

Oenococcus oeni e la fermentazione malolattica

I batteri lattici: una storia di millenni

I batteri lattici rivestono, per gli esseri umani - e per numerosi altri esseri viventi - una enorme importanza, innanzitutto a partire dal loro ruolo quali componenti essenziali del microbiota, giungendo per esempio ad essere presenti nell'organismo umano in numero da 10 a 20 volte superiore a quello delle cellule che complessivamente costituiscono l'organismo stesso.

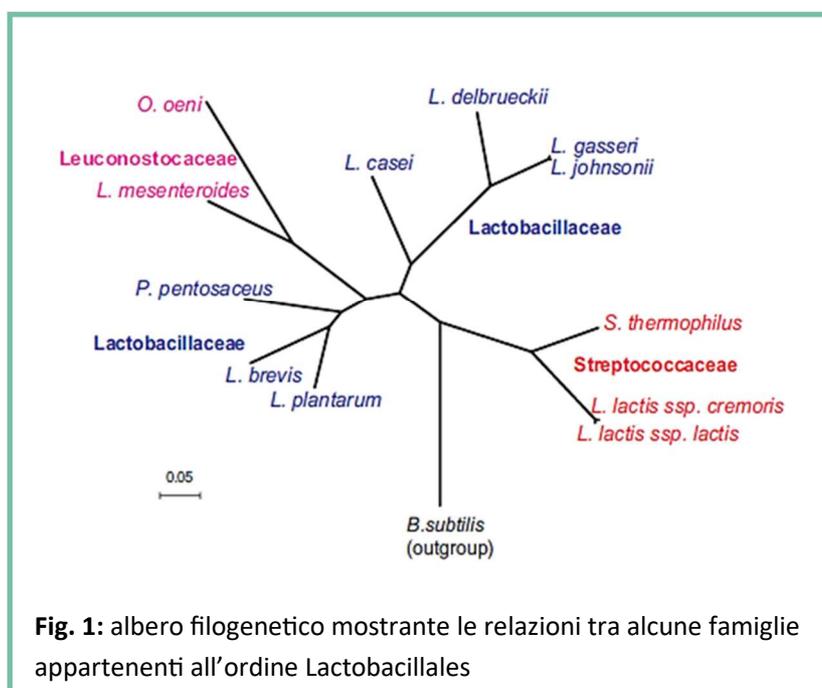
I medesimi batteri sono poi essenziali protagonisti in una svariata serie di processi e di preparazioni alimentari le cui prime tracce sono attestate fin dal Neolitico. Lo scopo comune di esse è quello di estendere la serbabilità del latte, importantissimo e diffuso alimento, estremamente ricco di nutrienti e per questo estremamente alterabile.

I batteri lattici infatti intervengono sia nelle classiche lavorazioni dei prodotti lattiero caseari (una per tutte quelle alla base dell'industria del formaggio) sia nei processi di conservazione di altre preparazioni - ad esempio quelle su matrici vegetali per l'alimentazione umana (ad es. crauti) a quella - altro esempio - dei foraggi insilati per l'alimentazione bovina. In queste situazioni i batteri lattici vengono utilizzati al fine di trasformare in maniera strategica alcuni componenti della matrice - in questo caso gli zuccheri (glucosio, lattosio) estremamente attaccabili da svariati microrganismi, in acido lattico, eliminandoli ed al contempo favorendo un abbassamento del pH e promuovendo in questa maniera la serbabilità occupando la nicchia ecologica ed inibendo la proliferazione dei microrganismi di alterazione (es. *Clostridium*).

Oenococcus oeni, una questione di stile: semplicità, parsimonia, discrezione ed efficienza

Secondo la classificazione attuale i batteri lattici sono fatti appartenere all'ordine *Lactobacillales*. In particolare il microrganismo di rilevanza enologica appartenente al citato ordine, ***Oenococcus oeni***, si distingue decisamente dalle specie a lui più prossime nell'albero filogenetico (Fig. 1) per alcune specificità che lo rendono un vero e proprio **microrganismo a parte** fra gli individui appartenenti al suo ordine:

⇒ mentre la generalità delle famiglie a lui filogeneticamente vicine si dimostrano adatte a substrati generalmente ricchi di risorse nutritive ***O. oeni*** prospera invece in situazioni particolarmente difficili, quali quelle che si ritrovano nel vino e nel sidro;



- ⇒ all'adattamento alle suddette ostiche condizioni è anche legato il peculiare metabolismo suo tipico; caratterizzato fra l'altro per una crescita lenta, una ridotta produzione di biomassa in un contesto metabolico estremamente discreto e poco evidente: il microrganismo ritrae infatti l'energia che gli occorre per le funzioni vitali grazie ad un sistema di produzione indiretta legata a scambi transmembranalmente protoni/elettroni (vedi parte sinistra di Fig. 2);
- ⇒ **O. oeni**, come abbiamo detto adattato a svilupparsi in ambienti ricchi di composti inibitori e poverissimi dal punto di vista nutrizionale, si distingue poi per possedere uno dei più piccoli genomi se paragonato a quelli degli altri suoi simili, rappresentando quindi un concentrato di efficienza ed efficacia: giusto per portare un esempio *Lactobacillus plantarum* ne possiede uno grande circa il doppio.

Alcolica e malolattica: entrambe fermentazioni

L'etimo del vocabolo proviene dal latino *fervere*, ribollire, l'evidenza macroscopica dell'attività dei microrganismi nel substrato liquido.

Louis Pasteur per primo attribuì correttamente il fenomeno a non meglio precisate entità, allora sconosciute, in seguito identificate con il progredire delle scienze biologiche e della strumentazione ottica a disposizione degli studiosi.

Oggi si considera, dal punto di vista più generale, la fermentazione come una via metabolica che alcuni esseri viventi sono in grado di utilizzare per ricavare energia in assenza di ossigeno.

E' dunque opportuno chiarire che, nonostante per questioni fondamentalmente storiche i fenomeni legati alla produzione di etanolo ed alla trasformazione di acido malico in acido lattico siano entrambi denominati **fermentazioni** i due processi sono in realtà profondamente differenti dal punto di vista biochimico, consistendo infatti il primo, la fermentazione alcolica, in una produzione diretta di energia derivante dalla sintesi di ATP e caratterizzato da rapido accrescimento e notevole produzione di biomassa in un contesto metabolico ad elevato impatto quando, per contro, l'attività dei batteri lattici presenta caratteristiche molto differenti, ricordate ad inizio pagina ed illustrate in Fig. 2, parte destra. Per concludere il parallelismo vale la pena di ricordare come, nella pratica, l'estrinsecazione macroscopica legata alla fermentazione alcolica sia evidentissima, a volte imponente, con ampia produzione di schiuma, sviluppo importantissimo di gas (anidride carbonica) presenza di biomassa residua (feccia) trasporto di solidi, se presenti, mentre la fermentazione malolattica si caratterizza per una leggera, scarsamente evidente, effervescenza ed una estremamente ridotta fecciosità residua.

L'interesse dell'utilizzo enologico dei batteri lattici selezionati

E' ora opportuno rimarcare alcuni aspetti biochimici legati all'uso in enologia dei batteri lattici selezionati e che ne giustificano in particolare l'interesse.

Una necessaria premessa

Prima di procedere oltre è però opportuno notare preliminarmente come non sia possibile utilizzare per *Oenococcus oeni* e per la sua selezione il medesimo

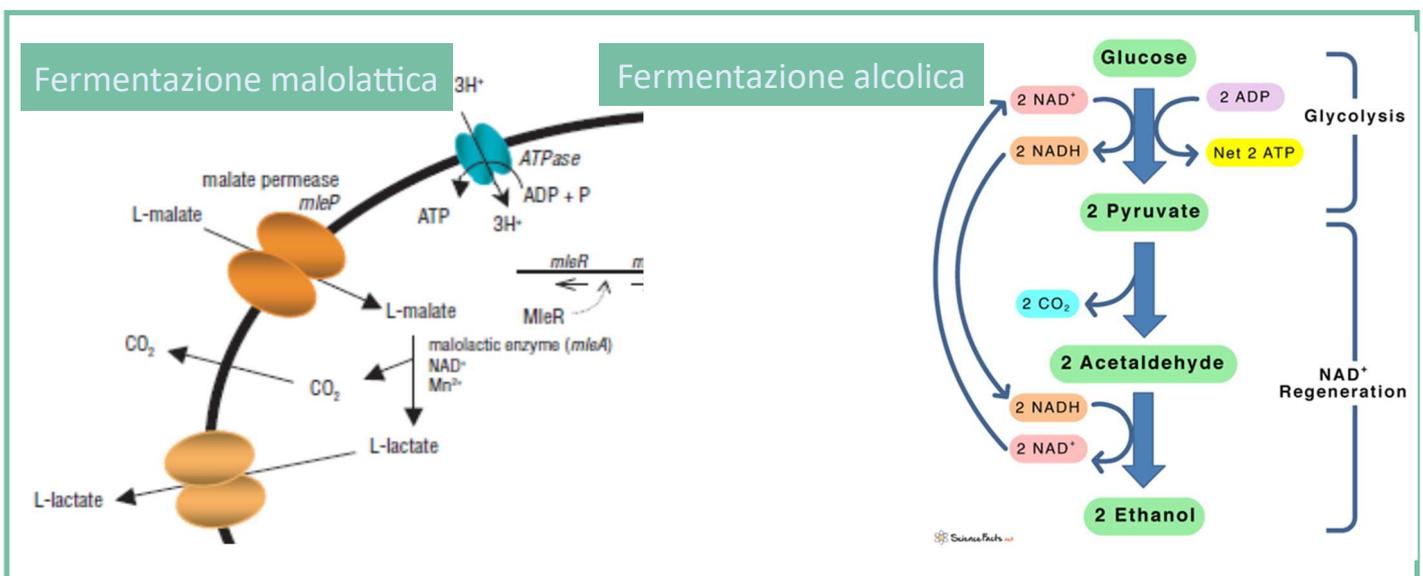


Fig. 2: Fermentazione malolattica e Fermentazione alcolica: principali differenze e specificità.

approccio di miglioramento genetico possibile per *Saccharomyces cerevisiae*.

In breve è necessario ricordare come *S. cerevisiae* sia un fungo unicellulare eucariota che si riproduce normalmente per gemmazione, le sue cellule si moltiplicano infatti producendo spontaneamente copie di loro stesse. Le cellule di *S. cerevisiae*, in condizioni vegetative, si presentano come diploidi, con un contenuto nucleare pari a 16 coppie di cromosomi.

Di fronte a particolari condizioni (tipicamente quelle fortemente ostate) le cellule di *S. cerevisiae* sono in grado di differenziare, tramite un processo meiotico, spore aploidi: ciascuna di esse, nell'ambiente, è in grado di accoppiarsi ad un'altra spora compatibile, ricostituendo il corredo cromosomico diploide in cellule in grado di riprodursi nuovamente per gemmazione. Sono stati individuati, nel corso di studi effettuati durante gli anni, taluni lieviti ibridi appartenenti al genere *Saccharomyces* comparsi per via verosimilmente naturale nel corso del tempo, ma è stato sfruttando la caratteristica appena descritta che si è addivenuti ad operare un classico miglioramento genetico tramite incrocio guidato, dal quale derivano la totalità dei ceppi definiti *ibridi selezionati* presenti sul mercato dei lieviti enologici.

In quanto *Oenococcus oeni* non possiede al contrario capacità di riproduzione sessuata, non incorrendo in fenomeni meiotici, non è possibile operare alcun miglioramento genetico salvo non intervenire con metodologie di manipolazione non classiche.

Da cui deriva che, nel caso dei batteri malolattici, l'ago nel pagliaio è costituito non da un QTL, ma da un **ceppo performante** individuato mediante la più classica selezione massale, da poter poi essere riprodotto ed utilizzato in ambito enologico.

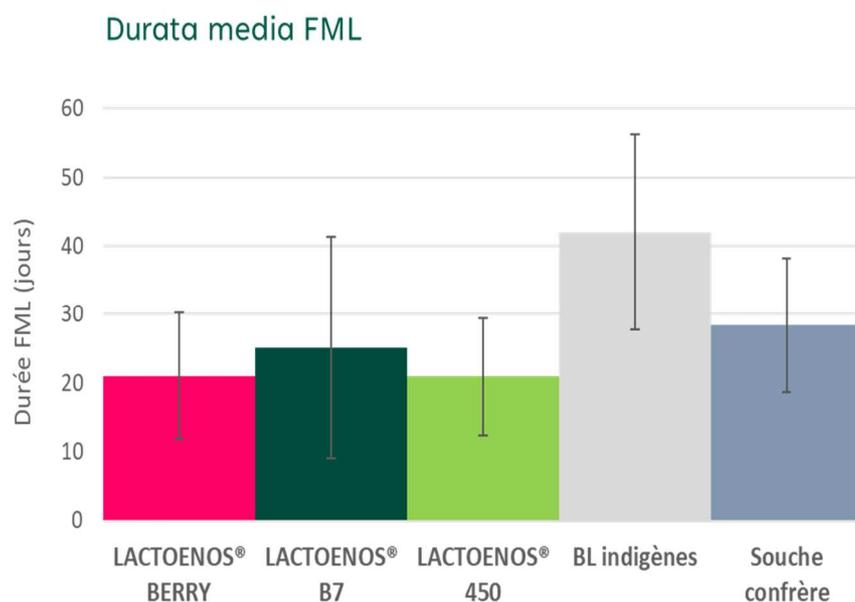


Fig. 3 - Fermentazione malolattica: differente durata media fra FML spontanea ed indotta per inoculo sequenziale.

L'attività di ricerca LAFFORT

Da parecchi anni anche Laffort si è dedicata alla ricerca ed alla selezione di ceppi di *Oenococcus oeni* candidati all'utilizzo enologico. E' così che sono stati via via negli anni individuati e proposti, fra gli altri, Lactoenos 450, Lactoenos B7 ed il recentissimo Lactoenos Berry. Quest'ultimo, in particolare, è stato individuato sulla scorta di un'estesa attività di selezione massale condotta su una collezione di più di 1.200 ceppi raccolti in 8 regioni viticole, su 19 differenti vitigni nel corso di 3 differenti millesimi. A seguito di detta ricerca sono stati isolati più di 150 ceppi con profili genetici totalmente sconosciuti, *in toto* differenti quindi da altri già presenti sul mercato. In questo ambito è stato così possibile isolare progressivamente 8 ceppi di interesse, fra i quali 4 ceppi definibili "ad elevato potenziale enologico" ed infine uno definito "ad elevatissimo potenziale" sul quale si è proceduto a condurre i test più completi, relativi a:

- verifica della possibilità di produzione sotto forma liofilizzata in scala di laboratorio;
- verifica della possibilità di produzione sotto forma liofilizzata in scala industriale;
- efficacia e pulizia della cinetica malolattica a seguito di coinoculo;
- caratterizzazione del metabolismo dell'acido citrico;
- identificazione dell'impatto sensoriale specifico del ceppo *Analisi sensoriale descrittiva; *Analisi sensoriale triangolare.

Poste queste premesse vediamo ora nel dettaglio l'importanza dei tratti rilevati nel nuovo Berry - i criteri cioè di selezione - e la loro specifica importanza.

Possibilità di produzione sotto forma liofilizzata

Fondamentale per la possibilità di una efficace predisposizione e commercializzazione del preparato.

La rapidità del decorso fermentativo

Inoculando la massa di vino utilizzando un ceppo di batteri malolattici selezionati uno degli effetti attesi è un decorso della FML molto più rapido e deciso rispetto a quello ottenibile con qualsiasi popolazione indigena. Ciò consente di evitare le molteplici alterazioni legate all'azione negativa di microrganismi quali:

- comparsa di sentori anomali correlati a specifiche molecole prodotte;

- aumento della presenza di popolazioni indesiderate (fra le quali anche *Brettanomyces*) a causa della persistente situazione di “vuoto microbiologico”
- situazioni ossidative legate alle condizioni di malolattica stentata e languente.

Efficacia nella FML in situazioni a ridotta presenza di acido malico

Normalmente le malolattiche condotte da batteri indigeni tendono a bloccarsi attorno ai 2 g/L, con un inoculo corretto è possibile ottenere decorsi malolattici ottimali anche al di sotto dei livelli citati.

Efficacia e pulizia della cinetica malolattica a seguito di coinoculo

Aspetto sempre più importante con l'adozione vieppiù estesa della pratica, essa è motivata dai notevoli vantaggi di rapidità ed efficacia nell'utilizzo: consente infatti ai batteri di iniziare il loro lavoro, su mosto, in condizioni ambientali notevolmente più clementi per svariati fattori, non ultimo il grado alcolico decisamente meno elevato. FA ed FML tendono poi, in situazione di coinoculo, a concludersi pressoché contemporaneamente. Essenziale ricordare l'importanza di una stretta anaerobiosi nelle prime ore dall'inoculo: in un conveniente range di pH il batterio non tende ad attaccare gli zuccheri in maniera inopportuna.

Correttezza e moderazione del metabolismo dell'acido citrico

Una delle caratteristiche massimamente critiche da considerare nella selezione dei batteri lattici è la modalità del ceppo individuato nella cinetica dell'utilizzo dell'acido citrico. Detto metabolismo, che si rivela normalmente essenziale per una ottimale sintesi degli steroli assicurando al microrganismo una ottimale vigoria soprattutto nella fase iniziale dell'attività fermentativa,



Acide citrique* fin FML

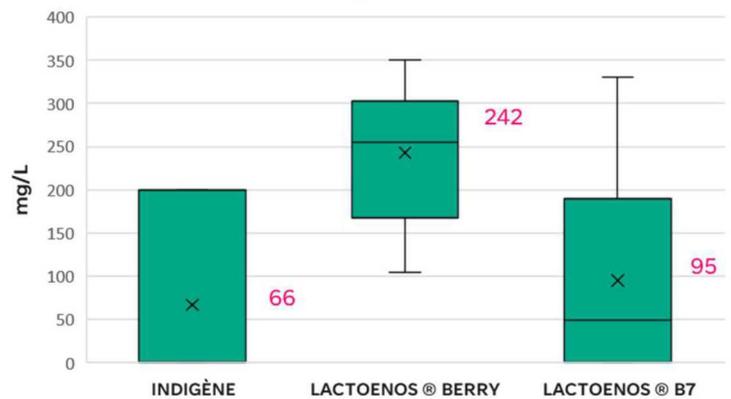


Fig. 4: Il metabolismo dell'Acido citrico, importanza e particolarità.

può divenire negativo se porta, con il suo protrarsi, alla formazione di diacetile, con pesanti espressioni di note burroso/rancide.

Il ceppo LACTOENOS® BERRY Direct presenta, in particolare, caratteristiche estremamente interessanti al riguardo: un metabolismo dell'acido citrico molto lento, che lo rende capace di salvaguardare a tutto tondo freschezza e frutto del vino. Questo aspetto assume un rilievo ancora maggiore se lo si collega alla recentemente dimostrata capacità di *Oenococcus oeni* nel produrre molecole aromatiche (esteri etilici di acidi grassi sostituiti, esteri etilici di acidi idrossicarbossilici) in grado di esercitare un positivo impatto sul profilo organolettico del vino, ancor più notevole ed evidente proprio in quanto collegato al plus di **freschezza e fruttato** espresso da LACTOENOS® BERRY grazie ad un metabolismo dell'acido citrico particolarmente favorevole e moderato.

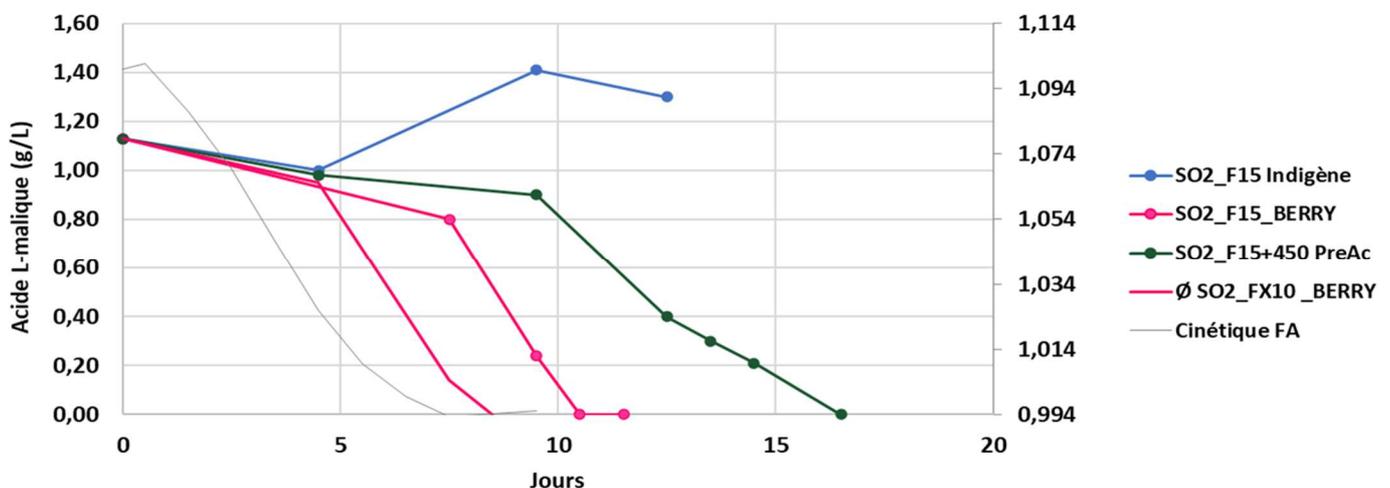


Fig. 5 - Cinetiche di FML in coinoculo precoce, confronto tra 4 differenti casi; la curva grigia rappresenta il decorso della fermentazione alcolica.