture starter (rapporto interno Lallemand R&D).

CEPPI DIVERSI PER TIPOLOGIE DIVERSE DI VINO

La FML gioca un ruolo importante nella definizione della qualità finale dei vini rossi e di certi vini bianchi. Per anni la FML è stata considerata semplicemente il processo di degradazione dell'acido L-malico in acido L-lattico e CO_2. Henick-Kling[3] ha descritto l'attività metabolica dei batteri malolattici e la loro influenza sui composti dell'aroma del vino, e Richardson[4] ha documentato gli specifici contributi sensoriali dei singoli ceppi di batteri malolattici. Alcuni ceppi producono note caratteristiche di burrato, lievito e frutta secca, mentre altri amplificano gli aromi fruttati e riducono i caratteri vegetali. Nel futuro, le colture malolattiche saranno caratterizzate dal loro contributo sensoriale al profilo organolettico complessivo del vino, e saranno disponibili specifiche colture batteriche adatte alla produzione di determinati tipi di vino.

BATTERI IMMOBILIZZATI E BIOREATTORI

Diverse volte l'uso di *Oenococcus oeni* con popolazioni elevate è stato oggetto di studio[8]. Nel vino, l'impiego di batteri malolattici ad alte concentrazioni (10^7-10^8 UFC/ml) potrebbe essere d'aiuto perché gli effetti negativi di pH, alcool e SO_2 non sarebbero più una preoccupazione, non essendo più necessaria una crescita batterica per completare la FML. Hammes et al.[9] hanno indotto una FML facendo uso di un bioreattore a letto fluido, nel quale le cellule di *Oenococcus oeni* erano state immobilizzate in una matrice d'alginato ed il vino era fatto circolare nel bioreattore. I migliori risultati sono stati osservati facendo uso di sfere di piccolo diametro (1,2 mm) ed è stato verificato che il pellet di batteri immobilizzati poteva essere conservato in azoto liquido a -85°C. Si sa ora che l'immobilizzazione in matrice di ceramica aumenta la stabilità meccanica delle sfere e migliora la rigenerazione. Janssen et al.[10] hanno proposto un bioreattore con

Oenococcus oeni immobilizzato su trucioli di legno, che ha una vita media di 11 giorni quando utilizzato a 21°C e rifornito di vino a pH 3,45 e 13% (v/v) etanolo. Maicas et al.[11] hanno studiato l'assorbimento di *Oenococcus oeni* su spugne di cellulosa caricate positivamente.

BIOREATTORI CON ELEVATE BIOMASSE DI CELLULE LIBERE

Maicas[12] ha studiato bioreattori ad elevata densità cellulare, ottenuta con riciclo di cellule attraverso filtri tangenziali o a fibre cave che separano le cellule dal vino. Come affermato da Bauer in *Controllo della fermentazione malolattica nei vini*[13], "le cellule rimangono nel sistema e raggiungono elevate densità cellulari, mentre il vino viene costantemente rimosso per prevenire l'inibizione alla crescita cellulare provocato dagli alti livelli di acido lattico e dal basso pH. I limiti sono da ricercare nello stress a cui sono sottoposte le cellule nell'unità di filtrazione, nelle difficoltà a passare a modelli industriali e nel drastico decremento dell'attività malolattica dopo pochi giorni". Maicas[14] ha anche utilizzato elevate popolazioni di cellule libere di *Oenococcus oeni* in un reattore in agitazione continua, per realizzare la FML in continuo per 2-3 settimane, senza che siano intervenuti fenomeni di inibizione da acido lattico.

Sebbene queste tecniche si siano rivelate efficaci nella rimozione dell'acido L-malico dal vino, esse sono state rifiutate dall'industria produttiva per la complessità e per la delicatezza meccanica e microbiologica del processo.

BIOREATTORI CON ENZIMI E DEGRADAZIONE DEL MALICO CON *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Formisyn et al.[15] hanno sviluppato un bioreattore senza cellule con enzima malolattico da *Oenococcus oeni* e cofattori richiesti per l'attività enzimatica. L'efficienza della conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico è dipendente da pH ed etanolo, e non è stata raggiunga una FML completa.

Utilizzando *Schizosaccharomyces pombe* in condizioni anaerobiche è possibile degradare efficacemente l'acido malico[16]. Taillander[17] è riuscita ad indurre la degradazione dell'acido malico in vini bianchi fruttati, immobilizzando *Schizosaccharomyces pombe* in biglie di arginato a doppio strato contenute in grandi sacche, ma senza arrivare al completamento della FML. Dal lavoro della Talliander del 2001, la tecnologia è stata perfezionata ed effettivamente sono ora disponibili sul mercato prodotti a base di *Schizosaccharomyces pombe* immobilizzato che sono abbastanza efficienti.

DEGRADAZIONE DELL'ACIDO MALICO CON CEPPI RICOMBINANTI DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

I ceppi naturali di *Saccharomyces cerevisiae* metabolizzano quantità insignificanti di acido malico durante la fermentazione alcolica[18]. Volschenk et al.[19] hanno ricostruito un ceppo di lievito malolattico *Saccharomyces cerevisiae*, facendovi esprimere il gene di *Schizosaccharomyces pombe* che codifica per la malato permeasi (mae1) e quello di *Lactococcus lactis* per l'enzima malolattico (mleS). Questo ceppo di lievito ricombinante è in grado di attuare contemporaneamente la fermentazione alcolica e malolattica ed è molto tollerante a pH bassi.

Secondo gli autori, questo ceppo è in grado di completare la FML entro 3-7 giorni dall'inoculo, cioè prima del termine della fermentazione alcolica. L'organismo non dà rischi di produzione di ammine biogene o odori anomali associati con la FML spontanea, ma nemmeno i contributi positivi all'aroma e al gusto legati alla FML. Come ha commentato Bauer, "la sostituzione dei batteri malolattici con lieviti geneticamente modificati è molto dubbiosa"[13].

COLTURE SELEZIONATE DI BATTERI LATTICI NON-*OENOCOCCUS OENI*

I batteri sono presenti nel vino in ogni fase della vinificazione e dello stoccaggio. La superficie degli acini d'uva, i raspi, le foglie, il terreno e l'attrezzatura di cantina sono tutte fonti potenziali d'inoculo batterico dei mosti e dei vini. Tuttavia, a causa delle condizioni proibitive, solo alcune specie sono in grado di sopravvivere e svilupparsi nei mosti e nei vini[5, 6] ed i batteri lattici predominano in condizioni di vinificazione anaerobiche. I batteri lattici del vino appartengono a quattro generi: *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. *Oenococcus oeni*, prima denominato *Leuconostoc oenos*, è capace di crescere nella maggior parte dei vini. Si ritrovano comunemente nel vino anche tre specie di *Pediococcus* e sette specie *Lactobacillus*. Come discusso nelle sezioni precedenti, il basso pH del vino determina il tipo di microrganismo che è presente. In vini con pH inferiore a 3,5 generalmente dominano ceppi di *Oenococcus oeni*, e in vini con pH superiore a 3,5 saranno invece predominanti ceppi di *Lactobacillus* e *Pediococcus*. La maggior parte delle colture starter impiegano *Oenococcus oeni* per l'eccellente tolleranza alle condizioni limitanti di basso pH, alcool elevato, alta SO_2 e basse temperature del vino, abbinata a buone caratteristiche organolettiche, ma è stata introdotta sul mercato anche una coltura a base di *Lactobacillus plantarum*.

Essa è da inoculare nel mosto perché è inibita da livelli di alcool superiore al 5% (v/v) e non è più vitale dopo il primo terzo della fermentazione alcolica. Come accennato in precedenza, le FML spontanee sono normalmente dominate da ceppi indigeni e selvaggi di *Oenococcus oeni*, ma in molte di esse, quando il pH del vino è sopra i 3,5, si può assistere ad una dominanza di

Pediococcus damnosus e certi ceppi di *Lactobacillus*. L'applicazione di appropriati criteri di selezione in vini che appartengono a questa categoria potrebbe portare all'isolamento di ceppi di batteri in grado di indurre la FML in vini a pH alti. Il gruppo di Fumi[7] ha mostrato che alcuni ceppi alcool tolleranti di *Lactobacillus plantarum* possono ridurre del 90% la concentrazione di Ocratossina A nel vino. Questa proprietà sta acquistando interesse, perché dal marzo 2005 l'OIV ha introdotto un limite per l'Ocratossina A nel vino di 2 µg/L.

CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA TRAMITE BATTERIOCINE ED ALTRI COMPOSTI

Nel passato la solforosa era l'unico strumento a disposizione per controllare o inibire la crescita microbica nel vino. Le preoccupazioni sui possibili rischi per la salute associati alla SO_2 e l'obbligo di dichiarare in etichetta la presenza di SO_2 in bottiglia hanno spinto alla ricerca di alternative. Con questo obiettivo nel 2001 l'OIV ha autorizzato l'uso di lisozima nel vino. Il lisozima è un composto antimicrobico ricavato dal bianco d'uovo ed è molto utilizzato nell'industria casearia; esso è attivo solamente contro i batteri Gram positivi, come i batteri lattici, ma non ha alcuna azione sui Gram negativi come *Acetobacter*. Allo stesso modo, non ha effetti sui lieviti. L'attività del lisozima non è influenzata dall'alcool o dalla solforosa, ed aumenta all'aumentare del pH. Il suo costo elevato, insieme ad alcune considerazioni relative all'instabilità proteica, non permette l'uso di lisozima su tutti i vini.

Le batteriocine sono peptidi o proteine con effetto antimicrobico sintetizzati sui ribosomi dei batteri. Sono tossiche nei confronti di altri organismi, in particolare verso i ceppi strettamente in relazione con il microrganismo che le produce. Il fenomeno conferisce effettivamente un vantaggio competitivo ambientale all'organismo che produce batteriocine. Al contrario del lisozima, le batteriocine sono molto specifiche e sono attive solo nei confronti di un ristretto gruppo di microrganismi. Sono senza odore e senza colore, e non mostrano tossicità nei confronti dell'uomo. La nisina, isolata da *Lactococcus lactis*, è attualmente l'unica batteriocina purificata ammessa per l'uso alimentare[22]. Si è dimostrato che alcuni batteri lattici isolati dal vino sono in grado di produrre batteriocine e che essi possono essere responsabili degli effetti di antagonismo osservati nel vino tra batteri lattici[19, 20]. Secondo Bauer[21] "la produzione di batteriocine nel mosto d'uva o nel vino può avere un ruolo significativo sul completamento della FML". Egli ha anche mostrato che il mosto d'uva non contiene i fattori di crescita necessari per la produzione di pediocina PD-1, una batteriocina prodotta da *Pediococcus damnosus*[21], concludendo "deve essere dimostrato se ciò è vero anche per altre singole batteriocine". Questi peptidi sono stabili nelle condizioni enologiche, non hanno effetti sulla crescita dei lieviti, ma sono inibenti nei confronti di *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ed *Oenococcus* sp.[24] L'aggiunta di nisina[23] e pediocina PD-121 al vino è stata vista essere in grado di prevenire la crescita dei batteri lattici. La nisina inibisce i pediococchi, la plantaricina 423 sembra essere molto attiva nei confronti di *Oenococcus oeni*[25] e la pediocina PA-1[26], una batteriocina prodotta da *Pediococcus acidilactici*, è attiva contro la maggior parte dei batteri contaminanti del vino, ma non nei confronti di *Oenococcus oeni*. La pediocina PA-1, secondo Bauer, "…sarebbe quindi un antibatterico ideale nei vini in cui è desiderata una FML condotta da *Oenococcus oeni*"[13] Schoeman et al.[26] hanno clonato il gene corrispondente in *Saccharomyces cerevisiae*.

Ceppi di lievito in grado di produrre queste batteriocine sarebbero utili nella produzione di vini in cui non si vuole la FML, oppure nei quali si vuole evitare lo sviluppo di batteri lattici indesiderati. Nel futuro si possono immaginare FML condotte con batteri lattici selezionati in grado di produrre batteriocine, ma le condizioni e le tempistiche dell'inoculo restano ancora da definire. Sempre citando Bauer, "Questi inibitori 'naturali' saranno una parte importante delle future ricerche, perché potranno permettere di migliorare le strategie antimicrobiche con vantaggi sulla qualità e sulla sicurezza alimentare"[13].

REFERENCES

1. Fornachon, J. C. M. 1963. Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *J. Sci. Food. Agric.* 19:857-862.

2. King, S. W., and R. B. Beelman. 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:53-60.

3. Henick-Kling, T., T. E. Acree, S. A. Krieger, M. H. Laurent, and W. D. Edinger. 1994. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. *Wine East.* 8-15.

4. Richardson, J., K. Arnink and T. Henick-Kling. 2000. Flavor profiles created by various strains of *Oenococcus oeni* in malolactic fermentation of wine. In: *Proceedings of the ASEV/Eastern section conference 2000*, Ithaca, USA.

5. Wibowo, D., R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic*. 36:203-313.

6. Van Vuuren, H. J. J., and L. M. T. Dicks. 1993. *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. J. Enol. Vitic*. 44:99-112.

7. Silva, A., R. Galli, B. Grazioli, and M. D. Fumi. 2003. Metodi di reduzione di residui di Ocratossina A nei vini. *Industrie delle Bevande* XXXII, October: 467-471.

8. Gao, C., and G. H. Fleet. 1994. The degradation of malic acid by high cell density suspensions of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol*. 76:632-637.

9. Trück, H. U., and W. P. Hammes. 1989. Die Verwendung eines Fliessbettreaktors zur Ausführung des biologischen Säureabbaus im Wein mit immobiliserten Zellen. *Chem. Mikrob. Technol. Lebensm*. 12:119-126.

10. Janssen, D. E., I. S. Maddox, and J. A. Mawson. 1993. An immobilized cell bioreactor for the malolactic fermentation of wine. *Wine Industry Journal*, May 2003:161-165.

11. Maicas, S., I. Pardo, and S. Ferrer. 2001. The potential of positively charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme Microb. Technol*. 28:415-419.

12. Maicas, S. 2001. The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 56:35-39.

13. Bauer, R., and L. M. T. Dicks. 2004. Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 25/2:74-88.

14. Maicas, S., I. Pardo, and S. Ferrer. 1999. Continuous malolactic fermentation in a red wine using free *Oenococcus oeni*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 15:737-739.

15. Formisyn, P., H. Vaillant, F. Lantreibecq, and J. Bourgois. 1997. Development of an enzymatic reactor for initiating malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic*. 48:345-349.

16. Grobler, J., F. Bauer, R. E. Subden, and H. J. J. Van Vuuren. 1995. The mae1 gene of *Schizosaccaromyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. *Yeast* 11:1485.

17. Taillander, P. 2001. Encapsulated *Schizosaccharomyces pombe* to induce malolactic fermentation in wine. PhD thesis.

18. Van Vuuren, H. J. J., M. Viljoen, M. J. Grobler, H. Volschenk, F. Bauer, and R. E. Subden. 1995. Genetic analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* malate permease (mae1) and malic enzyme (mae2) genes and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Gousard P. G., E. Archer, D. Saayman, A. Tromp and C. J. van Wyk, (Eds). 1995. *Proceedings of the first SASEV International Congress*, Cape Town, South Africa. 6-8.

19. Lonvaud-Funel, A., and A. Joyeux. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: Inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Micriobiol*. 10:411-419.

20. Strasser de Saad, A. M., and M. C. Manca de Nadra. 1993. Characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol*. 74:406-410.

21. Bauer, R., H. A. Nel, and L. M. T. Dicks. 2003. Pediocin PD-1 as a method to control the growth of *Oenococcus oeni* in wine. *Am. J. Enol. Vitic*. 54:86-91.

22. Hansen, J. N. 1994. Nisin as a model for food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 34:69-93.

23. Radler, F. 1990. Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. *Am. J. Enol. Vitic*. 41:7-11.

24. Bauer, R. 2003. Strategies for the control of malolactic fermentation: Characterization of pediocin PD-1 and the gene for the malolactic enzyme from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. Dissertation, Stellenbosch University, South Africa.

25. Nel, H. A., R. Bauer, G. M. Wolfaardt, and L. M. T. Dicks. 2002. The effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 432 and nisin on biofilms of *Oenocoocus oeni* on a stainless steel surface. *Am. J. Enol. Vitic*. 53:191-196.

26. Schoeman, H., M. A. Vivier, M. Du Toit, L. M. T. Dicks, and I. S. Pretorius. 1999. The development of bacterial yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:647-656.

CONTATTI

selezionati dalla natura
LALLEMAND

Italia

Lallemand
Paola Vagnoli
Via Rossini 14/B
37060 Castel D'Azzano, Italia

Tel. (39) 04 55 12 555
pvagnoli@lallemand.com

BATTERI MALOLATTICI LALLEMAND, NUTRIENTI PER BATTERI MALOLATTICI E LISOZIMA

COLTURE MBR® DI *OENOCOCCUS OENI*

LALVIN 31®: Aumenta il contenuto in polifenoli ed amplifica il carattere fruttato. Adattato a vini con bassi pH e temperatura. LALVIN 31® è stato selezionato dall'Institut Technique du Vin (ITV), Francia; dà buoni risultati in condizioni difficili dovute al pH (>3,1) o alle basse temperature (>14°C). L'intensità del colore finale dipende alla durata della fermentazione malolattica. Dando la possibilità di condurre la FML a basse temperature, LALVIN 31® offre all'enologo uno strumento di controllo per ottenere vino con maggiore intensità e stabilità del colore. LALVIN 31® è noto per la sua influenza positiva sulle caratteristiche organolettiche dei vini bianchi e rossi e per la bassa produzione di ammine biogene. LALVIN 31® trae vantaggio dall'aggiunta di nutrienti specifici per la malolattica.

UVAFERM® ALPHA: Sicurezza e morbidezza in bocca.
Indicato per vini ad elevato grado alcolico. ® ALPHA è stato selezionato dall'Institut Technique du Vin (ITV), Francia, da fermentazione malolattiche spontanee che mostravano buona attività fermentativa e ottimo contributo sensoriale. UVAFERM® ALPHA è un ceppo dominante, in grado di dare FML sicure ed aumentare la complessità del vino. Inoltre, la sua bassa produzione di ammine biogene permette di produrre in tranquillità rispetto ai limiti normativi e alla salute dei consumatori. Al contrario di quanto accade con le FML spontanee, il contributo di UVAFERM® ALPHA al profilo organolettico dei vini bianchi è normalmente descritto come aumento della morbidezza in bocca nel rispetto dei caratteri tipici della varietà. L'impatto positivo di UVAFERM® ALPHA alla complessità del vino è completato dalla tendenza a ridurre la percezione degli odori verdi e vegetali.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

LALVIN® ELIOS 1: Contribuisce all'intensità tannica ed al volume in bocca. Indicato per vini con alcool elevato.
LALVIN® ELIOS 1 è stato isolato dall'Institut Coopératif du Vin (ICV) di Montpellier, Francia, da una fermentazione malolattica spontanea che mostrava sia caratteristiche cinetiche molto buone, sia un profilo organolettico positivo del vino ottenuto. ICV ha valutato il ceppo LALVIN® ELIOS 1 utilizzando in vinificazioni sperimentali comparative con numerosi altri *Oenococcus oeni* isolati in vari anni di ricerca. Il ceppo LALVIN® ELIOS 1 ha mostrato in tutte le prove buone cinetiche di FML, anche in vini con alcool di 15,5%. Questa coltura malolattica aumenta la percezione dell'intensità tannica riducendo nel contempo i caratteri verdi e vegetali.

LALVIN VP 41®: Aumenta la complessità ed il volume in bocca. Adatto a vini con alcool elevato.
LALVIN VP 41® è stato isolato in Italia in seno ad un programma di ricerca dell' Unione Europea finalizzato alla ricerca di ceppi naturali di Oenococcus oeni. Il lavoro, durato quattro anni, ha coinvolto diversi istituti di ricerca e cantine e si è focalizzato sulla selezione di ceppi con proprietà enologiche uniche. L'effetto positivo di LALVIN VP 41® sul gusto del vino è emerso nettamente nelle prove di confronto con altri ceppi malolattici. A temperature inferiori a 16°C, LALVIN VP 41® si avvia lentamente, ma completa la FML. La forte dominanza, la tolleranza alla SO_2 ed ai gradi alcolici elevati, oltre alla cinetica regolare di fermentazione, fanno di LALVIN VP 41® un ceppo molto affidabile, da utilizzare ogni qualvolta sia importante avere un impatto significativo sulla struttura gustativa del vino.

NUTRIENTI PER BATTERI MALOLATTICI

ACTI-ML®

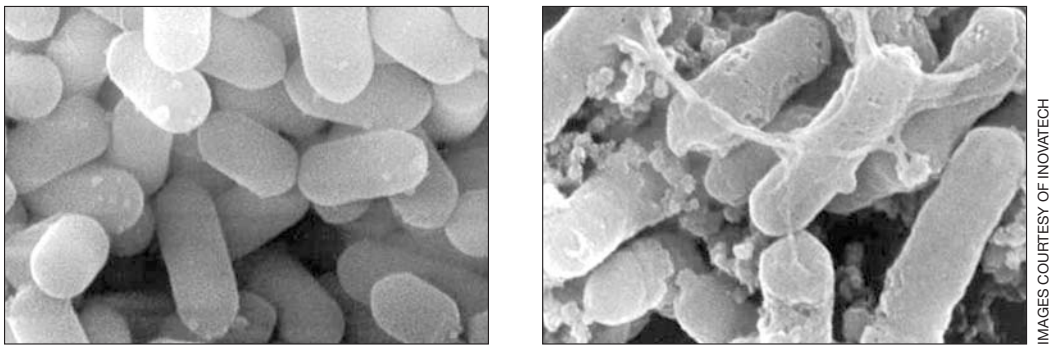
ACTI-ML® è stato sviluppato dal gruppo R&S Lallemand diretto da Dr. Sibylle Krieger. È un preparato da aggiungere all'acqua di reidratazione della coltura batterica per agevolare la FML di vini difficili. ACTI-ML è una miscela speciale di lieviti inattivi ricchi in amminoacidi, cofattori minerali e vitamine. Questi derivati del lievito sono miscelati con cellulosa per fornire maggiore superficie di adesione e mantenere in sospensione i batteri.

LISOZIMA PER L'INIBIZIONE DEI BATTERI LATTICI INDESIDERATI

LALLZYME® LYSO: Lisozima concentrato in polvere.
LALLZYME® LYSO è un enzima naturale purificato estratto dal bianco d'uovo, con azione inibitrice specifica sui batteri Gram positivi. LALLZYME® LYSO agisce lisando la membrana protettiva esterna dei batteri Gram + (vedi Fig. 1). Non ha effetti sui lieviti o sui batteri Gram negativi come *Acetobacter*.

Figura 1. Effetto del lisozima su *Lactobacillus* spp.

Prima del trattamento con lisozima **Dopo trattamento con lisozima**



IMAGES COURTESY OF INOVATECH

Per ridurre i rischi di contaminazione da batteri lattici, utilizzare LALLZYME® LYSO durante:

- macerazione a freddo prefermentativa
- fermentazioni alcoliche spontanee
- fermentazioni alcoliche rallentate o arrestate
- macerazione prolungata sulle vinacce
- microssigenazione

LALLZYME® LYSO-EASY: Soluzione di lisozima pronta all'uso.
LALLZYME® LYSO-EASY è la versione facile da usare di LALLZYME® LYSO e può essere aggiunta direttamente al mosto o al vino. È una soluzione di lisozima molto efficace (soluzione al 22%, senza conservanti, stabile a temperatura ambiente per 12 mesi o più a lungo se tenuta al freddo).

Redatto da Lallemand Nord America nel 2005. Le informazioni qui contenute sono veritiere e precise secondo lo stato attuale delle conoscenze; tuttavia, questa informazione commerciale non può essere considerata come una garanzia espressa o implicita, o come una condizione di vendita per nessuno dei prodotti Lallemand.

GUIDA ALLA SCELTA DELLA COLTURA LALLEMAND MBR® ADEGUATA

Nella scelta di una coltura MBR® è necessario rifarsi a due concetti:
1. SICUREZZA – compatibilità della coltura con l'ambiente vino
2. QUALITÀ – i contributi delle diverse colture al profilo sensoriale del vino

SICUREZZA: identificare la migliore coltura per le caratteristiche del proprio vino

Tabella 1. Tolleranza alle condizioni limitanti del vino

Coltura MBR®	Condizioni limite di sviluppo			
	Alcool	pH	Temperatura minima	SO_2 totale
LALVIN 31®	14%	>3,1	13°C	<50 ppm
UVAFERM® ALPHA	14,5%	>3,1	14°C	<50-60 ppm
LALVIN® ELIOS 1	15,5%	>3,4	18°C	<50 ppm
LALVIN VP 41®	15%	>3,1	16°C	<50-60 ppm

Le informazioni qui riportate sono frutto di numerose esperienze di vinificazione condotte in Italia su tipologie diverse di vino e in differenti condizioni enologiche.

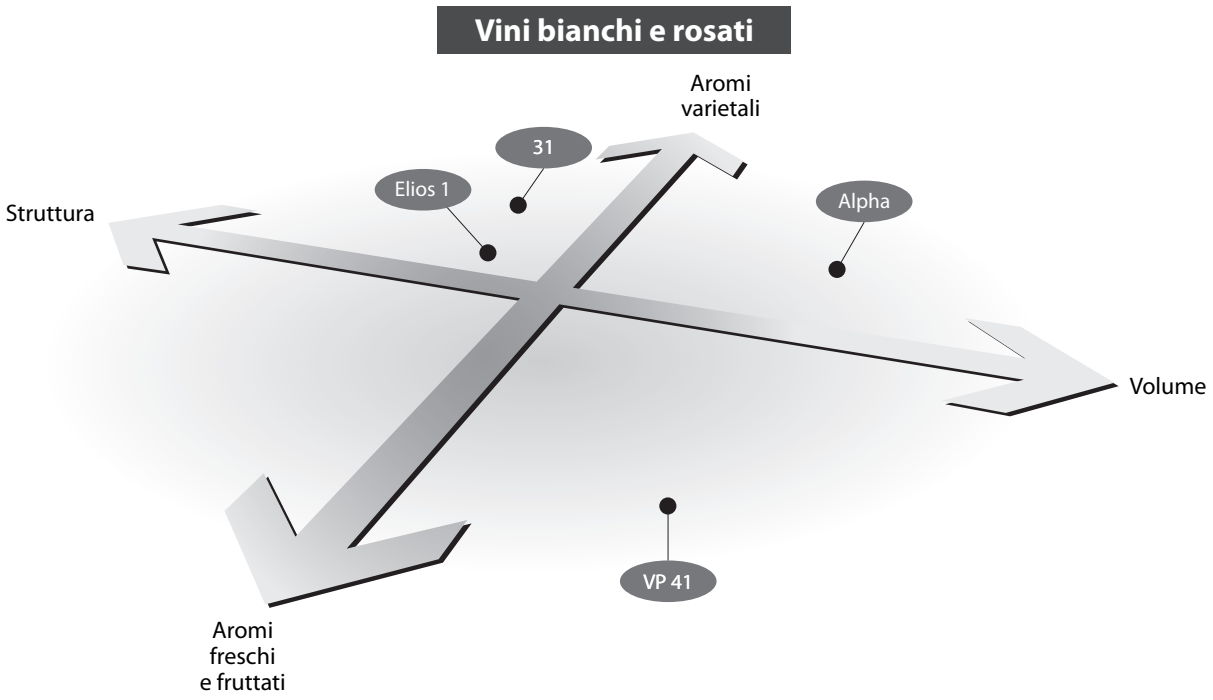
N.B. Queste non rappresentano le migliori condizioni per il successo della FML. I livelli sopra citati sono i valori limite normalmente tollerati dalle colture. Questi fattori di stress hanno effetto sinergico e devono essere presi in considerazione nel loro complesso.

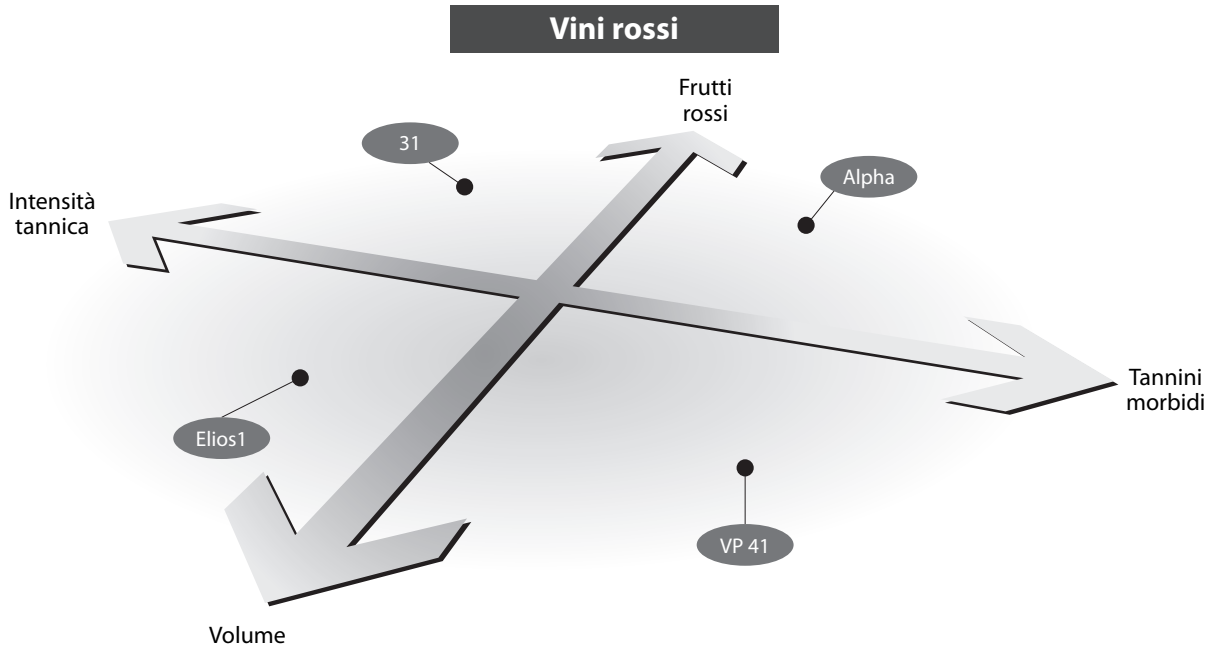
Tabella 2. Guida alla scelta dei batteri in condizioni difficili

Condizioni difficili	Scelta migliore
Alcool elevato	LALVIN VP 41®, LALVIN® ELIOS 1, UVAFERM® ALPHA
pH basso	LALVIN 31®, UVAFERM® ALPHA
Temperatura bassa	LALVIN 31®, UVAFERM® ALPHA
SO_2 elevata	UVAFERM® ALPHA, LALVIN VP 41®, LALVIN® ELIOS 1

N.B. L'elenco delle colture sopra raccomandate non segue un ordine di preferenza. I quattro principali fattori limitanti (alcool, pH, temperatura, SO_2) hanno un effetto inibente sinergico sulle colture.

SCEGLIERE UNA COLTURA IN BASE AL CONTRIBUTI SENSORIALE





FERMENTAZIONE MALOLATTICA: TECNICHE DI VINIFICAZIONE E STILE DEL VINO

AGOSTO 2006

selezionati dalla natura
LALLEMAND

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vini bianco stile fruttato ottenuto con la tecnica di coinoculo lieviti - batteri

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINI BIANCO STILE FRUTTATO OTTENUTO CON LA TECNICA DI COINOCULO LIEVITI - BATTERI

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. Vendemmiare di notte per assicurare basse temperature all'arrivo in cantina. Pressatura del raccolto a basse temperature. Addizione di SO_2 a 3-4 g/hL. Per effettuare il co-inoculo è necessario un ottimo stato sanitario. Macerazione delle uve, aggiungere enzima LALLZYME® CUVÉE BLANC (2g/q).	Sfecciatura del mosto a basse temperature. Torbidità tra 80 e 100 NTU. Aggiungere enzimi di chiarifica. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 250 mg/L. Il pH massimo del mosto per questa pratica deve essere di 3,4. Al di sopra di questo livello devono essere realizzate correzioni.	Proteggere e nutrire il lievito e i batteri adeguatamente per un corretto andamento della fermentazione alcolica e malolattica. L'uso di nutrienti complessi è altamente consigliabile, particolarmente per i batteri. Utilizzare lieviti con un fabbisogno di azoto assimilabile da basso a medio, non produttori di SO_2 e senza una crescita vigorosa. La sinergia con i batteri deve essere accertata prima dell'uso. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: UVAFERM® VRB, LALVIN® QA23, LALVIN ICV D47™.	La temperatura di fermentazione non deve superare i 18 ºC durante tutta la vinificazione. Aggiungere 30 g/hL di OPTI-WHITE® per aumentare il volume in bocca e l'effetto antiossidante. Inoltre servirà da supporto ai batteri durante la loro latenza. Addizione un nutriente complesso a 1/3 della FA fino a raggiungere la concentrazione richiesta di APA in funzione del grado alcolico e del lievito. Non è consigliata l'addizioni di fosfato diammonico per evitare crescite eccessive di lieviti che inibiscono i batteri.	Inoculo dei batteri dopo 12 ore dall'inizio della fermentazione alcolica, quando ci sia una attività fermentativa evidente. Mantenere la temperatura a 18-20 ºC durante la FML. Inoculare con UVAFERM® ALPHA, LALVIN 31®. Omogeneizzare i batteri in circuito chiuso senza ossigeno. Realizzare un controllo costante della degradazione di acido malico.	Evitare incrementi di temperatura durante la fermentazione malolattica. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML. Quando il tenore degli zuccheri è < 2 g/L, addizionare nutriente specifico per batteri. Realizzare un controllo costante della degradazione dell'acido malico.	Una volta finita la FML, travasare e correggere l'SO_2 molecolare a 0,9 g/L. Abbassare la temperatura a meno di 15 ºC.
	Precauzioni: la solfitazione è più blanda all'inizio e si integra alla fine della FML.	**Precauzioni:** evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** tenere sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente dell'acidità volatile.
	Scelte raccomandate per la chiarifica del mosto. Condizioni facili: LALLZYME® HC (2 g/q). Condizioni difficili: LALLZYME® C-MAX (1-2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: UVAFERM® VRB, LALVIN® QA23, LALVIN ICV D47™. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E BLANC.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: UVAFERM® ALPHA, LALVIN 31®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino bianco fermentato in barrique

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO BIANCO FERMENTATO IN BARRIQUE

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. Se possibile, vendemmiare di notte per assicurare basse temperature all'arrivo in cantina. Pressatura del raccolto a basse temperature. All'uscita della pressa, contenuto in SO_2 di 50 ppm. Se necessario, correggere acidità con acido tartarico.	Sfecciatura del mosto a basse temperature. Obiettivo: meno di 1% di solidi dopo questa operazione. Aggiungere enzima di chiarifica. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 300 mg/L.	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Sempre che sia possibile, correggere con nutrienti complessi. Aggiungere in questa fase la metà della dose. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: LALVIN® QA23, CROSS EVOLUTION®, LALVIN® CY3079, LALVIN ICV D47™. Aggiungere 30 g/hL di OPTI-WHITE® per aumentare il volume in bocca e l'effetto antiossidante.	Addizione di nutriente complesso fino ad arrivare alla concentrazione richiesta di APA in funzione del grado alcolico e del lievito. La prima aggiunta di nutriente dopo la fase di latenza. La seconda addizione in torno ai 18 ºBrix. Mantenere la temperatura della barricaia intorno ai 18 ºC. Temperature massime raggiunte dal mosto (24-26 ºC). Mantenere le fecce fini in post-fermentazione.	Ritardare l'inizio della fermentazione malolattica fino a che la fermentazione alcolica non sia conclusa. Inoculare coltura malolattica ad inoculo diretto: UVAFERM® ALPHA. Mantenere la barricaia a 20 ºC. Si consiglia l'uso di WHITESTYLE a una dose di 20 g/hL prima dell'inizio della FML per migliorare la nutrizione dei batteri e il volume in bocca.	Realizzare una movimentazione del vino nelle barrique (batonnage) una volta alla settimana fino alla fine della FML. Controllo continuo del livello di L-malico: la FML si considera finita quando i livelli si trovano sotto 0,1 g/L.	Una volta finita la FML, aggiungere 30 ppm di SO_2. L'obbiettivo è una SO_2 libera di 25 ppm, ma le correzioni si faranno in funzione del pH. Mantenere la temperatura della barricaia a 13 ºC. Mantenere il vino in contatto con le fecce fino alla fine dell'affinamento. Per accelerare il processo di affinamento sulle fecce può essere utilizzato l'enzima ß-glucanasi LALLZYME® MMX a 2-5 g/hL.
Precauzioni: aggiungere CO_2 ai serbatoi per evitare ossidazioni.		**Precauzioni:** evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** senza ossigeno.	**Precauzioni:** realizzare una adeguata reidratazione della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente dell'acidità volatile.
Scelte raccomandate per la macerazione prefermentativa. Enzima: LALLZYME® CUVÉE BLANC (2 g/q).	Scelte raccomandate per l'illimpidimento dei mosti. Enzima: condizioni facili LALLZYME® HC (2 g/q), condizioni difficili LALLZYME® C-MAX (1-2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® QA23, CROSS EVOLUTION®, LALVIN® CY3079, LALVIN ICV D47™ Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E BLANC. Altri: OPTI-WHITE®.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: UVAFERM® ALPHA. Attivanti: ACTI-ML®. Altri: WHITESTYLE.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino bianco varietale

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO BIANCO VARIETALE

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare aromi, zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. (Grado potenziale < 12% e pH < 3,4). Se possibile, vendemmiare di notte per assicurare basse temperature dell'uva all'arrivo in cantina. Trasporto di uve integre, in caso contrario aggiungere metabisolfito alle dosi adeguate. Uve provenienti da vigneti con rese inferiori a 4 tonnellate per ettaro.	Raffreddare il pigiato per 24-48 ore a 12-15 ºC, realizzando un rimontaggio giornaliero. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 180 mg/L. Solfitare il raccolto in funzione del suo stato sanitario e del suo pH (tra 3 e 6 g/al). Se necessario, correggere l'acidità con addizione di acido tartarico fino a pH 3,4. Aggiungere enzima di macerazione per l'estrazione di aromi e chiarifica. Realizzare la sfecciatura a 15 ºC fino a raggiungere una torbidità di 60-100 NTU. Recuperare le fecce fini dell'interfaccia.	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Sempre che sia possibile, correggere con nutrienti complessi. Se ci sono più di 160 mg/L aspettare a correggere fino a una densità di 1060. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: LALVIN ICV D47™, LALVIN ICV D21™, LALVIN® QA23, UVAFERM® WAM.	Mantenere la temperatura di fermentazione tra 18-20 ºC evitando temperature più alte, in particolare nella fase tumultuosa. Addizione di nutriente complesso fino a raggiungere la concentrazione richiesta di APA (in funzione del grado alcolico e del lievito) a densità 1060 se non è stata realizzata all'inizio. Alla fine della fermentazione alcolica addizionare 2-4 g/hL di acido ascorbico. Recuperare le fecce fini di lievito per addizionarle di nuovo nell'affinamento e nella fermentazione malolattica.	Ritardare l'inizio della fermentazione malolattica fino al completamento della fermentazione alcolica. Nel caso di basse acidità evitarla completamente solfitando in funzione del pH. Abbassare la temperatura a 16-18 ºC. Colmare il serbatoio. Inoculare con LALVIN 31® o UVAFERM® ALPHA.	Mantenere la temperatura tra 16-18 ºC. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML.	Dopo la FML, travasare con aerazione e aggiungere da 4 a 5 g/hL di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L fino all'imbottigliamento.
	Precauzioni: aggiungere acido ascorbico a 3-5 g/hL dopo la solforosa.	**Precauzioni:** evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** analizzare gli zuccheri residui, tenere sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente dell'acidità volatile.
	Scelte raccomandate per la macerazione prefermentativa. Enzima: LALLZYME® CUVÉE BLANC (2 g/q). Scelte raccomandate per l'illimpidimento dei mosti. Enzima: condizioni facili LALLZYME® HC (2 g/q), condizioni difficili LALLZYME® C-MAX (1-2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D47™, LALVIN ICV D21™, LALVIN® QA23, UVAFERM® WAM. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E BLANC. Altri: OPTI-WHITE®.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31® o UVAFERM® ALPHA Attivanti: ACTI-ML®		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso Ultra Premium ottenuto da doppia fermentazione

Fonte:
Protocollo redatto da Andrea Dal Cin, membro del gruppo tecnico di MASI AGRICOLA(Valpolicella, Verona).

1) VINIFICAZIONE DI UVE FRESCHE

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO ULTRA PREMIUM OTTENUTO DA DOPPIA FERMENTAZIONE

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Uva sana e matura (zuccheri: 210-220 g/L).	Addizionare 50 ppm di SO_2. Addizionare 3 g/hL di enzimi per la macerazione.	Fermentare con LALVIN ICV D80™, LALVIN ICV D21™, LALVIN® QD145, LALVIN ICV GRE™. Dosaggio dei lieviti: 30 g/hL. Reidratare i lieviti con GO-FERM PROTECT® (30 g/hL).	Temperatura di fermentazione: 25 ºC. Addizionare 50 g/hL di FERMAID® E ad 1/3 dall'esaurimento degli zuccheri. Effettuare délestage quando inizia la FA, nei giorni seguenti effettuare délestage e rimontaggio con aggiunta di ossigeno (4 délestage totali e 6 rimontaggi). Dopo 10-12 giorni di fermentazione svinare.	Fermentare con LALVIN 31®, LALVIN VP 41®.	Mantenere la temperatura superiore a 15 ºC.	Se la fermentazione malolattica è per qualche motivo indesiderata non addizionare SO_2 ma 30-40 g/hL di Lisozima (per il controllo dei batteri malolattici).
Precauzioni: controlli analitici dei mosti: zuccheri, pH, acidità totale ed acido malico.			**Precauzioni:** controlli analitici giornalieri della FA: zuccheri, acido acetico.		**Precauzioni:** controlli analitici giornalieri dell'evoluzione della fermentazione malolattica.	
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D80™, LALVIN ICV D21™, LALVIN® QD145, LALVIN ICV GRE™. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31®, LALVIN VP 41®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso Ultra Premium ottenuto da doppia fermentazione

Fonte:
Protocollo redatto da Andrea Dal Cin, membro del gruppo tecnico di MASI AGRICOLA(Valpolicella, Verona).

2) SECONDA FERMENTAZIONE DI VINO ADDIZIONATO DI MOSTO DI UVE PASSITE

VINO ROSSO ULTRA PREMIUM OTTENUTO DA DOPPIA FERMENTAZIONE

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Uve passite: 250-260 g/L di zuccheri. Pigiadiraspatura dell'uva (Non è importante la rimozione completa dei raspi).	Addizionare il 40% di uva pressata al vino ottenuto al punto 1 (vedi protocollo precedente). Il mosto ottenuto dovrà essere al 9% di alcol e 70 g/L di zuccheri.	Fermentare con LALVIN® EC-1118, LALVIN® L 2226, UVAFERM® 43, UVAFERM® VRB. Dosaggio dei lieviti: 30 g/hL. Reidratare i lieviti con GO-FERM PROTECT® (30 g/hL). La temperature delle uve passite è circa 5 ºC, quindi i lieviti necessitano uno specifico protocollo di acclimatazione. Esempio per 100 hl: • Addizionare 60 litri di lieviti reidratati a 180 litri (50% di vino, 50% di acqua più 100 g di FERMAID® E) termostatando a 20 ºC (volume totale: 240 litri). • Quando la FA inizia, (12-24 ore) addizionare i precedenti 240 litri ai 240 litri di vino a temperatura di 15°C e addizionare 100 g/hL di FERMAID® E (volume totale: 480 litri). • Quando la FA è iniziata addizionare i 480 litri ai 95 hl di vino termostatato a 12-15 ºC.	Addizionare 30 g/hL di FERMAID® E e O_2. Controlli analitici giornalieri della FA (Tº, consumo degli zuccheri, acido acetico). Svinare dopo 20 giorni di fermentazione. Se la FA non è terminata termostatare a 15-16ºC.	Fermentare con LALVIN VP 41®.	Mantenere la temperatura superiore a 15 ºC.	Se la temperatura è troppo bassa e non si dispone di un sistema per la termostatazione a temperatura superiore a 15ºC addizionare lisozima ed effettuare la FML in primavera.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® EC-1118, LALVIN® L 2226, UVAFERM® 43, UVAFERM® VRB. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino bianco giovane e fruttato

Fonte:
Protocollo redatto da Goffredo Agostini, enologo consulente del Gruppo Matura. Già enologo presso le Cantine Tollo, uno dei più importanti produttori del centro Italia.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO BIANCO GIOVANE E FRUTTATO

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo della maturità delle uve. Evitare la rottura degli acini. Addizionare 2-3 g/q di acido ascorbico e 50-60 ppm di SO_2. Pigiadiraspatura soffice tale da evitare la lacerazione delle bucce. Pressatura soffice (<1 Bar).	Separare il mosto delle ultime frazioni di pressatura. Addizionare 2-3 g/hL di enzimi pectolitici. Refrigerare a 10-12ºC. Durante la decantazione del mosto illimpidito reintrodurre il 5% di fecce fini.	Fermentare con LALVIN® BA11, LALVIN® QA23, LALVIN® EC-1118. Dosaggio dei lieviti: 20-25 g/hL. Reidratare i lieviti con GO-FERM PROTECT® (40 g/hL). Addizionare 30 g/hL di FERMAID® E.	Temperatura di fermentazione tra 16-18ºC. Addizionare 20 g/hL di FERMAID® E a 1/3 della FA. Alla fine della FA la temperatura deve essere tra 18 e 19 ºC.	Alla fine della FA dopo il travaso e la separazione delle fecce inoculare i batteri malolattici. Fermentare con LALVIN VP 41®, LALVIN 31®.	Mantenere la temperatura tra 18 e 20 ºC.	Alla fine della fermentazione malolattica addizionare 50 ppm di SO_2. Filtrazione del vino. Mantenere la SO_2 libera a 15-25 ppm e la temperatura a 18 ºC.
Precauzioni: impostazione della durata del ciclo di pressatura.	**Precauzioni:** la refrigerazione a temperature più basse genera problemi di acclimatazione dei lieviti.	**Precauzioni:** se il ΔT tra mosto e lieviti reidratati è maggiore di 10ºC è necessario effettuare un passaggio aggiuntivo di acclimatazione.	**Precauzioni:** controlli analitici giornalieri della FA.	**Precauzioni:** controlli analitici giornalieri della fermentazione malolattica.		
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® BA11, LALVIN® QA23, LALVIN® EC-1118. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41®, LALVIN 31®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso giovane e fresco

Fonte:
Protocollo redatto da Goffredo Agostini, enologo consulente del Gruppo Matura. Già enologo presso le Cantine Tollo, uno dei più importanti produttori del centro Italia.

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO GIOVANE E FRESCO

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo della maturità Evitare la rottura degli acini durante il trasporto Addizionare 2-3 g/q di acido ascorbico Pigiadiraspatura soffice tale da evitare la lacerazione delle bucce	Addizionare 50-60 ppm di SO_2 Addizionare 2-3 g/hL di enzimi per la macerazione	Fermentare con LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D80™ Dosaggio dei lieviti: 20-25 g/hL Reidratare i lieviti con GO-FERM PROTECT® (30 g/hL) Addizionare 30 g/hL di FERMAID® E (omogeneizzare la massa)	Temperatura di fermentazione tra 22-24 ºC Addizionare 20 g/hL di FERMAID® E a 1/3 della FA Impostare un programma di rimontaggio tenendo in considerazione la massa del vino ed il sistema di irrorazione del cappello	Inoculo di batteri malolattici dopo 18 ore dall'inoculo dei lieviti Fermentati con LALVIN VP 41®, LALVIN 31®, LALVIN® ELIOS 1	Decantare e separare le fecce	Alla fine della fermentazione malolattica addizionare 50 ppm di SO_2 Filtrazione del vino Mantenere la SO_2 libera a 15-25 ppm e la temperatura a 15 ºC
Precauzioni: evitare crescite microbiologiche prima dell'inoculo dei lieviti			**Precauzioni:** controlli analitici giornalieri della FA Controlli analitici giornalieri della fermentazione malolattica durante la FA			
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D80™ Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41®, LALVIN 31®, LALVIN® ELIOS 1		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Ultra Premium Chardonnay

Fonte:
Protocollo redatto da Stefano Valla, enologo alle cantine Donnafugata (Sicilia).

selezionati dalla natura
LALLEMAND

ULTRA PREMIUM CHARDONNAY

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controlli analitici e degustazione delle uve relativamente alla maturazione aromatica ed all'evoluzione dell'acidità. Raccolta notturna delle uve. Diraspatura e pigiatura soffice. Addizionare 30 ppm SO_2 ed enzimi per la macerazione. Pressatura soffice.	Addizionare 20 ppm di SO_2. Refrigerare a 2-3 ºC per la chiarifica del mosto.	Fermentare con LALVIN® BA11 o LALVIN® EC-1118. Dosaggio dei lieviti: 40 g/hL. Reidratare i lieviti con GO-FERM PROTECT® (30 g/hL).	Temperatura di fermentazione nell'intervallo 14-16 ºC. Addizionare FERMAID® E e O_2 ad 1/3 e 1/2 dell'esaurimento degli zuccheri. Degustazione e controlli analitici del succo 2 volte al giorno.	Termostatare il vino a 18 ºC. Fermentare con LALVIN VP 41®. Usare il nutriente per batteri malolattici ACTI-ML®	Agitare e risospendere le fecce 1 volta a settimana (bâtonnage).	Addizionare 40 ppm SO_2 alla fine della fermentazione malolattica. Addizionare enzimi ad attività betaglucanasica (idrolisi dei ß-glucani parietali). Agitare le fecce 2 volte a settimana per i primi 2 mesi , proseguire 1 volta a settimana per ulteriori 2 mesi. Micro-ossigenazione. Mantenere la SO_2 libera a 15-25 ppm e termostatare a 15 ºC.
Precauzioni: pratiche di buona igiene. Saturazione con CO_2 per evitare contatti con O_2.			**Precauzioni:** controllo microbiologico della FA. Alla fine della FA settare la temperatura tra 18 e 20 ºC.		**Precauzioni:** degustazione e controlli analitici giornalieri dell'evoluzione della fermentazione malolattica.	
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® BA11, LALVIN® EC-1118. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41®. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Rosso stile Bordeaux

Cabernet sauvignon, Merlot, Cabernet franc, Petit verdot e Carmenère coltivati nell'azienda di Rutherford

Fonte:
Consulenza fornita da Aaron Pott, Quintessa.
Aaron ha il titolo d'enologo ottenuto all'UCD e un "Masters degree" in Viticoltura conseguito all'Università di Borgogna a Dijon. Ha cominciato la sua carriera nella Napa Valley e ha lavorato per 5 anni in Francia. Ha lavorato come consulente per Beringer Vineyards nel periodo 1999-2003 principalmente per i progetti esteri. Dal 2004 è enologo a Quintessa.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

ROSSO STILE BORDEAUX

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Parametri di vendemmia: 24-29° Brix; 3,4-3,9 pH; 4-8 g/L AT. Nessuna correzione al mosto o al vino. Vendemmia manuale al mattino presto. Selezione dei grappoli alla diraspatrice.	Addizionare 40-80 mg/L SO_2 al pigiato. Macerazione prefermentativa a freddo 10 °C per 2-10 giorni.	Addizionare LALVIN ICV D254™ adeguatamente reidratato. Addizionare 25 g/hL di FERMAID® E all'inizio della fermentazione. Addizionare il fosfato diammonico necessario per correggere l'azoto. Addizionare 30 g/hL di OPTI-RED®. Una volta consumati circa un quarto degli zuccheri, aggiungere una quantità supplementare di FERMAID® E di 25 g/hL.	Effettuare rimontaggi e délestage (svuotamento e riempimento) – frequenza in funzione della varietà dell'uva. Iniziare la fermentazione a 32 ºC e aumentare fino a 35 ºC. Effettuare macerazioni lunghe per 3-8 settimane in funzione della varietà. Dopo la macerazione post-fermentativa, estrarre le vinacce, sgrondo e pressato direttamente alle barrique.	Inoculare le barrique con LALVIN® ELIOS 1.	Agitare le fecce una volta per settimana. FML completa a metà-fine dicembre.	Travasare in serbatoi, pulire barrique, correggere SO_2 e riempire di nuovo le barrique con il vino. Travasare ogni 3-4 mesi. Tutte le chiarifiche si realizzano per sedimentazione in barrique o dopo il taglio in serbatoio. Nessuna filtrazione o chiarifica prima dell'imbottigliamento.
		Precauzioni: evitare shock termico ai lieviti!				
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™ Attivanti: FERMAID® E fosfato diammonico (se necessario). Altri: OPTI-RED®				

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Cabernet Sauvignon Premium e Super Premium

Fonte:
Consulenza fornita da Carl Schultz, Hartenberg Estate, Stellenbosch, Sudafrica

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

CABERNET SAUVIGNON PREMIUM E SUPER PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Nella diraspatura e pigiatura impostare la distanza tra i rulli e la velocità dei battitori in funzione della varietà d'uva. Realizzare addizioni precoci di acido tartarico se richieste. I calcoli vanno fatti in funzione delle ultime analisi. Addizionare da 40 a 50 mg/L di SO_2 al pigiato.	Macerazione a freddo per 3-5 giorni. Addizionare Opti-Red a 30 g/hL contemporaneamente all'inoculo del lievito.	Dose d'inoculo del lievito superiore a 40-45 g/hL se si lavora con uve molto mature (>25-26 oB). Utilizzare LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D21™ e LALVIN® BM45 per tutte le fermentazioni di Cabernet sauvignon. Assemblare i vini dopo la fermentazione.	Rimontaggi regolari durante la fermentazione. Realizzare estrazioni in base allo spessore delle bucce ed alla durezza delle uve. Anche délestage. Addizionare nutrienti supplementari se necessario. Inoculo della FML una volta completata la fermentazione alcolica Temperature di fermentazione 24-25 °C. Nel caso di zuccheri elevati, le temperature di fermentazione saranno più basse. Realizzare macerazioni post-fermentative lunghe. La durata della macerazione sarà funzione dello stile specifico e delle degustazioni regolari del vino.	ACTI-ML® 20 g/hL se necessario. Portare e mantenere la temperatura a +/-21-22 °C. Agitare regolarmente ma delicatamente le fecce. Inoculare i batteri in serbatoio, e successivamente trasferire in barrique.	Agitare regolarmente ma delicatamente le fecce. Innalzare e mantenere la temperatura.	Appena completata la FML, addizionare le quantità richieste di SO_2. Addizionare 5 g/hL di enzima LALLZYME® MMX (nelle fecce) se si richiede una maggiore pienezza.
Precauzioni: le uve non devono essere avvizzite. Le bacche devono essere molto turgide.		**Precauzioni:** assicurare un buon inoculo del lievito per essere certi della buona riuscita della fermentazione alcolica, particolarmente nel caso di uve molto mature.	**Precauzioni:** selezionare il ceppo di lievito adeguato allo specifico stile di vino ed accertare la sua tolleranza ad elevati livelli di alcol.		**Precauzioni:** realizzare analisi regolarmente per osservare l'andamento della FML.	
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D21™ e LALVIN® BM45. Attivanti: FERMAID® E e azoto ammoniacale in soluzione. Altri: OPTI-RED®.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: UVAFERM® ALPHA o LALVIN VP 41®, specialmente con gradi alcolici al di sopra del 15%. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Chardonnay prodotto in regioni fredde

Vino "Riserva del Proprietario", note fruttate leggere e delicate, senza gusto burrato

Fonte:
Consulenza fornita da Mark Johnson, Chateau Chantal in Michigan.
Mark si è laureato all'Università Tecnica e Centro di Ricerca di Geisenheim, Germania. Una volta completati gli studi nel 1978, ha realizzato un periodo di apprendistato di 2 anni nella cantina tedesca Palatinate. Dal 1983 fino al 1993 è stato l'enologo del Chateau Grand Traverse in Michigan. Dal 1994 è enologo e partner del Chateau Chantal e, dall'inizio del 2005, di una cantina dello stesso gruppo in Argentina.

Fare attenzione a:
1. shock termico del lievito!
2. Temperature fredde di cantina durante la FML

selezionati dalla natura
LALLEMAND

CHARDONNAY PRODOTTO IN REGIONI FREDDE

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
"Riserva del Proprietario" dai vigneti più vecchi (1986) e in anni di qualità eccellente. Resa limitata, da 10 ton/ha a 4,5 t/ha. Parametri di vendemmia: 24,5°Brix; 3,3-3,4 pH; 8 g/L AT. Vendemmia normalmente all'inizio di novembre.	Diraspatura e pigiatura. Aggiunta di enzimi di chiarifica. Aggiunta di 30 mg/L di SO_2. Il pressato del serbatoio direttamente alle barrique Senza sfecciatura. Temperatura del mosto 5-7 ºC.	Fermentare l'80% del mosto con LALVIN® CY3079, adeguatamente reidratato. Fermentare il rimanente 20% con LALVIN® EC-1118 o LALVIN® BA11, adeguatamente reidratato.	2-3 giorni dopo l'inoculo del lievito, addizionare 25 g/hL di FERMAID® E. 100% fermentato in barrique nuove di rovere francese. Temperature di fermentazione in barrique a circa 13-18°C. La FA normalmente si completa in 8-9 giorni.	Aggiunta di LALVIN 31® alle barrique.	Aumentare la temperatura della cantina per assicurare il completamento della FML a metà o alla fine di dicembre. Verificare la conclusione della FML mediante cromatografia su carta.	Una volta conclusa la FML, travasare e portare a 0,8 la SO_2 molecolare. Riempire di nuovo le barrique pulite. Travasare a febbraio. Affinamento in barrique per 7-8 mesi. Creare il taglio "Riserva del proprietario" e portare la SO_2 molecolare a 0,8. Filtrazione a cartoni e sterile prima dell'imbottigliamento.
Precauzioni: produzione limitata!		**Precauzioni:** acclimatare i lieviti alla temperatura fredda del mosto prima dell'inoculo!		**Precauzioni:** addizionare i batteri solo quando la FA si è conclusa!		
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® CY3079 (80% del mosto) LALVIN® EC-1118 (circa 20% del mosto) o LALVIN® BA11. Attivanti: FERMAID® E. Altri: enzimi di chiarifica.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Merlot Ultra Premium

FML in barrique con agitazione della biomassa di lievito

Fonte:
Consulenza fornita da Dominique Delteil. Dominique è stato direttore scientifico dell'ICV ed ha operato come consulente enologico in oltre 10 paesi negli ultimi 10 anni.

Fare attenzione a:
1. Prevenire la formazione di caratteri ossidati e di odori e aromi solforati.
2. Prevenire la crescita di microrganismi indesiderati.
3. Prevenire la comparsa di amaro e di secchezza in bocca dovuti al rovere o all'alcol.

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

MERLOT ULTRA PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Raccogliere le uve quando la maturità della polpa e polifenolica è ottimale. Alcol potenziale dovrebbe essere tra 13 e 15%. Aggiungere 30 mg/L di SO_2 appena prima di diraspare. Diraspare e pigiare delicatamente gli acini.	Utilizzare enzimi di macerazione. Aggiunta di acido tartarico per ottenere un pH di 3,5-3,6.	Fermentare con: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D80™ o LALVIN ICV D21™. Aggiunta di acido tartarico per ottenere un pH di 3,5-3,6. Dose di lievito: 25 g/hL se l'alcol potenziale è inferiore a 13.5%; 30 g/hL se superiore. Reidratare i lieviti con GO-FERM®.	Aggiunta di FERMAID® E all'inoculo. Nota: l'aggiunta di fosfato diammonico è sconsigliata. Ulteriore aggiunta di FERMAID® E a un terzo del consumo degli zuccheri. Seguire le buone pratiche di fermentazione, in particolare con mosti ad elevato grado potenziale: aerazione, controllo della temperatura e una buona gestione del cappello. Macerazione oltre 21 giorni. Se necessario - Aggiungere BOOSTER ROUGE® in base alla degustazione. Eliminare le fecce pesanti al termine della macerazione. Sgrondare in un serbatoio, sedimentare 24 ore, trasferire in barrique eliminando le fecce pesanti.	Portare la temperatura del vino a 18 °C. Reidratare LALVIN® ELIOS 1 come indicato. Usare attivante per FML ACTI-ML® seguendo le istruzioni. Inoculare con LALVIN® ELIOS 1 reidratato direttamente in barrique.	Idealmente mantenere la temperatura del vino a 18 °C (+/- 1 °C). Agitare le fecce settimanalmente.	Non appena la FML è terminata, addizionare SO_2 e acido tartarico. Obiettivo un pH tra 3,6 e 3,7; aggiungere 15-25 mg/L di SO_2 per raggiungere un minimo di 0,5-0,7 mg/L di SO_2 molecolare. Agitare giornalmente le fecce per 2 o 3 giorni, poi pompare vino e fecce in un serbatoio. Riportare la SO_2 libera a 15-25 mg/L (obiettivo 0,5-0,7 mg/L di SO_2 molecolare). Regolare la temperatura del vino a 15 °C e lasciare in vasca per 24 ore Travasare eliminando le fecce pesanti e ritornare in barrique. Agitare le fecce una volta a settimana il primo mese, poi due volte al mese per 2-4 mesi. Colmature periodiche per controllare lo spazio di testa. Al termine dell'affinamento, assemblare, regolare la SO_2 e lasciar riposare il vino 15 giorni prima dell'imbottigliamento.
	Precauzioni: buone pratiche d'igiene!		**Precauzioni:** monitorare i microrganismi indesiderati.		**Precauzioni:** analisi di routine per i microrganismi indesiderati, deviazioni aromatiche e gustative.	**Precauzioni:** monitorare deviazioni aromatiche e gustative dovute a composti solforati. Intraprendere azioni correttive se necessario.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™. Attivanti: GO-FERM®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN® ELIOS 1. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso ad elevata gradazione alcolica

Fonte:
Consulenza fornita da Miro Tcholakov, Trentadue Winery.
Miro è enologo alla cantina Trentadue Winery nell'Alexander Valley e consulente negli Stati Uniti e nel suo paese natale, la Bulgaria. Possiede inoltre una propria etichetta di vini rossi ultra premium. Miro ha un'esperienza di più di 15 anni in Sonoma County, California ed è specialista di Zinfandel e Petite Syrah.

Fare attenzione a:
1. Alcol potenziale
2. Contaminazione da *Brettanomyces*

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO AD ELEVATA GRADAZIONE ALCOLICA

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Parametri di maturazione dell'uva: maturazione omogenea all'interno del grappolo, valutazione sensoriale, colore. Vendemmiare di notte quando le temperature sono più fredde Valutare all'arrivo l'integrità delle uve. In funzione dello stato addizionare fino a 40 mg/L di SO_2. Se la carica batterica è alta, prendere in considerazione l'uso di lisozima.	Macerazione prefermentativa a freddo a circa 13 ºC per 3-4 giorni. Dopo la macerazione a freddo determinare di nuovo l'alcol potenziale per selezionare il ceppo di lievito. Analizzare l'APA (Azoto Prontamente Assimilabile); obiettivo: 350-400 mg/L di azoto. Addizionare enzimi di macerazione e tannini per l'estrazione e la stabilizzazione del colore.	Correggere APA con nutrienti di lievito complessi e fosfato diammonico; addizionare metà al momento di inoculo, metà prima dei 12 °Brix o in seguito alla formazione di H_2S. Addizionare 25 g/hL di LALVIN® L 2056 o di LALVIN ICV D254™ adeguatamente reidratati. Mantenere attiva una cultura starter di UVAFERM® 43.	Impostare il controllo della temperatura di fermentazione a 25-26 °C. Effettuare rimontaggi con aerazione due volte al giorno (1/3 del volume di fermentazione) fino alla fine della FA. Ritardare la FML fino al completamento della FA. Quando l'alcol raggiunga circa 14%, inoculare lo starter di Uvaferm 43 (fino al 5% in volume) per assicurare il completamento della fermentazione. Sgrondatura/pressatura fino ad esaurimento delle vinacce. Dopo la pressatura, controllare gli zuccheri residui. Se non sono andati a secco, continuare la fermentazione. Utilizzare scorze di lievito in caso di rallentamenti.	Abbassare la temperatura a 20-21 °C. È preferibile la fermentazione in serbatoio per controllare la temperatura. Inoculare UVAFERM® ALPHA.	Mantenere la temperatura a circa 20-21 °C. Omogeneizzare la massa una volta al giorno.	Dopo la FML, travasare con aerazione e addizionare 40-50 mg/L SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Dopo l'eliminazione delle fecce, travasare in barrique e portare la SO_2 libera a 25-30 mg/L in funzione del pH.
		Precauzioni: evitare shock termico!	**Precauzioni:** tenere sotto controllo l'alcol potenziale, controllare la temperatura, prestare attenzione alla produzione di H_2S.	**Precauzioni:** effettuare una reidratazione adeguata delle colture liofilizzate.	**Precauzioni:** evitare l'esposizione all'aria.	**Precauzioni:** controllare periodicamente AV.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lievito iniziale: LALVIN® L 2056 o LALVIN ICV D254™. Lievito per completare la FA: UVAFERM® 43. Attivanti: GO-FERM®, FERMAID® E, fosfato diammonico (in base alla necessità). Altri: enzimi di macerazione, tannini enologici.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: UVAFERM® ALPHA. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Premium Syrah

Prezzo al dettaglio $10-15, fruttato intenso, rotondo in bocca, senza un tannino eccessivo

Fonte: Consulenza fornita da David Sorokowsky, R.H. Phillips Vineyard. David si è laureato, in Biochimica all'Università di Toronto, in Enologia e in Viticoltura alla Brock University. Fino al 2001, prima di ritornare al suo nativo Quebec, David ha lavorato in Hillebrand Estates e Lakeview Cellars in Ontario, Canada. David è ricercatore enologico e viticolo presso R.H. Phillips Vineyard nella regione californiana di Dunningan Hills. La R.H. Phillips Vineyard ha un vasto programma R&D e cerca di combinare il meglio della tecnologia analitica con le capacità umane per raggiungere il massimo potenziale nei suoi vini.

Fare attenzione a:
1 Arresti di fermentazione dovuti a gradi alcolici elevati
2 Produzione di H_2S
3 Estrazione eccessiva di tannini

selezionati dalla natura
LALLEMAND

PREMIUM SYRAH

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Parametri di vendemmia: basati sull'aroma e sapore – obiettivo uva ben matura, con note di marmellata, normalmente a circa 27 °Brix quando le uve cominciano ad appassire. Pigiare e diraspare. Addizionare 50 mg/L di SO_2 e 2 g/L di acido tartarico al pigiato.	Macerazione prefermentativa a freddo di 24 ore minimo a 13 °C. Se l'uva ha tannini aspri o astringenti allungare la macerazione a freddo fino a 72 ore. Addizionare enzima di macerazione in funzione della maturità dell'uva, la storia del vigneto e il contenuto di tannini.	Correggere pH e AT con acido tartarico se necessario. Addizionare 25 g/hL di nutriente complesso, 25 g/hL di fosfato diammonico e micronutrienti. Inoculare 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato. La scelta del lievito è determinata dall'obiettivo sensoriale, dalla tolleranza all'alcol, dalle cinetiche di fermentazione. Circa il 50% fermentato con LALVIN ICV D254™ ('gran lavoratore', espressione fruttata, tolleranza all'alcol, sapore). Il resto fermentato con una combinazione di LALVIN ICV D80™ (frutta intensa), LALVIN ICV D21™ (ricchezza), e LALVIN® L 2056 o LALVIN ICV GRE™ (vini morbidi con frutta intensa)	Fare attenzione all'H_2S e alle fermentazioni stentate. Addizionare nutrienti supplementari se necessario. Incrementare i rimontaggi con aerazione in caso di rallentamenti o di cattivi odori Cominciare la fermentazione a 18 °C e alzare la temperatura a 24 °C. Fermentare alcuni lotti a 27 °C per incrementare l'estrazione dei composti fenolici. Rimontare utilizzando un sistema Venturi per addizionare O_2 due volte al giorno, serbatoio pieno. Addizionare 25 g/hL di nutriente complesso e 25 g/hL di fosfato diammonico a circa 20 °Brix. Analizzare giornalmente i polifenoli. Ridurre i rimontaggi a uno al giorno se l'estrazione è elevata. Pressare basandosi sulla degustazione e sul livello di polifenoli ricercato, no zuccheri residui. Mantenere sgrondo e le frazioni di pressatura in serbatoi separati.	Una volta completata la fermentazione alcolica, inoculare i batteri malolattici in serbatoi inox. Addizionare nutriente per BML. Temperatura massima d'inoculo 23 °C.	Se il serbatoio si raffredda troppo, riscaldare a 21 °C. Analizzare l'acido malico tutti i giorni. I vini spesso si travasano nelle barrique per finire la FML nel momento in cui il malico comincia a diminuire. Ritardare le addizioni di SO_2 se si osserva presenza di diacetile, per permettere che sia ri-metabolizzato. Separare dalle fecce una volta completata la FML.	Travasare i vini prima di introdurli nelle barrique. Mantenere una SO_2 libera di circa 30 mg/L. Effettuare aggiunte e colmature mensilmente. Travasare i serbatoi ogni tre mesi. Chiarificare con gelatina se necessario. Affinare in barrique per circa 18 mesi. Filtrazione tangenziale e sterile prima dell'imbottigliamento.
		Precauzioni: effettuare una reidratazione corretta del lievito.	**Precauzioni:** per diminuire la formazione di H_2S, mantenere bassa la temperatura di fermentazione (~24 °C) e arieggiare durante i rimontaggi (specialmente durante la fase di crescita del lievito).	**Precauzioni:** aspettare il completamento della FA prima di inoculare la FML.	**Precauzioni:** controllare periodicamente la temperatura. Le temperature fredde rappresentano un problema a stagione avanzata.	**Precauzioni:** controllare periodicamente AV e solforosa prima dei travasi.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D80™, LALVIN ICV D21™, LALVIN ICV GRE™ e LALVIN® L 2056. Attivanti: FERMAID® E, fosfato diammonico. Altri: enzimi di macerazione (in funzione dell'uva).		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31®, LALVIN VP 41®. Attivanti: nutriente per batteri malolattici.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rossi subito pronto per il mercato

Fonte:
Consulenza fornita da Tom Westberg, Echelon Vineyards. Prima di arrivare a Echelon a metà del 2001, Tom è stato l'enologo di Peachy Canyon Winery in Paso Robles, California. La sua vasta esperienza con le uve e con i viticoltori della Central Coast rappresenta un importante vantaggio per Echelon, conosciuto per la sua ricerca di uva eccezionale dalle zone emergenti. Echelon crea vini rossi pronti da bere appena immessi sul mercato, frequentemente insigniti di riconoscimenti.

Fare attenzione a:
1 Igiene della cantina
2 Eccesso di composti a base di zolfo in vigneto
3 Ossidazione

selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSI SUBITO PRONTO PER IL MERCATO

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Assaggiare le uve da vendemmiare (circa 24-26 °Brix). Diraspatura. Addizionare 40 mg/L di SO_2 al pigiato. Trattenere un 35-40% di uve intere Alcol potenziale di 13-14%.	Addizionare tannini al pigiato. Portare l'acidità a 6-7 g/L ed il pH a 3,5. Macerazione a freddo per 36 ore a 16 °C. Rimontare 2-3 volte al giorno con aerazione.	Addizionare 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato durante il primo rimontaggio. Addizionare tutti i nutrienti contemporaneamente al lievito. La scelta del lievito è in funzione dello stile di vino così come della tolleranza alla temperatura e all'alcol.	Fermentare a 27 °C (temperatura massima sotto il cappello 29-30 °C). Pressatura a 0 °Brix, senza frazioni di pressa. Macerazioni lunghe per i vini che hanno bisogno di una maggiore estrazione di colore. Sfecciatura e travaso per separare le fecce.	Inoculare con LALVIN 31® o LALVIN VP 41® in serbatoi con doghe. Utilizzare nutrienti per BML solo se la FML è lenta.	Mantenere il vino a 18°C ed a pH 3,45-3,55. Due volte la settimana controllare temperatura, AT e degustazione. Agitare i serbatoi ogni 10 giorni.	Tutti i vini sono imbottigliati entro 6 –12 mesi. Una volta completata la FML, travasare dalle fecce e introdurre i vini in barrique o in serbatoi con doghe. Addizionare 50 mg/L di SO_2 e mantenere una SO_2 libera di 30 mg/L. Effettuare le colmature delle barrique ogni 6-8 settimane. Agitare i serbatoi una volta il mese. Prima dell'imbottigliamento effettuare una filtrazione a farina/cartoni o tangenziale.
			Precauzioni: controllare con attenzione le temperature.		**Precauzioni:** controllare AV una volta alla settimana.	
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D80™, LALVIN ICV D21™, LALVIN ICV GRE™. Attivanti: FERMAID® E, fosfato diammonico, scorze di lievito. Altri: enzima di macerazione, tannino enologico, derivati di rovere.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31® o LALVIN VP 41®. Attivanti: non usare salvo che la FML sia lenta.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vini rossi con macerazione prefermentativa a freddo

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINI ROSSI CON MACERAZIONE PREFERMENTATIVA A FREDDO

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zucchero, acidità e pH potenziali per correzioni successive. (Grado potenziale > 14,5%). Se possibile, vendemmiare di notte per assicurare basse temperature all'arrivo dell'uva in cantina e così facilitare il raffreddamento in camera o mediante l'uso di neve carbonica. Trasporto delle uve integre, in caso contrario aggiungere metabisolfito alle dosi adeguate e non realizzare macerazione prefermentativa. Inoculare un lievito adeguato e reidratato a 10 g/100 kg d'uva per evitare contaminazioni di non-Saccharomyces prima del raffreddamento dell'uva.	Raffreddare l'uva a 10-15 ºC mediante l'uso di camera fredda o mediante neve carbonica a 6 g/kg di uva/ºC di temperatura da abbassare. Mantenere l'uva fredda per 2-4 giorni secondo la temperatura raggiunta. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: Superiore a 250 mg/L. Se necessario correggere acidità con addizione di acido tartarico fino a pH 3,6. Aggiungere enzima di macerazione per l'estrazione di tannino e colore in fase acquosa. Solfitare il raccolto in funzione del suo stato sanitario e del suo pH (tra 5 e 6 g/hL).	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Sempre che sia possibile, correggere con nutrienti complessi (che contengono tiamina). Aggiungere in questa fase la metà della dose. Aggiungere 30 g/hL di lievito adeguatamente reidratato in presenza di protettore di lieviti: LALVIN® 2056, LALVIN® QA23. L'inoculo deve essere realizzato quando la temperatura si alza al di sopra dei 15ºC. Tenere pronto un lievito bayanus (fruttofilo se possibile) da inoculare nel caso di arresto previa acclimatazione all'alcol. UVAFERM® 43, LALVIN® EC-1118.	Controllare la temperatura di fermentazione per farla cominciare tra 16-18 ºC, evitando salti bruschi di temperatura. La temperatura non deve superare nel corso di tutta la fermentazione i 28 ºC. Addizione di nutriente complesso fino a raggiungere la concentrazione richiesta di APA in funzione del grado alcolico e del lievito utilizzato. Realizzare una o due aggiunte di ossigeno in concomitanza con l'apporto di azoto fino ad un totale di 10 mg/L. Nel caso di fermentazioni rallentate, utilizzare prodotto a base di levito inattivo ad azione detossificante e lisozima nel caso di popolazioni crescenti di batteri.	Ritardare l'inizio della fermentazione malolattica fino al termine della fermentazione alcolica. Abbassare la temperatura a 20-22ºC. Colmare la vasca. Inoculare con LALVIN® ELIOS 1.	Mantenere la temperatura tra 20-22 ºC. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML.	Dopo la FML, travasare con aerazione e aggiungere da 4 a 5 g/hL di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L durante tutto il tempo di permanenza in cantina.
		Precauzioni: evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare, specialmente in questo tipo di vinificazione.	**Precauzioni:** analizzare gli zuccheri residui, tener sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente dell'acidità volatile.
	Scelte raccomandate per l'estrazione in macerazione. Enzima: LALLZYME® EXV (2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® 2056, LALVIN® QA23. Attivanti: GO-FERM PROTECT® FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN® ELIOS 1. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso con macerazione carbonica

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO CON MACERAZIONE CARBONICA

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. (Grado potenziale < 12,5% e pH < 3,7). Trasporto dell'uva integra fino alla cantina, in caso contrario non realizzare macerazione carbonica.	Introdurre i grappoli interi nel serbatoio da fermentare cercando di mantenere la loro integrità fisica. Precedentemente sarà realizzato un pied de cuve (12 ore prima) con l' 1% di liquido, inoculando un lievito adatto alla macerazione carbonica. Iniettare CO_2 esogena nel fondo del serbatoio. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 180 mg/L. Se necessario, correggere l'acidità con l'aggiunta di acido tartarico fino a pH 3,6.	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Quando possibile utilizzare nutrienti complessi. Introdurre i nutrienti all'inizio del riempimento dei tini. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: LALVIN ICV GRE™, LALVIN® 71B. Se possibile, aggiungere lisozima a 200 mg/L per evitare la fermentazione malolattica.	Mantenere la temperatura di fermentazione tra 28-30 ºC evitando temperature più alte o più basse per favorire il metabolismo anaerobio. Realizzare giornalmente un rimontaggio al chiuso per omogeneizzare. Svinare a densità 1000 o quando la polpa comincia a colorarsi per gli antociani. Vinificare separatamente vino fiore e di pressatura fino alla valutazione del loro taglio per degustazione. Nel secondo è necessario addizionare 10 g/hL di nutriente complesso.	Ritardare l'inizio della fermentazione malolattica fino a che la fermentazione alcolica non sia conclusa nei due vini. Riunire in base alla degustazione. In funzione della acidità e della quantità di malico, la FML si realizzerà solo sul vino di pressatura o sulla massa totale. Abbassare la temperatura a 18 ºC se non si desidera realizzare la FML e solfitare a 4 g/hL di solforosa. Colmare il serbatoio dove si desidera realizzare la FML. Inoculare con LALVIN 31®.	Mantenere la temperatura tra 18-20 ºC. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML.	Dopo la FML, travasare con aerazione e aggiungere da 4 a 5 g/L di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L fino all'imbottigliamento.
	Precauzioni: solfitare il raccolto in funzione del suo stato sanitario e del pH (fra 6 e 8 g/q).	**Precauzioni:** evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** analizzare gli zuccheri residui in vino fiore e torchiato. Tenere sotto controllo la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente della acidità volatile.
	Scelte raccomandate per l'estrazione in macerazione. Enzima: LALLZYME® EX (2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV GRE™, LALVIN® 71B. Attivanti: GO-FERM PROTECT® FERMAID® E. Altri: Lallzyme Lyso.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31®. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso corposo e fruttato

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO CORPOSO E FRUTTATO

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. Trasporto di uve integre, in caso contrario aggiungere metabisolfito alla dose adeguata. Assicurare basse temperature all'arrivo in cantina. Diraspatura e pigiatura delicate.	Raffreddare l'uva a 14 ºC per evitare arresti di fermentazione e shock osmotico. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 250 mg/L. Se necessario, correggere l'acidità con addizione di acido tartarico fino a pH 3,6. Aggiungere enzima di macerazione per l'estrazione di tannino e di colore in fase acquosa. Solfitare il raccolto in funzione del suo stato sanitario e del pH (tra 3 e 6 g/hL).	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Quando possibile, correggere con nutrienti complessi. Aggiungere in questo momento la metà della dose. La scelta del lievito sarà effettuata in funzione dell'obiettivo sensoriale del vino, della tolleranza all'alcol, della cinetica di fermentazione. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D21™, UVAFERM® VRB, LALVIN® BM45.	Controllare la temperatura di fermentazione. Cominciare a 18 ºC e non superare i 24 ºC, evitando temperature più alte in particolare nella fase tumultuosa della FA. Addizione di nutriente complesso fino a raggiungere la concentrazione richiesta di APA in funzione del grado alcolico e del lievito. Realizzare una o due aggiunte di ossigeno in concomitanza con l'apporto di azoto fino ad un totale di 10 mg/L. Svinatura a fine Fermentazione Alcolica. Pressatura e possibile addizione di torchiato in funzione della degustazione.	Realizzare un secondo travaso 24 ore dopo la svinatura per separare le fecce grossolane . Abbassare la temperatura a 18-20 ºC. Colmare la vasca. Inoculare con UVAFERM® ALPHA, LALVIN 31®.	Mantenere la temperatura tra 18-20 ºC. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML per mantenere i batteri in sospensione.	Dopo la FML, travasare con aerazione e aggiungere da 4 a 5 g/hL di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L durante tutto il tempo di permanenza in cantina.
		Precauzioni: evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** analizzare gli zuccheri residui, tenere sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria. Realizzare un controllo costante della degradazione dell'acido malico.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente dell'acidità volatile .
	Scelte raccomandate per l'estrazione in macerazione. Enzima: LALLZYME® EX (2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D21™, UVAFERM® VRB, LALVIN® BM45. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® K. Altri: OPTI-RED®, BOOSTER ROUGE®.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: UVAFERM® ALPHA, LALVIN 31®. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso, stile fruttato ottenuto con la tecnica del coinoculo lieviti-batteri

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO, STILE FRUTTATO OTTENUTO CON LA TECNICA DEL COINOCULO LIEVITI-BATTERI

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. Se possibile, bassa temperatura all'arrivo dell'uva in cantina. Massima diraspatura e pigiatura per evitare uve intere o parzialmente rotte durante la macerazione fermentativa. E' imprescindibile un'ottimo stato sanitario delle uve per realizzare questo tipo di vinificazione.	Raffreddare il pigiato fino a temperature di 14 ºC per evitare arresti di fermentazione e shock osmotico. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 300 mg/L. Se necessario, correggere l'acidità con l'aggiunta di acido tartarico fino a pH 3,6 o inferiore. Addizionare l'enzima di macerazione per l'estrazione di tannino e colore in fase acquosa. Solfitare la raccolta a dosi medie o basse (tra 4 e 5 g/Hl).	Proteggere e nutrire il lievito adeguatamente per un corretto andamento della fermentazione alcolica. L'uso di nutrienti complessi è altamente consigliabile. Utilizzare lieviti con un fabbisogno di azoto assimilabile da basso a medio, non produttori di SO_2 e senza una crescita vigorosa. La compatibilità tra lievito e batterio deve essere precedentemente valutata. Addizionare 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: UVAFERM® VRB, LALVIN ICV D254™.	La temperatura di fermentazione non deve superare i 22-24 ºC. Addizione di nutriente complesso a 1/3 della FA fino ad arrivare alla concentrazione di APA richiesta in funzione del grado alcolico e del lievito. Realizzare una o due aggiunte di ossigeno in concomitanza con l'apporto di azoto fino ad un totale di 10 mg/L. Non sono consigliate addizioni di fosfato diammonico per evitare crescite eccessive di lieviti che inibiscano batteri.	Quando il mosto in fermentazione contiene solo 10 g/L di zuccheri residui, inoculare il batterio selezionato scelto compatibile con il lievito inoculato. Abbassare la temperatura fino a 18-20 ºC in questo momento. Inoculare con UVAFERM® ALPHA, LALVIN 31®.	Mantenere la temperatura a 18 ºC. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML.	Dopo la FML, travasare con aerazione e addizionare da 4 a 5 g/hL di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L durante tutto il tempo di permanenza in cantina.
	Precauzioni: la solfitazione è più blanda all'inizio e si integra alla fine della FML.	**Precauzioni:** evitare shock termico fra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** tenere sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria. Realizzare un controllo costante della degradazione dell'acido malico.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente dell'acidità volatile.
	Scelte raccomandate per l'estrazione in macerazione. Enzima: LALLZYME® EX (2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: UVAFERM® VRB, LALVIN ICV D254™. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31®. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso a macerazione corta

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO A MACERAZIONE CORTA

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. (Grado potenziale < 13,5% e pH < 3,6). Se possibile, vendemmiare di notte per assicurare basse temperature dell'uva all'arrivo in cantina. Trasporto di uve integre, in caso contrario aggiungere metabisolfito alle dosi adeguate.	Trattenere un 35-40% di uve intere. Raffreddare l'uva per 36 ore a 15 ºC realizzando un rimontaggio giornaliero. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 200 mg/L. Se necessario, correggere l'acidità con acido tartarico fino a pH 3,6. Aggiungere enzima di macerazione per l'estrazione di tannino e di colore in fase acquosa. Solfitare il raccolto in funzione del suo stato sanitario e del suo pH (tra 3 e 6 g/hL).	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Quando possibile, correggere con nutrienti complessi. Se ci sono più di 180 mg/L di APA aspettare fino a densità 1060. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato: LALVIN ICV GRE™, LALVIN® 71B.	Mantenere la temperatura di fermentazione tra 24-26 ºC, evitando temperature più alte particolarmente nella fase tumultuosa. Tenere sotto controllo la temperatura del cappello in modo che rimanga al di sotto di 28 ºC. Addizione di nutriente complesso, fino a raggiungere il livello richiesto di APA, in funzione del grado alcolico e del lievito a 1060, se non è stato realizzato all'inizio. Realizzare un apporto di ossigeno fino ad un totale di 10 mg/L. Svinare dopo i 1030 in funzione della degustazione e della necessità di tannini.	Ritardare l'inizio della fermentazione malolattica fino alla conclusione della fermentazione alcolica. Abbassare la temperatura a 18 ºC. Colmare il serbatoio. Inoculare con LALVIN 31®.	Mantenere la temperatura tra 18-20 ºC. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML.	Dopo la FML, travasare con aerazione e aggiungere da 4 a 5 g/hL di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione . Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L fino all'imbottigliamento.
		Precauzioni: evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** analizzare gli zuccheri residui, tenere sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente della acidità volatile.
	Scelte raccomandate per l'estrazione in macerazione. Enzima: LALLZYME® EX (2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV GRE™, LALVIN® 71B. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN 31®. Attivanti: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Chardonnay fermentato in barrique Ultra Premium

California Central Coast

Fonte:
Consulenza fornita da Kirby Anderson, Gainey Vineyard.
Kirby è l'enologo di Gainey Vineyard in Santa Ynez, California dal 1997, dove si occupa dei vini del nuovo vigneto Santa Rita Hills di Gainey a Evans Ranch. Ha studiato viticoltura alla UC Davis ed ha esercitato in molte delle principali regioni viticole della California.

Fare attenzione a:
Formazione di H_2S

Selezionati dalla natura
LALLEMAND

CHARDONNAY FERMENTATO IN BARRIQUE ULTRA PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Valutare la maturità delle uve in funzione di °Brix, pH, AT così come osservando la salute della pianta, la maturità dei vinaccioli e dei peduncoli e degustando l'uva. Riempire il serbatoio con CO_2 per evitare ingresso di ossigeno. Pressatura dei grappoli interi con sfecciatura a freddo durante la notte (circa 13 °C). Dopo la pressatura, addizionare circa 50 mg/L di SO_2. Se necessario, correggere l'acidità.	Cercare di ottenere meno del 1% di solidi dopo la sfecciatura.	Inoculare con LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D47™ in serbatoio prima di travasare alle barrique.	Effettuare due aggiunte di FERMAID® E, e fosfato diammonico (se necessario) per portare l'APA almeno a 250 mg/L. Realizzare la prima aggiunta di nutrienti (metà della dose) dopo la fase di latenza. Seconda aggiunta di nutrienti (l'altra metà della dose) intorno ai 18 ºBrix Temperatura ambiente della barricaia circa 18 °C. Picchi massimi di temperatura di fermentazione di 21 ºC. Trattenere i solidi dopo la fermentazione per prolungare il contatto con le fecce.	Ritardare la FML fino alla fine della FA. Inoculare con UVAFERM® ALPHA reidratato direttamente in barrique. Mantenere la barricaia a 20 ºC.	Rimescolare la barrique una volta alla settimana fino al completamento della FML. Controllare periodicamente i livelli di acido L-malico; considerare finita la FML quando il livello è al di sotto dei 20 mg/100 ml.	Dopo la FML, addizionare 30 mg/L di SO_2. L'obiettivo è intorno ai 25 mg/L di SO_2 libera. Dopo la FML, mantenere la temperatura della barricaia a 13 °C. Il vino rimane a contatto con le fecce fino alla fase che precede l'imbottigliamento. Le scelte per la filtrazione all'imbottigliamento vanno dalla non filtrazione alla filtrazione a 0,45 µm. Criteri: prezzo, FML parziale, storia microbiologica.
		Precauzioni: acclimatare il lievito alla temperatura del mosto.	**Precauzioni:** NO ossigeno!		**Precauzioni:** evitare l'ossigeno!	
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN ICV D47™ Attivanti: FERMAID® E, fosfato diammonico		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: UVAFERM® ALPHA.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Cabernet Sauvignon Ultra Premium

Sycamore Vineyard, Napa Valley

Fonte:
Consulenza fornita da Tim Bell, Freemark Abbey Winery.
Tim ha il titolo di enologo e ha lavorato in cantine delle contee di Napa, Sonoma, e Monterey prima di diventare enologo alla Freemark Abbey Winery in St. Helena, California.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

CABERNET SAUVIGNON ULTRA PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Raccolta manuale in recipienti di mezza tonnellata, al mattino presto. Vigneti localizzati a circa 10 minuti dalla cantina. Temperatura di arrivo delle uve circa 18 °C. Parametri di vendemmia: 24,5-26 °Brix; pH 3,6-3,8 (correggere a 3,65 pH); AT del mosto 6-6,5 g/L	Selezionare i grappoli e diraspare. Selezionare le bacche ed eliminare foglie e raspi. Addizionare 40 mg/L di SO_2 in pigiatura. Addizionare enzimi di macerazione. Macerazione a freddo a 16-18 °C per 24-48 ore. Fermentare in contenitori aperti da 8 tonnellate.	Inoculare LALVIN ICV D21™ adeguatamente reidratato e addizionare FERMAID® E al mosto. Correggere l'APA con fosfato diammonico 1-2 giorni dopo l'aggiunta del lievito. Addizionare OPTI-RED® 30 g/hL.	Impostare la temperatura a 29 °C ed eventualmente raggiungere i 31 °C. Addizione supplementare di Fermaid E quando si siano consumati da un terzo a metà degli zuccheri. Rimontaggi con aerazione all'inizio della fermentazione, due volte al giorno per 20-30 minuti ognuno. Durata della macerazione su un terzo / metà del raccolto di 8-10 giorni. Durata della macerazione nel resto del raccolto di 25-28 giorni.	Inoculare LALVIN VP 41® durante la macerazione una volta che la FA sia completata. Addizionare un attivante specifico per BML.	Temperatura ambiente fra 18-21 °C. Sgrondo e vino di pressa in serbatoi inox. Verificare con analisi enzimatica che la FML si sia conclusa prima di riempire le barrique.	Correggere SO_2 totale a 40 mg/L. Travasare una o due volte in serbatoio per chiarificare prima di andare alle barrique. Realizzare colmature regolarmente.
	Precauzioni: selezionare l'uva!			**Precauzioni:** aspettare la conclusione della FA prima di aggiungere i batteri!	**Precauzioni:** FML completa prima di mandare il vino alle barrique.	**Precauzioni:** controllare periodicamente AV, SO_2, e degustare frequentemente.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica: Lievito: LALVIN ICV D21™ . Attivanti: FERMAID® E, fosfato diammonico (se necessario). Altri: enzimi di macerazione, OPTI-RED®.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica: Batteri: LALVIN VP 41®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Cabernet Sauvignon Ultra Premium

Domain Saint Hilaire, Montagnac, Languedoc, Francia

Fonte:
Consulenza fornita da Sam Harrop
Sam è enologo consulente di diverse tenute di tutto il mondo. È inoltre partner di una cantina del Roussillon. Prima di dedicarsi alle consulenze è stato wine buyer/enologo di Marks and Spencer nel Regno Unito. È Master of Wine.

Fare attenzione a:
1. Formazione eccessiva di aromi volatili prima, durante e dopo la fermentazione – lavorare cercando un'assoluta purezza e una maggiore pulizia dell'aroma
2. Eccessiva secchezza – lavorare cercando una consistenza morbida ed equilibrata

selezionati dalla natura
LALLEMAND

CABERNET SAUVIGNON ULTRA PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Sfemminellatura precoce per esporre le uve formate alla luce accelerando la maturità fenolica ed aromatica. Raccolta manuale delle uve alla maturità fenolica e aromatica. Resa: 3,7 t/ha. Alcol potenziale tra 13-14%. Selezione manuale prima della diraspatura. Aggiunta di 30 mg/L di SO_2 al serbatoio prima e dopo la diraspatura. Non pigiare! Bacche intere per un fruttato intenso, pulizia ed estrazione delicata dei tannini.	Addizionare acido tartarico (se necessario) per mantenere un pH pre-fermentativo fra 3,4-3,5. Addizionare enzima di macerazione LALLZYME® EX. Follatura delicata per miscelare gli enzimi e l'acido. Macerazione prefermentativa a freddo (~7-10 °C) per 24 ore.	Dopo la macerazione prefermentativa a freddo, addizionare 25 g/hL di LALVIN ICV D254™ o LALVIN ICV D80™ adeguatamente reidratato. Dopo l'inoculo del lievito, addizionare 25 g/hL di FERMAID® E. Addizionare 10 g/hL di fosfato diammonico a circa 14 °Brix.	Se l'uva ha una buona maturità fenolica e aromatica, fermentare a bassa temperatura (circa 22-25 °C) per trattenere l'intensità del fruttato e la sua pulizia. Follature manuali delicate in vasche aperte due volte al giorno. Fermentazioni in piccoli volumi sono più facili da manipolare, ma fare attenzione alla comparsa di odori solforati, applicare misure correttive se necessario. Dividere le fermentazioni in due volumi: Lotto 1 (25% della massa): sgrondare a 10 g/L di zuccheri residui e travasare in botti di rovere francese da 500 litri per la FML. Mantenere separati i vini di pressa per evitare amaro e aromi verdi eccessivi. Lotto 2 (75% della massa): sgrondare dopo 5-10 giorni di macerazione (21 °C).	Lotto 1: Dopo la FA, inoculare LALVIN® ELIOS 1 o LALVIN VP 41® direttamente in botti di rovere da 500 litri. Addizionare ACTI-ML® al vino. Lotto 2: dopo la FA, travasare in serbatoio per inoculo con LALVIN® ELIOS 1 o LALVIN VP 41®. Addizionare ACTI-ML® al vino. Travasare il vino nelle barrique per completare la FML.	Mantenere la temperatura a 18-20 °C. Agitare i vini ogni due settimane. Controllare regolarmente l'andamento della FML.	Una volta completata la FML, addizionare 30 mg/L di SO_2 (l'obiettivo ideale per il controllo dei microrganismi è una SO_2 molecolare di 0,5). Non agitare le fecce dopo la FML. Mantenere la temperatura di affinamento sotto i 15 °C. Lotto 1: Travaso dalle fecce grossolane, pulire le barrique e riempire di nuovo le barrique con il vino. Lotto 2: Travaso dalle fecce grossolane e fare invecchiare questo lotto in barrique più vecchie. Il totale di barrique è 35% rovere francese nuovo, 35% rovere francese di 1 anno, e 30% rovere francese di 2 anni. Controllare la SO_2 ogni 4 settimane e mantenere una SO_2 molecolare di 0,5 per tenere sotto controllo i *Brettanomyces*. Invecchiare per 12-14 mesi in barrique con solo 2 travasi. Nel primo travaso, tagliare i lotti per omogeneizzare l'aroma e il sapore, consistenza e stabilità microbiologica. Controllare regolarmente AV, fenoli volatili e aromi solforati. Mantenere le barrique colme. Dopo l'affinamento, travasare e correggere la SO_2. Se necessario, applicare una chiarifica leggera con bianco d'uovo. Prima dell'imbottigliamento, filtrare delicatamente e conservare per 30 giorni a 15 °C.
	Precauzioni: praticare una buona igiene.	**Precauzioni:** non aggiungere fosfato diammonico durante la reidratazione del lievito.	**Precauzioni:** controllare frequentemente AV e microrganismi. Se si formano odori solforati, effettuare follature energiche più di una volta al giorno e délestage (travasi e riempimenti) a metà fermentazione.		**Precauzioni:** controllare frequentemente i livelli di AV e la presenza di microrganismi indesiderati specialmente se si sviluppano cattivi odori e sapori.	**Precauzioni:** evitare *Brettanomyces* mantenendo buoni livelli di SO_2 specialmente nel periodo di vacanze e nei mesi caldi.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D80™, LALVIN ICV D254™. Attivanti: FERMAID® E, fosfato diammonico. Altri: LALLZYME® EX.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN® ELIOS 1 o LALVIN VP 41®. Attivante: ACTI-ML®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Merlot Ultra Premium

Napa Valley

Fonte:
Consulenza fornita da Ken Vigoda, Raymond Vineyard and Cellar
Prima di conseguire la laurea in chimica organica ed elaborare vini ultra premium, Ken ha lavorato come chimico analitico in un laboratorio enologico di Napa. Dal 1983 è l'enologo di Raymond Vineyard and Cellar.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

MERLOT ULTRA PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Parametri di vendemmia: 10-15 ton/ha; 24-26 °Brix; 3,6-3,8 pH; 7-8 g/L AT nel mosto. Vendemmia manuale. Tutti i vigneti sono a 5-20 minuti della cantina.	Diraspatura e pigiatura delicate. 20% uve intere. Con uve sane, non addizionare SO_2. Se l'uva è a rischio, addizionare 40 mg/L di SO_2 libera. Se l'uva è erbaceo/vegetale addizionare enzimi di macerazione. Realizzare 1-2 piccole aggiunte di tannino enologico. Non effettuare macerazione a freddo. Addizionare lisozima se l'uva è ammuffita e/o il microscopio indica batteri lattici.	Addizionare LALVIN ICV D254™ adeguatamente reidratato. Addizionare nutriente complesso all'inizio della fermentazione e una o due volte durante la fermentazione. Correggere l'APA del mosto utilizzando fosfato diammonico.	Intervallo temperatura di fermentazione 24-25 °C. Rimontare due volte al giorno per circa 30-40 minuti. Arieggiare durante il rimontaggio nei primi tre giorni. Pressare a circa 4-5 °Brix (normalmente 5 giorni).	Aggiungere nutriente per BML e dopo inoculare LALVIN VP 41® direttamente al vino.	La FML si completa in serbatoio normalmente in 2-4 settimane.	Dopo la FML. Addizionare SO_2 fino a 60 mg/L di totale. Travasare in barrique (tutto rovere nuovo, 60% americano, 40% francese). Senza agitazione delle fecce. Travasare una volta durante i 12-18 mesi di affinamento in barrique. Stabilizzazione a freddo in barrique. Assemblare i vini in serbatoio inox, senza chiarifica. Filtrare a farina e a cartoni prima dell'imbottigliamento.
				Precauzioni: aspettare il completamento della FA prima di inoculare la FML.		**Precauzioni:** controllare AV ed SO_2 . Degustare ed effettuare colmature delle barrique con regolarità.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lievito: LALVIN ICV D254™ Attivanti: FERMAID® E, fosfato diammonico (se necessario). Altri: tannini enologici, enzimi di macerazione, lisozima (se necessario).		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41®.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Pinot Nero Ultra Premium

California Central Coast

Fonte:
Consulenza fornita da Brett Escalera, Fess Parker Winery.
Brett ha cominciato la sua carriera come enologo nella cantina Santa Barbara Winery, trasferendosi poi a Byron come enologo dopo avere ottenuto un Master all'Università statale di Fresno. Lavora per Fess Parker Winery in Los Olivos dal 1996, dove è stato promosso al ruolo di Direttore delle Operazioni Enologiche e Viticole.

Fare attenzione a:
1. Uva a rischio –è necessaria una selezione attenta per eliminare uve non adeguate, foglie e raspi
2. Produzione di H2S, specialmente quando l'uva proviene da siti con bassa vigoria o viti stressate

selezionati dalla natura
LALLEMAND

PINOT NERO ULTRA PREMIUM

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Diraspatura 100%. Mantenere il 30-35% di uve intere. Parametri di maturazione tipici dell'uva: 24,5-25,5 °Brix 3,5-3,45 pH 6-8 g/L AT. Obiettivo di alcol potenziale 14-15%. Addizionare 50 mg/L di SO_2 al pigiato. Fermentare il 50% del volume in fermentatori chiusi (rimontaggi). Fermentare il 50% del volume in fermentatori aperti (follature).	Macerazione prefermentativa a freddo per 48-96 ore in funzione della disponibilità di serbatoi. Addizionare enzima di macerazione 24 ore dopo la pigiatura. Realizzare follature o rimontaggi 1-2 volte durante le 24 ore della macerazione a freddo. Riempire lo spazio di testa con CO_2 o addizionare ghiaccio secco se si desidera abbassare la temperatura.	Inoculare con 25 g/hL di lievito adeguatamente reidratato. In condizioni difficili di fermentazione, reidratare con GO-FERM®. La scelta del lievito è funzione della compatibilità con l'uva e con lo stile di vino desiderato.	Fermentatori chiusi: effettuare un rimontaggio per immergere il cappello 2-3 volte al giorno mediante una pompa sommersa inox con superficie per arieggiare il vino ed eliminare i vinaccioli (se interessa). Fermentatori aperti: follature del cappello 2-3 volte al giorno, fino a cappello completamente immerso. Obiettivo di temperatura di fermentazione 31-32 °C. Considerare nutrienti supplementari se la fermentazione comincia a rallentare. Pressatura entro 24 ore dall'esaurimento degli zuccheri	Se necessario aggiungere attivante per batteri malolattici. Obiettivo di temperatura circa 21 °C. Inoculare Lalvin VP41 in serbatoi inox appena prima o immediatamente dopo la pressatura. 48 ore dopo la pressatura, travasare il vino nelle barrique.	Obiettivo temperatura: superiore a 15 °C fino al completamento della FML. Non agitare o movimentare il vino fino al completamento della FML.	Addizionare SO_2 non appena si è completata la FML. Travasare due volte il vino prima del taglio e dell'imbottigliamento. Lavare le barrique in ogni travaso. Prendere in considerazione una chiarifica leggera con bianco d'uovo per i vini eccessivamente tannici. Filtrazione tangenziale circa 24 ore prima dell'imbottigliamento.
	Precauzioni: prendere in considerazione la refrigerazione se l'uva arriva calda e il succo/mosto è eccessivamente caldo.	**Precauzioni:** reidratare adeguatamente i lieviti – evitare gli shock	**Precauzioni:** fare attenzione alla produzione di H_2S.	**Precauzioni:** non inoculare la FML prima che la FA non si sia conclusa.	**Precauzioni:** controllare frequentemente la temperatura del vino.	**Precauzioni:** mantenere livelli adeguati di SO_2 libera (circa 30 mg/L) dopo la FML e durante l'affinamento in barrique.
		Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN® RC212, LALVIN® RA17 Attivanti: FERMAID® E e/o GO-FERM®. fosfato diammonico (se necessario).		Scelte raccomandate accomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41® Attivanti: se necessario aggiungere attivante per batteri malolattici.		

Stile di vino . . . Tecniche per il successo

Obiettivo: Vino rosso con microssigenazione

Fonte:
Protocolli redatti in Spagna da Enologi di riconosciuto prestigio professionale

selezionati dalla natura
LALLEMAND

VINO ROSSO CON MICROSSIGENAZIONE

Gestione delle uve	Trattamento del succo o mosto	Inoculo di lieviti	Gestione della fermentazione alcolica	Inoculo di batteri malolattici	Gestione della fermentazione malolattica	Stabilizzazione del vino
Controllo analitico e sensoriale dell'uva al fine di valutare zuccheri, acidità e pH potenziali per correzioni successive. (Grado potenziale 13-15%). Se possibile vendemmiare di notte per assicurare basse temperature all'arrivo in cantina. Trasporto della uve integre, in caso contrario aggiungere metabisolfito alle dosi adeguate.	Raffreddare il pigiato a 14 ºC per evitare arresti di fermentazione e shock osmotico. Analizzare APA (Azoto Prontamente Assimilabile). Consigliabile: superiore a 200 mg/L. Se necessario, correggere acidità con addizione di acido tartarico fino a pH 3,6. Aggiungere enzima di macerazione per una massima estrazione di tannino e di colore in fase acquosa. Solfitare in funzione dello stato sanitario e del pH (tra 3 e 6 g/hL).	Correggere l'APA in funzione del tipo di lievito da utilizzare. Quando possibile, correggere con nutrienti complessi. Aggiungere in questo momento la metà della dose. Aggiungere 25 g/hL di lievito adeguatamente idratato: Lalvin LALVIN ICV D254™, LALVIN® BM 4x4, LALVIN® L 2056, LALVIN® RA17. Impiegare lisozima per evitare lo sviluppo di batteri lattici durante la FA (150 g/L).	Mantenere la temperatura di fermentazione tra 24-26 ºC evitando temperature più alte particolarmente nella fase tumultuosa. Addizione di nutriente complesso fino a raggiungere la concentrazione richiesta di APA in funzione del grado alcolico e del lievito. Realizzare una o due aggiunte di ossigeno in concomitanza con l'apporto di azoto fino a un totale di 10 mg/L. Nel caso di fermentazioni rallentate, utilizzare prodotti a base di lievito inattivo con azione detossificante e lisozima in caso di eccessivo sviluppo delle popolazioni di batteri. Nel caso di sviluppo di batteri è consigliabile una seconda addizione di lisozima a una dose di 200 g/L. Alla fine della FA abbassare la temperatura fino a 18 ºC e svinare quando secondo la degustazione vi sia sufficiente tannino nel mezzo. Altrimenti continuare con la macerazione e i rimontaggi fino a raggiungere estrazione desiderata.	Ritardare l'inizio della fermentazione malolattica per poter realizzare la microssigenazione. Per questo motivo utilizzare preventivamente lisozima e aggiungere SO_2 una volta esauriti gli zuccheri in ragione di 3 g/hL. Abbassare la temperatura a 16-20 ºC una volta finiti gli zuccheri per evitare la FML. Colmare la vasca e realizzare la microssigenazione con dosi di ossigeno che dipenderanno dalla struttura fenolica del vino (dosi consigliate 0,5-5 mg/L/mese in funzione del vino). Seguire l'evoluzione mediante degustazione fino alla comparsa di acetaldeide. Dopo la microssigenazione inoculare con LALVIN VP 41® o LALVIN® ELIOS 1 o UVAFERM® ALPHA.	Mantenere la temperatura tra 20-22 ºC durante la FML. Realizzare omogeneizzazioni costanti durante tutta la FML.	Dopo la FML, travasare con aerazione e aggiungere da 4 a 5 g/hL di SO_2. Correggere pH e acidità in funzione della degustazione. Mantenere SO_2 molecolare al di sopra di 0,5 g/L durante tutto il tempo di permanenza in cantina.
		Precauzioni: evitare shock termico tra il lievito reidratato e il mosto da inoculare.	**Precauzioni:** analizzare gli zuccheri residui, tenere sotto controllo la temperatura e la produzione di H_2S.	**Precauzioni:** realizzare una reidratazione adeguata della coltura batterica.	**Precauzioni:** evitare il contatto con l'aria.	**Precauzioni:** realizzare un controllo frequente della acidità volatile.
	Scelte raccomandate per l'estrazione in macerazione. Enzima: LALLZYME® EXV (2 g/q).	Scelte raccomandate per la fermentazione alcolica. Lieviti: LALVIN ICV D254™, LALVIN® BM 4x4, LALVIN® L 2056, LALVIN® RA17. Attivanti: GO-FERM PROTECT®, FERMAID® E. Altri: LALLZYME® LYSO.		Scelte raccomandate per la fermentazione malolattica. Batteri: LALVIN VP 41® o LALVIN® ELIOS 1 o UVAFERM® ALPHA. Attivanti: ACTI-ML®.		

RIAVVIO DELLE FERMENTAZIONI MALOLATTICHE ARRESTATE

CONSIGLI DA LALLEMAND NORD AMERICA

Gli enologi sanno che i batteri *Oenococcus oeni*, principale agente della FML, sono efficaci solo se riescono ad adattarsi alle difficili condizioni del mosto in fermentazione o del vino. I fattori che maggiormente influenzano la FML sono pH, temperatura, alcool e solforosa (sia libera che totale).

Quando il pH è basso (sotto i 3,4), l'alcool è elevato (maggiore di 14,5%), la temperatura è bassa (meno di 18°C), o la SO_2 totale è alta (maggiore di 30 ppm), si possono verificare problemi. Inoltre, questi quattro parametri hanno effetto sinergico, rendendo la vita dei batteri malolattici molto difficile se le condizioni sono limitanti per più fattori chimico-fisici.

Lallemand produce ceppi malolattici veloci ed efficaci, selezionati sia per le loro caratteristiche sensoriali sia per la capacità di agire anche nelle difficili condizioni sopra descritte. Durante la produzione industriale, i batteri malolattici sono sottoposti a condizioni biofisiche che inducono la formazione di proteine con effetto protettivo. Le cellule vengono recuperate in questa fase fisiologica e liofilizzate. A seguito di questo trattamento, le cellule sviluppano una resistenza naturale alle condizioni del vino e possono quindi esser aggiunte direttamente allo stesso senza perdite significative di vitalità. In alcuni casi, per portare a termine una FML arrestata, è sufficiente aggiungere nuovamente una coltura di batteri malolattici MBR® ad inoculo diretto appena reidratata. In altri casi è necessaria una fase di adattamento più accurata per riuscire a completare la FML. Questa fase di adattamento può permettere di superare l'ostacolo di una matrice vino particolarmente sfavorevole alla crescita dei batteri lattici, e conseguentemente consentire il completamento della FML.

Lallemand Australia ha lavorato in collaborazione con il gruppo R&S diretto da Dr. Sibylle Krieger al fine di sviluppare una strategia di acclimatazione dei batteri malolattici che permetta il riavvio ed il completamento delle fermentazioni malolattiche arrestate.

selezionati dalla natura
LALLEMAND

PROTOCOLLO DI ADATTAMENTO PER LA GESTIONE DELLE FERMENTAZIONI MALOLATTICHE ARRESTATE

FASE 1

Preparare il vino e regolare la temperatura

Preparare il vino con FML arrestata rimuovendo le fecce, potenziali tossine inibenti, e controllando i microrganismi contaminanti. Per bloccare i batteri indesiderati Lactobacillus o Pediococcus possono essere necessarie piccole quantità di SO_2 e/o lisozima, oppure una filtrazione.

Il lisozima è molto efficace nell'inibire i batteri lattici contaminanti, specialmente quando il pH del vino è maggiore di 3,5. Se si usa lisozima, bisogna assicurarsi che non ne rimangano residui di attività nel vino trattato prima di aggiungere la coltura malolattica.

In un vino con FML arrestata in cui si sospetta la presenza di sostanze tossiche per i batteri, Lallemand raccomanda un pre-trattamento con scorze di lievito (lieviti inattivi) alle dosi di 6,25 – 12,5 g/hl. Preparare la sospensione di scorze di lievito in acqua o vino, quindi aggiungere al vino arrestato mantenuto in agitazione.

Infine, regolare la temperatura del vino tra 18° e 22°C.

FASE 2

Acclimatare la coltura batterica MBR® in tre passaggi:

Step 1: preparare il mezzo
Step 2: reidratare la coltura
Step 3: aggiungere la coltura reidratata al mezzo di acclimatazione.

N.B.: I volumi indicati di seguito fanno riferimento al riavvio di 100 hL di vino arrestato.

Step 1: Preparazione del mezzo di acclimatazione

Miscelare:
- 10 L di mosto d'uva (senza SO2)
- 10 L di acqua (senza cloro)
- 20 L di vino con FML arrestata.
- Dopo aver miscelato le componenti, aggiustare il pH tra 3,6 e 4,0
- Regolare la temperatura tra 25°C e 30°C.

Step 2: Reidratazione delle coltura starter MBR®

- Portare 5 L di acqua (senza cloro) ad una temperatura compresa tra 22° e 25°C.
- Sospendere 1 kg di nutriente ACTI-ML® nei 5 L di acqua.
- Reidratare 100 g di batteri malolattici MBR® nei 5 litri di sospensione di ACTI-ML®. Lasciare riposare per 15 minuti la sospensione.

Step 3: Acclimatazione dei batteri malolattici

- Miscelare il mezzo di acclimatazione (da Step 1) alla coltura batterica reidratata (da Step 2).
- Lasciare acclimatare i batteri ad una temperatura di 22° - 25°C per almeno due ore e per non più di quattro ore.
- Dopo questa fase di acclimatazione, raddoppiare il volume della sospensione con il vino arrestato (aggiungere alla coltura di 50 L altri 50 litri di vino). Se non è possibile misurare l'acido malico per seguire l'andamento della FML, si assume che la coltura in 4-6 ore sia pronta per l'inoculo. Deve essere evidente lo sviluppo di CO_2 e/o un leggero odore lattico. Se è possibile analizzare il contenuto in acido malico, attendere che il 50-70% dell'acido malico della coltura sia degradato prima di procedere alla fase 3.

FASE 3

Aggiungere al vino arrestato 1 kg di nutriente per batteri malolattici e successivamente la coltura preparata nella fase 2.

Agitare dolcemente il vino per evitare aerazione eccessiva, ed unire la coltura malolattica acclimatata ai 100 hL di vino arrestato.

Si raccomanda un controllo analitico regolare dell'acido malico (ogni due settimane) e dell'acidità volatile (ogni settimana).

Redatto da Lallemand Nord America nel 2005. Le informazioni qui contenute sono veritiere e precise secondo lo stato attuale delle conoscenze; tuttavia, questa informazione commerciale non può essere considerata come una garanzia espressa o implicita, o come una condizione di vendita per nessuno dei prodotti Lallemand.

CALCOLI E CONVERSIONI

WILFRIED DIETERICH

CONVERSIONE DELLA TEMPERATURA

C° = Gradi Celsius

F° = Gradi Fahrenheit

F° => C° = (F° - 32)*(5/9)

C° => F° = (C° * 9/5) + 32

C°	-18	-15	-10	10	16	21	27	32	38	49
F°	0	5	14	50	60	70	80	90	100	120

CONVERSIONE DELLA MASSA

1 kg	=	1 000 g
1 kg	=	2,205 lb
1 g	=	1 000 mg
1 lb	=	453,6 g
1 lb	=	0,4536 kg
1 t	=	1 000 kg
1 t	=	2 205 lb
1 t (US)	=	2 000 lb
1 t (US)	=	907 kg

CONVERSIONE DEL VOLUME

1 mL	=	0,035 US fl oz
1 US fl oz	=	30 mL
1 L	=	1000 mL
1 L	=	0,2642 gal (US)
1 gal (US)	=	3 785 mL
1 gal (US)	=	3,785 L
1 hL	=	100 L
1 hL	=	26,4 gal (US)

ALTRE CONVERSIONI

1 kg/hL = 1000 g/hL = 10 000 mg/L = 10 g / L = 10 mg / mL
1 lb /1 000 gal (US) = 454 g /1 000 gal (US) = 0,454 kg /1 000 gal (US) = 120 mg/L = 0,120 g/L
1 ppm = 1 mg/L
1 ppb = 1 mg /1 000 L
1° Brix = 1% zuccheri (p/v)
1 Vol.% = 1 mL/100 mL
1 densità % = 1 g/100 g

sélectionnés dalla natura
LALLEMAND

ENERGIA DEI COMPOSTI CHE CARATTERIZZANO IL VINO

Se dovete calcolare l'energia dei composti che caratterizzano la composizione del vino, i seguenti valori risulteranno utili

1 g etanolo	7 cal	o	30 kJ
1 g carboidrati digeribili	4 cal	o	17 kJ
1 g proteine	4 cal	o	17 kJ
1 g grassi	9 cal	o	38 kJ
1 g acidi organici (acido tartarico o acido malico)	3 cal	o	13 kJ
12 g glucosio	1 unità pane		

La seguente tabella è di aiuto nel calcolo della densità nelle tre unità di misura più diffuse nel mondo: Balling/Brix, Beaumé e Oechsle.

CONFRONTO FRA DIVERSI VALORI DI DENSITÀ

Densità 20°/20°	Gradi Balling / Brix	Gradi Beaumé	Gradi Oechsle	Densità 20°/20°	Gradi Balling / Brix	Gradi Beaumé	Gradi Oechsle
1,00000	0,0	0	0	1,08733	21,0	11,7	87
1,00078	0,2	0,1	1	1,08823	21,2	11,8	88
1,00155	0,4	0,2	2	1,08913	21,4	11,9	89
1,00233	0,6	0,3	2	1,09003	21,6	12,0	90
1,00311	0,8	0,45	3	1,09093	21,8	12,1	91
1,00389	1,0	0,55	4	1,09183	22,0	12,2	92
1,00779	2,0	1,1	8	1,09273	22,2	12,3	93
1,01172	3,0	1,7	12	1,09364	22,4	12,45	94
1,01567	4,0	2,2	16	1,09454	22,6	12,55	95
1,01965	5,0	2,8	20	1,09545	22,8	12,7	95
1,02366	6,0	3,3	24	1,09636	23,0	12,8	96
1,02770	7,0	3,9	28	1,09727	23,2	12,9	97
1,03176	8,0	4,4	32	1,09818	23,4	13,0	98
1,03586	9,0	5,0	36	1,09909	23,6	13,1	99
1,03998	10,0	5,6	40	1,10000	23,8	13,2	100
1,04413	11,0	6,1	44	1,10092	24,0	13,3	101
1,04831	12,0	6,7	48	1,10193	24,2	13,45	102
1,05252	13,0	7,2	53	1,10275	24,4	13,55	103
1,05667	14,0	7,8	57	1,10367	24,6	13,7	104
1,06104	15,0	8,3	61	1,10459	24,8	13,8	104
1,06534	16,0	8,9	65	1,10551	25,0	13,9	106
1,06968	17,0	9,4	70	1,10643	25,2	14,0	106
1,07142	17,4	9,7	71	1,10736	25,4	14,1	107
1,07404	18,0	10,0	74	1,10828	25,6	14,2	108
1,07580	18,4	10,2	76	1,10921	25,8	14,3	109
1,07844	19,0	10,55	78	1,11014	26,0	14,45	110
1,07932	19,2	10,65	79	1,11106	26,2	14,55	111
1,08021	19,4	10,8	80	1,11200	26,4	14,65	112
1,08110	19,6	10,9	81	1,11293	26,6	14,8	113
1,08198	19,8	11,0	82	1,11386	26,8	14,9	114
1,08287	20,0	11,1	83	1,11480	27,0	15,0	115
1,08376	20,2	11,2	84	1,11573	27,2	15,1	116
1,08465	20,4	11,35	85	1,11667	27,4	15,2	117
1,08554	20,6	11,45	86	1,11761	27,6	15,3	118
1,08644	20,8	11,55	86	1,11855	27,8	15,45	119

La seguente tabella permette la conversione dei grammi di alcool nella percentuale in volume

TAVOLATAVOLA PER IL CALCOLO DEL CONTENUTO IN ALCOOL

Grammi di alcool in un litro		Grammi di alcool in un litro									
Centinaia	Decine	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Vol.%									
	0	0	0,13	0,25	0,38	0,51	0,63	0,76	0,89	1,01	1,14
	1	1,27	1,39	1,52	1,65	1,77	1,90	2,03	2,15	2,28	2,41
	2	2,53	2,66	2,79	2,91	3,04	3,17	3,29	3,42	3,55	3,67
	3	3,80	3,93	4,05	4,18	4,31	4,43	4,56	4,69	4,81	4,94
	4	5,07	5,19	5,32	5,45	5,57	5,70	5,83	5,95	6,08	6,21
	5	6,33	6,46	6,59	6,71	6,84	6,97	7,09	7,22	7,35	7,49
	6	7,60	7,73	7,85	7,98	8,11	8,23	8,36	8,49	8,61	8,74
	7	8,87	8,99	9,12	9,25	9,37	9,50	9,63	9,75	9,88	10,01
	8	10,13	10,26	10,39	10,51	10,64	10,77	10,89	11,02	11,15	11,27
	9	11,40	11,53	11,65	11,78	11,91	12,03	12,16	12,29	12,41	12,54
1	0	12,67	12,79	12,92	13,05	13,17	13,30	13,43	13,55	13,68	13,81
1	1	13,93	14,06	14,19	14,31	14,44	14,57	14,69	14,82	14,95	15,07
1	2	15,20	15,33	15,45	15,58	15,71	15,83	15,96	16,09	16,21	16,34
1	3	16,47	16,59	16,72	16,85	16,97	17,10	17,32	17,35	17,48	17,61
1	4	17,73	17,86	17,99	18,11	18,24	18,37	18,49	18,62	18,75	18,87
1	5	19,00	19,13	19,25	19,38	19,51	19,63	19,76	19,89	20,01	20,14

VALUTAZIONE DELL'ACIDITÀ TITOLABILE

In paesi come Svizzera e Germania, l'acidità titolabile del vino è espressa come acido tartarico ed è indicata in grammi per litro. In Francia l'acidità titolabile del vino è espressa come grammi per litro di acido solforico. Per i succhi di frutta l'acidità titolabile è spesso calcolata e indicata come acido citrico o malico. Al fine di operare correttamente la conversione moltiplicate il valore di acidità titolabile per i fattori indicati nella sguente tabella.

L'acidità totale è stata titolata e calcolata come	**L'acidità totale è stata espressa come**					
	Acido tartarico	Acido malico	Acido citrico	Acido lattico	Acido solforico	Acido acetico
Acido tartarico	—	0,893	0,853	1,2	0,653	0,8
Acido malico	1,119	—	0,955	1,343	0,731	8,896
Acido citrico	1,172	1,047	—	1,406	0,766	0,938
Acido lattico	0,833	0,744	0,711	—	0,544	0,667
Acido solforico	1,531	1,367	1,306	1,837	—	1,225
Acido acetico	1,25	1,117	1,067	1,5	0,817	—